

SKRIPSI

ENDANG MARSUSIANTI

**PROFIL PITA DNA HYALURONIDASE TESTIS MENCIT
SETELAH PEMBERIAN FASE AIR
Justicia gendarussa Burm.f DENGAN TEKNIK PCR**



FF 35/07
Mar
?

**FAKULTAS FARMASI UNIVERSITAS AIRLANGGA
BAGIAN ILMU BAHAN ALAM
SURABAYA
2006**



Lembar Pengesahan

**PROFIL PITA DNA HYALURONIDASE TESTIS MENCIT
SETELAH PEMBERIAN FASE AIR
Justicia gendarussa Burm.f DENGAN TEKNIK PCR**

SKRIPSI

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

2006


OLEH :

ENDANG MARSUSIANTI

NIM : 050212581

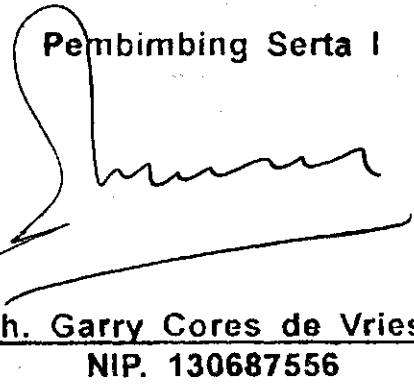
Skripsi ini telah disetujui
Tanggal 28 September 2006 oleh :

Pembimbing Utama



Dr. Bambang Prajogo E.W., MS
NIP. 131470993

Pembimbing Serta I



Dr. drh. Garry Cores de Vries, MSc
NIP. 130687556

KATA PENGANTAR

Segala puji bagi Allah SWT, karena hanya atas rahmat dan karuniaNya sehingga skripsi “Profil DNA Hyaluronidase Testis Mencit Setelah Pemberian Fase Air *Justicia gendarussa* Burm.f Dengan Teknik PCR” ini dapat diselesaikan dengan sebaik-baiknya.

Penyusun mengucapkan terima kasih dan penghormatan yang setinggi-tingginya kepada semua pihak yang telah mendukung terselesainya skripsi ini, yaitu :

1. Dr. Bambang Prajogo E.W., MS selaku pembimbing utama dan penyanggah dana project penelitian *Justicia gendarussa* Burm.f yang dengan penuh kesabaran membimbing, memotivasi dan memberi dorongan baik moril maupun materiil demi terselesainya skripsi ini.
2. Dr. drh Garry Cores de Vries., MSc selaku pembimbing serta yang dengan penuh kesabaran, membimbing, memberi dorongan dan masukan sehingga skripsi ini dapat diselesaikan.
3. Ketua Laboratorium Dasar Bersama Universitas Airlangga, Dr.rer.nat. Mulja Hadi Santosa, Apt sekaligus sebagai dosen penguji atas saran dan masukan-masukan yang diberikan untuk penyelesaian skripsi ini.
4. Dekan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga Surabaya, Prof.Dr. H.Noor Cholies Zaini atas kesempatan yang diberikan kepada saya untuk mengikuti pendidikan program sarjana.
5. Dr. drh Aulani'am DESS, atas segala fasilitas yang diberikan selama penyusunan di Malang, bimbingan, motivasi dan wejangan sekaligus sebagai dosen penguji atas masukan yang diberikan yang sangat berguna untuk penyelesaian skripsi ini.
6. Semua dosen serta guru saya, yang telah mendidik dan mengajarkan ilmu pengetahuan hingga saya dapat menyelesaikan pendidikan sarjana.
7. Ayah (Selan) dan Ibu (Tandur) tercinta atas segala curahan kasih sayang, dukungan dorongan semangat dan pengorbanan yang diberikan kepada ananda selama ini.

8. Kangmas (Sumarsono), Mbak (Marsusiani) dan Adik (Indah Marsusianing) atas kasih sayang, senyuman dan persaudaraan yang senantiasa menjadi penyemangat tersendiri bagiku. Semoga kita bisa menjadi anak-anak yang sholeh dan sholehah. Amiin
9. Sahabat-sahabatku, Nurul, Robitoh, Reny yang selalu menjadi tempat curhatku, atas dukungan dan semangat yang kalian berikan. Semoga persahabatan kita abadi
10. Teman-Teman satu team "*Justicia gendarussa* Burm.f" Nia, Farida, Marcha, Nina, Alivia, Wuri, Irma dan Andik yang saling mendukung dan menyemangati. Maafkan atas keusilanku selama kita bersama.
11. Teman-teman dari Universitas Brawijaya, Mbak Ika RL, Mas Cecep, Mbak Devi, Tutut, Mbak Puji dan teman-teman dari team ulat sutra Fapet atas semangat, pengertian dan persahabatan yang kalian berikan.
12. Teman-teman di pondok putri 42, Yanti Kajool, Ana, Prima dkk, atas semangat, persahabatan, motivasi dan waktu yang kalian luangkan untuk mendengarkan kesahku.
13. Semua pihak yang telah membantu dalam penyelesaian skripsi ini, terutama staf laboran Ilmu Bahan Alam Fakultas Farmasi Universitas Airlangga atas kesabaran dan bantuannya selama ini, dan pihak-pihak yang tidak bisa penyusun sebutkan satu persatu, semoga Allah SWT membalas dengan sebaik-baiknya balasan.

Akhirnya semoga skripsi ini bisa bermanfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan pada umumnya, dan ilmu kefarmasian pada khususnya.

Surabaya, September 2006

Penyusun

RINGKASAN
PROFIL DNA HYALURONIDASE TESTIS MENCIT SETELAH
PEMBERIAN FASE AIR *Justicia gendarussa* Burm.f DENGAN TEKNIK
PCR

Endang Marsusianti

PCR banyak digunakan untuk amplifikasi gen (DNA) pada berbagai penelitian khususnya biologi molekuler karena PCR lebih sensitif, spesifik, efektif, sederhana, fleksibel dan hanya memerlukan waktu yang relatif singkat (3-4 jam). Selain itu PCR juga bisa digunakan untuk mendeteksi ada tidaknya perubahan pada gen. Pada penelitian ini PCR digunakan untuk mengetahui ada tidaknya perubahan pada profil gen hyaluronidase yang terpapar oleh fase air *Justicia gendarussa* Burm.f dengan melihat ada tidaknya amplifikasi gen hyaluronidase pada testis mencit setelah dilakukan proses PCR.

Fase air *Justicia gendarussa* Burm.f yang digunakan dalam penelitian ini yaitu $1/12$ LD₅₀ (26,06mg/20g BB) dan $1/17$ LD₅₀ (18,39mg/20g BB), selain itu digunakan juga CMC-Na 0,5% sebagai kontrol negatif dan hesperidin 0,2% sebagai kontrol positif.

PCR dilakukan dengan suhu *annealing* 57°C. *Primer* yang digunakan pada lokus AB085677 adalah; *Primer Forward* 5'- GCT TAG CTA TCA TTG ACT GG - 3' dan *Primer Reverse* 5'- GCA CAT TTT GGC TGC TAG GG-3'. Produk hasil PCR dielektroforesis dengan 2% agarose untuk mengetahui keberhasilan reaksi. Hasil amplifikasi gen hyaluronidase dengan metode PCR memperlihatkan bahwa hanya kontrol negatif yang mengalami amplifikasi sedangkan kontrol positif dan perlakuan tidak mengalami amplifikasi. Hal ini mengindikasikan bahwa terjadi perubahan pada gen hyaluronidase dari kontrol positif dan perlakuan.

Plot terhadap persamaan regresi linear $Y = -2,0792x + 3,7153$ dengan $r = -0,9804$ menunjukkan kontrol negatif yang teramplifikasi mempunyai panjang 802 bp. Munculnya band DNA pada kontrol negatif menunjukkan bahwa *primer* yang didesain sesuai untuk gen hyaluronidase.

ABSTRACT

DNA HYALURONIDASE PROFILE FROM MICE TESTIS AFTER GIVEN WATER FRACTION *Justicia gendarussa* Burm.f USED PCR METHOD

The purpose of this study is to observe and identify whether any changes of the PCR amplified Hyaluronidase gene because of the influence of *Justicia gendarussa* Burm.f which was given to mice testis (*Mus musculus* L.) in form of water phase of *Justicia gendarussa* Burm.f. The concentration of water phase of *Justicia gendarussa* that used in this research were $1/12$ LD₅₀ (26,06mg/20g BW) and $1/17$ LD₅₀ (18,39mg/20g BW), CMC-Na 0,5% was used as negative control and hesperidin 0,2% was used as positive control. Annealing temperature used in this PCR process was 57°C. Primer that use in AB085677 locus were *Primer Forward* 5'- GCT TAG CTA TCA TTG ACT GG - 3' and *Primer Reverse* 5'- GCA CAT TTT GGC TGC TAG GG-3'. The result of amplified Hyaluronidase gene showed that only negative control have been amplified, in the other site positive control and treatment have not been amplified. This indicated that there was a changing in Hyaluronidase gene in positive control and treatment.

Linear regression $Y = -2,0792x + 3,7153$ with $r = -0,9804$ showed that the measurement of the negative control was 802 bp. DNA band at negative control showed that primer located in Hyaluronidase gene.

Keyword : PCR, DNA, Hyaluronidase Profile, *Justicia gendarussa* Burm.f

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	
LEMBAR PENGESAHAN	ii
KATA PENGANTAR	iii
RINGKASAN	v
ABSTRACT	vi
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG	xii
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	5
2.1.3 Morfologi tanaman.....	5
2.1.4 Kandungan tanaman.....	6
2.1.5 Kegunaan tanaman	7
2.2 Tinjauan Tentang Ekstraksi.....	7
2.2.1 Ekstraksi dengan menggunakan pelarut	8
2.2.2 Destilasi uap.....	9
2.3 Tinjauan Tentang Sistem Reproduksi	9
2.3.1 Anatomi dan fisiologi testis.....	10
2.3.2 Spermatogenesis	10
2.3.3 Hyaluronidase	10

2.3.4 Tinjauan tentang mencit jantan	11
2.4 Tinjauan Tentang DNA.....	12
2.4.1 Isolasi dan purifikasi DNA	14
2.4.2 Menentukan ukuran molekul DNA	15
2.4.3 Mendeteksi tingkat kemurnian DNA dengan Spektrofotometri UV	15
2.4.4 Mutasi	15
2.5 Tinjauan Tentang Elektroforoforesis Gel Agarose	17
2.6 Tinjauan Tentang PCR	18
2.6.1 DNA target	21
2.6.2 Primer.....	21
2.6.3 Polimerase DNA yang termotabil	22
2.6.4 Termal cyclers	22
BAB III KERANGKA KONSEPTUAL	23
3.1 Kerangka Konseptual	24
BAB IV MATERI DAN METODE PENELITIAN.....	25
4.1 Rancangan Penelitian.....	25
4.2 Bahan Penelitian	25
4.2.1 Bahan untuk pembuatan ekstrak	25
4.2.2 Bahan penelitian.....	25
4.2.3 Hewan penelitian	26
4.2.4 Pengambilan testis	26
4.3 Alat-Alat Penelitian	26
4.4 Metode Penelitian	27
4.4.1 Pembuatan ekstrak	27
4.4.2 Pemberian bahan uji.....	27
4.4.3 Proses isolasi total DNA testis mencit.....	28
4.4.4 Pengukuran konsentrasi dan kemurnian DNA.....	28
4.4.5 Prosedur PCR	29
4.4.6 Analisis data.....	31

BAB V HASIL PENELITIAN	34
5.1 Hasil Ekstraksi Fase Air Daun <i>Justicia gendarussa</i> Burm. F.....	34
5.2 Isolasi DNA Total	34
5.3 Hasil PCR	36
BAB VI PEMBAHASAN	38
BAB VII KESIMPULAN DAN SARAN	42
7.1 Kesimpulan	42
7.2 Saran	42
DAFTAR PUSTAKA	43
Lampiran	47



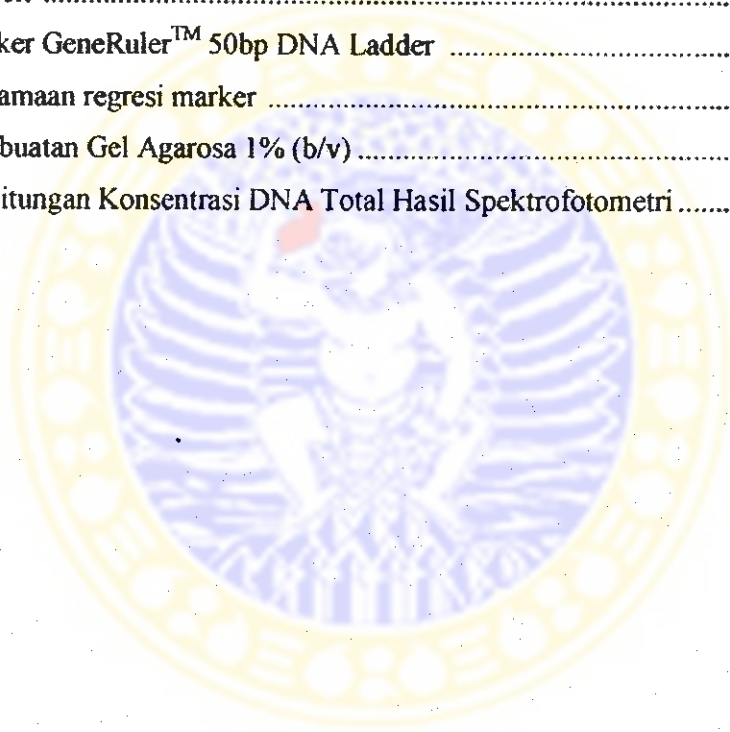
DAFTAR GAMBAR

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 Struktur alkaloid <i>Justicia gendarussa</i> Burm.f	7
2.5 Organ reproduksi mencit jantan	12
2.6 Struktur penyusun DNA	13
2.7 Struktur DNA dan DNA double helix	14
2.8 Siklus amplifikasi PCR	19
2.9 Amplifikasi eksponensial PCR	20
3.1 Bagan alur kerangka konseptual	24
4.1 Perkiraan hasil amplifikasi gen Hyaluronidase	31
4.2 Bagan pembuatan serbuk kering fraksi air <i>Justicia gendarussa</i> Burm.f	32
4.3 Bagan kerangka operasional PCR	33
5.1 Isolat DNA total yang tampak pada gel agarose	35
5.2. Produk PCR yang tampak pada gel elektroforesis	36

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran

1	Data Penimbangan	47
2	Komposisi Larutan dan Buffer-buffer	49
3	Prosedur Isolasi DNA	50
4	Formula reaksi dan Siklus Reaksi RT-PCR	51
5	Sekuen Nukleotida Gen Hyaluronidase <i>Mus musculus</i>	52
6	Sekuensing Fragment DNA Gen Hyaluronidase Testis Mencit	55
7	Marker GeneRuler™ 50bp DNA Ladder	56
8	Persamaan regresi marker	57
9	Pembuatan Gel Agarosa 1% (b/v)	58
10.	Perhitungan Konsentrasi DNA Total Hasil Spektrofotometri	59



DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

DNA	: Deoxyribonucleic Acid
ATP	: Adenocin Tri Phosphat
A	: Adenin
C	: Cytosin
T	: Timin
G	: Guanin
EtBr	: Ethidium Bromide
F	: Fahrenheit
UV	: Ultra Violet
TE	: Tris-EDTA
EDTA	: Ethylene Diamine tetraacetic Acid
TBE	: Tris Boric acid - EDTA
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

Pria Indonesia tahun ini menjadi fokus baru program KB. Kontrasepsi pria mulai mempunyai harapan perkembangan cukup luas di masa-masa mendatang. Di Indonesia sekitar 27 juta akseptor KB, 90 persen diantaranya adalah perempuan tentu sangat disayangkan, ketika melihat angka partisipasi pria yang jumlahnya menjadi sangat minim. Berdasarkan SDKI (Survey Kesehatan dan Demografi Indonesia) pada tahun 1997 hanya 1,1 persen peserta KB pria secara nasional. Selanjutnya pada 2003, pencapaiannya hanya naik sedikit yakni 1,3 persen (www.bkkbn.go.id).

Berbeda dengan kontrasepsi pada wanita yang banyak jenisnya seperti diafragma, IUD, sumbat leher rahim (*cervical caps*), *Morning after pil*, norplant, depoprovera, metode-metode alami, sterilisasi dan banyak lainnya (Lestari, 2005). Di Indonesia cara ber-KB pria biasanya dilakukan dengan cara pantang berkala, senggama terputus, kondom dan vasektomi (www.bkkbn.go.id). Sehingga perlu dikembangkan kontrasepsi-kontrasepsi baru bagi pria agar banyak pilihan dalam penggunaan kontrasepsi baginya. Oleh karena itu pria dapat ikut lebih bertanggung jawab dalam pengaturan keturunan dalam keluarga (Lestari, 2005).

Indonesia sebagai negara yang kaya akan tanaman obat memiliki tanaman yang dapat berkasiat sebagai kontrasepsi pria. Menurut hasil laporan Moeso S. dan Agus P. dari perjalanan ke Sentani 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 akar dan daun dua kali sebulan.

Berdasarkan penelitian mengenai *Justicia gendarussa* Burm.f yang mengarah pada efek hambatan dari gendarussa pada fungsi spermatozoa dalam fertilisasi sel telur, yaitu adanya kandungan senyawa aktif pada gendarussa dari senyawa golongan flavonoid (diantaranya disebut sebagai gendarusin A dan B)

akan mencegah penetrasi spermatozoa mencit pada proses fertilisasi in vitro (IVF) serta menunjukkan adanya penurunan aktivitas hyaluronidase (Prajogo, 2002).

Kontrasepsi yang ideal sampai sekarang belum ada. Kontrasepsi ideal harus memenuhi syarat sebagai berikut: dapat dipercaya, tidak menimbulkan efek yang mengganggu kesehatan, daya kerjanya dapat diatur menurut kebutuhan, tidak menimbulkan gangguan sewaktu melakukan coitus, tidak memerlukan motivasi terus menerus, mudah pelaksanaannya, murah harganya sehingga dapat dijangkau oleh semua lapisan masyarakat dan dapat diterima penggunaannya oleh pasangan yang bersangkutan (Wiknjosastro, 1999)

Kontrasepsi tidak menimbulkan efek yang mengganggu kesehatan, dengan kata lain kontrasepsi yang digunakan aman. Kontrasepsi yang aman adalah yang bukan mutagen. Mutagenesis dapat dibuktikan dengan cara biologi molekuler yang terkait dengan gen. Hal tersebut disebabkan karena gen merupakan rangkaian molekul-molekul DNA yang terdapat dalam kromosom. Sehingga Untuk mengetahui keamanannya perlu dilakukan analisis apakah terjadi perubahan pada rangkaian DNA testis mencit setelah pemberian fraksi air tanaman *Justicia gendarussa* Burm.f. Oleh karena itu diperlukan adanya pembuktian dengan cara biologi molekuler yang terkait dengan gen. Salah satu langkah awal untuk mendeteksi ada tidaknya mutasi gen Hyaluronidase yang terdapat pada DNA mencit tersebut dilakukan dengan melihat profil hyaluronidase setelah diPCR.

PCR merupakan suatu reaksi in vitro untuk menggandakan jumlah molekul DNA pada target tertentu dengan cara mensintesis molekul DNA baru yang berkomplemen dengan molekul DNA target (Muladno, 2002). Untuk menghitung pasang basa maka profil DNA sampel pada gel agarosa dilihat dibawah sinar UV kemudian dikonversikan antara harga Rf sampel ke dalam persamaan regresi Rf Vs log Jumlah pasang basa dari DNA marker (Robyt, 1987).

1.2 Rumusan Masalah

Dari uraian latar belakang di atas maka permasalahan yang timbul: Apakah ada perbedaan profil DNA hasil PCR dari hyaluronidase pada testis mencit setelah pemberian fase air *Justicia gendarussa* Burm.f?

1.3 Tujuan Penelitian

Mengetahui profil fragmen DNA Hyaluronidase mencit setelah pemberian fase air daun *Justicia gendarussa* Burm.f dengan teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

1.4 Manfaat Penelitian

Mendukung penelitian dan pengembangan tanaman obat Indonesia dibidang antifertilitas, khususnya bidang antifertilitas pria, yang masih sedikit dilakukan. Profil dari DNA dari testis mencit setelah pemberian fase air daun gendarussa diharapkan dapat digunakan sebagai data pendukung dalam pengembangan tanaman gendarusa (*J. Gendarussa* Burm.f.) sebagai obat fitofarmaka dan hasil penelitian ini dapat digunakan untuk melengkapi acuan penelitian sejenis.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Tentang *Justicia sp*

Kata *Justicia* diambil dari nama penulis dan ahli perkebunan Skotlandia yaitu James Justice, Marga /genus ini meliputi 250-300 spesies yang tersebar secara luas didaerah-daerah yang beriklim panas. Marga ini mempunyai ciri-ciri yang hamir sama dengan hampir 30 marga lain dalam famili *achantaceae* yang terdiri dari 173 marga. Diantara beberapa jenis dari marga *justicia* selain *Justicia gendarussa* Burm.f adalah *J. Procumbens*, *J. Leptostachya*, *J. Magnifica*, *J. Carnea*, *J. Pohlana*, *J. Velutina*, *J. Mohintlii*, *J. Coccinea*, *J. Ghiesbreghtiana*, *J. Lindenii* (Bailey, 1963; Tjitrosoepomo, 1991)

2.1.1 Klasifikasi *Justicia gendarussa* Burm.f.

Divisi	: Spermatophyta
Anak divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledonae
Anak kelas	: Sympetalae
Bangsa	: Schopulariales
Suku	: Acanthaceae
Marga	: <i>Justicia</i>
Jenis	: <i>Justicia gendarussa</i> Burm.f.
Sinonim	: <i>Gendarussa vulgaris</i> Nees <i>Justicia dahona</i> Buch <i>Justicia nigricans</i> Lair <i>Justicia salicina</i> Vahl

(Van Steenis, 1978)

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)

(Anonim, 1983)



Gambar 2.1 Tanaman *Justicia gendarussa* Burm.f (www.pdpersi.co.id)

2.1.3 Morfologi tumbuhan

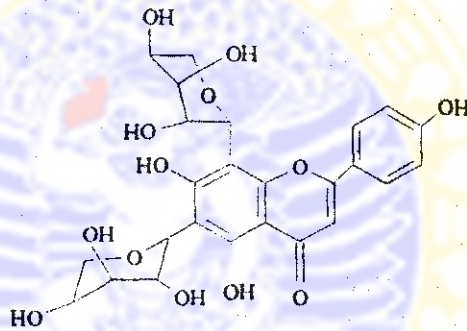
Setengah perdu tegak, sering bercabang banyak, 0,7-1,8 m tingginya. Batang segiempat tumpul atau cukup bulat, yang muda ungu, yang tua coklat muda. Tangkai daun 5-8 mm, helaian daun bentuk lanset, beringgit lebar dan tidak dalam, seperti kulit tipis, 6-20 kali 1,5-3,5 cm.

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.

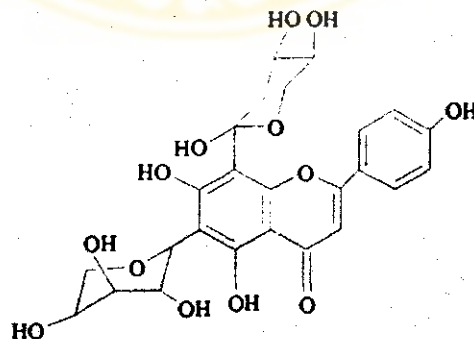
Pinggiran mahkota berbibir dua; bibir bawah bentuk baji hingga bulat telur terbalik, dengan 3 taju membalut pendek, putih, pada pangkal ungu, berbintik dan dengan lipatan miring; bibir atas segitiga, runcing, putih, berbintik ungu. Tangkai putik gundul, 6-10 mm. Buah bentuk gada, gundul (Van Steenis, 1978).

2.1.4 Kandungan tanaman

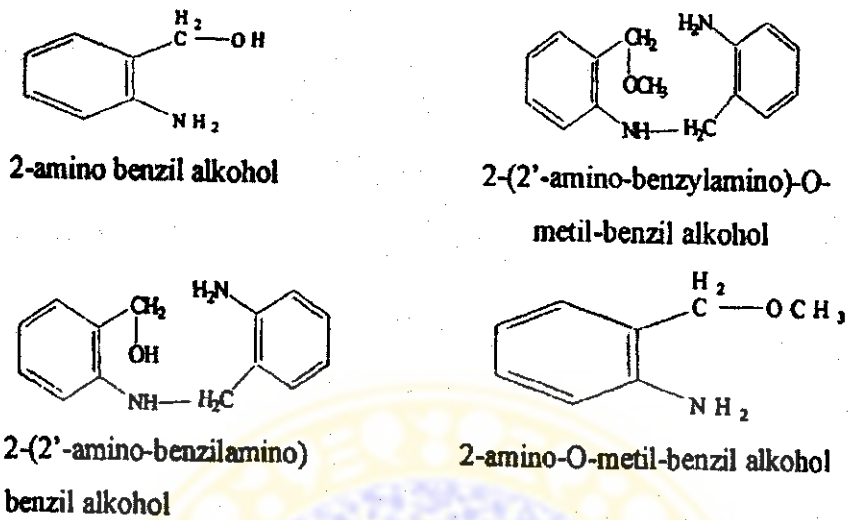
Tanaman gandarusa mengandung zat kimia kalium, flavonoid (6,8-diarabinosilapigenin dan 6-arabinosil-8-silosilapigenin), (prajogo, 2002); steroid, triterpen, tannin 0,4% (Material VI, 1996).



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)



Gambar 2.4 Struktur alkaloid *Justicia gendarussa* Burm.f. (Chakravarty, *et al*; 1982)

2.1.5 Kegunaan tanaman

Daun gendarusa digunakan dalam beberapa ramuan obat tradisional, pada umumnya digunakan sebagai obat penahan nyeri. Daun-daun ditumbuk bersama cuka dan merica digunakan untuk mengobati sakit kepala. Daun gendarusa ditumbuk halus bersama dengan kapur sirih dan sedikit air digunakan sebagai obat sakit pegal linu (Anonim, 1983)

Daun gendarusa juga digunakan sebagai infus dengan 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 gendarusa diminum oleh para suami dua kali dalam satu bulan sebagai obat kontrasepsi pria (Moeso dan Agus, 1985).

2.1. 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 (penetasan 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 40-50°C.

2.2.1.2.4 Infus

Adalah ekstraksi dengan pelarut air pada temperatur penangas air (bejana infus tercelup dalam penangas air mendidih, temperatur terukur 96-98°C) selama waktu tertentu (15-20 menit).

2.2.1.2.5 Dekok

Adalah infus pada waktu yang lebih lama (30°C) 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 Sistem Reproduksi

Produksi sperma atau spermatogenesis terjadi pada tubulus seminiferus, sel-sel leydig mensekresi testosteron. Pada bagian posterior tiap-tiap testis, terdapat duktus melingkar yang disebut epididimis, bagian kepalanya berhubung dengan duktus seminiferus dari testis dan bagian ekornya terus melanjut ke vas deferens. Vas deferens adalah duktus ekskretorius testis yang membentang hingga ke duktus vesikula seminalis kemudian bergabung dengan uretra yang merupakan saluran keluar bersama baik untuk semen maupun kemih (Price, 1995).

2.3.1 Anatomi dan fisiologi testis

Testis terbentuk dari lengkungan-lengkungan tubulus seminiferus yang bergelung yang dindingnya merupakan tempat pembentukan spermatozoa dari sel germinativum primitif (spermatogenesis) (Nalbandov, 1990). Testis bagian dalam terbagi atas lobulus yang terdiri dari tubulus seminiferus, sel-sel sertoli dan sel-sel leydig (Price, 1995).

Testis mempunyai fungsi yaitu menghasilkan hormon seks jantan yang disebut androgen dan menghasilkan gamet jantan yang disebut sperma. Pada semua mamalia, kecuali yang hidup di laut dan pakidermis (binatang berkulit tebal), testis mengalami penurunan ke arah skrotum. Fungsi utama skrotum adalah untuk memberikan testis suatu lingkungan yang memiliki 1-8⁰F lebih dingin dibanding temperatur rongga tubuh. (Nalbandov, 1990).

2.3.2 Spermatogenesis

Spermatogonia, sel-sel germinativum primitif yang terletak di samping lamina basalis tubulus seminiferus, berkembang menjadi spermatosid primer. Spermatosid primer mengalami pembelahan meiotik, sehingga jumlah kromosomnya berkurang. Dalam proses dua tahap ini, sel-sel tersebut membelah menjadi spermatosid sekunder lalu menjadi spermatid, yang mengandung jumlah kromosom haploid. Spermatid berkembang menjadi spermatozoa (sperma). Sewaktu sebuah spermatogonium membelah dan menjadi matang, turunan-turunannya tetap terikat oleh jembatan sitoplasma sampai stadium spermatid lanjut (Ganong, 2003).

2.3.3 Hyaluronidase

Istilah hyaluronidase diperkenalkan pertama kali pada tahun 1940 sebagai enzim yang mendegradasi hyaluronan atau asam hyaluronat. Hyaluronidase ini sering disebut juga sebagai "spreading factor" oleh banyak penulis. Hyaluronan banyak tersebar pada ruang ekstra selular dari hewan tingkat tinggi dan berperan secara struktural pada kartilago dan jaringan yang lain.

Hyaluronidase terbagi atas 3 golongan utama berdasarkan mekanisme kerjanya pada hyaluronan, yaitu:

1. Hyaluronoglukosaminidase (hyaluronat 4-glukanohidrolase)

Hyaluronidase jenis ini secara acak menghidrolisis ikatan 1,4 diantara N-asetil β -D-glukosamin dan residu D-glukoronat pada hyaluronan. Berdasarkan sumbernya enzim ini terbagi menjadi tiga:

a. Hyaluronidase testikular/testis

Enzim yang didapatkan pada jaringan testis sebagian besar mamalia dan terletak dalam kepala akrosom spermatozoa. Hyaluronidase ini mendegradasi hyaluronan, khondroitin, khondroitin 4 dan 6-sulfat hingga oligo sakarida, terutama tetrasakarida. Juga terjadi degradasi parsial pada dermatan sulfat.

b. Hyaluronidase jaringan atau lisosom

Hyaluronidase yang ditemukan pada berbagai jaringan yang lain selain testis, juga terdapat pada fraksi lisosom dari jaringan (banyak terdapat dihati) dan serum manusia.

c. Hyaluronidase racun seperti pada ular, kadal, kalajengking, laba-laba, semut, tawon dan lebah.

2. Hyaluronoglukoronidase (hyaluronat 3-glukanohidrolase)

Enzim ini menghidrolisis ikatan 1,3 diantara β -glukoronat dan residu N-asetil D-glukosamin pada hyaluronan. Enzim ini didapatkan pada lintah (*Hirudo medicinalis* dan *Sanguisoga granulosa*) dan *Euphausia superba*.

3. Hyaluronat Lyase

Enzim ini biasanya berasal dari bakteri seperti bakteri-bakteri pneumokokus, stafilokokus, streptokokus dan klostridia. Enzim ini mendegradasi hyaluronan menjadi disakarida (Lestari, 2005).

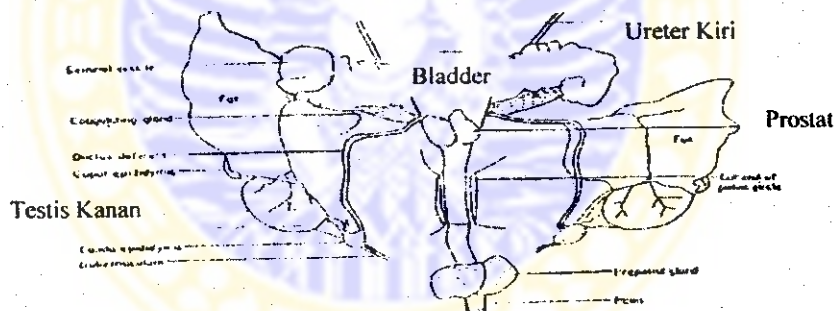
2.3.4 Tinjauan tentang mencit jantan

Mencit atau lebih dikenal dengan *Mus musculus* L. merupakan hewan percobaan yang banyak digunakan dalam penelitian biomedik modern. Banyak

varietasnya, ukurannya yang sesuai, subur, waktu penyiapan pendek, mudah pemeliharaanya (Smith and Mangkuwijaya, 1998)

Mencit peka atau tahan terhadap penyakit-penyakit yang dialami manusia. Karena itu binatang ini sering digunakan di bidang genetika, imunologi, biologi selular, dan onkologi (Prajogo dkk, 1999). Lama hidup mencit 1-2 tahun, ada yang mencapai 3 tahun. Masa pubertas pada mencit jantan dapat dicapai setelah berumur 35 hari, kawin 8 minggu, berat dewasa 20 – 40 g (jantan) dan 18 – 35 g (betina) (Prajogo dkk., 1997).

Menurut Ganong (1987), organ reproduksi mulai berfungsi bersamaan dengan timbulnya tanda – tanda kelamin sekunder dan libido mulai tampak seperti mengejar dan menggigit kepala atau badan mencit betina atau mencium bagian luar alat kelamin betina. Pada mencit, waktu yang dibutuhkan untuk spermatositogenesis kira – kira 8 hari, dan spermiogenesis sendiri kira – kira 13,5 hari. Jadi proses spermatositogenesis pada mencit memerlukan waktu kurang lebih 34,5 hari (Morse, 1981).



Gambar 2.5 Organ reproduksi mencit jantan

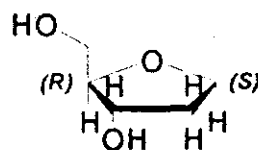
2.4 Tinjauan Tentang DNA

DNA merupakan materi genetik yang diturunkan dari tetua kepada keturunannya. Sebagai unit keturunan terkecil, DNA terdapat pada semua makhluk hidup mulai dari mikroorganisme sampai organisme tingkat tinggi. DNA terdapat dalam sel dan dalam inti sel. Struktur molekul DNA terdiri atas dua rangkaian nukleotida yang tersusun secara linier (Muladno, 2002).

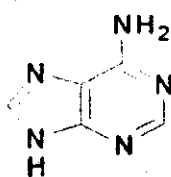
Nukleotida tersusun atas 3 bagian, yaitu :

1. Gula dengan 5 rantai C (disebut pentosa) yang terdapat dalam 2 jenis :
Deoxiribose yang atom hidrogennnya melekat pada atom C nomer 2 (ditandai 2'), Ribose, yang mempunyai kelompok hidroksil.
2. Nitrogen yang mempunyai bentuk cincin disebut basa. Basa melekat pada atom C nomer 1 dari pentosa (1'). Pada DNA terdapat 4 basa yang berbeda, yaitu :
 - a. Purin : Adenin (A) dan Guanin (G)
 - b. Pirimidin : Timin (T) dan Sitosin (C)
 sedangkan kombinasi antara suatu basa dengan suatu pentosa disebut nukleosida.
3. Fosfat (phosphat) yang melekat pada atom C pentosa nomer 5 (5').
4. DNA terangkai dari nukleosida trifosfat, dimana pada DNA terdapat dATP, dCTP, dGTP, dan dTTP (Kimball, 2004).

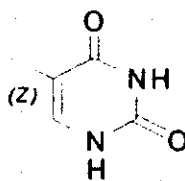
Kedua rangkaian nukleotida yang saling berikatan ini berbentuk seperti tali yang terpilin, sehingga molekul DNA dikatakan sebagai *double helix*. Untuk membentuk rangkaian molekul DNA heliks ganda, basa nitrogen dari setiap nukleotida dalam satu rangkaian akan berpasangan dengan basa nitrogen dari setiap nukleotida pada rangkaian lainnya melalui ikatan hidrogen. Basa A selalu berikatan dengan T dengan dua ikatan hidrogen. Basa G selalu berikatan dengan C dengan tiga ikatan hidrogen (Muladno, 2002).



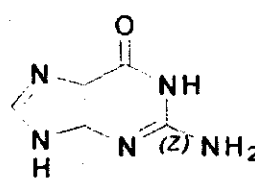
Gula deoksiribosa



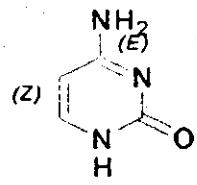
Adenin



Timin



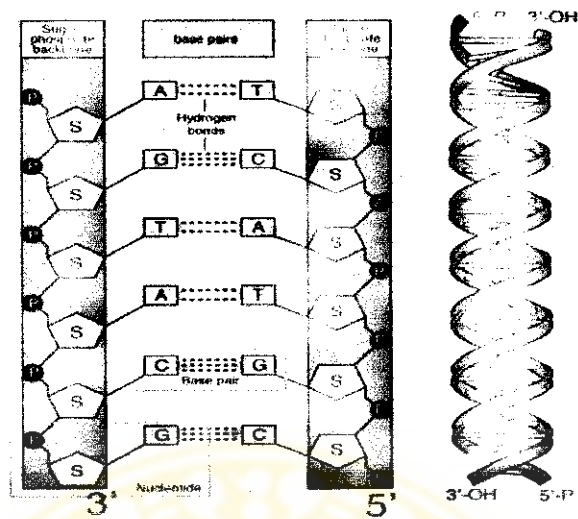
Guanin



Sitosin

Gambar 2.6 Struktur penyusun DNA

Profil Pita Dna Hyaluronidase ...



Gambar 2.7 Struktur DNA dan DNA double helix (www.ncbi.nlm.nih.gov)

2.4.1 Isolasi dan purifikasi DNA

DNA terdapat di semua bagian tubuh makhluk hidup, maka DNA dapat diambil dari segala organ yang terdapat dalam tubuh seperti daging, ginjal, jantung, sperma, darah dan lain-lain. Walaupun cara ekstraksi DNA dari berbagai sumber pada prinsipnya sama, namun ada beberapa modifikasi tertentu yang biasanya dilakukan agar dapat menghancurkan inhibitor yang ada dalam masing-masing sumber.

Isolasi DNA dari organisme *eukariote* biasanya dilakukan melalui proses penghancuran (lysis), pemusnahan protein dan RNA, dan pemurnian DNA. Penghancuran sel dilakukan dengan memanfaatkan senyawa kimia seperti lisozim, EDTA dan SDS. Pemusnahan protein dari larutan digunakan fenol, kloroform dan proteinase. RNA dapat dibersihkan dengan menggunakan RNase. Dengan hilangnya protein dan RNA, maka DNA dapat diisolasi secara utuh. Hal ini dilakukan dengan cara mencampur larutan DNA dengan etanol dan NaCl yang berfungsi untuk memekatkan, memisahkan DNA dari larutan dan mengendapkan DNA (Muladno, 2002).

2.4.2 Menentukan ukuran molekul DNA

Panjang molekul DNA diukur dengan pengukur DNA yang biasa disebut sebagai *molecule weight DNA marker*, interval ukurannya sangat bervariasi misalnya: puluhan, ratusan atau ribuan pasang basa. Pengukuran DNA yang terakurat tentu saja yang berinterval satuan.

DNA pengukur dan DNA sampel yang ingin diukur dimasukkan dalam gel yang sama dan dielektroforesis selama waktu tertentu. Larutan buffer untuk proses elektroforesis tadi dicampuri dengan ethidium bromide. Molekul DNA yang tertempeli ethidium bromide akan tampak berwarna orange apabila gelnya disinari dengan sinar UV. DNA pengukur maupun DNA sampel biasanya seperti pita berjajar dari atas ke bawah. Ukuran DNA sampel dapat diperkirakan dengan melihat posisi DNA sampel terhadap DNA pengukur yang memang sudah diketahui panjangnya (Muladno, 2002).

2.4.3 Mendeteksi tingkat kemurnian DNA dengan Spektrofotometri UV

Kemurnian DNA hasil isolasi dapat diuji dengan spektrofotometer UV. DNA dilarutkan dan absorban dibaca pada 280 nm, 260 nm dan 230 nm. Untuk asam nukleat absorban maksimal pada 260 nm dan minimal pada 230 nm. Kebanyakan protein memberikan mempunyai absorpsi kuat pada 280 nm (Helms. *et al*, 2001).

Tingkat kemurnian DNA, yang dikorelasikan dengan kualitas DNA dapat ditentukan dengan cara menghitung rasio antara nilai OD_{260} dan nilai OD_{280} pada sampel DNA yang diukur melalui spektrofotometer. Molekul DNA dikatakan murni apabila rasio kedua nilai tersebut berkisar antara 1,8-2,0. Apabila konsentrasi DNA yang diukur terlalu kecil, seringkali sulit digunakan sebagai patokan dalam menentukan tingkat kemurnian (Muladno, 2002).

2.4.4 Mutasi

Mutasi gen adalah sebuah perubahan dari satu sampai beberapa basa yang ada dalam susunan nukleotida dari DNA (Starr, 1990). Beberapa mutasi gen timbul spontan ketika DNA direplikasi. Proses replikasi DNA sangat akurat,

Copying errors terjadi sekitar satu per 100 juta basa yang digandakan (Norton, 1986). Tidak semua mutasi terjadi spontan, mutasi gen dapat terjadi setelah terpapar mutagen (bahan kimia tertentu penyebab mutasi yang ada di lingkungan).

Berbagai jenis mutasi yang menimbulkan efek berbeda-beda pada protein yang dikode, yaitu:

1. Mutasi Titik (*Point Mutation*)

Terjadi apabila hanya satu basa pada DNA yang mengalami perubahan, menghasilkan perubahan satu basa pada kodon mRNA

a. Mutasi Samar (*Silent Mutation*)

Mutasi dikatakan silent apabila tidak mempengaruhi urutan asam amino protein. Misalnya perubahan kodon dari CGA menjadi CGG tidak mempengaruhi protein karena kedua kodon ini menentukan arginin.

b. Mutasi Missense

Apabila mutasi menyebabkan satu asam amino dari protein digantikan oleh asam amino lain. Misalnya perubahan CGA menjadi CCA menyebabkan arginin diganti oleh prolin.

c. Mutasi Nonsense

Mutasi nonsense menyebabkan penghentian prematur suatu rantai polipeptida. Misalnya perubahan kodon dari CGA menjadi UGA menyebabkan kodon untuk arginin diganti oleh kodon *stop* dan sintesis protein mutan terhenti di titik ini.

2. Insersi (sisipan)

Insersi terjadi apabila satu atau lebih nukleotida ditambahkan ke DNA. Apabila insersi tidak menimbulkan kodon *stop*, dapat menghasilkan protein dengan jumlah asam amino lebih banyak daripada normal.

3. Delesi (penghilangan)

Apabila satu atau lebih nukleotida dikeluarkan dari DNA, mutasi yang terjadi adalah delesi. Apabila delesi tidak mempengaruhi kodon *start* dan kodon *stop*

yang normal, dapat dihasilkan protein dengan jumlah asam amino lebih sedikit daripada normal.

4. Mutasi frameshift

Mutasi frameshift terjadi apabila jumlah nukleotida yang diinsersikan atau didelesikan bukan kelipatan tiga. Setelah insersi atau delesi kerangka baca bergeser sehingga titik tersebut basa dibaca dalam kodon yang tidak tepat (Marks *et al*, 2000).

2.5 Tinjauan Tentang Elektroforoforesis Gel Agarose

Metode standar yang digunakan untuk memisahkan, mengidentifikasi, dan memurnikan fragmen DNA adalah elektroforesis gel agarose. Tekniknya cukup sederhana, cepat dilakukan dan mampu memisahkan fragmen DNA yang tidak dapat dipisahkan secara lengkap dengan prosedur lain seperti sentrifugasi gradien densitas (Mubaroka, 1990).

DNA dapat bermigrasi di dalam gel bentuk padat yang diletakkan dalam larutan penyangga yang dialiri listrik, molekul DNA yang bermuatan negatif pada pH netral akan bermigrasi ke arah positif/anode (Muladno, 2002).

Cara yang paling mudah untuk memperlihatkan DNA di dalam gel agarose ialah dengan zat warna fluoresen Ethidium bromid. Zat warna yang terikat pada DNA menunjukkan peningkatan fluoresensi dibanding zat warna bebas dalam larutan. Radiasi UV yang diabsorpsi oleh DNA pada 260 nm dan diteruskan pada zat warna, atau radiasi yang diabsorpsi pada 300 nm dan 360 nm oleh zat warna yang terikat, dipancarkan pada 590 nm pada daerah warna merah orange yang dapat dilihat (Mubaroka, 1990).

Kecepatan migrasi DNA ditentukan oleh beberapa faktor di antaranya:

1. Ukuran molekul DNA

Migrasi molekul DNA berukuran besar lebih lambat daripada migrasi molekul berukuran kecil.

2. Konsentrasi agarose

Migrasi molekul DNA pada gel berkonsentrasi rendah lebih cepat daripada

3. Konformasi DNA

Konformasi atau bentuk rangkaian molekul DNA berukuran sama akan bermigrasi dengan kecepatan berbeda.

4. Voltase yang digunakan

Pada voltase rendah, kecepatan migrasi DNA sebanding dengan tingginya voltase yang digunakan. Tetapi bila penggunaan voltase dinaikan, mobilitas molekul DNA meningkat secara lebih tajam. Hal ini mengakibatkan pemisahan molekul DNA dalam gel menurun dengan meningkatnya voltase yang digunakan.

5. Adanya Ethidium bromide di dalam gel

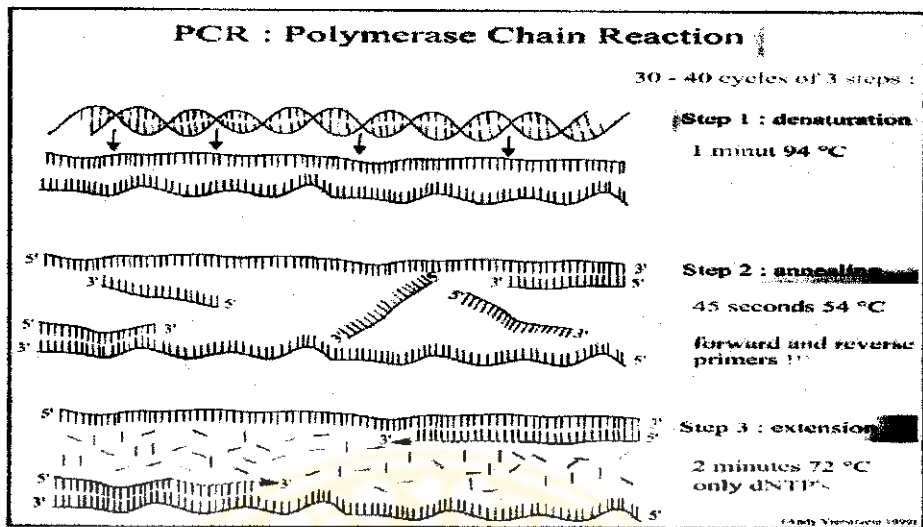
Adanya Ethidium bromide mengakibatkan pengurangan tingkat kecepatan migrasi molekul DNA linear sebesar 15%

6. Komposisi larutan bufer

Apabila tidak ada kekuatan ion di dalam larutan, maka aliran listrik akan sangat minimal dan migrasi DNA sangat lambat, sedangkan larutan bufer berkekuatan tinggi akan meningkatkan panas sehingga aliran listrik menjadi maksimal (Muladno, 2002).

2.6 Tinjauan Tentang PCR

PCR merupakan suatu reaksi *in vitro* untuk menggandakan jumlah molekul DNA pada target tertentu dengan cara mensintesis molekul DNA baru yang berkomplemen dengan molekul DNA target dengan bantuan enzim dan oligonukleotida sebagai *primer* dalam suatu *thermocycler* (Muladno, 2002).



Gambar 2.8 Siklus amplifikasi PCR (Anonim, 1999)

Prinsip pelipat gandaan jumlah molekul DNA pada target yang diinginkan melalui teknik PCR dapat dijelaskan sebagai berikut. Pada suhu 95⁰C, molekul DNA mengalami denaturasi sehingga strukturnya berubah dari untai ganda menjadi untai tunggal. Pada suhu berkisar antara 50-60⁰C, *Primer Forward* dan *Primer Reverse* akan menempel pada komplemennya (*annealing*). Setelah kedua primer menempel pada posisinya masing-masing, enzim *polymerase* mulai mensintesis molekul DNA baru yang dimulai dari ujung 3'-nya masing-masing primer. Sintesa molekul DNA baru ini terjadi pada suhu 72⁰C. Proses ini disebut ekstensi. Dengan demikian, satu molekul DNA ganda akan berlipat jumlahnya menjadi dua dan seterusnya. Proses dari denaturasi-penempelan-ekstensi disebut sebagai satu siklus. Suhu denaturasi dan ekstensi bersifat permanen, masing-masing pada 95⁰c dan 72⁰C, sedang suhu penempelan bergantung dari panjang pendeknya primer (primer biasanya berukuran 18-24 basa). Proses PCR biasanya berlangsung 35-40 siklus (Muladno, 2002). Macam-macam PCR:

1. Multiplex PCR

Teknik ini menggunakan beberapa pasang primer yang spesifik untuk target yang berbeda pada suatu amplifikasi DNA yang sama. Koamplifikasi ini mempunyai beberapa tujuan:

- a. Dapat mendeteksi adanya kelainan pada sekuens DNA yang panjang
- b. Dapat untuk uji segmen dari target genom yang tidak terkait
- c. Sebagai kontrol internal
- d. Untuk uji multi patogen dari spesimen tunggal

2. Deteksi point mutation

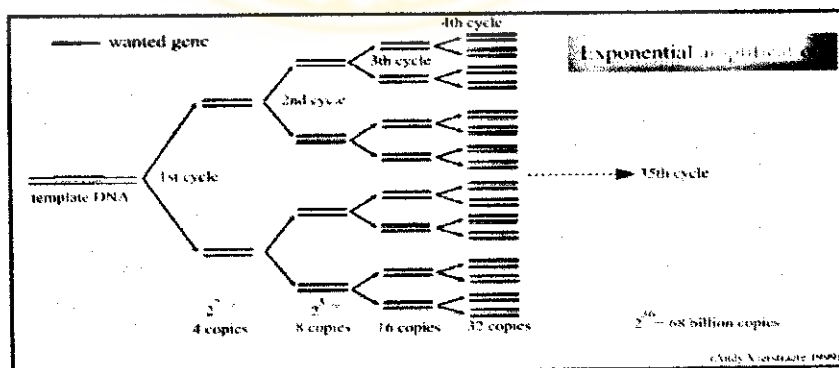
The Amplification Refractory Mutation System (ARMS). Menggunakan primer 3' yang mismatch dan polimerase yang kehilangan aktifitas eksonukleasenya (3' ke 5'). Jika terjadi mismatch, maka PCR akan berjalan.

3. Deteksi target RNA

Template RNA dapat dideteksi dengan PCR jika ekstrak RNA terlebih dahulu diubah menjadi cDNA dengan menggunakan *enzim reverse transcriptase*.

4. PCR kuantitatif

Asumsi umum bahwa amplifikasi secara eksponensial dari sekuens asam nukleat *target* dengan menggunakan PCR dianggap sebagai prosedur kuantitatif. Tetapi sekarang dapat dibuktikan bahwa dengan menggunakan keadaan dan kontrol yang sangat teliti, level dari produk PCR berkorelasi langsung terhadap jumlah input molekul target. Faktor yang berpengaruh pada PCR kuantitatif ini antara lain: optimasi dari protokol untuk mendapatkan efisiensi maksimal, menghindari siklus yang berlebih dan pemrosesan sampel yang sebaik mungkin untuk menghindari adanya inhibitor yang dapat menurunkan efisiensi dari amplifikasi.



Gambar 2.9 Amplifikasi Eksponensial PCR (Anonim, 1999)

2.6.1 DNA target

Ukuran target untuk amplifikasi biasanya kurang dari 700-1000 bp, tetapi target dari spesimen klinik yang efisien untuk diamplifikasi antara 100-400 bp. Walaupun target panjang dapat juga diamplifikasi namun prosesnya kurang efisien, karena produknya yang panjang lebih rentan terhadap inhibitor yang mempengaruhi kerja enzim polimerase, disamping itu waktu untuk amplifikasi lebih panjang. Sesungguhnya DNA dalam bentuk apapun bisa sebagai template, tetapi semakin murni DNA tersebut semakin baik sebagai template. Ketidak murnian DNA dapat mengganggu reaksi, menghambat kerja polimerase.

2.6.2 Primer

Faktor yang sangat penting dalam reaksi PCR adalah karakteristik primer dan bagaimana secara spesifik berikatan dengan target. Ada beberapa hal penting yang perlu diperhatikan dalam merancang primer:

- a. Spesifitas. Primer tersebut haruslah hanya mengenal dan berhibridisasi pada sekuens DNA target yang unik dan tidak berhibridisasi pada DNA non target. Tujuannya adalah membuat primer yang unik. Primer dengan 9 bp relatif tidak spesifik dapat anneal pada beberapa bagian genom. Primer dengan 16-20 bp cukup spesifik terhadap perubahan basa tunggal, sedangkan primer >30bp tidak menambah spesifitas dan biaya sintesanya lebih mahal.
- b. Hindari primer yang bisa mengadakan hibridisasi silang satu sama lain (*dimer*) atau saling melipat sendiri (*hairpins*). Jadi dalam satu set primer jangan membentuk *hairpins* atau *dimer*. Bila mungkin hindari sekuens yang repetitif.
- c. Satu set primer hendaknya mempunyai T_m (*melting temperature*) yang mirip. T_m ini dipengaruhi oleh konsentrasi oligonukleotida, komposisi sekuens dan komposisi solven. Suhu *annealing* pada umumnya lebih rendah dari harga T_m . Perhitungan T_m secara

sederhana adalah $2(A+T)+4(C+G)$. Nilai T_m untuk kedua primer yang digunakan dalam suatu amplifikasi harus sedekat mungkin untuk menghindari *asymmetric priming*, dimana satu primer anneal ke sekuens target dengan aviditas yang lebih besar daripada yang lain dalam kondisi hibridisasi yang sama.

- d. Sekuens dengan kandungan 50-60% GC. Komposisi primer menentukan temperatur *annealing* (Putra, 1997).

2.6.3 Polimerase DNA yang termostabil

Enzim yang digunakan sebagai pencetak rangkaian molekul DNA baru dikenal sebagai enzim *polymerase*. Enzim polimerase termostabil yang diisolasi dari *Thermus aquaticus* (*taq polimerase*) merupakan polimerase pertama kali ditemukan dan saat ini sering digunakan. Taq mempunyai aktifitas polimerase DNA 5'-3'. Aktifitas enzimatik dari taq polimerase mempunyai waktu paruh sekitar 40 menit pada 95°C (Putra, 1997). Untuk dapat mencetak rangkaian tersebut dalam teknik PCR, diperlukan juga dNTPs yang mencakup dATP (nukleotida berbasis *Adenine*), dCTP (nukleotida berbasis *Cytosine*), dGTP (nukleotida berbasis *Guanine*) dan dTTP (nukleotida berbasis *Thymine*) (Muladno, 2002).

2.6.4 Thermal cycler

Alat *thermal cycler* (mesin PCR) yang secara tepat meregulasi temperatur dan siklus, waktu yang dibutuhkan untuk menjamin reproduibilitas dan keakuratan dari reaksi amplifikasi.

BAB III

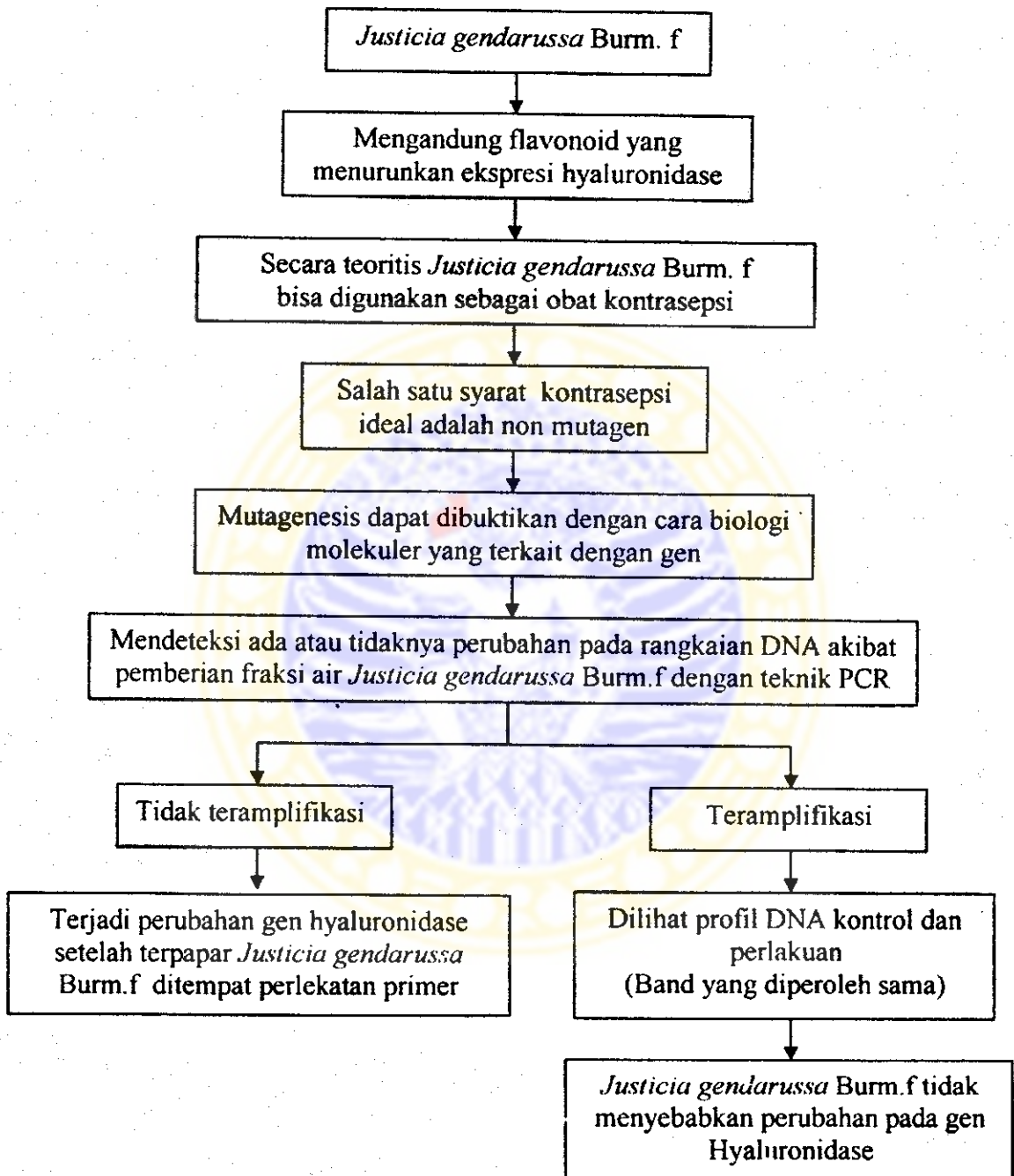
KERANGKA KONSEPTUAL

Keluarga Berencana merupakan salah satu cara untuk menangani masalah peningkatan jumlah penduduk dan laju pertumbuhannya. Tahun ini pemerintah bertekad untuk mulai menggalakkan program KB (keluarga Berencana) pria. Pengertian mulai digalakkan (kembali) program KB pria di sini agaknya berkaitan dengan upaya pemerintah di tahun-tahun lalu selalu gagal mengajak kaum pria Indonesia menjadi peserta KB. Selama ini keikutsertaan pria sebagai akseptor KB masih sangat rendah karena keterbatasan dari alat-alat kontrasepsi tersebut sehingga diperlukan kontrasepsi baru bagi pria agar ada banyak pilihan dalam penggunaannya (www.bkkbn.go.id).

Syarat kontrasepsi ideal diantaranya adalah tidak menimbulkan efek yang mengganggu kesehatan atau dengan kata lain kontrasepsi tersebut aman digunakan. Aman dalam hal ini tidak toksik, tidak mutagenik, teratogenik dan karsinogenik.

Justicia gendarussa Burm.f. mengandung flavonoid dan berpotensi menjadi tanaman yang bisa digunakan untuk kontrasepsi. Kontrasepsi yang aman adalah yang bukan mutagen. Mutagenesis dapat dibuktikan dengan cara biologi molekuler yang terkait dengan gen (Lestari, 2005). Hal tersebut disebabkan karena gen merupakan rangkaian molekul-molekul DNA yang terdapat dalam kromosom. Sehingga Untuk mengetahui keamanannya perlu dilakukan analisis apakah terjadi perubahan pada rangkaian DNA testis mencit setelah pemberian fraksi air tanaman *Justicia gendarussa* Burm.f.

Kerangka Konseptual



Gambar 3.1 Bagan Kerangka Konseptual Profil DNA dengan PCR

BAB IV

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 menganalisa profil DNA testis mencit dengan teknik PCR, yang terdiri atas: persiapan hewan perlakuan dan tanpa perlakuan, pemberian bahan uji pada hewan perlakuan, isolasi DNA dari sel-sel dalam tubulus seminiferus testis dari hewan perlakuan dan tanpa perlakuan, DNA di PCR dengan primer tertentu, DNA hasil PCR dielektroforesis dan dilihat profil DNA 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 Pacet, 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 penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel DNA, bubuk agarose (United State Biological), film polaroid, aquadest steril, ethidium bromida (Biorad katalog 161-0433), proteinase-k (Promega), Triss-HCl (MP. Biomedical. Inc), SDS (Biobasic. inc), EDTA (MP. Biomedical. Inc), RNase, sodium asetat, isopropanol (Merck), etanol absolut (Merck), etanol 70%, 2x PCR *master mix* (Fermentas), nuclease free water (Fermentas), TBE 1x (MP. Biomedical. Inc cat no. 816721), DI (*deionized water*).

4.2.3 Hewan penelitian

Dalam penelitian ini hewan coba yang digunakan adalah mencit jantan (*Mus musculus L.*) galur balb C, umur 2-3 bulan, dengan berat badan antara 20-30 gram. Mencit dipelihara di kandang Lab. Hewan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga dengan persyaratan yang sesuai dengan penelitian eksperimental, yaitu:

a. Kandang hewan percobaan

Mencit ditempatkan dalam kandang dari plastik dengan tutup jeruji ukuran 50x30x15 dengan alas sekam padi yang berfungsi untuk menyerap kotoran yang setiap minggu dilakukan pembersihan.

b. Makanan hewan percobaan

Selama pengujian, Mencit diberi makan "pelet Par G" produksi PT guyofeed Sidoarjo dengan komposisi air max. 12%, protein min. 15%, lemak min. 3%, serat kasar max. 8%, abu max. 12%, Ca max. 3,6%, P max1%, M>E 2650-2850 KCI/Kg yang diproduksi oleh PT Wirifa Sakti Surabaya, Rungkut Industri Estate Surabaya.

4.2.4 Pengambilan testis mencit

Mencit dibunuh dengan menekan kuat bagian lehernya dengan pinset, kemudian mencit didesinfeksi dengan alkohol 70 %. Skrotum dibedah dan testis kanan – kiri ditarik. Testis dimasukkan dalam pot plastik dan diberi tanda. Testis tersebut disimpan dalam freezer pada suhu – 80⁰C

4.3 Alat-Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah Mikropipet berbagai ukuran, timbangan analitik, freezer, vortex, mortir–stamper dingin, sentrifuge 10000 rpm, autoklaf, rotary evaporator, maserator, pinset dan gunting steril, pipet pasteur, eppendorf, yellow & blue tip, pipet-pipet ujung yang steril, seperangkat alat elektroforesis (Biorad), suplai tenaga DC (Biorad), UV-1601 UV-VIS Shimadzu), dan minicyclerTM (MJ Research)

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 rotavapor 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. LD_{50} fase air dari *Justicia gendarussa* Burm.f : 312,67 mg/20g BB mencit. Lama pemberian disesuaikan dengan siklus spermatogenesis mencit yaitu 1 dan 1,5 kali siklus spermatogenesis mencit (siklus spermatogenesis mencit 34,5 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. $1/12 \text{LD}_{50}$:
26,06 mg/20g BB mencit selama 1,5 siklus

- Kelompok II : diberikan fraksi air *Justicia gendarussa* Burm.f. 1/17 LD₅₀: 18,39 mg/20g BB mencit selama 1,5 siklus
- Kelompok III : diberikan larutan hesperidin 0,2%, sebagai kelompok kontrol positif.
- Kelompok IV : diberikan larutan CMC Na 0,5% dalam aquadest, sebagai kelompok kontrol negatif.

4.4.3 Proses isolasi DNA testis mencit

Setelah diberi perlakuan maka testis mencit diambil dan diisolasi untuk mendapatkan DNA-nya. Sebanyak 100 mg organ testis dihomogenasi dengan mortir dan stamper sampai halus pada kondisi dingin sambil ditambah 1ml bufer lisis. Homogenat dimasukkan tabung eppendorf kemudian ditambahkan proteinase-k sebanyak 4 µl dipipeting lalu diinkubasi pada suhu 55°C selama 1 jam dan disentrifuge 10000 rpm selama 15 menit kemudian supernatan diambil dan dipindahkan ke tube yang baru. Supernatan ditambah RNase 4 µl kemudian dipipeting dan diinkubasi selama 10 menit. Ditambahkan Isopropanol 400µl dan NaoAc 100 µl 3M. Disimpan di Freezer bersuhu -20°C selama 30 menit. Disentrifuse 10000 rpm selama 10 menit. Pelet yang didapat kemudian dikering anginkan. DNA yang sudah kering ditambahkan DI sebanyak 50 µl pada tiap tabung. Hasil isolasi selanjutnya diukur kadar, kemurnian dan konsentrasi DNA dengan spektrofotometer.

4.4.4 Pengukuran konsentrasi dan kemurnian DNA

Ambil 1µl sampel dan diencerkan dengan aquadest steril sebanyak 1 ml. Untuk blangko digunakan aquadest steril. Masukkan sampel dalam kuvet dan lakukan pengukuran dengan spektrofotometri pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm.

Konsentrasi DNA (µg/ml) dapat dihitung dengan menggunakan rumus:

$$\text{Konsentrasi DNA} = A_{260} \times \text{Faktor Pengenceran} \times 50 \mu\text{g/ml}$$

A_{260} = Absorbansi pada panjang gelombang 260 nm.

50 = Konstanta 260 nm suatu larutan yang nilai absorbansi 1 sebanding dengan 50 µg/ml DNA untai ganda/ml.

Kemurnian DNA dihitung dengan rumus:

$$\text{Kemurnian DNA} = A_{260}/A_{280}$$

DNA bisa dikatakan murni jika rasio $A_{260}/A_{280}=1,8-2$. Apabila rasio DNA kurang dari 1,8 menunjukkan bahwa DNA terkontaminasi etanol atau protein, sedangkan rasio DNA lebih dari 2 menunjukkan bahwa DNA terkontaminasi RNA.

4.4.5 Prosedur PCR

4.4.5.1 Penentuan primer gen Hyaluronidase spermatozoa

Primer yang digunakan adalah primer *forward* dan *reverse*. Primer ini merupakan rangkaian nukleotida tertentu yang diperoleh dengan memasukkan susunan nukleotida gen hyaluronidase yang diperoleh dari GEN BANK NCBI dengan kode akses AB085677, primer yang digunakan sebagai berikut :

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

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

4.4.5.2 Proses PCR

Melting temperatur dihitung berdasarkan rumus $= 4(G+C) + 2(A+T)$ menghasilkan menghasilkan:

Primer Forward : $4(G=5 + C=4) + 2(A=4 + T=7) \rightarrow 58^{\circ}\text{C}$

Primer Reverse : $4(G=7 + C=4) + 2(A=3 + T=6) \rightarrow 62^{\circ}\text{C}$

Melting temperatur sangat penting dalam penentuan suhu *annealing* pada PCR, dimana suhu *annealing* berada 5°C di bawah *melting temperatur primer*. Dari hasil perhitungan di atas didapat *melting temperatur primer* antara $53-57^{\circ}\text{C}$ (Lestari, 2005).

Profil siklus reaksi PCR adalah sebagai berikut:

- a. Tahap predenaturasi pada suhu 95°C selama 2 menit
- b. Tahap amplifikasi yang terdiri dari 3 tahap reaksi dengan suhu yang berbeda sebanyak 40 siklus diantaranya:
 1. Suhu 95°C selama 30 detik, pada tahap ini terjadi denaturasi untai DNA

2. Suhu 57°C selama 1 menit, pada tahap ini terjadi proses penggandaan dan *annealing*
 3. Suhu 68°C selama 2 menit, pada tahap ini terjadi proses penggandaan dan pemanjangan (*extension*)
- c. Suhu 68°C selama 7 menit sebanyak satu siklus, pada tahap ini terjadi pemanjangan akhir untai kedua.
 - d. Suhu 4°C selama waktu yang tidak terbatas sebanyak 1 siklus tahap ini adalah tahap akhir dari siklus PCR untuk penyempurnaan bentuk DNA.

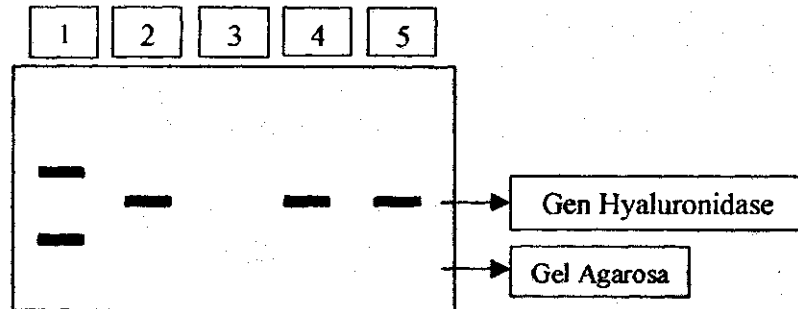
4.4.5.3 Prosedur elektroforesis dengan gel agarose

Bubuk agarose 0,2 gram dilarutkan dalam 20 ml TBE (gel agarosa 1%). Larutan dipanaskan sampai bening (90°C), kemudian didinginkan sampai hangat (70°C). Larutan dituang pada bak elektroforesis dan didiamkan hingga membentuk gel. Loading dye 2 μl diletakkan pada kertas film dan ditambahkan 7 μl sampel DNA kemudian dirunning pada 80 volt, 40 mA, selama 60 menit. Setelah 60 menit, gel hasil running direndam dalam EtBr selama 20 menit. Gel dicuci dengan air yang mengalir tiga kali. Untuk melihat band DNA, gel diletakkan di atas transiluminator.

4.4.5.4 Pengamatan dan analisis data

Pita-pita (band-band) DNA yang terbentuk pada gel yang merupakan hasil amplifikasi gen Hyaluronidase mencit dianalisa secara deskriptif. Analisis secara deskriptif ini dilakukan dengan mengamati ada tidaknya gen Hyaluronidase yang teramplifikasi (Gambar 4.1). Gen Hyaluronidase yang teramplifikasi akan tampak pada gel.

Contoh:



Gambar 4.1 Perkiraan hasil amplifikasi gen Hyaluronidase

Sumur 1 = Marker DNA Sumur 2, 3, 4, dan 5 = sampel DNA mencit

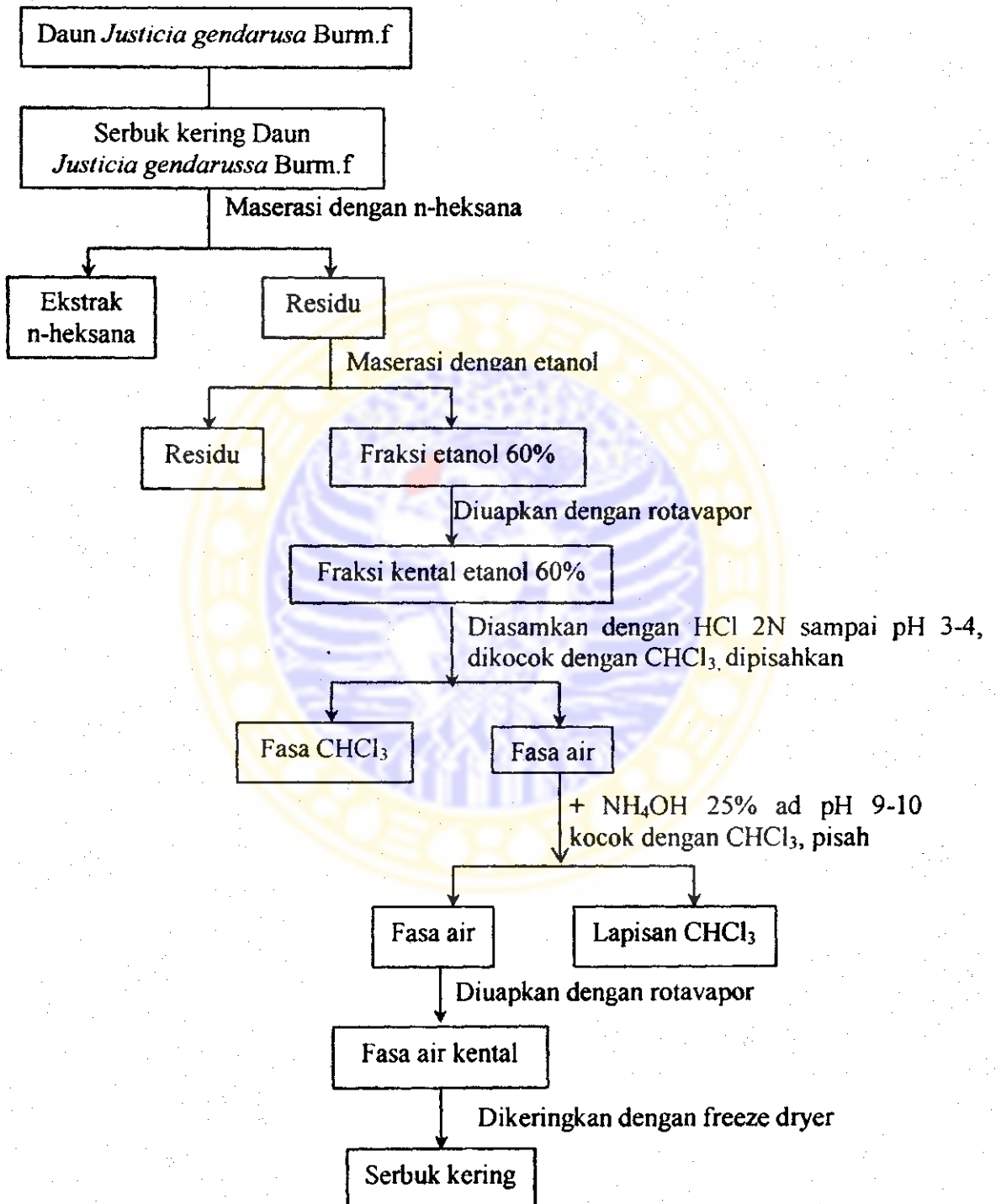
Keterangan:

1. Hyaluronidase tidak mengalami amplifikasi sehingga tidak terbentuk band DNA bila terjadi mutasi pada tempat penempelan primer.
2. Hyaluronidase mengalami amplifikasi sehingga terbentuk band DNA bila tidak terjadi mutasi pada tempat penempelan primer.

4.4.6 Analisis data

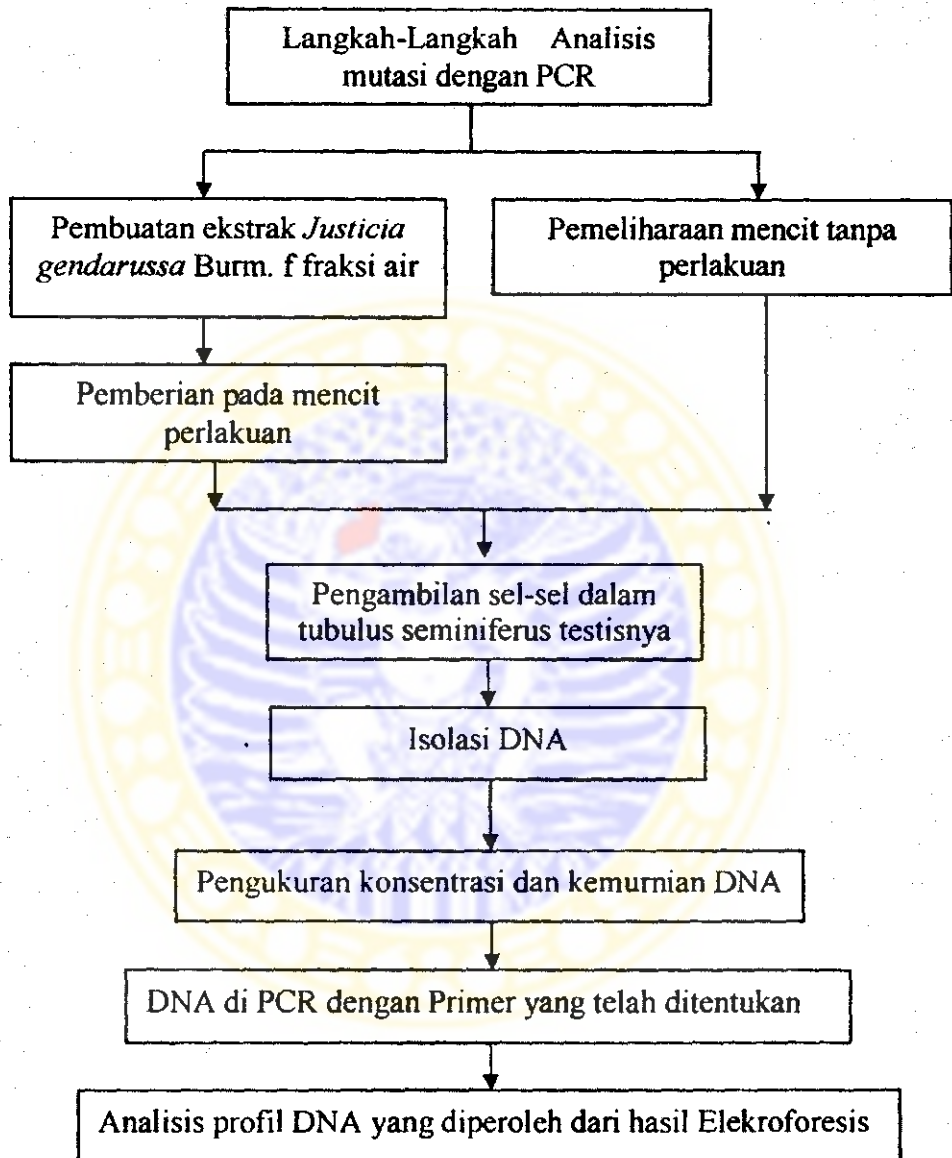
Pengumpulan data dilakukan dalam lingkungan yang terkontrol dan terkendali dengan asumsi semua kondisi diusahakan sama. Profil DNA akan tampak sebagai pita berwarna merah orange di bawah sinar UV. Hasil identifikasi band DNA perlakuan dibandingkan dengan band DNA marker. Kemudian dihitung jumlah pasang basa DNA dengan konversi harga Rf sampel dengan persamaan regresi Rf DNA marker Vs log pasang basa DNA marker. Jumlah pasang basa DNA sampel yang dapat di hitung adalah DNA sampel yang harga Rf-nya berada dalam rentang regresi marker.

Skema Pembuatan Serbuk Kering Fraksi air *Justicia gendarussa* Burm.f



Gambar 4.2 Bagan Pembuatan serbuk kering fraksi air *Justicia gendarussa*

Kerangka Operasional



Gambar 4.3 Bagan Kerangka Operasional Analisis Mutasi Gen Hyaluronidase dengan PCR

BAB V

HASIL PENELITIAN

5.1. Hasil Ekstraksi Fase Air Daun *Justicia gendarussa* Burm. F

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 rotavapor 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 NH₄OH 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. Setelah dilakukan ekstraksi terhadap daun *Justicia gendarussa* Burm. f didapatkan data sebagai berikut :

Tabel 5.1. Berat Hasil Ekstraksi daun *Justicia gendarussa* Burm. F

No.	Berat (g)			Fase air
	Serbuk daun <i>Justicia gendarussa</i> Burm. F	Ekstrak n-heksan	Ekstrak etanol 60%	
1	1750	64,7	175,1	660 ml

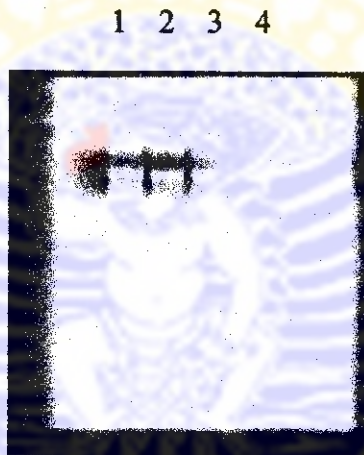
5.2. Isolasi DNA Total

Isolasi DNA total dari testis mencit dilakukan dengan cara mengambil testis mencit seberat 100 mg kemudian digerus dalam mortar yang telah didinginkan semalam dalam freezer yang bersuhu -20°C. Testis mencit digerus sampai halus lalu ditambahkan 1 ml bufer lisis ke dalam mortar dan digerus kembali. Sampel dibagi menjadi 2 tabung eppendorf dan DNA diisolasi sesuai dengan prosedur isolasi. Keberhasilan isolasi DNA yang dilakukan dicek dengan

elektroforesis gel agarose 1% dan spektrofotometer. Dari hasil isolasi DNA diperoleh data sebagai berikut:

Tabel 5.2. Konsentrasi dan Kemurnian DNA

No.	Sampel	A ₂₆₀	A ₂₈₀	Konsentrasi (µg/ml)	Kemurnian
1	Kontrol (-)	0,725	0,471	7250	1,54
2	Kontrol (+)	0,489	0,293	4890	1,67
3	1/12 LD ₅₀	0,470	0,298	4700	1,64
4	1/17 LD ₅₀	0,565	0,330	5650	1,71



Gambar 5.1. Isolat DNA Total yang tampak pada gel agarose 1%

Keterangan: 1: kontrol negatif 3: 1/12 LD₅₀
2: kontrol positif 4: 1/17 LD₅₀

Pada Gambar 5.1 terlihat bahwa hasil elektroforesis dari isolasi DNA total menunjukkan adanya kandungan DNA pada keempat sampel yang *dirunning*. DNA relatif stabil dan dapat dideteksi menggunakan elektroforesis gel dengan penambahan zat penampak noda ethidium bromida. Zat ini dapat berikatan dengan molekul nukleotida (RNA/DNA) sehingga dapat berpendar (berfluoresensi) ketika divisualisasi dengan UV eluminator. Konsentrasi dan kemurnian DNA tiap sampel dapat diketahui dengan analisis spektrofotometri UV pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm.

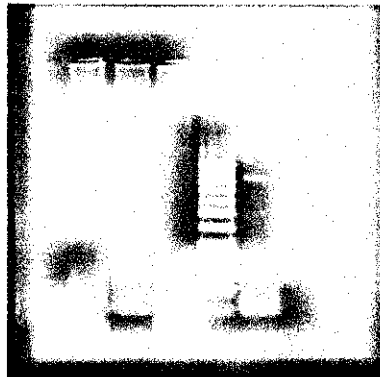
5.3. Hasil PCR

Formula reaksi PCR secara lengkap dapat dilihat pada lampiran 4.. Sedangkan profil siklus reaksi PCR adalah sebagai berikut :

- 1) Suhu 95°C selama 2 menit sebanyak 1 siklus; pada tahap ini terjadi denaturasi DNA (disebut juga tahap Predenaturasi)
- 2) Tahap amplifikasi yang terdiri dari 3 tahap reaksi dengan suhu yang berbeda sebanyak 40 siklus diantaranya;
 - a. Suhu 95°C selama 30 detik; pada tahap ini terjadi denaturasi dan pembentukan untai DNA yang kedua
 - b. Suhu 57°C selama 1 menit; pada tahap ini terjadi proses penggandaan dan *annealing*
 - c. Suhu 68°C selama 2 menit; pada tahap ini terjadi poses penggandaan dan pemanjangan (*extension*)
- 3) Suhu 68°C selama 7 menit sebanyak 1 siklus; pada tahap ini terjadi pemanjangan akhir untai kedua
- 4) Suhu 4°C selama waktu yang tidak terbatas sebanyak 1 siklus; tahap ini adalah tahap terakhir dari siklus PCR untuk penyempurnaan pembentukan DNA.

Untuk mengetahui keberhasilan proses PCR maka dilakukan elektroforesis gel agarosa 2% dengan *Marker GeneRuler™ 50bp DNA Ladder*. Hasil visualisasinya dapat dilihat pada Gambar 5.2.

1 2 3 4 5



Gambar 5.2. Produk PCR pada 2% gel Agarose hasil elektroforesis

Keterangan : (1) Sampel 1/12 LD₅₀ (4) *Marker*
(2) Sampel 1/17 LD₅₀ (5) kontrol negatif
(3) Kontrol positif

Pada Gambar di atas terlihat bahwa dari hasil elektroforesis produk PCR menggunakan 2% agarose hanya kontrol negatif yang teramplifikasi. Sedangkan kontrol positif dan perlakuan tidak mengalami amplifikasi. Hasil amplifikasi produk PCR dari kontrol negatif terletak antara pita ke tiga dan ke empat dari DNA ladder.



BAB VI

PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui profil fragmen DNA Hyaluronidase mencit setelah pemberian fase air daun *Justicia gendarussa* Burm.f dengan teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Tanaman gandarusa tersebut diambil di daerah Pacet, Mojokerto kemudian mengalami beberapa perlakuan mulai dari sortasi, pengeringan di udara bebas, kemudian dijadikan serbuk. Serbuk yang digunakan dalam penelitian ini seberat 1750 g, kemudian diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut n-heksan dengan tujuan untuk menghilangkan lemak-lemak, klorofil dan lilin-lilin yang ada pada serbuk tersebut. Proses ini menghasilkan ekstrak kental seberat 64,7 g yang dianggap sebagai residu.

Telah diketahui pada penelitian sebelumnya bahwa tanaman gandarusa mengandung senyawa flavonoid yang mempunyai aktivitas penghambatan enzim hyaluronidase pada spermatozoa, yaitu 6,8-di- α -L-arabinopiranosil-4',5,7-trihidroksi-flavon atau 6,8-diarabino-silapigenin sebagai komponen mayor dan 6- α -L-arabinopiranosil-4',5,7-trihidroksi-8- β -D-silopiranosilflavon atau 6-arabino-sil-8-silosilapigenin sebagai komponen minor. Pada umumnya flavonoid larut dalam pelarut etanol, dari penelitian sebelumnya komponen-komponen di atas larut baik pada etanol 60% sehingga serbuk yang tidak terlarut dalam pelarut n-heksan diekstraksi dengan dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 60%, didapatkan ekstrak kental seberat 175,1 g.

Fase air didapatkan dengan melakukan pemisahan menggunakan pelarut kloroform untuk melarutkan alkaloid bebas. Setelah itu dilakukan pengasaman dengan HCl 2 N sampai pH 3-4 untuk penyempurnaan alkaloid. Fase air asam dipisahkan dari fase kloroform, kemudian dibasakan dengan NaOH sampai pH 9-10 dan dipartisi dengan kembali kloroform dengan harapan agar alkaloid basa tersari dalam kloroform sehingga terpisah dari glikosida flavonoid yang tersari dalam fase basa. Dari hasil pemisahan didapatkan ekstrak cair sebesar 660 ml yang digunakan untuk perlakuan pada mencit jantan.

Fase air *Justicia gendarussa* Burm.f yang digunakan dalam penelitian ini diambil dalam dua dosis yaitu $1/12$ LD₅₀ (26,06mg/20g BB) dan $1/17$ LD₅₀ (18,39mg/20g BB), selain itu digunakan juga CMC-Na 0,5% sebagai kontrol (-) dan hesperidin 0,2% sebagai kontrol (+). Dipilihnya dua dosis tersebut disebabkan karena menurut penelitian IVF (In Vitro Fertilisation) yang telah dilakukan sebelumnya didapatkan data bahwa pada dosis tersebut tidak menimbulkan terjadinya fertilisasi pada ovum mencit yang dibuahi oleh sperma mencit yang telah diberi perlakuan.

Mencit yang telah diberi perlakuan dibedah untuk diambil testisnya untuk dilakukan proses isolasi DNA. Hasil isolasi kemudian dirunning dengan agarose 1% untuk mengetahui ada tidaknya DNA hasil isolasi dan dilakukan pengukuran absorbansi dengan spektrofotometer untuk mengetahui konsentrasi dan kemurnian DNA dari hasil isolasi.

Hasil elektroforesis memperlihatkan adanya pita DNA yang mengindikasikan bahwa DNA telah terisolasi walaupun masih ada smear yang menunjukkan masih adanya kontaminasi. Hasil pengukuran dengan menggunakan spektrofotometer menunjukkan DNA yang terisolasi mempunyai konsentrasi yang cukup tinggi yaitu untuk kontrol negatif 7250, kontrol positif 4890, $1/12$ LD₅₀ 4700 dan $1/17$ LD₅₀ 5650. Sedangkan nilai kemurnian DNA sebagai berikut kontrol negatif sebesar 1,54, kontrol positif 1,67, $1/12$ LD₅₀ 1,64 dan $1/17$ LD₅₀ 1,71 dari pengukuran spektrofotometer masih memperlihatkan adanya kontaminasi, hal ini diketahui dari rasio antara A₂₆₀ dengan A₂₈₀ yang nilainya kurang dari 1,8 yang menunjukkan adanya kontaminasi yang disebabkan oleh protein maupun etanol. Tingkat kemurnian DNA, yang dikorelasikan dengan kualitas DNA dapat ditentukan dengan cara menghitung rasio antara nilai OD₂₆₀ dan nilai OD₂₈₀. Molekul DNA dikatakan murni apabila rasio kedua nilai tersebut berkisar antara 1,8-2,0.

Hasil isolasi DNA dari testis mencit kemudian di PCR., walaupun PCR lebih banyak digunakan untuk amplifikasi gen (DNA) pada berbagai penelitian khususnya biologi molekuler karena PCR lebih sensitif, spesifik, efektif, sederhana, fleksibel dan hanya memerlukan waktu yang relatif singkat (3-4 jam),

namun PCR juga bisa digunakan untuk mendeteksi ada tidaknya perubahan pada gen.

Pada penelitian ini PCR digunakan untuk mengetahui ada tidaknya perubahan pada profil gen hyaluronidase yang terpapar oleh fase air *Justicia gendarussa* Burm.f dengan melihat ada tidaknya amplifikasi gen hyaluronidase pada testis mencit setelah dilakukan proses PCR. PCR dilakukan dengan suhu *annealing* 57°C. Ada banyak faktor yang mempengaruhi reaksi PCR diantaranya; DNA *template*, kontaminasi, konsentrasi magnesium, desain *primer*, temperatur, waktu inkubasi dan banyaknya siklus. Diantara faktor-faktor tersebut, *primer* dan temperatur adalah faktor yang paling mempengaruhi hasil reaksi. Berdasarkan penelitian terdahulu yang dilakukan oleh Ulfiyanti (2005), temperatur *annealing* telah dioptimasi yaitu 57° C, sehingga pada penelitian ini digunakan temperatur tersebut untuk reaksi *annealing*nya.

PCR memerlukan dua macam *primer* yaitu *forward* dan *reverse* yang terdiri dari 20 basa nukleotida untuk masing-masing *primer*. *Primer* yang digunakan pada proses PCR ini adalah; *Primer Forward* 5'- GCT TAG CTA TCA TTG ACT GG - 3' dan *Primer Reverse* 5'- GCA CAT TTT GGC TGC TAG GG-3'. Hasil perhitungan menunjukkan *melting temperatur primer* antara 58-62°C, dengan suhu *annealing* yang digunakan antara 53-57°C.

Produk hasil PCR ini dielektroforesis dengan agarose 2% untuk mengetahui keberhasilan reaksi. Hasil amplifikasi gen hyaluronidase dengan metode PCR memperlihatkan bahwa hanya kontrol negatif yang mengalami amplifikasi sedangkan kontrol positif dan perlakuan tidak mengalami amplifikasi. Hal ini mengindikasikan terjadinya perubahan pada gen hyaluronidase yang terletak pada tempat penempelan *primer* dari kontrol positif dan perlakuan $1/12$ LD₅₀ dan $1/17$ LD₅₀.

Dosis ini pula yang digunakan untuk uji reversibilitas oleh peneliti terdahulu (Sa'adullah, 2005). Hasil penelitian menunjukkan bahwa mencit yang mendapat perlakuan $1/12$ LD₅₀, $1/17$ LD₅₀ dan kontrol positif selama 1,5 siklus spermatogenesis tidak ada satupun yang mengalami fertilisasi. Reversibilitas

fertilitas mencit jantan dapat kembali ke kondisi normal 100% setelah perlakuan dihentikan selama 1 siklus spermatogenesis.

Frakasi n-butanol daun *Justicia gendarussa* Burm.f tidak menyebabkan gangguan sintesis protein dalam arti masih bersifat reversibel. Diketahui jumlah protein yang terbentuk tidak selalu linear dengan peningkatan atau penurunan aktivitas biologi, ada kemungkinan jumlah tetap aktivitas turun dan jarang terjadi aktivitas turun dengan jumlah protein meningkat. Dari beberap kemungkinan yang terjadi untuk sementara lebih banyak disebabkan dalam faktor-faktor regulasi ekspresi gen (Prajogo, 2002). Hasil uji dengan northern blot pada dosis yang sama pada mencit perlakuan tidak menyebabkan terjadinya perubahan rangkaian RNA pada testis mencit (Nidom, 2005).

Sehingga untuk mengetahui apakah mutasi yang terjadi bersifat permanen atau tidak, maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut di bidang biologi molekuler terhadap mencit yang telah ditreatmen dan dibiarkan selama 1 siklus atau lebih yang telah diuji reversibilitasnya.

Kontrol negatif yang teramplifikasi mempunyai panjang antara 800-900 bp setelah dilakukan plot terhadap persamaan regresi linear $Y = -2,0792x + 3,7153$ dengan $r = -0,9804$ ternyata sampel mempunyai panjang 802 bp. Munculnya band DNA pada kontrol negatif menunjukkan bahwa *primer* yang didesain sesuai untuk gen hyaluronidase. *Primer forward* dan *reverse* yang digunakan pada lokus AB085677 menghasilkan panjang nukleotida 1784 bp. Namun dari hasil amplifikasi didapatkan panjang sebesar 802 bp, ada kemungkinan tidak semua intron teramplifikasi. Exon yang terdapat antara *primer Forward* dan *Reverse* sebanyak 710 bp. Hasil ini sama dengan panjang cDNA Hyaluronidase yang diperoleh dari hasil RT-PCR dari RNA testis mencit dengan menggunakan primer yang sama. Panjang 710 ini diperoleh dari exon urutan 3264-3799 (536 bp), 4595-4684 (90 bp), 4964-5047 (84 bp) sehingga kemungkinan intron yang teramplifikasi dari kontrol negatif sebanyak 92 bp.

BAB VII

KESIMPULAN DAN SARAN

1.1. Kesimpulan

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan sebagai berikut:

Ada perbedaan profil hasil PCR dari *hyaluronidase* pada testis mencit setelah pemberian fase air daun *Justicia gendarussa* Burm.f menggunakan *Primer Forward* 5'-GCT TAG CTA TCA TTG ACT GG-3' dan *Primer Reverse* 5'-GCA CAT TTT GGC TGC TAG GG-3' dengan produk PCR sebesar 802 bp.

1.2. Saran

Perlu diadakan penelitian lebih lanjut terhadap gen *hyaluronidase* pada mencit yang telah diberi perlakuan dan dibiarkan selama 1 siklus atau lebih, dan telah diuji reversibilitas fertilitasnya untuk mengetahui profil DNA *hyaluronidase* yang dihasilkan sebagai skrining terjadinya mutasi dengan teknik PCR.

DAFTAR PUSTAKA

- Ani Hartati, Sutarjadi, Bambang Prajogo EW & Onny PS, 1997. *Pengaruh pemberian per oral Ekstrak Diklormetan dan ekstrak Metanol daun Gendarussa vulgaris Nees terhadap Spermatozoa Epididimis Mencit. Simposium Penelitian Bahan Obat Alami IX. Yogyakarta.*
- Anonim, 1983. *Pemanfaatan Tanaman Obat*. Edisi ke-2 Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Hal.22
- Anonim, 1996. *Materia Medika Jilid IV*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Hal. 33.
- Anonim, 1999. *Principle of PCR*.
<http://asers.ugent.be/~avierstr/principle/pcr.htm>, diakses 12 februari 2006
- 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.
- Backer, G.A., Baikhuisen Van den Brink, R.C., 1968. *Flora of Java*. Volume II, NVP, Noodhoff-The Netherlands, hal.590.
- Bailey LH, 1963. *The Standart Cyclopedia of Holticulture*, Vol. I AE & Vol. II FO. New York: the Mcmillan Company
- Bambang Prajogo EW dan Suwijoyo Pramono, 1988. *Isolasi Glikosida Flavonoid dari daun Gandarussa (Justicia gendarussa Burm.f). Simposium Penelitian Tumbuhan Obat VI. Jakarta.*
- Bambang Prajogo EW, 2002. *Aktivitas Antifertilitas Flavonoid Daun Justicia gendarussa Burm.f.* **Disertasi**. Surabaya : Universitas Airlangga.

- Chakravarty,AK., Dastidar P.P.G., 1982. *Simple Aromatic Amine From Justicia gendarussa* Burm.f *¹³C NMR Spectra of The Bases and Their analogue*. Tetrahedron, Vol. 38, No 12 P1792-1797
- 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.
- Ganong, William F. 2003. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran*. Jakarta:EGC. Halaman 408-411
- Heyne K.1987. *Tumbuhan Berguna Indonesia, Jilid III*. Terjemahan.Jakarta: Yayasan Sarana Wana Jaya. Hal.1759.
- <http://www.bkkbn.go.id/hgweb/pusna/kb.htm>, diakses 7 Februari 2006
- <http://www.pdpersi.co.id/images/news/content/gandarusa.jpg>, diakses 7 Februari 2006
- www.ncbi.nlm.nih.gov/.../images/dna2.gif, diakses 7 Februari 2006
- 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)
- Mark, Dawn B; Mark, Allan D; Smith, Colleen M; 2000, *Biokimia Kedokteran Dasar Sebuah Pendekatan Klinis*, alih bahasa: dr.Brahm U. Pendit. Sp. Kk, Jakarta: EGC
- Moeso S, Agus P.1985. *Laporan Perjalanan Ke Jayapura Sentani (Irian Jaya)*.Yogyakarta: Fakultas Biologi Universitas Gajah Mada. Hal.19.
- Mubaroka, Sofia. 1990. *Rekayasa Genetika*, Yogyakarta: PAU-Bioteknologi

- Muladno, 2002. *Seputar Rekayasa Genetika*, edisi pertama, editor: Rakhmad Pambudi, Bogor: Pustaka Wirausaha Muda. Hal 8, 10-13, 18-23, 29-31, 61-67.
- Nalbandov AV. 1990. *Fisiologi Reproduksi Pada Mamalia dan Unggas* Ed.3. Jakarta: Universitas Indonesia. Hal.42.
- Norton, Cynthia Friend. 1986. *Microbiology*, 2nd Edition. California: Addison-Wesley publishing Company, inc. P 247
- Price, Sylvia A. and Wilson, Lorraine M.; 1995. *Patofisiologi Konsep Klinis Proses-Proses Penyakit*, Ed. 4. Alih Bahasa: Peter Anugerah. Jakarta: ECG. Hal 1146
- Putra, Suhartono Taat. 1997. *Biologi Molekuler Kedokteran*. Surabaya: Airlangga University Press. Hal. 150-164
- Robyt, IM., and B.J White, 1987. *Biochemical Technique Theory and Practice*. California: Brook-Cole Publishing company
- Sa'adullah, Imam. 2005. *Uji Reversibilitas Fertilitas Mencit Jantan Setelah Pemberian Fase Air Justicia gendarussa Burm.f*. **Skripsi**. Surabaya: Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.
- Sambrook J, EF Fritsch., T Maniatis. 1989. *Molecular Cloning A Laboratory Manual* 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Starr, Cecie. 1990. *Biology Concept and application* 4th Edition. California: R.R Donnelley and Sons Company. P 208-209
- Tjitrosoepomo G, 1991. *Taksonomi Tumbuhan (Spermatophyta)*. Yogyakarta: Gajah Mada University Press
- Ulfiyanti, Itsna. 2005. *Isolasi Fragmen cDNA Gen Hyaluronidase Hasil Amplifikasi RT-PCR*. **Skripsi**. Surabaya: Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.

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.

Wiknjosastro, 1999. *Ilmu Kandungan*. Jakarta: Yayasan Bina Pustaka Sarwono Prawirohardjo. Hal 534-535



Lampiran 1. Data Penimbangan**Kelompok Perlakuan 1/12 LD₅₀**

No	Kode Mencit	Berat Mencit (g)							
		Minggu I	Minggu II	Minggu III	Minggu IV	Minggu V	Minggu VI	Minggu VII	Minggu VIII
1	1	27	25,5	25,5	27,5	29,5	29,5	29,5	29,5
2	2	28,5	28	28	30,5	30	31,5	31	31
3	3	27	27	29	30,5	30	31	31	31
4	4	26	27	28	29	29,5	30	31	31
5	5	33	33	32	33	33	32,5	323,5	31
6	6	13	13	13	13	13	12,5	13	11,5
7	7	26	27	27	28	27	27,5	28	27
8	8	29,5	31,5	31,5	33	33,5	34,5	34	32,5
9	9	21	19,5	18,5	20	21	23	26	28,5
10	10	19	19,5	20,5	23	24	24,5	26	25

Kelompok Perlakuan 1/17 LD₅₀

No	Kode Mencit	Berat Mencit (g)							
		Minggu I	Minggu II	Minggu III	Minggu IV	Minggu V	Minggu VI	Minggu VII	Minggu VIII
1	1	15	15	21	22	23	25,5	25,5	27
2	2	14	14	20,5	20,5	19,5	20,5	20	19
3	3	14,5	14,5	19	19	17,5	17	16	15
4	4	17	17	-	-	-	-	-	-
5	5	12	12	12,5	13	11	-	-	-
6	6	16	16	18	20	21	21,5	23	22
7	7	16	16	26	26	26	27,5	27,5	26
8	8	20,5	20,5	23	26	25	27	28	27,5
9	9	14	14	16,5	19	20	21	20,5	18,5
10	10	15,5	15	20,5	22,5	23,5	23	21,5	21

Kelompok Kontrol (+)

No	Kode Mencit	Berat Mencit (g)							
		Minggu I	Minggu II	Minggu III	Minggu IV	Minggu V	Minggu VI	Minggu VII	Minggu VIII
1	1	18,5	19,5	19	19,5	22	23	25	24
2	2	29	29,5	31	31	32	33,5	34	33
3	3	21	19,5	20	25	27	28,5	29	27
4	4	21	19,5	20	25	27	28,5	29	27
5	5	27,5	27,5	26	26	27	27	28	27,5
6	6	14	13,5	13,5	16	17	17	17,5	17
7	7	32	30,5	29	30	30	29	29	29
8	8	28	28,5	29	31	31	33	33,5	32,5
9	9	16	16,5	17	21	22	25	27	27,5
10	10	22	22	24	26	28	28	28,5	28

Kelompok Kontrol (-)

No	Kode Mencit	Berat Mencit (g)							
		Minggu I	Minggu II	Minggu III	Minggu IV	Minggu V	Minggu VI	Minggu VII	Minggu VIII
1	1	15,5	15	15	14	14	14	14	13
2	2	22	16	14,5	16	16	15	-	-
3	3	19	15,5	17	19	19	20	21,5	21,5
4	4	15	18,5	19,5	20	20	23	25	25
5	5	15	13,5	15	16	17	18,5	19	20
6	6	16	18,5	19,5	20,5	20	22,5	23	21
7	7	25,5	17,5	21	24,5	24	26	26,5	26,5
8	8	19,5	21,5	24	26	27	29	29	28,5
9	9	17	18	19	22	21	23	23,5	25,5
10	10	20	17	19	21	21	2,5	26	27



Lampiran 2 : Komposisi Larutan dan Buffer-buffer

1. TBE 1x per Liter

100 ml TBE 10x produk dari MP Biomedicals, Inc dicampur aquades steril sampai 1 liter.

2. Buffer lisis

10 mM Triss HCl pH 8

0,1 M EDTA pH 7,4

0,5% SDS w/v

3. *Loading dye* DNA

Mengandung 0,25% *bromophenol blue* dan 40% (b/v) sukrosa dalam air 4° C

4. Larutan sodium asetat 3M

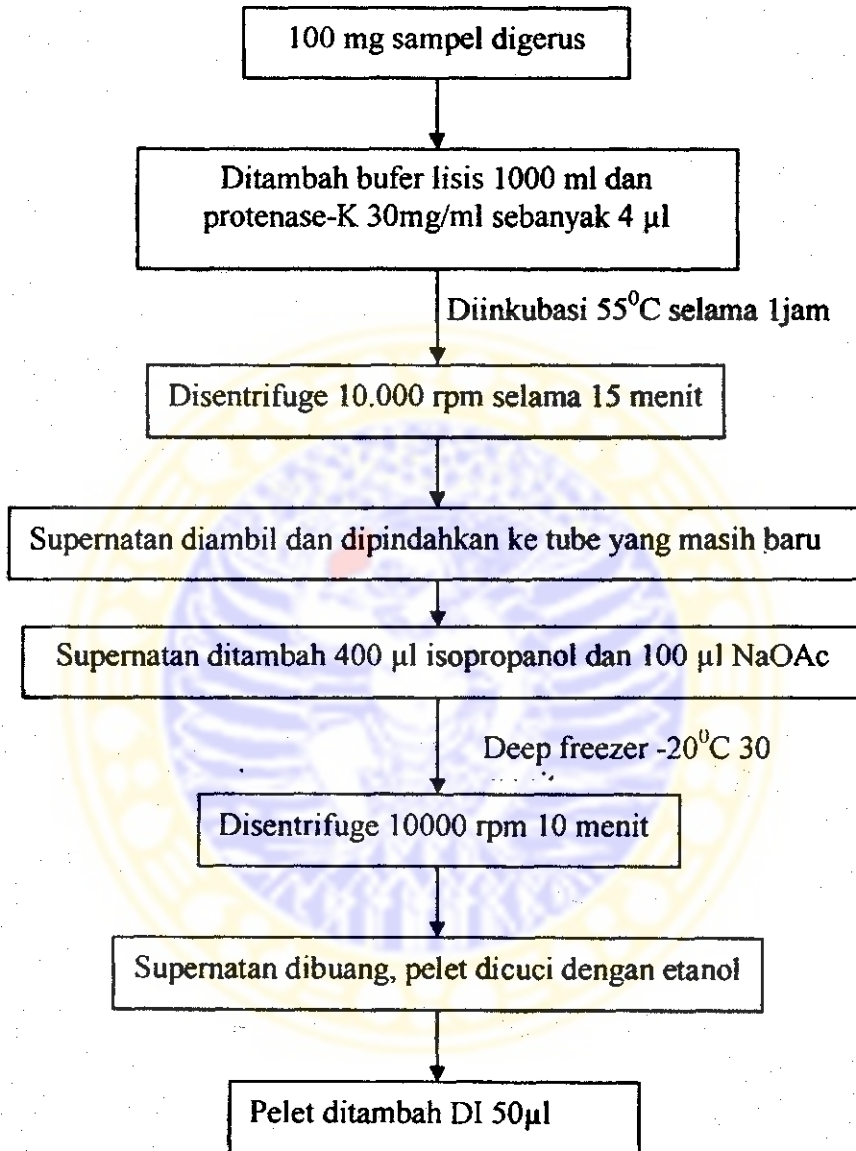
Mengandung 408,1 g sodium asetat.3H₂O dalam 1 liter aquadest

5. 2x PCR Master mix produk dari Fermentas

Taq DNA polymerase 0,05 unit/ μ l

MgCl 4 mM

dNTPs masing-masing 0,4 mM

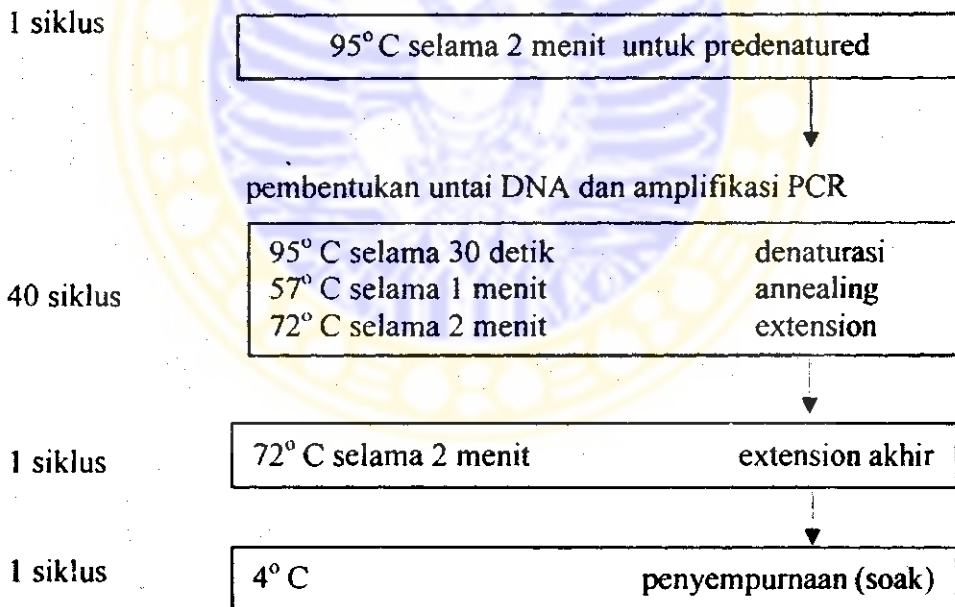
Lampiran 3. Prosedur Isolasi DNA

Lampiran 4. Formula reaksi dan Siklus Reaksi RT-PCR

1. Formula Reaksi RT-PCR

	volume
Sampel total DNA	2 μL
<i>Primer Forward</i>	3 μL
<i>Primer Reverse</i>	3 μL
2x PCR Master Mix	12,5 μL
<i>Nuclease-free Water</i>	4,5 μL
Volume akhir	25 μL

2. Profil Siklus Reaksi PCR



Lampiran 5. Sekuen Nukleotida Gen Hyaluronidase *Mus musculus*

LOCUS AB085677 6042 bp DNA linear ROD 24-FEB-2005
DEFINITION Mus musculus Ph-20 gene for PH-20, complete cds.
ACCESSION AB085677 AB085675 AB085676
VERSION AB085677.2 GI:60683926
KEYWORDS
SOURCE Mus musculus (house mouse)
ORGANISM Mus musculus
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Glires; Rodentia;
Sciurognathi; Muroidea; Muridae; Murinae; Mus.

REFERENCE 1
AUTHORS Baba, D., Kashiwabara, S., Honda, A., Yamagata, K., Wu, Q., Ikawa, M., Okabe, M. and Baba, T.
TITLE Mouse Sperm Lacking Cell Surface Hyaluronidase PH-20 Can Pass Through the Layer of Cumulus Cells and Fertilize the Egg
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 6042)
AUTHORS Baba, T. and Baba, D.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (21-MAY-2002) Tadashi Baba, University of Tsukuba, Institute of Applied Biochemistry; Tennohdai 1-1-1, Tsukuba science city, Ibaraki 305-8572, Japan (E-mail: acroman@sakura.cc.tsukuba.ac.jp, Tel: 81-298-53-6632, Fax: 81-298-53-6632)

COMMENT On or before Mar 10, 2005 this sequence version replaced gi:27544337, gi:27544338, gi:27544339.

FEATURES
source Location/Qualifiers
1..6042
/organism="Mus musculus"
/mol_type="genomic DNA"
/strain="129/SvJ"
/db_xref="taxon:10090"
/sex="male"
/tissue_type="testis"
/dev_stage="adult"

mRNA join(2118..2230,2648..3799,4595..4684,4964..5704)
/product="PH-20"

gene 2118..5458
/gene="Ph-20"

exon 2118..2230
/gene="Ph-20"
/product="PH-20"
/db_xref="MGI:1906281"

5'UTR 2118..2230
/gene="Ph-20"
/db_xref="MGI:1906281"

gap 2471..2570
/estimated_length=unknown

exon 2648..3799
/gene="Ph-20"
/product="PH-20"
/db_xref="MGI:109335"

CDS join(2846..3799,4595..4684,4964..5458)
/gene="Ph-20"
/codon_start=1
/product="PH-20"
/protein_id="BAC55070.1"
/db_xref="GI:27544340"
/db_xref="MGI:109335"
/translation="MGELRFKHLFWGSEFVESCGETFQTVLIFLLIPCSLTVDYRAAPIL
SNTTFLWIWNVPTERCVGNVNDPIDLSPFSLIGSPRKTATGQPVTLFYVDRGLGLYPHI
DANQAEHYGGIPQRGDYQAHLRKAKTDIEHYIPDDKLG LAI IDWEEWRPTWLRNWKPK
DNYRNKSIELVQSTNPGLSITEATQKAIQQFEEAGRKFMEGTLHLGKFLRPNQLWGYI
LFPDCYNNKFDQPKYDGCQCPAVEKRNNDNLKWLKASTGLYPSVYLKDLKSHRQATL
YVRYRVVEAIRVSKVGNASDPVPIFVYIRLVFTDRTSEYLLDDLVNTIGEIVALGTS
GIIWDAMSLAQRAGCPILHKYMQTTLPYIVNVTLAAKMCSQTL CNEKGMCSRKE"

SSDVYLHLNPSHFDIMLTETGKYEVLGNPRVGDLEYFSEHFKCSCFSRMTCKETS DVK
 NVQDVNVCVGDNVCIKAKVEPNPAFYLLPGKSLFLPMTTLGHVLYHLPQDIFVFPKTL
 VSTP"

exon 4595..4684
 /gene="Ph-20"
 /product="PH-20"
 /db_xref="MGI:109335"
 gap 4853..4952
 /estimated_length=unknown
exon 4964..5704
 /product="PH-20"
 /db_xref="MGI:109335"

ORIGIN

```

1 atcctgtgtg tgtccttgcg ggtgtccaga gactccctgg gccagggacc caggtgctgc
61 agttggccag aagggcgaag ttttactttt ttaaaattaa ctttatttaa ctatatttat
121 ttacttttta ttaaaaatag tttttttaca taatatattc tgttcacact tctctccctc
181 caactcctcc cagatttctc atatacccaa cttcatacc tttctttttt tctctcttta
241 aaaaaaaaag aagagcaaaa aaccttcaaa ctacaacacc accaacaaca aaaataacaa
301 cagaatatac cccccacact taagaaaca aaacaaaaca aaacaccagg gatcattaaa
361 agtgaaacca aagtatacaa gcaaaagacc aataatataa aaagtgttca aacaaggtaa
421 tttgagactc aaagtctaca aaaattgtac tgagtttggt tagtgttggc catttattgc
481 tgggtaaggg ccttacccctt aagtgtgttt actataccta gtgagactcc actggagaaa
541 actaagcttt cctttgctag tgttaattgg agctagcttc tcagttaggt gtggggagcca
601 tttctgctc cccctctgag tacttggacc ctgtctgact tgaacatgta cagcccttat
661 gcatgctgtc atagtcttta taaattcatt tgtttgtcca tctgtttgtg tctggaagat
721 tctatttctc tggagtcatt catccccctc ggctcttaaa gtctttgcat tctctcttac
781 acatagctcc ttgacccttg aggggagggg tttttgatgg agacatctca tttaacactg
841 ggtgtttcaa agtctcttat tctcagcata cagtccagtt gtgggtcttc ccactacta
901 taagaggctt ctctgatgaa ggttgagcaa ggcagggatc ctttaccaga tgtgtaattg
961 gtaaaagatc tttccattc tgtgtcctgc tgcctttgtg aatagacagt gtcctttgtc
1021 atacagaaga agttttattt ttcattcagg gtacggattt gatattagat gatgtgtggg
1081 tcaagggaca ttcttactaa caatataagg atttattggt ttattatatt tattgttatt
1141 gttgtttatt agacttattc agcactttcc atgtgtcaga tatagggggg gagaataagt
1201 atttttttaa ataccctttt taggttcac ttagggaatga attgaaataa ggcagattaa
1261 tataagaaaa acaggttaagg tgagctacgc actctggcca actccagagc tttgatcttt
1321 taatgtacgt attttagaat taggcagcct agtcagggga agagctaaat tattccatgt
1381 tctgtgattg gtcctgtaac tctgcatatt tagcagaaac ataatacata cacttttata
1441 acaactttgg gtctgtaatc aagaatttga aataacgctt ttgaaaccca atcctagggg
1501 ttttaattaca ttattgtcct tgcctaataa aaatagaaaa gccaaagtcta ttttcccata
1561 aaaagcaaat caaaaatctt tcaactgtcat cttctgaaca ggaacacagc ttgtgtttca
1621 ctggagattt tcttagcatt gaagtttcaa caggagggaa ggtagcagga tgcactcttc
1681 tggtcacaaa tgctatccag ttttaataca accatcttaa cagtagttct actagatgct
1741 cactgtgagt atctagtaga attcagggg tgaaagctaa tgacataatg tttcatgcta
1801 cctacatgct gcaattactg caaggatttg ttaatatggc aaggttttgg gttgtatgat
1861 ttttgtgatt aattcagaaa acaatacagt taaaaggaga gtcacatgtc tgaaagctga
1921 atagattgag aaaagtatat cagccagact tcatagggaa gaagtgaatc aggaattttt
1981 tgtttccctt gaaggatgg gagagttgaa ggaagagggg aaggggtggt ctgtgagctt
2041 gggagaatca gttcactttg tgatgtcacc tgttccctaga atcttctaga ttgtctggc
2101 tttccctctg gcttattcta agagtgtctg agtagattta gattgaccat ggctcacatg
2161 aattaagaag tgtttctttt gttatgatgg agatgcagat ggttagcagg tatttttaagt
2221 tttccagcaag gtaacagtat acatgctttt tataaaactc ttgattttct ctctctctt
2281 tttttcttta ggtgaaagtg atgaaagaat tgtcactcag tggaaaggtat attttctcac
2341 tgatgcccct actgtgttac agttgtcata attttcaagt ggtagtgcca aagtatccat
2401 ttaagcccct ttaaaatcca ttttaactcag gaactcaaga ttcaagatg ctaggataga
2461 accaattgac
[ gap 100 bp] Expand Ns
2571 taaactcctt
2581 gcatgaaatt agaattgtaa accttctcct tgtgaataca gtgaattcca tattgtctc
2641 ttttcagttc tggatgattt aacttgtctc aagatattcc tgaatgttaa cacaggaaga
2701 agaactctca gtgtaaatca gtcaccatcc attcactctcc ctcagtagcc tcatgccaca
2761 gcttttctaa tcttttgcct caaatactgg acagaccaca gttgtgtaag aggaataagt
2821 gctactctag taattattct ctgtgatggg agagttgaga tttaaagacc tcttttgggg
2881 gagctttggt gaatctgggg gcacattcca aacagtgtta atcttctctt tgattccatg
2941 ctcttgact gtggattata gggcagcacc aattttatca aatacaactt tcttttggat
3001 ttggaaatgc ccaactgaac gttgtgtagg aaatgttaat gatccaatag atctgagctt
3061 cttctcttta attggaagcc cccggaaaac tgccacaggg caacctgtca cattatttta
3121 tgttgatcga cttggtttgt atcctcacat agatgcaaac caagcagaac attatggagg
3181 aatacctcag aggggagatt atcaagctca tttgcgcaaa gctaaagact acatagagca
3241 ttacattcca gacgacaaat tgggcttagc tatcattgac tgggaagaat ggaggctac
3301 ctgggtgaga aactggaac ctaaggataa ctacaggaat aagtctattg aattgttcca
3361 atcaactaat ccaggactta gtatcacaga agccaccagc aaagccatcc aacaatttga
    
```

3421 agagggcagga aggaagttta tggagggaac ttacacctg gggaaattcc ttcgaccaa
 3481 ccagctatgg ggttattatc ttttccctga ttgttataac aataagtttc aagaccctaa
 3541 gtagtgatgg cagtgccctg ctgtggaaaa gaaaagaat gataatctta aatggctatg
 3601 gaaagcaagc accggccttt acccatctgt ctatttgaag aaagacttga agtcccatcg
 3661 caaagctacc ctctatgtcc gctaccgagt tgtggaagct atcagagtgt ccaaggttgg
 3721 gaatgcatcg gatccagtcg cgatttttgt ctatatccgt cttgttttta ctgatcgta
 3781 ctctgaatac cttctagagg taacaagca tctctgacct agtatccata aatacagttt
 3841 actgaaaatt aatgttttga aaggacatga atttagattt gtatatcaact taagaatgta
 3901 aacagggctt gttctatatt ctoccaaaca gatagaatta ctacactttt agtgcctatt
 3961 gtagttatat gacgtgtag cagccatgga gaaccataaa atgctgacaa tattttaacc
 4021 gttttatatt tattttatgg atattgccag aagaataat tataatagcc tcttttttaa
 4081 tagtaaaagga atgccccaaag agtctgattc acaaaccaaa gaacatacag ggtcggacct
 4141 aggcctcccc gcataatgtg agtagatgtg cagcttggtc ttcattgtgg tcccgaacaa
 4201 ctggaccagg gctgtccca aaagctgttg cctgtacgtg caataagttc tctagctgg
 4261 gctgccttgt ctgacctcag tggagaggaa gcacctagcc tcacagagac ttgaagtact
 4321 agtgtgtgtg tgtgtgatg tgtgtgatg tgtggagacc cagggggctc acctgctcag
 4381 aggataagat gaaggggaaa tgggtgaagg attgtgggaa ggggtgataa ggagcgggca
 4441 gtcagcagga tgaaaatgaa taagcaaaaa aaaaaaaaaag taaaagataa acatttaaag
 4501 tattattgat gggttagcgt gcttgccttg ttggtgtgtg cctgtgtaaa tgcttcaaat
 4561 tattacttcc tgctaactct atctcctctg ccaggatgac ctgtgtaata caattgtgta
 4621 aattgttgct ctgggtacct ctggaattat aatatgggat gctatgagtt tagcacaacg
 4681 tgcggtaagt tgaattggtt ggaatatgat aaaaataatt ttataactaa agtttttgga
 4741 gatcgtattt agaaaagtac tctgcttaag tattaagcac tatattaatt actgtgtgtg
 4801 gcaaacatta tatgcgcaga atctgcccag tcacgttgtg ttgcactctt ta

[gap 100 bp] Expand N5

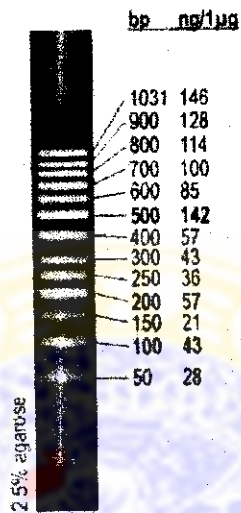
4953 ttatcata caggcaggtt gcccaatcct
 4981 acataaatac atgcagacga cctgaatcc ctacatagtc aatggtacc tagcagccaa
 5041 aatgtgcagc caaacacttt gtaatgagaa aggcattggt tcaagaagaa aagaaagttc
 5101 agatgtatat cttcacttga acccaagtca ttttgatatt atgttaacgg aaactggaaa
 5161 gtacgaagtt cttggcaacc ccagggttgg agacttagaa tacttttctg aacatttta
 5221 atgcagctgt tttagcagaa tgacatgtaa ggagacatct gatgtaaaaa atgtacaaga
 5281 cgtgaatgtg tgcgtcgggt acaatgtttg tataaaagcc aaggtagaac ccaaccagc
 5341 cttctacctc ctacctggca aaagccttct atttatgaca acacttggtc atgtgctgta
 5401 ccattctgcca caagatattt ttgttttcc acggaagaca ctagttagta ctcttagtt
 5461 ttctctacc acagcgttgg atgtattatt attattattt ttgcaggcct cagtaatttg
 5521 ggattatgaa tgggattcta ttttaccaaa gtaattcaat ttttataatc aagattctat
 5581 ttttgagttt caaagagaaa ttatatattc ttctaccaaa gattgattac aagcaaggct
 5641 acttagggat tagttttggt ttaaagagaa tgaagactga ataaaaataa atcactagaa
 5701 aattaatgtg ctttcagtag ttggtcatta ctttcaatat gatcaataa atatgaagat
 5761 aaaaacttct tttttaaaa atggaatgcc tcaagtctgt tagtttacat gtagaactgt
 5821 tttttagtta cttcatgttg aaaaaatttt ataactttt aacaaatagc tcaagtttaa
 5881 aatgataatt ctatttttgt agcatttaa tatattttca gtatttagtt ttataaagta
 5941 ttctaatttt cttttcattc ctgggtgtc aaacttaatt tctatactgt aaaatgctta
 6001 tgcacatc cctgcctgc cttaggtatt tatgaagcat ta

Lampiran 6. Sekuensing Fragment DNA Gen Hyaluronidase Testis Mencit

```

0.....gcttagctatcattgactgggaagaatggaggcctacctggttgaga
3311      3321      3331      3341      3351      3361
aactgaaacctaggataactacaggaataagtctattggaattggtccaatcaactaat
3371      3381      3391      3401      3411      3421
ccaggacttagtatcacagaagccaccagaaagccatacaacaatttgaaggcagga
3431      3441      3451      3461      3471      3481
aggaagtttatggaaggaaactttacacctggggaattccttcgaccaaaccagctatgg
3491      3501      3511      3521      3531      3541
ggttattatctatttctgattgttataacaataagtttcaagaccctaatgatgatggg
3551      3561      3571      3581      3591      3601
cagtgcctgtgtggaaaagaaaagaatgataatcttaaatggctatggaaagcaagc
3611      3621      3631      3641      3651      3661
accggcctttacctatctgtctatttgaagaaagacttgaagtcccatcgacaagctacc
3671      3681      3691      3701      3711      3721
ctctatgtccgctaccgagtgtggaagctatcagagtgccaaggttgggaatgcatcg
3731      3741      3751      3761      3771      3781
gatccagtcctgatttttcttatatccgtcttgtttttactgatcgtacctctgaatac
3791      3801      3811      3821      3831      3841
cttctagaggtaaacaagcatctctgacctagtatccataaatacagtttactgaaaatt
3851      3861      3871      3881      3891      3901
aatgttttgaaaggacatgaatttagatttgtatatcacttaagaatgtaaacagggctt
3911      3921      3931      3941      3951      3961
gttctatattctcccaacagatagaattactacactttttagtgcttattgtagtatat
3971      3981      3991      4001      4011      4021
gacgtgtagcagccatggagaaccataaaatgctgacaatattttaaccgttttat
4031      4041      4051      4061      4071      4081
tattttatggatattgccagaagaaataattataatagcctcttttttaatagtaaagga
4091      4101      4111      4121      4131      4141
atgcccaaagagctctgattcacaaccaaagaacatacagggtggacctaggcctccc
4151      4161      4171      4181      4191      4201
gcataatgttagtagatgtgcagcttggcttccatgtgggtcccgaacaactggaacagg
4211      4221      4231      4241      4251      4261
ggctgtcccaaaagctgttgcctgtactgtgcaataagttcttctagctgggctgcctgt
4271      4281      4291      4301      4311      4321
ctgacctcagtgagaggaagcacctagcctcacagagacttgaagtactagtgtgtgtg
4331      4341      4351      4361      4371      4381
tgtgtgtatgtgtgtgtatgtgtggagaccaggggctcacctgctcagaggataagat
4391      4401      4411      4421      4431      4441
gaaggggaaatgggtgaaggattgtgggaaggggtgataaggagcgggcagtcagcagga
4451      4461      4471      4481      4491      4501
tgaaaatgaataagcaaaaaaaaaaaaaagtaaaagataaacatttaagtattattgat
4511      4521      4531      4541      4551      4561
gggttagcgtgcttgccttgggtgtgtgcctgtgtaaatgcttccaattattacttcc
4571      4581      4591      4601      4611      4621
tgctaactctatctcctctgcccaggatgaccttgtgaatacaattggtgaaattgttgc
4631      4641      4651      4661      4671      4681
ctgggtacctctggaattataatattgggatgctatgagtttagcacaacgtgcggtaaat
4691      4701      4711      4721      4731      4741
tgaattgggtggaaatagataaaaataattttatacttaaagttttggagatcgtattt
4751      4761      4771      4781      4791      4801
agaaaagtactctgcttaagtattaagcaactatattaattactgtgggtgggcaaacatta
4811      4821      4931      4841      4851
tatgcgagaatctgccagtcacgttgtgttgcattttta[gap100bp]ExpandNs
4961      4971      4981      4991      5001
ttatcatacagcagggttgcctaacataaatacatgcagacgacctgaaatcc
5011      5021      5031      5041
ctacatagtcattgtaccctagcagcaaaaatgtgc.....6001

```

Lampiran 7. Marker GeneRuler™ 50bp DNA Ladder

Lampiran 8. Persamaan regresi marker

Marker (GeneRuler™ 50bp DNA Ladder)

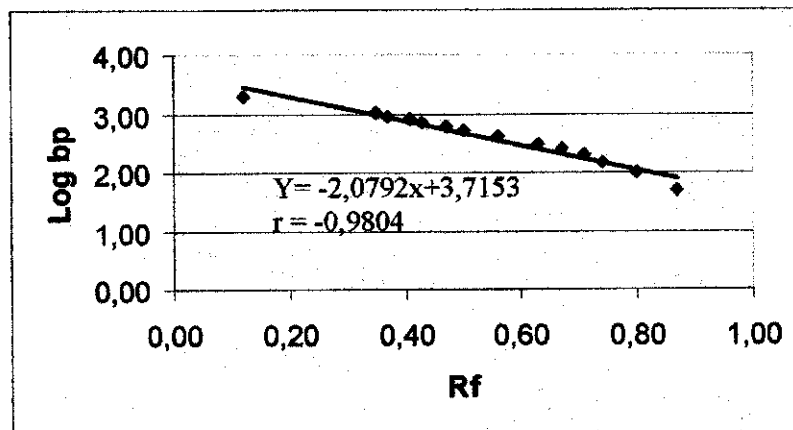
Rf (X)	Log bp (Y)	bp (basepair)
0,12	3,30	2000
0,35	3,01	1031
0,37	2,95	900
0,41	2,90	800
0,43	2,85	700
0,47	2,78	600
0,50	2,70	500
0,56	2,60	400
0,63	2,48	300
0,67	2,40	250
0,71	2,30	200
0,74	2,18	150
0,80	2,00	100
0,87	1,70	50

Persamaan regresi marker DNA

$$Rf = \frac{\text{Jarak migrasi band DNA}}{\text{Jarak migrasi warna}}$$

Jarak migrasi warna 4,50 cm

Kurva persamaan regresi marker DNA



Lampiran 9 : Pembuatan Gel Agarosa 1% (b/v)

Prosedur pembuatan gel agarosa 1% (b/v) adalah sebagai berikut :

1. 0,2 gram bubuk agarosa dilarutkan dalam 20 ml TBE (gel agarosa 1%).
2. Larutan dipanaskan sampai bening (90°C), kemudian didinginkan sampai hangat (70°C).
3. Larutan dituang pada bak elektroforesis dan didiamkan hingga membentuk gel.
4. Dipipet 2 μl loading dye diletakkan pada kertas film ditambahkan 5 μl sampel, kemudian diinjeksikan sumuran.
5. Gel dirunning pada 80 Volt, 40 mA, selama 60 menit.
6. Setelah 60 menit, rendam gel hasil running dalam EtBr selama 20 menit.
7. Gel diletakkan di atas transiluminator dan dilihat band DNA.

Note : Untuk pembuatan gel agarose 2% prosedur yang dilakukan sama, yang membedakan adalah jumlah agarose yang digunakan yaitu 0,4 g

Lampiran 10 : Perhitungan Konsentrasi DNA Total Hasil Spektrofotometri

Sampel sebanyak 5 μL yang ditambah aquades steril sebanyak 995 μL kemudian diukur dengan spektrofotometer UV pada λ 260 nm dan 280 nm maka didapatkan nilai absorbansi sebagai berikut :

No.	Sampel	A_{260}	A_{280}
1	Kontrol (-)	0,725	0,471
2	Kontrol (+)	0,489	0,293
3	1/12 LD ₅₀	0,470	0,298
4	1/17 LD ₅₀	0,565	0,330

Perhitungan konsentrasi DNA: $A_{260} \times \text{Faktor Pengenceran} \times 50 \mu\text{g/ml}$

Kontrol negatif	: 0,725 x 200 x 50 $\mu\text{g/ml}$: 7250 $\mu\text{g/ml}$
Kontrol positif	: 0,489 x 200 x 50 $\mu\text{g/ml}$: 4890 $\mu\text{g/ml}$
Perlakuan 1/12 LD ₅₀	: 0,470 x 200 x 50 $\mu\text{g/ml}$: 4700 $\mu\text{g/ml}$
Perlakuan 1/17 LD ₅₀	: 0,565 x 200 x 50 $\mu\text{g/ml}$: 5650 $\mu\text{g/ml}$

Perhitungan kemurnian DNA: A_{260} / A_{280}

Kontrol negatif	: 0,725/0,471	: 1,54
Kontrol positif	: 0,489/0,293	: 1,67
Perlakuan 1/12 LD ₅₀	: 0,470/0,298	: 1,64
Perlakuan 1/17 LD ₅₀	: 0,565/0,330	: 1,71