

**STUDI PAPARAN HORMON INHIBIN B TERHADAP PROFIL  
HORMON TESTOSTERON DAN JUMLAH SEL LEYDIG PADA  
*Rattus norvegicus***

**SKRIPSI**

**Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains  
dalam bidang Biologi**

Oleh:

**Noer Muhammad Dliyaul Haq  
0810913044**



**JURUSAN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2012**

**LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI**

**STUDI PAPARAN HORMON INHIBIN B TERHADAP PROFIL  
HORMON TESTOSTERON DAN JUMLAH SEL LEYDIG PADA  
*Rattus norvegicus***

oleh

**Noer Muhammad Dliyaul Haq**

**0810913044**

**Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji pada tanggal  
18 Juli 2012 dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh  
gelar Sarjana Sains dalam bidang Biologi**

**Pembimbing I**

**Pembimbing II**

**Dr. Agung Pramana Warih M., M.Si  
NIP. 19650616-199111-1-001**

**Prof. Dr. drh. Aulanni'am, DES  
NIP. 19600903-198802-2-001**

**Mengetahui,  
Ketua Jurusan Biologi  
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya**

**Widodo, S.Si., M.Si., Med.Sc., Ph.D.  
NIP 19730811 200003 1 002**

## LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Noer Muhammad Dliyaul Haq  
NIM : 0810913044  
Jurusan : Biologi  
Penulis Skripsi Berjudul :

### STUDI PAPARAN HORMON INHIBIN B TERHADAP PROFIL HORMON TESTOSTERON DAN JUMLAH SEL LEYDIG PADA *Rattus norvegicus*

Dengan ini menyatakan bahwa

1. Skripsi ini adalah benar-benar karya saya sendiri, dan bukan hasil plagiat dari karya orang lain. Karya-karya yang tercantum dalam daftar pustaka skripsi ini semata-mata digunakan sebagai acuan atau referensi.
2. Apabila di kemudian hari diketahui bahwa skripsi saya merupakan hasil plagiat, maka saya bersedia menanggung akibat dari keadaan tersebut.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 18 Juli 2012

Yang menyatakan,

(Noer Muhammad Dliyaul Haq)

NIM. 0810913044

## PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

Skripsi ini tidak dipublikasikan namun terbuka untuk umum dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada penulis. Daftar pustaka diperkenankan untuk dicatat, tetapi pengutipannya hanya dapat dilakukan seizin penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutkannya.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



## Studi Paparan Hormon Inhibin B Terhadap Profil Hormon Testosteron dan Jumlah Sel Leydig pada *Rattus norvegicus*

Noer Muhammad Dliyaul Haq, Agung Pramana W. Marhendra, Aulanni'am, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya.

### ABSTRAK

Sistem reproduksi pada pria merupakan target yang potensial untuk perkembangan obat kontrasepsi baru. Salah satu target dalam kontrasepsi pria adalah mengganggu produksi spermatozoa, tetapi tidak mempengaruhi maskulinitas dan libido pria. Inhibin B merupakan hormon polipeptida gonadal dimerik yang diproduksi oleh sel Sertoli dan secara selektif menghambat sekresi FSH melalui mekanisme umpan balik negatif, sehingga diharapkan dari mekanisme tersebut dapat mengganggu proses spermatogenesis tanpa mengganggu produksi testosteron. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh paparan inhibin B pada tikus (*Rattus norvegicus*) jantan terhadap profil hormon testosteron dan jumlah sel Leydig. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus diinjeksi dengan inhibin B secara *Intra Muscular* setiap 12 hari dan diulang sebanyak lima kali, kemudian tikus dibedah dan diambil testis dan darahnya. Testis digunakan untuk preparat dengan pewarnaan *Hematoxylin-Eosin* untuk menghitung jumlah rerata sel Leydig dan serum diambil dari darah untuk pengukuran kadar testosteron. Perlakuan pemberian inhibin B pada tikus tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan terhadap rata-rata jumlah sel Leydig pada testis. Rata-rata jumlah sel Leydig pada perlakuan inhibin B sebanyak  $22.53 \pm 0.50$ , sedangkan pada kelompok kontrol sebanyak  $23.07 \pm 0.81$ . Kadar testosteron pada serum tikus perlakuan inhibin B tidak menunjukkan perbedaan signifikan dengan kelompok kontrol, dengan kadar testosteron pada kelompok perlakuan inhibin B adalah  $2.339 \pm 0.053$  ng/mL, sedangkan kadar testosteron pada kelompok kontrol adalah  $2.399 \pm 0.074$  ng/mL.

Kata kunci: Inhibin B, *Rattus norvegicus*, sel Leydig, testosteron.

## Study Of Inhibin B Exposure Against Hormone Profiles of Testosterone and the number of Leydig cells in *Rattus norvegicus*

Noer Muhammad Dliyaul Haq, Agung Pramana W. Marhendra, Aulanni'am, Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Brawijaya University.

### ABSTRACT

Male reproductive system is a potential target for the development of new contraceptive drugs. One of the male contraceptive targets are annoying sperm production, but does not affect masculinity and male libido. Inhibin B is a gonadal dimeric polypeptide hormone produced by Sertoli cells and selectively inhibits FSH secretion via negative feedback mechanism, which is expected from these mechanisms can interfere with the process of spermatogenesis without affecting testosterone production. The purpose of this study was to determine the effect of inhibin B exposure in rats (*Rattus norvegicus*) towards the male hormone testosterone profiles and the number of Leydig cells. The method used in this study were mice injected Intra Muscular with inhibin B in every 12 days and was repeated five times, then dissected and rat testis and blood taken. Testis used for preparations by Hematoxylin-eosin staining to calculate the mean number of Leydig cells and serum from blood taken for measurement of testosterone levels. Provision of inhibin B treatment in rats did not show a significant difference to the average number of Leydig cells in the testis. The average number of Leydig cells in the treatment of inhibin B is  $22.53 \pm 0.50$ , whereas in the control group is  $23.07 \pm 0.81$ . Testosterone levels in serum inhibin B treated mice showed no significant differences with control, testosterone levels of inhibin B in the treatment group was  $2.339 \pm 0.053$  ng / mL, whereas levels of testosterone in the control group was  $2.399 \pm 0.074$  ng / mL.

Key words: Inhibin B, *Rattus norvegicus*, Leydig cells, testosterone.



## KATA PENGANTAR

Puji syukur Alhamdulillah dipanjatkan kepada Allah SWT, karena atas segala rahmat dan hidayahNya sehingga skripsi ini dapat diselesaikan. Sholawat serta salam semoga tetap terlimpahkan kepada Rosulullah Muhammad SAW, beserta keluarganya. Skripsi ini adalah bagian dari rangkaian penelitian hibah pasca sarjana dengan judul **Studi Paparan Hormon Inhibin B Terhadap Profil Hormon Testosteron Dan Jumlah Sel Leydig Pada *Rattus norvegicus*** yang diketahui oleh Prof. Dr. drh. Aulanni'am, DES.

Terima kasih disampaikan kepada beberapa pihak yang telah ikut membantu dalam penyelesaian skripsi ini, diantaranya:

1. Bapak Dr. Agung Pramana Warih M., M.Si. dan ibu Prof. Dr. drh. Aulanni'am, DES. selaku pembimbing atas segala bimbingan, nasehat, ilmu dan kesabaran selama penelitian ini.
2. Bapak Drs. Aris Soewondo, M.Si. dan Bapak Dr. Ir. Moch. Sasmito Djati, MS. selaku penguji skripsi ini atas seluruh saran-saran yang diberikan untuk perbaikan skripsi ini.
3. Keluargaku tersayang, Aba Yusuf, Ummy Nadliroh, Adik Akbar A'thoni elhaq, Rokha illiyyin, Zalfina illiyyin, Nenek Hj. Rohmah, Kakak Ikhwan Kristanto, S.Si. yang selalu memberikan doa dan motivasi.
4. Seluruh dosen pengajar, staf TU dan laboran Jurusan Biologi, FMIPA, UB atas segala bantuan dan ilmu yang telah diberikan selama ini.
5. Bapak Harmadji, dan rekan Laboratorium Biokimia, antara lain Dedi K, S.Si., M.Si, M. Hilman, S.Si., M.Si, Santi, S.Si., M.Si, Anton Muji Nugroho, S.Si, Akbar Farid H., S.Si, Rizka N., S.Si.; dan Biologi Molekuler antar lain Susi, S.Si atas masukan yang bermanfaat dan dukungannya selama ini.
6. Keluarga besar HIMABIO UB atas persaudaraan, pengalaman dan semua kenangan indah yang telah dilalui bersama dan tidak akan mudah untuk dilupakan.
7. Teman-teman Biologi 2008 "BIG" terutama Ikhwan Kristanto, S.Si., Ahmad Soni, S.Si., Arik Arubil S.Si., Anggun Indah B.D., S.Si., Bayu Agung Prahardika, S.Si., Agung Putra Purwanto, S.Si., Arie Raditya Atmaka, S.Si., M. Qomaruddin, S.Si.; dan

Ardyah Ramadhina Irsanti Putri atas motivasi, persahabatan, kekompakan dan kerjasamanya selama ini.

8. Teman-teman M.V.M.N.T Malang terutama Hendri T.P. Handoko, Muhammad Zaelani, Yuli Sumpil yang selalu mendukung dalam menyelesaikan skripsi ini.
9. Beberapa pihak yang tidak disebutkan, terima kasih atas segala bantuannya selama penelitian ini dilakukan.

Tidak ada di dunia ini yang sempurna dan disadari bahwa skripsi ini kurang sempurna, sehingga diharapkan saran dan kritik dari pembaca yang bersifat membangun. Semoga skripsi ini bermanfaat bagi semua pihak.

Malang, 18 Juli 2012

Penulis





## DAFTAR ISI

<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	<b>i</b>
<b>LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI</b> .....	<b>ii</b>
<b>LEMBAR PERNYATAAN</b> .....	<b>iii</b>
<b>PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI</b> .....	<b>iv</b>
<b>ABSTRAK</b> .....	<b>v</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>vi</b>
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	<b>vii</b>
<b>DAFTAR ISI</b> .....	<b>ix</b>
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	<b>xi</b>
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	<b>xii</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	<b>xiii</b>
<b>DAFTAR SINGKATAN DAN SIMBOL</b> .....	<b>xiv</b>
<b>BAB I PENDAHULUAN</b> .....	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	3
1.3 Tujuan.....	3
1.4 Manfaat.....	3
<b>BAB II TINJAUAN MASALAH</b> .....	<b>4</b>
2.1 Perkembangan Kontrasepsi Pria.....	4
2.2 Struktur dan Peran Inhibin B dalam Sistem Reproduksi Pria .....	6
2.3 Regulasi Hormonal Pada Spermatogenesis .....	8
2.4 Struktur dan Peran Hormon Testosteron dalam Reproduksi Pria .....	10
2.5 Sel Leydig .....	14
2.6 Kerangka Konsep Penelitian .....	16
<b>BAB III METODE PENELITIAN</b> .....	<b>19</b>
3.1 Waktu dan Tempat .....	19
3.2 Metode Penelitian.....	19
3.3 Prosedur Penelitian.....	19
3.3.1 Perlakuan hewan coba .....	19
3.3.2 Pengambilan organ testis dan serum .....	20
3.3.3 Pembuatan gambar histologi .....	20
3.3.3.1 <i>Embedding</i> testis.....	20
3.3.3.2 Pembuatan preparat testis.....	20
3.3.4 Pewarnaan preparat testis menggunakan <i>Hematoxylin-</i> <i>Eosin (H&amp;E)</i> .....	20
3.3.5 Penghitungan sel Leydig di preparat testis.....	21

3.3.6 Pengukuran kadar hormon testosteron dengan metode ELISA .....	21
3.4 Analisis Data .....	22
3.5 Skema Kerja .....	23
<b>BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>24</b>
4.1 Jumlah sel Leydig pasca pemberian inhibin B .....	24
4.2 Profil hormon testosteron pasca pemberian inhibin B .....	27
<b>BAB V KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>31</b>
5.1 Kesimpulan.....	31
5.2 Saran.....	31
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>32</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>37</b>



## DAFTAR GAMBAR

2.1 Target potensi kontrasepsi pada pria .....	5
2.2 Pembentukan struktur inhibin .....	6
2.3 Spermatogenesis .....	8
2.4 Jalur Persinyalan testosteron pada sel Sertoli .....	11
2.5 Jalur persinyalan FSH pada sel Sertoli .....	12
2.6 Histologi testis dengan pewarnaan H&E .....	15
2.7 Kerangka konsep penelitian .....	18
4.1 Rata-rata jumlah sel Leydig setelah pemberian inhibin B .....	24
4.2 Sel Leydig pada preparat jaringan testis tikus ( <i>Rattus norvegicus</i> ) pewarnaan H&E .....	25
4.3 Kadar hormon testosteron setelah pemberian inhibin B .....	28
L.5 Kurva Standar Testosteron .....	42
L.8 Sertifikat Laik Etik Penelitian .....	45



## DAFTAR TABEL

L.5 Kurva Standar Testosteron.....	42
L.6 Hasil Uji <i>t</i> -independent untuk pengaruh pemberian inhibin B terhadap rata-rata jumlah sel Leydig .....	43
L.7 Hasil Uji <i>t</i> -independent untuk pengaruh pemberian inhibin B terhadap kadar testosteron .....	44

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



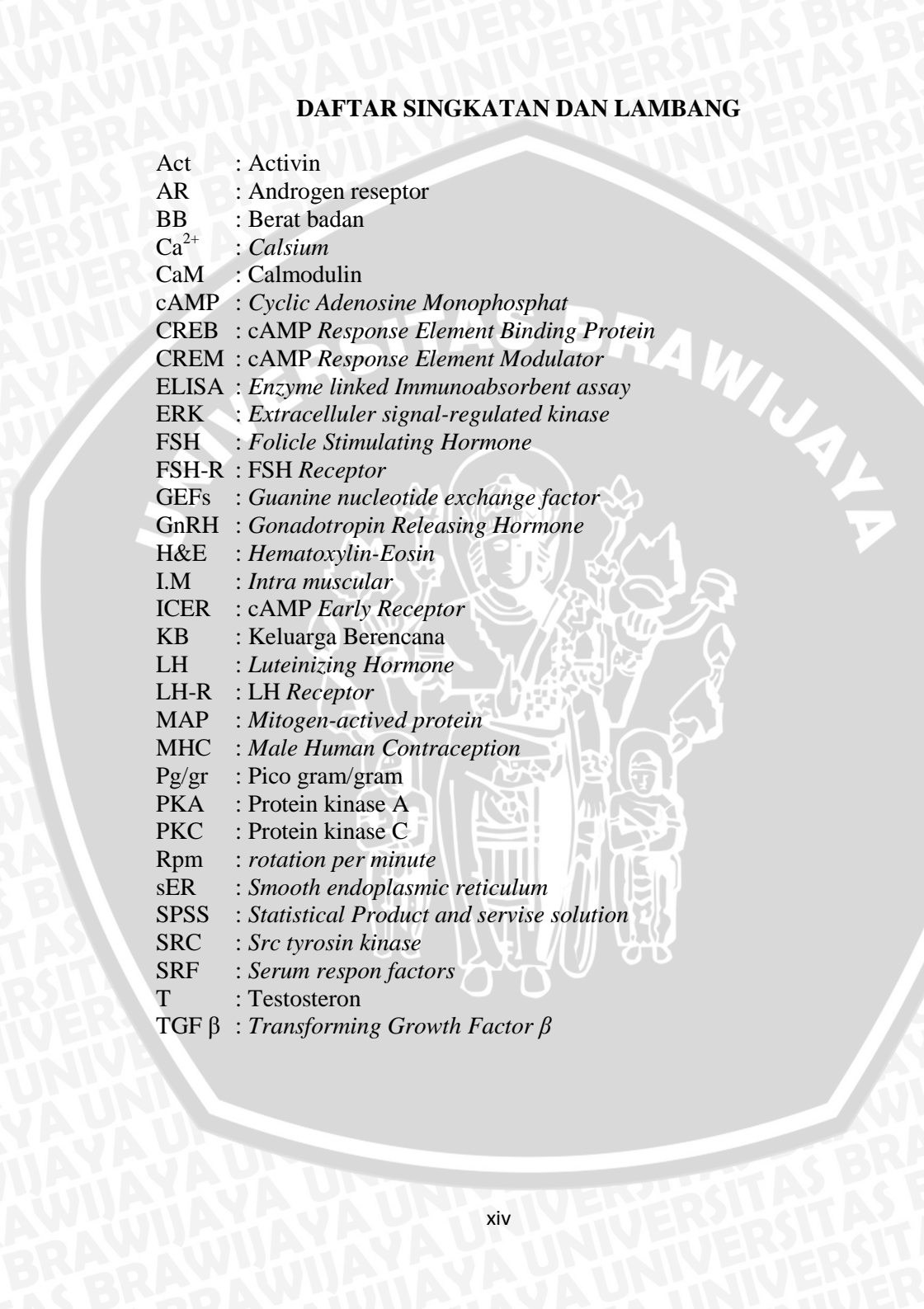
## DAFTAR LAMPIRAN

<b>Lampiran 1.</b> Komposisi Bahan .....	37
<b>Lampiran 2.</b> Diagram Alir Pengukuran Testosteron dengan <i>Testosteron ELISA Kit</i> .....	38
<b>Lampiran 3.</b> Diagram Alir Pewarnaan Hematoxylen dan Eosin (H&E).....	39
<b>Lampiran 4.</b> Digram Alir Penghitungan Sel Leydig pada Preparat Testis.....	41
<b>Lampiran 5.</b> Kurva Standart Testosteron.....	42
<b>Lampiran 6.</b> Hasil Uji t-independent untuk pengaruh pemberian inhibin B terhadap rata-rata jumlah sel Leydig.....	43
<b>Lampiran 7.</b> Hasil Uji t-independent untuk pengaruh pemberian inhibin B terhadap kadar testosteron .....	44





## DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG



Act	: Activin
AR	: Androgen reseptor
BB	: Berat badan
Ca <sup>2+</sup>	: <i>Calsium</i>
CaM	: Calmodulin
cAMP	: <i>Cyclic Adenosine Monophosphat</i>
CREB	: <i>cAMP Response Element Binding Protein</i>
CREM	: <i>cAMP Response Element Modulator</i>
ELISA	: <i>Enzyme linked Immunoabsorbent assay</i>
ERK	: <i>Extracelluler signal-regulated kinase</i>
FSH	: <i>Folicle Stimulating Hormone</i>
FSH-R	: <i>FSH Receptor</i>
GEFs	: <i>Guanine nucleotide exchange factor</i>
GnRH	: <i>Gonadotropin Releasing Hormone</i>
H&E	: <i>Hematoxylin-Eosin</i>
I.M	: <i>Intra muscular</i>
ICER	: <i>cAMP Early Receptor</i>
KB	: Keluarga Berencana
LH	: <i>Luteinizing Hormone</i>
LH-R	: <i>LH Receptor</i>
MAP	: <i>Mitogen-actived protein</i>
MHC	: <i>Male Human Contraception</i>
Pg/gr	: Pico gram/gram
PKA	: Protein kinase A
PKC	: Protein kinase C
Rpm	: <i>rotation per minute</i>
sER	: <i>Smooth endoplasmic reticulum</i>
SPSS	: <i>Statistical Product and servise solution</i>
SRC	: <i>Src tyrosin kinase</i>
SRF	: <i>Serum respon factors</i>
T	: Testosteron
TGF $\beta$	: <i>Transforming Growth Factor <math>\beta</math></i>

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Pertumbuhan penduduk di dunia saat ini meningkat secara drastis dari tahun ke tahun. Indonesia merupakan salah satu negara berkembang yang sedang mengalami fenomena tersebut. Berdasarkan data statistik, jumlah penduduk Indonesia selama dua puluh lima tahun mendatang terus meningkat yaitu dari 205,1 juta pada tahun 2000 menjadi 273,2 juta pada tahun 2025 (Data Statistik-Indonesia, 2011). Berdasarkan UU No. 52 tahun 2009, dalam mewujudkan pertumbuhan penduduk yang seimbang dan keluarga berkualitas dilakukan upaya pengendalian angka kelahiran dan penurunan angka kematian, pengarahan mobilitas penduduk, pengembangan kualitas penduduk seluruh dimensinya, peningkatan ketahanan dan kesejahteraan keluarga, penyiapan dan pengaturan perkawinan serta kehamilan sehingga penduduk menjadi sumber daya manusia yang tangguh bagi pembangunan dan ketahanan nasional, serta mampu bersaing dengan bangsa lain, dan dapat menikmati hasil pembangunan secara adil dan merata.

Program KB merupakan salah satu upaya yang digunakan untuk menekan pertumbuhan penduduk. Program KB dengan berbagai alat kontrasepsi lebih banyak untuk kaum wanita, sedangkan alat kontrasepsi yang dikembangkan untuk kaum pria sangat sedikit dan hanya terbatas pada alat kontrasepsi fisik, seperti kondom dan vasektomi, serta KB alamiah yang melibatkan pria atau suami, seperti metode senggama terputus, sehingga metode kontrasepsi pria yang dapat diandalkan dan *reversible* perlu dikembangkan (Handelsman, 2003).

Sistem reproduksi pada pria merupakan target yang potensial untuk perkembangan obat kontrasepsi baru. Salah satu target dalam kontrasepsi pria adalah mengganggu produksi spermatozoa, tetapi tidak mempengaruhi maskulinitas dan libido pria (Pasqualotto *et al.*, 2003). Despopoulos dan Silbiralg (2003) menyatakan bahwa, libido pada pria diregulasi oleh hormon testosteron. Selain itu, hormon testosteron juga berfungsi untuk menstimulasi perkembangan organ reproduksi pada pria (Sturmhöfel & Bartke, 1998). Hormon testosteron merupakan hormon yang diregulasi oleh sel Leydig yang

distimulasi oleh *Luteinizing Hormon* (LH) yang diproduksi di anterior pituitari, sehingga obat kontrasepsi dengan target produksi spermatozoa harus dilakukan tanpa mengganggu produksi LH atau testosteron.

Inhibin merupakan glikoprotein yang diproduksi oleh sel sertoli testis dan berperan penting dalam mengontrol sekresi gonadotropin pituitari melalui mekanisme umpan balik negatif. Terdapat dua bentuk molekuler aktif inhibin di dalam sirkulasi, yaitu inhibin A dan inhibin B. Inhibin A disusun oleh subunit  $\alpha$  dan  $\beta A$  dan inhibin B oleh subunit  $\alpha$  dan  $\beta B$ . Pada pria dewasa, FSH merangsang produksi inhibin B di dalam testis dan inhibin B menghambat sekresi FSH di pituitari anterior. Sampai saat ini, para peneliti meyakini bahwa inhibin B merupakan bentuk utama inhibin pada pria. Inhibin B bersifat antagonis dengan aktivin. Aktivin berfungsi merangsang pelepasan FSH, sedangkan inhibin B berperan untuk menghambat pelepasan FSH dari pituitari anterior (Aulanni'am, 2011).

Spermatogenesis merupakan suatu proses pembentukan dan perkembangan spermatozoa yang terjadi di tubulus seminiferus. Spermatogenesis pada mamalia dikendalikan oleh hormon gonadotropin, yaitu *Folicle stimulating hormon* (FSH) dan *Luteizing hormon* (LH) (Weinbauer *et al.*, 2001). LH merupakan hormone gonadotropin yang menstimulasi sel Leydig yang ada di dalam testis untuk mensekresi hormone testosterone, sedangkan FSH merupakan hormon gonadotropin yang berfungsi untuk menstimulasi produksi spermatozoa di tubulus seminiferous pada testis (Sturmhöfel *et al.*, 1998). Sekresi dan produksi FSH kelenjar pituitari pada pria diregulasi oleh inhibin B (Boepple *et al.*, 2008). Inhibin B merupakan hormon polipeptida gonadal dimerik yang diproduksi oleh sel sertoli dan secara selektif menghambat sekresi FSH melalui mekanisme *negative feedback* (umpan balik negatif) (Chada *et al.*, 2003), sehingga dalam penelitian ini akan diuji dampak inhibin B terhadap produksi hormon testosterone dan jumlah sel Leydig.

## 1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah paparan inhibin B pada tikus (*Rattus norvegicus*) jantan mempengaruhi profil hormon testosterone ?
2. Apakah paparan inhibin B pada tikus (*Rattus norvegicus*) jantan mempengaruhi jumlah sel Leydig ?

### 1.3 Tujuan

1. Mengetahui pengaruh paparan inhibitor B pada tikus (*Rattus norvegicus*) jantan terhadap profil hormon testosteron.
2. Mengetahui pengaruh paparan inhibitor B pada tikus (*Rattus norvegicus*) jantan terhadap jumlah sel Leydig.

### 1.4 Manfaat

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberi informasi bahwa paparan inhibitor B tidak berpengaruh terhadap produksi hormon testosteron dan jumlah sel Leydig.



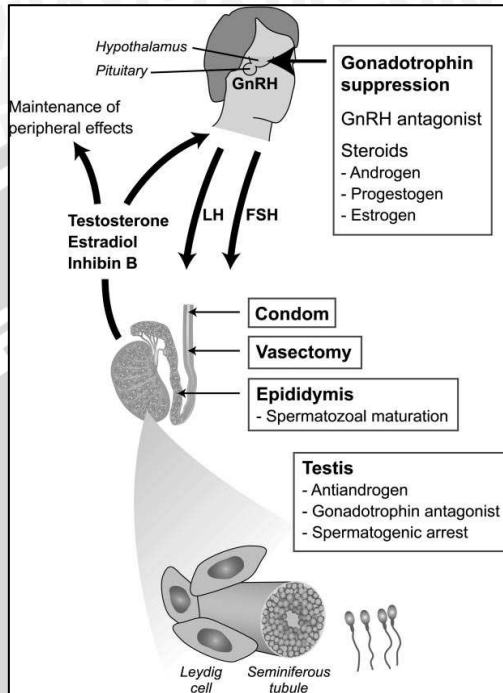
## BAB II TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Perkembangan Kontrasepsi Pria

Peningkatan pertumbuhan penduduk dalam banyak kasus mengakibatkan kebutuhan sumber daya alam (SDA) menjadi tidak seimbang. Ketidakseimbangan tersebut menyebabkan berbagai krisis di dunia, misalnya krisis air bersih, krisis makanan, dan krisis energi. Potensi kerusakan dan degradasi di lingkungan akan meningkat seiring dengan meningkatnya pertumbuhan penduduk. Menurut Anderson dan Baird (2002), sistem reproduksi jantan merupakan target yang potensial untuk pengembangan metode kontrasepsi baru. Saat ini, lebih dari 30% pasangan dunia telah menggunakan metode kontrasepsi pria (Martin *et al.*, 2000). Namun, di Indonesia sendiri penggunaan metode kontrasepsi pada pria masih sangat minim akibat rendahnya pengetahuan mengenai pentingnya penggunaan kontrasepsi pada kaum pria. Pertumbuhan penduduk yang demikian pesat di dunia dan kesadaran sosial yang tinggi terhadap kesehatan reproduksi mendorong pengembangan penelitian dalam bidang kontrasepsi (Chen *et al.*, 2005).

Dalam beberapa dekade terakhir, metode penggunaan kontrasepsi jenis pil sudah banyak berkembang pada wanita, sedangkan kontrasepsi pria hanya terbatas pada kontrasepsi metode fisik, seperti kondom dan vasektomi (Martin *et al.*, 2000). Menurut Amory dan Bremmer (2005), *male human contraception* (MHC) harus mempunyai potensi yang aman, mudah digunakan, dan bersifat *reversible*. Hal ini cukup beralasan karena metode kontrasepsi seperti kondom, senggama terputus, dan vasektomi belum sepenuhnya diterima oleh banyak pasangan di dunia. Kontrasepsi berbasis hormonal dapat dilakukan dengan pemberian testosteron dosis tinggi, namun dosis *suprafisiologi* androgen yang diperlukan untuk menginduksi azoospermia tersebut ternyata menyebabkan efek samping, seperti hiperplasia prostat dan perubahan plasma lipid yang kurang baik sehingga minim digunakan secara luas oleh kaum pria (Meringgiola *et al.*, 2002).





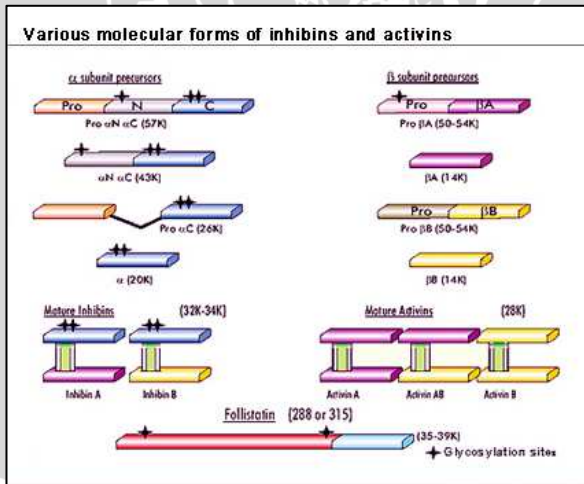
**Gambar 2.1** Target potensi kontrasepsi pada pria (Anderson dan Braid, 2002).

Dasar pendekatan MHC adalah pendekatan yang bersifat menekan spermatogenesis. Spermatogenesis tergantung pada sekresi gonadotropin, misalnya secara langsung sekresi *Folicle Stimulating Hormon* (FSH) dan secara tidak langsung adalah produksi hormon testosteron yang distimulasi oleh *Luteinizing Hormon* (LH). Penghambatan sekresi gonadotropin akan menyebabkan aktifitas endokrin dan aktifitas spermatogenik dalam testis terganggu (Roth dan Amory, 2010). Walaupun mekanisme spermatogenik belum sepenuhnya diketahui, penghambatan terhadap produksi LH dan FSH diketahui dapat menghambat spermatogenesis. Sampai saat ini, metode pengembangan kontrasepsi pria yang paling praktis adalah metode pendekatan secara hormonal (Gambar 2.1) (Anderson dan Braid, 2002).

Pendekatan MHC terkini adalah merangsang gonadotropin untuk menginduksi terjadinya penekanan spermatogenesis dan testosteron intratestikular (Anderson dan Braid, 2002). Metode MHC yang baik harus dapat menginduksi terjadinya azoospermia secara menyeluruh, tidak menyebabkan efek samping, dan mempunyai formula yang praktis (Roth dan Amory, 2010).

## 2.2 Struktur dan Peran Inhibin B dalam Sistem Reproduksi Pria

Inhibin merupakan suatu hormon gonadal berupa glikoprotein yang diproduksi oleh sel Sertoli di dalam testis dan memiliki peran penting untuk mengontrol sekresi gonadotropin pituitari melalui mekanisme umpan balik negatif (Aulanni'am, 2010). Inhibin tersusun atas dua subunit yang berikatan kovalen yakni  $\alpha$  dan  $\beta$ , dihubungkan oleh jembatan sulfida. Dua bentuk subunit  $\beta$  telah berhasil diisolasi oleh peneliti terdahulu yang dikenal dengan  $\beta A$  dan  $\beta B$ , keduanya dapat bergabung dengan subunit- $\alpha$  untuk menghasilkan inhibin A dan inhibin B (Gambar 2.2) (Rombauts *et al.*, 1992). Berdasarkan penelitian Winters *et al.* (2006) inhibin B merupakan glikoprotein heterodimer yang diproduksi oleh sel sertoli. Level inhibin B rendah ketika tubulus seminiferus rusak, namun pada penelitian kera normal mengungkapkan bahwa inhibin B berkolerasi dengan jumlah sel Sertoli.



Gambar 2.2 pembentukan struktur inhibin (Plin, 2011)

Inhibin merupakan molekul multifungsional yang terlibat dalam mengontrol pituitari untuk sekresi FSH. Inhibin B diproduksi oleh testis, terutama oleh sel-sel Sertoli. Ekspresi dan sekresi inhibin B berkorelasi positif dengan fungsi sel Sertoli, jumlah sperma, dan status spermatogenik dan berkorelasi negatif dengan FSH (Luisi *et al.*, 2005). Menurut Kumanov *et al.* (2006), parameter sperma dan volume testikular dalam pria infertil tidak hanya mempunyai korelasi positif dan signifikan dengan inhibin B, tetapi mempunyai korelasi negatif dan signifikan dengan hormon FSH. Inhibin diproduksi secara langsung oleh sel Sertoli pada testis. Inhibin B diproduksi untuk mengontrol sekresi FSH melalui mekanisme *negative feedback*. Produksi inhibin B pada orang dewasa tergantung pada FSH dan status spermatogenik (Meachem *et al.*, 2001).

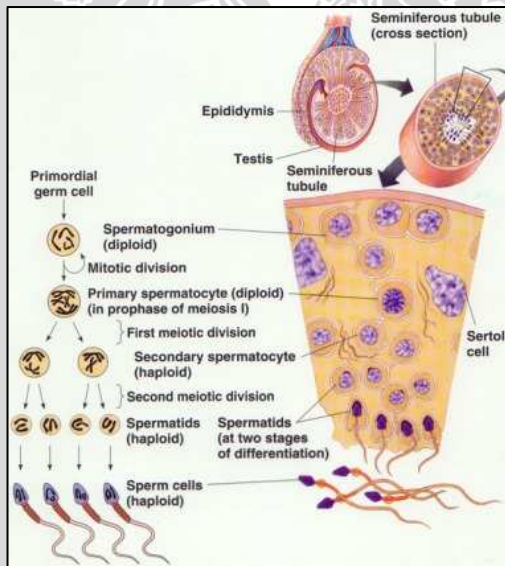
Inhibin, activin, dan follistatin pertama kali diidentifikasi kemampuannya dalam cairan folikel ovarium untuk mengatur sekresi FSH dari hipofisis gonadotropin secara *in vitro*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa inhibin dan follistatin menekan sekresi FSH, sedangkan activin meningkatkan sekresi FSH dari hipofisis (Knight & Glister, 2001). Inhibin berfungsi untuk menekan produksi hormon FSH dari sel hipofisis, sedangkan activin merangsang sekresi hormon FSH dari sel hipofisis (Robertson *et al.*, 2004). Kadar inhibin B juga berperan sebagai marker fertilitas individu jantan. Aktifitas inhibin B di dalam seminal plasma manusia memiliki keterkaitan dengan penurunan konsentrasi sperma. Kadar inhibin B pada individu infertil pada umumnya mampu memberikan gambaran spermatogenesis yang terjadi dan lebih memungkinkan juga digunakan sebagai penanda terjadinya spermatogenesis daripada FSH (Kumanov *et al.*, 2006).

Terdapat dua mekanisme penghambatan sintesis FSH oleh inhibin B, yaitu dengan melakukan *blocking signaling* activin dan menggunakan suatu jalur tertentu untuk menghambat *signaling* activin. Mekanisme *blocking signaling* activin terjadi jika inhibin B berikatan dengan reseptor *transforming growth factor- $\beta$*  (TGF- $\beta$ ) tipe II dan membentuk kompleks dengan  $\beta$ -glycan yang stabil, sehingga *signaling* untuk sintesis FSH tidak terjadi. Mekanisme kedua adalah jika inhibin B berikatan dengan reseptor TGF- $\beta$  tipe I dan reseptor inhibin membentuk suatu kompleks yang menginisiasi suatu *signaling* khusus untuk sintesis Smad6 atau Smad7. Smad6

atau Smad7 tersebut menghambat fosforilasi Smad2 atau Smad3 yang berperan dalam *signaling* activin (Matzuk, 2000).

### 2.3 Regulasi Hormonal Pada Spermatogenesis

Spermatogenesis merupakan suatu proses pembentukan spermatozoa yang terjadi di dalam tubulus seminiferus. Masing-masing tubulus seminiferus dikelilingi oleh membran basal dan di bagian tengah terdapat lumen yang mengandung spermatozoa, sedangkan dinding tubulus seminiferus berisi sel germinal yang berkembang dan sel Sertoli. Sel germinal yang belum berdiferensiasi disebut spermatogonium dan mulai membelah secara mitosis ketika memasuki masa pubertas. Hasil pembelahan mitosis pertama tersebut kemudian membelah lagi sampai mencapai jumlah tertentu atau biasa disebut spermatosit primer. Spermatosit primer tersebut akan meneruskan proses spermatogenesis melalui pembelahan meiosis. Tidak semua hasil pembelahan mitosis akan menjadi spermatosit primer, satu sel dari masing-masing hasil pembelahan mitosis akan tetap menjadi spermatogonium (Gambar 2.3) (Vander *et al.*, 2001)



Gambar 2.3 Spermatogenesis (Idysinger, 2011)



Masing-masing spermatosit primer akan berkembang dan mengalami pembelahan pertama untuk membentuk dua sel spermatosit sekunder yang haploid. Masing-masing spermatosit sekunder akan mengalami pembelahan meiosis sekunder menghasilkan spermatid. Sehingga satu spermatosit primer yang haploid akan menghasilkan empat spermatid yang haploid. Fase akhir spermatogenesis adalah diferensiasi spermatid menjadi spermatozoa. Diferensiasi spermatid meliputi *remodeling* sel, termasuk elongasi.

Kepala sperma tersusun atas nukleus atau inti yang mengandung DNA dengan ujung kepala nukleus dilindungi oleh akrosom, yaitu vesikel yang mengandung enzim khusus yang berperan penting dalam penetrasi sperma pada sel telur. Ekor spermatozoa merupakan flagel yang digunakan oleh sperma untuk dapat melakukan pergerakan maju, sedangkan mitokondria pada sperma membentuk bagian tengah sperma dan berfungsi sebagai penyuplai energi untuk pergerakan sperma (Vander *et al.*, 2001).

Spermatogenesis merupakan satu dari sejumlah proses diferensiasi selular yang sangat kompleks di dalam tubuh mamalia yang akan menghasilkan spermatozoa dengan spesialisasi sel tingkat tinggi (Ogawa *et al.*, 2006). Spermatogenesis pada mamalia membutuhkan aktifitas sejumlah hormon steroid dan peptida kompleks sebagai bentuk kerja oleh sel epitel seminiferus yang normal. Peran hormon tidak hanya dibutuhkan pada regulasi perkembangan sel germinal pria, tetapi juga diperlukan untuk proliferasi dan fungsi berbagai jenis sel somatik yang dibutuhkan untuk perkembangan testis (McLahlan *et al.*, 2002). Selain itu, spermatogenesis juga melibatkan sel-sel Leydig sebagai sel yang akan memicu sekresi hormon testosteron (Mendis-Handagama, 1997), sel mioid dan sel Sertoli (Griswold, 1998). Setiap sel tersebut mempunyai target langsung terhadap satu atau lebih hormon yang aktifitasnya esensial bagi fertilitas pria (Holdcraft dan Braun, 2004).

FSH dan LH merupakan glikoprotein yang disekresikan oleh kelenjar pituitari anterior yang akan mempengaruhi testis secara langsung untuk merangsang fungsi sel somatik dalam mendukung spermatogenesis. FSH dan LH merupakan salah satu bagian dari protein penting *transforming growth factor- $\beta$*  (TGF- $\beta$ ). Reseptor FSH (FSH-R) pada pria terekspresi pada sel Sertoli di testis (Walker



dan Cheng, 2005), sedangkan reseptor LH (LH-R) ditemukan pada sel Leydig pada testis (Eblen *et al.*, 2001). Penelitian pada hewan rodensia menunjukkan bahwa FSH berperan penting dalam spermatogenesis dengan merangsang proliferasi sel Sertoli selama perkembangan *pre-pubertal* (Heckert dan Griswold, 2002).

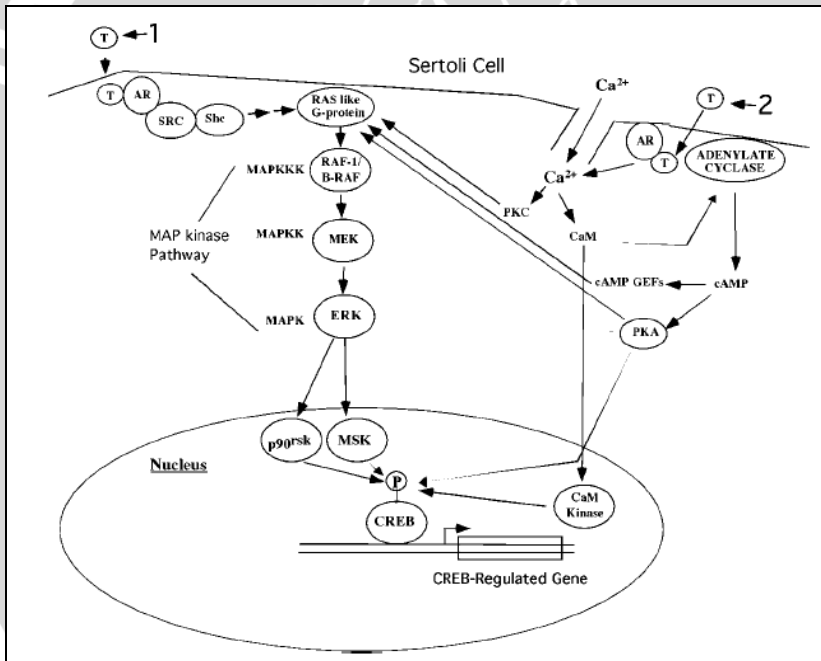
Regulasi sintesis hormon testosteron merupakan peran LH di dalam testis pria dewasa (Lei *et al.*, 2001). Hormon testosteron merupakan hormon steroid yang dapat berdifusi ke dalam tubulus seminiferus. Menurut Walker dan Cheng (2005), hanya sel Sertoli saja yang memiliki reseptor dalam tubulus seminiferus. Testosteron juga meregulasi karakteristik organ seks sekunder, seperti distribusi rambut, bentuk fisik, dan perubahan suara pada pria serta perilaku individu jantan (DeSoto *et al.*, 2009).

## **2.4 Struktur dan Peran Hormon Testosteron dalam Reproduksi Pria**

Hormon testosteron merupakan steroid androgenik utama yang disekresikan oleh testis yang sangat diperlukan untuk pematangan sel-sel germinal pria, produksi sperma, dan kesuburan pria (Walker, 2009). Hormon testosteron berfungsi untuk merangsang pertumbuhan dan perkembangan dari organ reproduksi pria. Selain itu, fungsi spesifik hormon testosteron ini bervariasi selama tahap-tahap perkembangan yang berbeda. Selama pubertas, hormon testosteron mendorong pertumbuhan organ seks primer pria dan bertanggung jawab untuk pengembangan karakteristik pria lainnya seperti organ seks sekunder, percepatan pertumbuhan pubertas, dan penghentian pertumbuhan pada tinggi dewasa. Hormon testosteron pada pria berfungsi terutama untuk mempertahankan maskulinitas, libido, dan potensi seksual serta mengatur produksi sperma (Sturmhöfel *et al.*, 1998).

Hormon testosteron dan FSH diperlukan pada proses spermatogenesis. Di dalam testis, sel somatik Sertoli mentransduksi sinyal dari testosteron dan FSH ke dalam faktor spermatogenesis yang diperlukan oleh sel germinal matang sampai menjadi spermatozoa (Walker dan Cheng, 2005). Proses spermatogenesis diatur oleh interaksi kompleks dari sinyal endokrin dan parakrin. Hormon kontrol induk *Gonadotropin releasing hormon* (GnRH) dihasilkan oleh syaraf *decapetide* khusus yang berada di

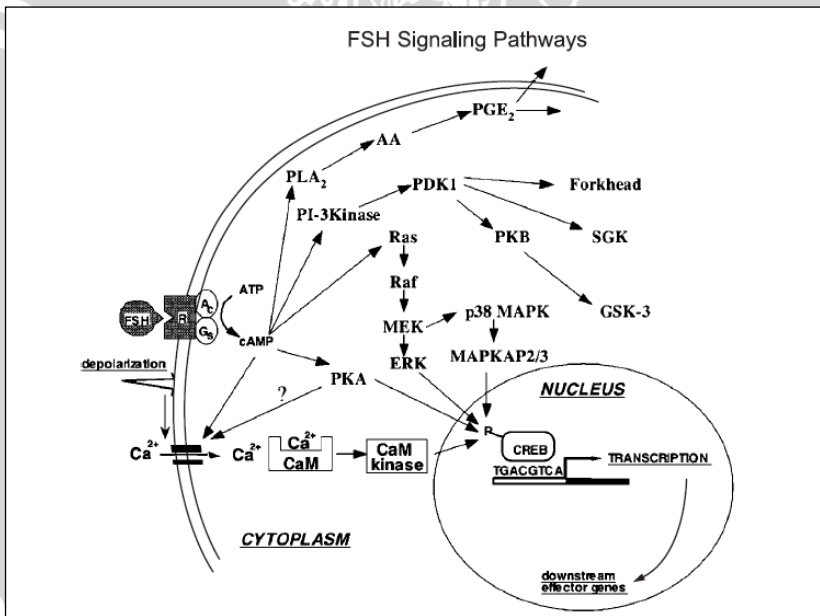
hipotalamus. Sinyal GnRH diproduksi untuk menstimulasi kelenjar pituitari anterior dalam menghasilkan FSH dan LH yang kemudian mengatur potensi spermatogenik pada testis. LH berikatan dengan reseptor pada permukaan sel Leydig di testis dan merangsang produksi testosteron. Sel Sertoli di dalam tubulus seminiferus memiliki reseptor testosteron dan FSH (Walker dan Cheng, 2005). Menurut Singh *et al.* (2006), spermatogenesis dikendalikan oleh kehadiran hormon testosteron dan FSH. Metabolisme hormon testosteron dan dihydro-testosteron akan langsung mempengaruhi spermatogenesis melalui reseptor androgen (AR). Di dalam sel Sertoli terdapat gen-gen yang berperan penting dalam proses spermatogenesis yang ekspresinya diatur oleh faktor transkripsi CREB dan CREM.



**Gambar 2.4** Jalur Persinyalan testosteron pada sel Sertoli (Walker dan Cheng, 2005)

Terdapat dua jalur persinyalan potensial yang menyebabkan fosforilasi *Testosterone-induced cAMP response element binding*

protein (CREB) (Gambar 2.4). Jalur persinyalan pertama (1), testosteron (T) berikatan dengan androgen reseptor (AR) yang selanjutnya berikatan dengan Src tyrosin kinase (SRC) dan mengaktifasi SRC yang akan menghasilkan rangsangan Raf dan Raf-1 kinase, serta mengaktifasi jalur MAP kinase. Jalur kedua (2), testosteron menginduksi pemasukan  $Ca^{2+}$  ke dalam sel Sertoli. Peristiwa ini menyebabkan calmodulin (CaM) menstimulasi CaM kinase yang bertranslokasi menuju nucleus dan secara temporer memfosforilasi CREB.  $Ca^{2+}$  merangsang protein kinase C (PKC), *Guanine nucleotide exchange factors* (GEFs) atau protein kinase A (PKA) merangsang *Ras* atau *Ras like GTP binding protein* yang menghasilkan aktivasi jalur MAP kinase. Kedua jalur ini mempunyai kemampuan menginduksi fosforilasi CREB dan ekspresi CREB-mediated gene (Walker dan Cheng, 2005).



**Gambar 2.5** Jalur persinyalan FSH pada sel Sertoli (Walker dan Cheng, 2005)

FSH yang berikatan dengan FSH-R menyebabkan reseptor gabungan protein G mengaktifasi *adenylate cyclase* (AC) dan

meningkatkan kadar intraseluler *cyclic adenosine monophosfat* (cAMP). Berbagai faktor dapat diaktivasi oleh cAMP di dalam sel sertoli. *Protein kinase A* (PKA) yang dapat memfosforilasi sejumlah protein di dalam sel dan juga meregulasi ekspresi dan aktivasi sejumlah faktor transkripsi seperti *cAMP response element binding protein* (CREB). FSH juga menyebabkan pemasukan ion kalsium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) ke dalam sel sertoli yang dimediasi oleh cAMP dan mungkin oleh PKA serta modifikasi permukaan  $\text{Ca}^{2+}$  channel. Peningkatan level  $\text{Ca}^{2+}$  mengaktivasi calmodulin dan CaM kinase yang mempunyai bebrbagai efek potensial termasuk fosforilasi CREB. Selama pubertas, FSH mengaktivasi *cascade mitogen-activated protein* (MAP) kinase dan *extracellular signal-regulated kinase* (ERK) kinase di dalam sel Sertoli yang mungkin melalui interaksi dengan *guanine nucleotide exchange factors* (GEFs) dan aktivasi *Ras-like* protein G. ERK mampu mengaktivasi sejumlah faktor transkripsi, seperti *serum respon factors* (SRF), c-jun dan CREB (Gambar 2.5) (Walker and Cheng, 2005). Berdasarkan jalur tersebut dapat disimpulkan bahwa FSH mempunyai kemampuan yang lebih efisien untuk memfosforilasi faktor transkripsi CREB karena jalur FSH mampu meningkatkan kadar intraseluler cAMP, sedangkan testosteron hanya mampu mengaktivasi jalur MAP kinase yang mempunyai kemampuan menginduksi fosforilasi CREB dan *CREB-mediated gene* (Walker and Cheng, 2005).

CREB mampu mengaktivasi transkripsi sejumlah gen promoter dalam sekali fosforilasi. Gen promoter CREB dan promoter internal menyebabkan produksi *inducible cAMP early repressor* (ICER) transkripsi gen yang dimediasi CRE (Walker *et al.*, 1995). Sebagai akibat induksi CREB, ICER menekan transkripsi promoternya sendiri dan promoter CREB (Walker *et al.*, 1998). Penurunan sementara regulasi CREB berkorelasi dengan ekspresi ICER. Auto-inhibisi ICER dapat menjelaskan gerakan cAMP yang dimediasi oleh ekspresi mRNA CREB yang diamati pada sel Sertoli selama siklus spermatogenik (Walker dan Habener, 1996). FSH juga berimplikasi terhadap ekspresi berbagai isoform CREM yang terekspresi pada spermatosit dan spermatid yang dibutuhkan untuk kelangsungan hidup mereka (Nantel *et al.*, 1996).

Faktor transkripsi CREM terekspresi secara nyata di dalam sel germinal manusia dan meregulasi ekspresi sejumlah gen pasca

meiosis penting, seperti gen penyandi protamine dan protein transisi. Protamine dibutuhkan untuk mengganti histone dalam mengkompaksi DNA pada tahapan spermiogenesis. Protamine mengganti histone dalam beberapa tahapan. Langkah pertama dalam proses ini terjadi dalam round spermatid yang dibutuhkan untuk penggantian histone dengan protein inti transisi (TP1 dan TP2). Kemudian, di dalam *elongated* spermatid, protamine mengganti TP1 dan TP2. Penggantian histone-protamine ini menghasilkan transkripsi pepadatan kromatin yang sempurna (Aulani'am, 2011). Defisiensi protamine di dalam spermatozoa berkorelasi signifikan dengan terjadinya kemunduran parameter kualitas semen, seperti terjadinya penurunan jumlah spermatozoa, gangguan motilitas spermatozoa, kecacatan kepala spermatozoa, dan gangguan kemampuan penetrasi spermatozoa ke dalam ovum (Aoki *et al.*, 2006). Selain itu, gangguan protamine berdampak pula terhadap kerusakan kromatin sperma. Hal ini disebabkan oleh kromatin disusun oleh struktur DNA dan nucleoprotein (protamine). Kerusakan kromatin atau DNA sperma berkorelasi signifikan terhadap penurunan kualitas sperma, yang pada akhirnya berdampak terhadap kemampuan sperma memfertilisasi sel telur (infertilitas) (Aulani'am, 2011).

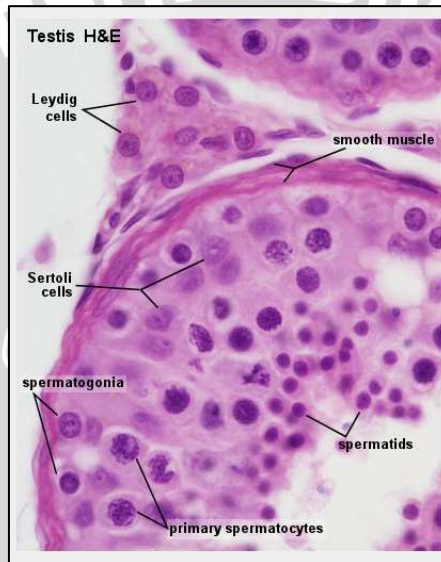
## **2.5 Sel Leydig**

Sel Leydig atau sel interstisial terletak di celah-celah antara tubulus seminiferus di dalam testis. Sel-sel Leydig berukuran cukup besar, berbentuk poligonal, mengandung butiran lipid atau lemak. Selain itu, terdapat pigmen lipofusin yang muncul secara bertahap pada sel Leydig dan kristal Reinke (Crystal of Reinke) yang merupakan kristal berbentuk batang berukuran 3 sampai 20 mikrometer, namun pigmen dan kristal ini belum diketahui secara jelas fungsinya. Perkembangan sel Leydig diawali oleh jaringan mesenkim yang memisahkan tubulus seminiferus sehingga jumlah sel Leydig akan meningkat. Sel Leydig mensekresi dan mensintesis hormon kelas androgen (Steroid C19) seperti testosteron, androsetenedion, dan dehidroepiandrosteron yang dirangsang oleh LH (Luteinizing Hormon) (Ross, 2002). LH merupakan hormon yang paling penting untuk mengontrol fungsi sel Leydig, namun



hormon dan faktor lainnya diproduksi secara lokal juga berperan dalam mengontrol sel Leydig ini (Nieschlag *et al.*, 2004).

Sel Leydig mulai aktif saat terjadi diferensiasi awal dari janin pria dan kemudian mengalami masa non-aktif yang dimulai saat bulan kelima saat perkembangan janin. Saat sel Leydig menjadi non-aktif, sel Leydig cukup sulit dibedakan karena strukturnya mirip dengan fibroblas, namun sel Leydig yang menginisiasi stimulasi gonadotropik saat masa pubertas, sel Leydig kembali mensekresi androgen dan tetap aktif sepanjang hidup (Ross, 2002).



**Gambar 2.6** Histologi testis dengan pewarnaan H&E (anhb, 2011)

Sel-sel somatik dari testis adalah sel Leydig, sel peritubulus myoids dan sel Sertoli. Dalam sel-sel tersebut telah menunjukkan adanya reseptor androgen (AR) (Rodríguez, 2008). Reseptor FSH (FSH-R) pada pria terekspresi pada sel Sertoli di dalam testis (Walker dan Cheng, 2005), sedangkan reseptor LH (LH-R) ditemukan secara dominan pada sel Leydig, meskipun juga ditemukan pada sel spermatogenik (Eblen *et al.*, 2001). Seperti pada kebanyakan sel sekresi-steroid, sel Leydig memiliki sER (*smooth endoplasmic reticulum*). Selain itu, enzim diperlukan untuk sintesis testosteron dari kolesterol yang terkait dengan sER tersebut.

Mitokondria dengan *tubulovesicular cristae* sebagai karakteristik lain dari sel sekresi steroid, juga terdapat dalam sel-sel Leydig. Sel Leydig berdiferensiasi dan mensekresi testosteron selama perkembangan awal janin. Sekresi testosteron diperlukan selama perkembangan embrio, pematangan seksual, dan fungsi reproduksi; pertama pada embrio, sekresi testosteron dan androgen yang lain diperlukan untuk perkembangan gonad pada janin pria. Kedua, saat masa pubertas sekresi testosteron bertanggung jawab untuk mengawali produksi sperma, dan sekresi kelenjar seks tambahan, dan perkembangan karakteristik organ seks sekunder. Ketiga, saat dewasa, sekresi testosteron mengawali spermatogenesis dan pematangan karakteristik organ seks sekunder, bekas aliran pembuluh genital, dan kelenjar aksesoris (Ross, 2002).

## 2.6 Kerangka Konsep Penelitian

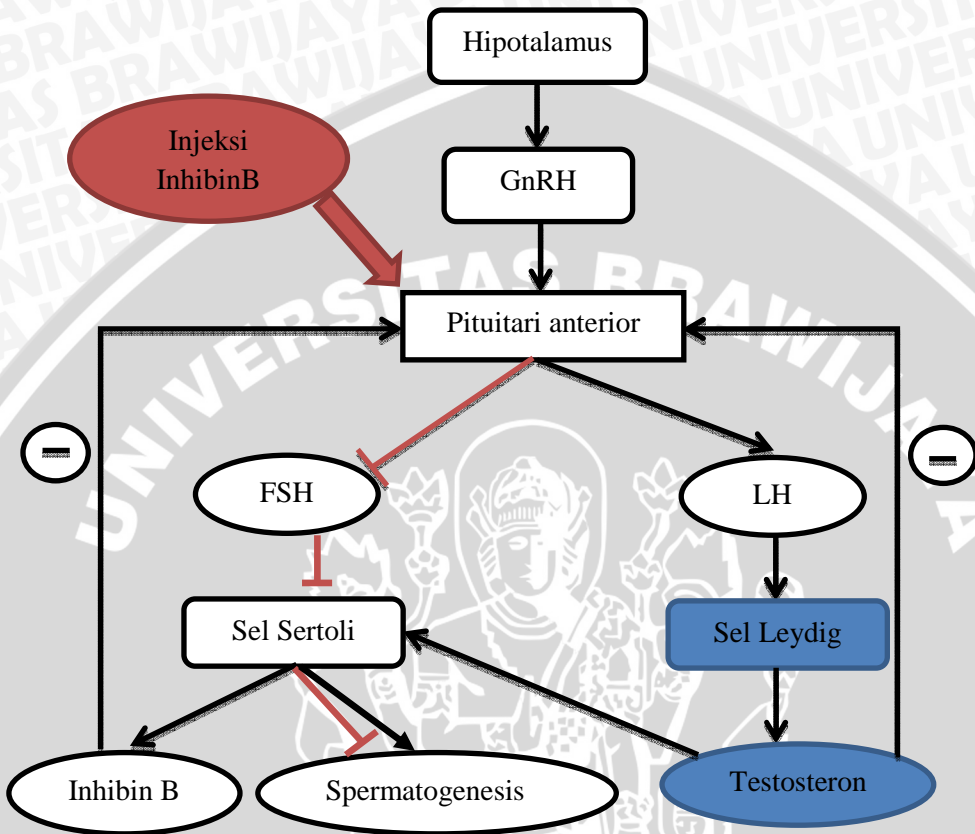
Spermatogenesis merupakan proses terbentuknya spermatozoa yang terjadi di tubulus seminiferus. Spermatozoa pada mamalia dikendalikan oleh hormon gonadotropin, yaitu *Luteinizing Hormon* dan *Follicle Stimulating Hormon* yang diproduksi oleh pituitary anterior (Weinbauer *et al.*, 2001). *Luteinizing Hormon* (LH) merupakan hormon gonadotropin yang disekresi dengan tujuan untuk menstimulasi sekresi hormon testosteron di sel Leydig. Hormon testosteron berfungsi untuk merangsang pertumbuhan dan perkembangan dari organ reproduksi pria. Selain itu, fungsi spesifik testosteron bervariasi selama tahap-tahap perkembangan yang berbeda. Selama pubertas, testosteron mendorong pertumbuhan organ seks pria dan berfungsi untuk pengembangan karakteristik pria lainnya, seperti percepatan pertumbuhan pubertas dan akhirnya penghentian pertumbuhan pada tinggi dewasa, seperti pertumbuhan wajah, ketiak kemaluan, rambut tubuh, dan peningkatan otot. Pada pria dewasa, testosteron berfungsi terutama untuk mempertahankan maskulinitas, libido, dan potensi seksual serta mengatur produksi sperma (Sturmhöfel *et al.*, 1998). *Follicle Stimulating Hormon* (FSH) merupakan hormon gonadotropin yang memiliki peran sentral dalam dalam testis pada proses reproduksi, seperti pada spermatogenesis. Sekresi FSH dipengaruhi oleh aktivin dan inhibin. Aktivin berfungsi untuk menstimulasi sekresi FSH di pituitari

anterior dengan berikatan dengan ActII, sedangkan inhibin berfungsi untuk menekan sekresi FSH melalui mekanisme umpan balik negatif.

Inhibin merupakan hormon glikoprotein yang terdiri dari subunit  $\alpha$  dan subunit  $\beta$  yang dihubungkan oleh jembatan sulfida. Dua bentuk subunit  $\beta$  telah diisolasi yang dikenal dengan  $\beta A$  dan  $\beta B$ , yang bergabung dengan subunit- $\alpha$  untuk menghasilkan inhibin A dan Inhibin B (Rombauts *et al.*, 1992). Inhibin B yang diproduksi oleh sel Sertoli berfungsi untuk mengatur sekresi *Follicle Stimulating Hormon* (FSH) di pituitari anterior melalui mekanisme *feedback* (umpan balik) negatif.

Penambahan inhibin B secara *Intra Muscular* (I.M) pada *Rattus norvegicus* jantan diduga menghambat sekresi FSH di pituitari anterior, sehingga dapat mengganggu spermatogenesis tanpa mengganggu sekresi hormon testosteron dan jumlah sel Leydig (Gambar 2.7).





Gambar 2.7 Kerangka Konsep Penelitian

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Waktu dan Tempat**

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Desember 2011 sampai dengan Juni 2012 di laboratorium Biokimia dan Fisiologi Hewan, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang.

#### **3.2 Metode Penelitian**

Metode yang digunakan pada penelitian ini dilakukan dengan beberapa tahapan kerja yang meliputi :

1. Perlakuan hewan coba
2. Pengambilan organ testis dan serum
3. Pembuatan gambaran histologi testis
4. Pewarnaan *Hematoxylin-Eosin*
5. Penghitungan jumlah sel Leydig di preparat organ testis
6. Pengukuran kadar hormon testosteron dengan metode ELISA
7. Analisis data secara deskriptif dan statistik menggunakan *software* SPSS

#### **3.3 Prosedur Penelitian**

##### **3.3.1 Perlakuan hewan coba**

Preparasi hewan coba dilakukan selama 10 minggu di laboratorium Fisiologi Hewan, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang. Tikus dibagi menjadi dua kelompok, yaitu : (1) kelompok kontrol, yaitu kelompok tikus yang tidak diinjeksi dengan hormon inhibin B sebanyak 3 ekor, (2) kelompok tikus yang diinjeksi dengan hormon inhibin B dengan dosis 100 pg/200 gr sebanyak 3 ekor. Injeksi inhibin B dilakukan secara *Intra Muscular* (I.M) dengan jangka waktu 12 hari tiap injeksi dan berulang sebanyak lima kali. Pada hari ke 50 tikus dikorbankan dengan dislokasi leher untuk koleksi organ testis dan darah. Penggunaan hewan coba pada penelitian ini sudah mendapat sertifikat laik etik No : 88 dari Komisi Etik Penelitian (KEP) Universitas Brawijaya.



### **3.3.2 Pengambilan organ testis dan serum**

Hewan coba pada akhir penelitian yaitu hari ke 50 dikorbankan dengan dislokasi leher dan dibedah untuk koleksi organ testis dan serum. Sebelum dilakukan pengambilan organ testis, terlebih dahulu hewan coba didislokasi pada bagian leher untuk kemudian dilakukan pembedahan. Testis diambil dan dibilas dengan NaCl-fis 0,9% dingin. Kemudian testis difiksasi dalam larutan formaldehide (PFA) 10 % untuk pembuatan preparat.

Darah tikus diambil melalui bagian apex jantung, kemudian darah didiamkan selama 4 jam dengan kemiringan 45°. Selanjutnya darah disentrifus dengan kecepatan 3500 rpm selama 10 menit. Serum dikoleksi di mikrotube baru dan disimpan di dalam freezer.

### **3.3.3 Pembuatan gambaran histologi testis**

#### **3.3.3.1 Embedding testis**

Organ testis yang telah direndam dalam larutan formaldehide 10%, dipindahkan dalam etanol 70% selama 24 jam, selanjutnya dipindahkan dalam etanol 80% selama 2 jam, etanol 90% selama 20 menit, etanol 95% selama 20 menit dan etanol absolut selama 20 menit. Dari etanol absolut organ testis dimasukkan pada larutan xilol selama 20 menit sebanyak 2 kali. Berikutnya, dimasukkan kembali ke dalam larutan xilol dan dilakukan pada suhu 60-63 °C selama 30 menit. Lalu, organ testis dimasukkan dalam parafin cair yang telah dituang ke dalam wadah. Setelah beberapa saat parafin akan memadat dan organ testis berada dalam blok parafin.

#### **3.3.3.2 Pembuatan preparat testis**

Blok parafin hasil embedding sebelumnya dipotong dengan ukuran 5 µm, diambil irisan dengan kuas dan dimasukkan air pada suhu ruang. Berikutnya, dipindahkan hasil irisan dengan kuas ke dalam air hangat 38-40 °C dan diambil irisan yang terentang sempurna dengan objek gelas. Irisan yang terpilih dikeringkan di atas *hot plate* 38-40 °C hingga kering dan setelah itu preparat disimpan dalam inkubator pada suhu 38-40 °C selama 24 jam.

#### **3.3.4 Pewarnaan preparat testis menggunakan *Hematoxylin-Eosin* (H&E)**

Pewarnaan *Hematoxylin-Eosin* dilakukan melalui beberapa tahapan. Deparafinasi, preparat dimasukkan dalam xilol bertahap 1-3

masing-masing selama 5 menit. Berikutnya, dilakukan tahapan rehidrasi preparat dimana preparat dimasukkan dalam etanol bertingkat yang dimulai dari etanol absolut, etanol 95, 90, 80, dan 70 % masing-masing selama 5 menit. Lalu, direndam dalam akuades selama 5 menit. Setelah itu dilakukan tahapan pewarnaan, preparat dimasukkan dalam pewarna hematoxylin hingga diperoleh hasil warna terbaik selama 10 menit. Kemudian dicuci dengan air mengalir, Kemudian direndam dalam ethanol berseri dan dimasukkan dalam pewarna eosin selama 5 menit. Lalu, direndam preparat dalam akuades untuk menghilangkan kelebihan eosin. Berikutnya, dilakukan tahapan dehidrasi dengan preparat dimasukkan dalam seri etanol bertingkat dari 80, 90, dan 95 % hingga etanol absolut 1-3. Selanjutnya, dilakukan *clearing* yaitu dengan memasukkan preparat pada xilol 1, 2 .Setelah itu, dilakukan mounting dengan entellan.

### 3.3.5 Penghitungan sel Leydig di preparat testis

Sel Leydig terletak di testis, tepatnya terletak diantara tubulus seminiferus. Penghitungan sel Leydig dilakukan di preparat testis dengan pewarnaan *Hematoxylin Eosin* pada perbesaran 100X terlebih dahulu dilanjutkan dengan perbesaran 400X. Perhitungan dilakukan dengan menghitung sel Leydig dari lima bidang pandang preparat kemudian dirata-rata dengan rumus :

$$\text{Rata-rata jumlah sel Leydig} = \frac{X^1 + X^2 + X^3 + X^4 + X^5}{5}$$

Keterangan :  $X^1$  = Jumlah sel Leydig dari bidang pandang 1

$X^2$  = Jumlah sel Leydig dari bidang pandang 2

$X^3$  = Jumlah sel Leydig dari bidang pandang 3

$X^4$  = Jumlah sel Leydig dari bidang pandang 4

$X^5$  = Jumlah sel Leydig dari bidang pandang 5

### 3.3.6 Pengukuran kadar hormon testosteron dengan metode ELISA

Pengukuran kadar hormon testosteron dilakukan dengan kit ELISA testosteron (*cat.no.* KGE010). 50  $\mu$ L larutan antibodi primer dimasukkan ke dalam sumuran (*well*) mikropate (kecuali sumuran untuk NSB), kemudian diinkubasi selama 1 jam pada suhu ruang dan dishaker pada 500 rpm. Setelah masa inkubasi selesai, masing-

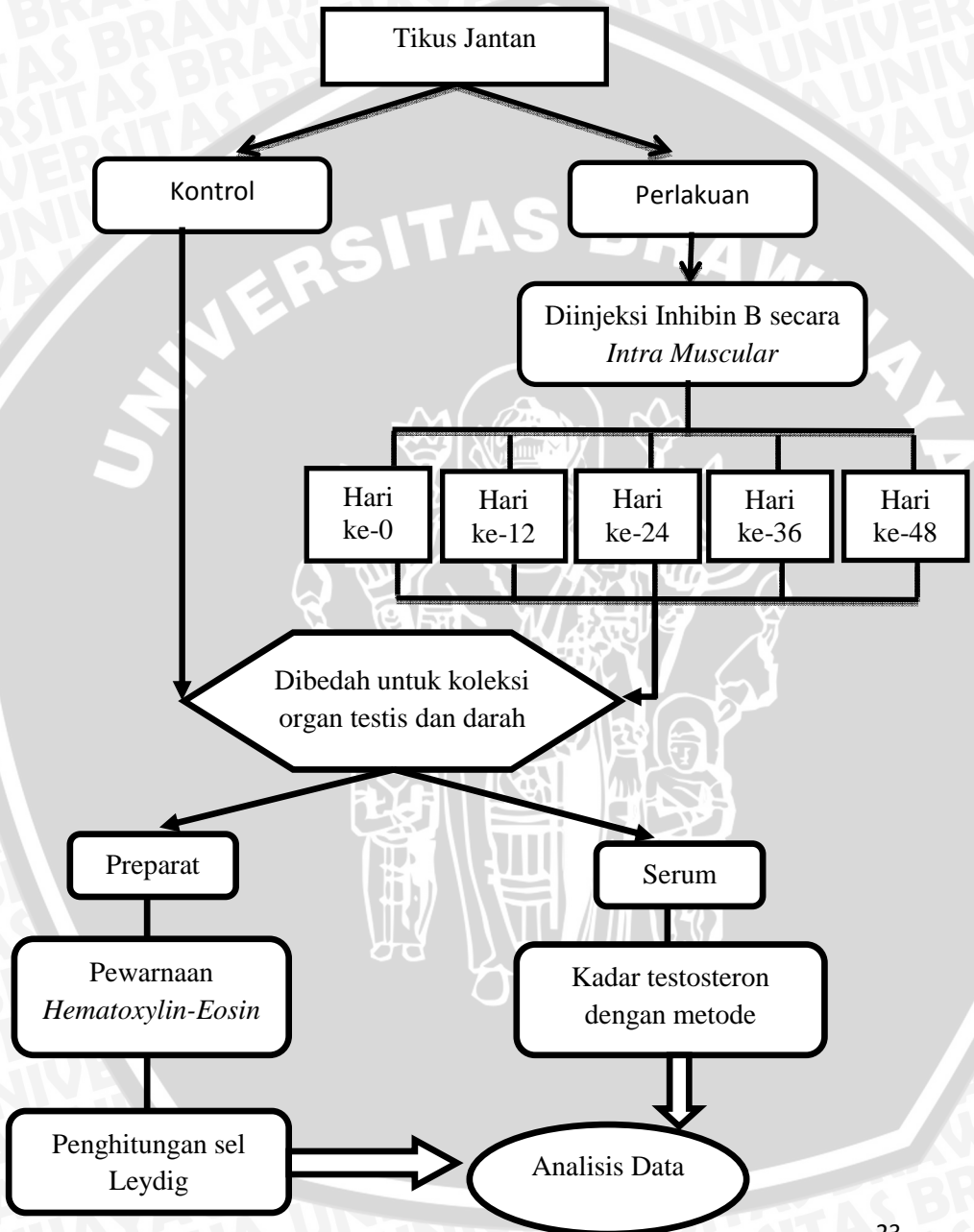
masing sumuran dicuci dengan *wash buffer* sebanyak empat kali, kemudian ditambahkan 100  $\mu\text{L}$  Calibrator Diluent RD5-48 ke dalam sumuran NSB dan standar blanko, kemudian 100  $\mu\text{L}$  testosteron standar dan sampel ke dalam sumuran yang lainnya. 50  $\mu\text{L}$  *testosteron conjugate* kemudian dimasukkan ke semua sumuran, selanjutnya diinkubasi selama 3 jam pada suhu ruang, setelah itu dicuci dengan dengan *wash buffer* sebanyak empat kali. Selanjutnya ditambahkan substrate solution 200  $\mu\text{L}$  ke dalam masing-masing sumuran dan diinkubasi selama 30 menit, kemudian ditambahkan 50  $\mu\text{L}$  stop solution pada masing-masing sumuran dan dibaca dengan ELISA reader pada panjang gelombang 450 nm.

### 3.4 Analisis Data

Data jumlah sel Leydig dan pengukuran kadar hormon testosteron dianalisis secara deskriptif dan statistik. Analisis statistik jumlah sel Leydig diuji menggunakan uji chi square dan pengukuran kadar testosteron diuji menggunakan uji *t independent*.



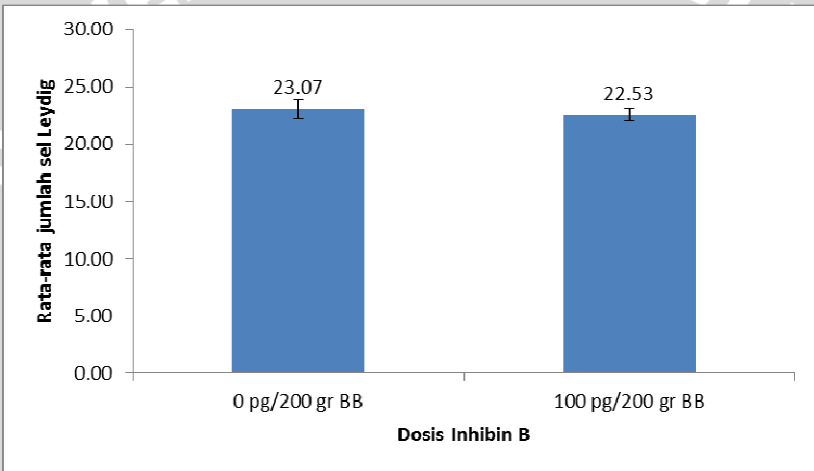
### 3.5 Skema Kerja



## BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Jumlah sel Leydig pasca pemberian inhibin B

Sel Leydig atau sel interstisial terletak diantara tubulus seminiferus di dalam testis. Sel Leydig mulai aktif saat terjadi diferensiasi awal dari janin pria dan kemudian mengalami masa non-aktif yang dimulai saat bulan kelima saat perkembangan janin. Sel Leydig memiliki ukuran yang lebih besar dibandingkan sel lainnya yang terdapat di jaringan interstisial (Ross, 2002).

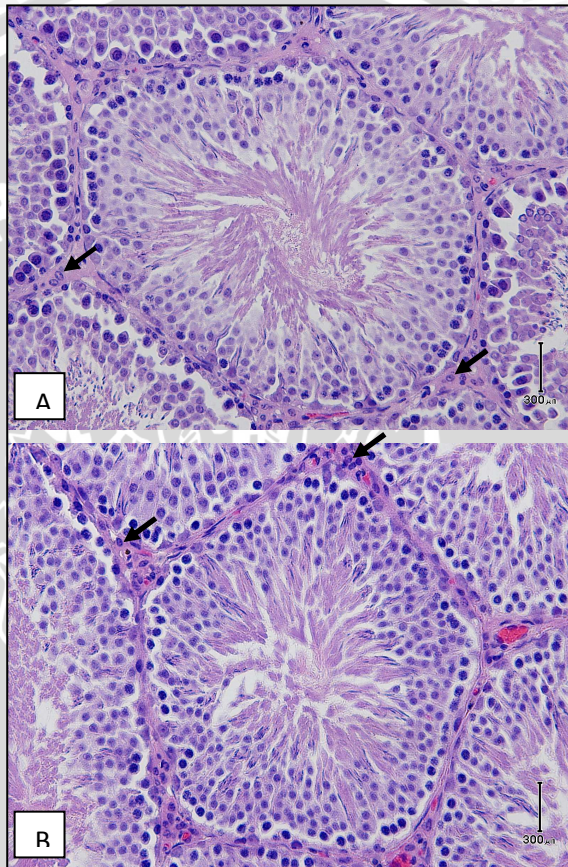


Gambar 4.1 Rata-rata jumlah sel Leydig setelah pemberian inhibin B

Pasca pemberian inhibin B terhadap tikus, diketahui bahwa rata-rata jumlah sel Leydig tidak terdapat perbedaan yang signifikan ( $p > 0,05$ ) antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan yang diberi inhibin B dengan dosis 100 pg/200 gr BB secara I.M (*Intra Muscular*) pada tikus (*Rattus narvegicus*) strain wistar (Gambar 4.1). Rata-rata jumlah sel Leydig pada kelompok kontrol adalah  $23.07 \pm 0.81$ , sedangkan rata-rata jumlah sel Leydig pada kelompok perlakuan yang diberi inhibin B dengan dosis 100 pg/200 gr BB adalah  $22.53 \pm 0.50$ . Hal ini menunjukkan bahwa pemberian inhibin B dengan dosis 100pg/BB secara I.M (*Intra Muscular*) pada tikus



(*Rattus norvegicus*) strain wistar tidak berdampak pada jumlah sel Leydig di testis.



Gambar 4.2 Sel Leydig pada preparat jaringan testis tikus (*Rattus norvegicus*) pewarnaan H&E

Keterangan: (A) Kelompok kontrol dan (B) kelompok perlakuan inhibin B dengan dosis 100 µg/200 gr BB. Sel Leydig ditunjukkan dengan tanda panah hitam (↖).

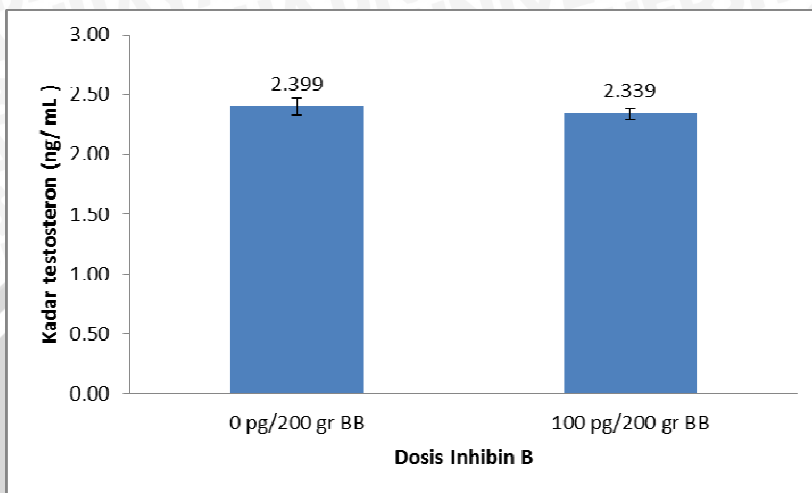
Tahapan perkembangan sel Leydig di dalam testis dimulai dari sel *mesenchymal* prekursor, sel progenitor, sel Leydig dewasa, sel Leydig *immature* dan sel Leydig *mature*. Proliferasi sel Leydig dipengaruhi oleh beberapa hormon salah satunya adalah LH (*Luteninizing hormon*). LH berfungsi untuk menginduksi proliferasi sel leydig, hipertrofi dan fungsi steroidogenik pada sel Leydig (Mendis-handagama & Ariyaratne, 2001). Permulaan diferensiasi sel *mesenchymal* prekursor menjadi sel progenitor tidak tergantung pada LH, tetapi LH sangat penting untuk tahapan selanjutnya dalam perkembangan sel Leydig. Setelah sel progenitor terbentuk, Sel progenitor mampu memproduksi androgen. Androgen sangat penting untuk diferensiasi menjadi sel Leydig dewasa. Tahapan selanjutnya dalam proses diferensiasi sel Leydig adalah transformasi sel progenitor menjadi sel Leydig dewasa. Perbedaan paling jelas antara sel progenitor dengan sel Leydig dewasa adalah perubahan bentuk sel dari spindel menjadi poligonal dan memiliki LH reseptor. Sel Leydig dewasa mampu mensekresi testosteron hanya 40% dari kapasitas sekresi *immature* dan *mature* sel Leydig. Ukuran sel Leydig dewasa yang baru terbentuk akan terus meningkat dengan memiliki sitoplasma lebih dan menjadi sel Leydig *immature*. Kemampuan sel Leydig *immature* untuk memproduksi testosteron masih lebih rendah dibandingkan dengan sel Leydig *mature*. Tahapan terakhir dalam perkembangan sel Leydig adalah transformasi sel leydig *immature* menjadi sel Leydig *mature*. Perubahan ini ditandai dengan peningkatan ukuran sel Leydig dan sekresi testosteron yang meningkat secara signifikan karena sel Leydig *mature* sudah memiliki organel lebih yang diperlukan untuk produksi komponen steroid dan ditingkatkan sebagai respon terhadap peredaran LH. Hal ini mungkin disebabkan adanya peningkatan jumlah dari reseptor LH (Mendis-handagama & Ariyaratne, 2001). Berdasarkan Baker *et al.* (2003) tidak adanya stimulasi LH menyebabkan kegagalan proliferasi normal dan pengembangan fungsi steroidogenik normal.

Sel leydig berfungsi mensekresi hormon testosteron setelah diregulasi oleh hormon LH yang berikatan dengan LH-R di sel leydig. Regulasi sintesis hormon testosteron merupakan peran utama LH di dalam testis pria dewasa (Lie *et al.*, 2001). Sekresi hormon testostesron secara maksimal terjadi pada saat sel Leydig berada

pada kondisi *mature*. Hal tersebut terjadi karena pada kondisi *mature* sel Leydig mampu berikatan secara maksimal dengan LH (Mendis-handagama & Ariyaratne, 2001). Hasil penelitian yang dilakukan oleh Fu'adil (2011) dengan metode pemberian inhibin B pada tikus (*Rattus norvegicus*) secara eksogenus dengan dosis yang beragam (25, 50, 100 pg/200 g BB) menunjukkan bahwa tidak terdapat korelasi yang signifikan antara peningkatan dosis inhibin B yang diberikan pada tikus (*Rattus norvegicus*) dengan kadar LH pada serum. Hal ini dikarenakan inhibin B hanya menghambat sintesis FSH dengan cara umpan balik (*feedback negative*) tanpa menghambat sintesis LH di pituitari anterior.

#### **4.2 Profil hormon testosteron pasca pemberian inhibin B**

Kontrasepsi pria yang ideal harus memenuhi beberapa persyaratan, salah satunya adalah tidak memiliki efek samping, khususnya dampak terhadap maskulinitas dan libido. Libido dan maskulinitas pada pria diregulasi oleh hormon testosteron yang disekresikan oleh sel Leydig. Didalam jaringan tertentu, testosteron dikonveksi menjadi bentuk yang lebih kuat daya aktivitasnya, yaitu *Dihydrotestosteron* (DHT) oleh  $5\alpha$ -reductase. Testosteron beraktivitas terhadap sel melalui transkripsi-regulasi intraseluler terdapat AR (Androgen reseptor). Androgen reseptor merupakan *nuclear reseperptor transcription factor* yang memediasi berbagai peran androgen, khususnya berbagai proses reproduksi pada pria (Aulanni'am, 2011) Di dalam testis, AR terdapat pada sel Sertoli dan sel Leydig. Selain itu, AR juga terekspresi secara nyata pada sel epitel tubular, dan sel stromal interstitial di dalam duktus epididimis. Berdasarkan hasil ELISA yang dilakukan, kadar hormon testosteron dalam serum kelompok tikus (*Rattus norvegicus*) perlakuan yang diberi inhibin B secara eksogenus dengan dosis 100 pg/200 gr BB tidak menunjukkan perbedaan signifikan dengan kelompok tikus (*Rattus norvegicus*) kontrol ( $>0,05$ ) (gambar 4.3).



Gambar 4.3 Kadar hormon testosteron setelah pemberian inhibin B

Kadar hormon testosteron pada kelompok tikus kontrol adalah  $2.399 \pm 0.074$  ng/mL, sedangkan kadar hormon testosteron pada kelompok tikus perlakuan yang diberi inhibin B secara eksogenus dengan dosis 100 pg/200 gr BB adalah  $2.339 \pm 0.053$  ng/mL. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian inhibin B dengan dosis 100 pg/200 gr BB secara I.M (*Intra Muscular*) pada tikus (*Rattus norvegicus*) tidak berdampak pada kadar hormon testosteron dalam serum yang disekresikan oleh sel Leydig. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian ini yang menyatakan bahwa rata-rata jumlah sel Leydig tidak mengalami perbedaan yang signifikan antara kelompok tikus kontrol dengan kelompok tikus perlakuan yang diberi inhibin B dengan dosis 100 pg/200 gr BB secara I.M (*Intra Muscular*). Testosteron merupakan androgen yang utama pada mamalia yang disekresikan oleh sel Leydig testis dibawah pengaruh LH yang bekerja pada epitelium seminiferous untuk mendukung spermatogenesis. Testosteron berperan penting dalam mendukung maturasi *round spermatid* menjadi *elongated spermatid* yang dimungkinkan dengan menjaga kondisi *sertoli cell-spermatid binding* (Aulanni'am, 2011).

Testosteron dan FSH menginisiasi jalur pensinyalan yang berkontribusi dalam mendukung spermatogenesis. Testosteron atau FSH secara independen dapat mendukung proliferasi sel Sertoli,



namun FSH memiliki kemampuan dua kali lebih efektif dalam fosforilasi CREB. Kurang efisiennya fosforilasi CREB akibat peran testosteron secara tunggal bertanggung jawab terhadap terjadinya penurunan fertilitas (Aulanni'am, 2011). Hasil penelitian yang dilakukan oleh Fu'adil (2011) dengan metode pemberian inhibin B pada tikus (*Rattus norvegicus*) strain wistar secara eksogenus dengan dosis yang beragam (25, 50, 100 pg/200 g BB) menunjukkan bahwa pemberian inhibin B dapat menurunkan konsentrasi dan motilitas spermatozoa yang signifikan dibandingkan dengan kelompok kontrol. Penurunan konsentrasi dan motilitas spermatozoa tersebut berkorelasi negatif dengan dosis inhibin B yang diberikan. Hal ini menunjukkan bahwa semakin besar dosis inhibin B yang diberikan pada tikus (*Rattus norvegicus*) akan menurunkan konsentrasi dan motilitas spermatozoa yang lebih besar. Menurut Pasqualotto *et al.*, (2003), induksi infertilitas tidak hanya dilakukan dengan menekan produksi spermatozoa, tetapi dapat dilakukan dengan menginduksi penurunan motilitas spermatozoa.

Salah satu kemungkinan penyebab penurunan motilitas spermatozoa adalah penurunan ekspresi CREM dan beberapa faktor transkripsi pada testis. CREM dan beberapa faktor transkripsi dalam *pathway* cAMP-PKA meregulasi beberapa gen pada sel Sertoli yang berperan dalam spermatogenesis, salah satunya adalah *lactate dehydrogenase-A* (LDH-A) yang mengontrol sintesis sumber energi yang utama untuk sel germinal (Walker & Cheng, 2005). Sel sertoli berperan dalam sekresi faktor regulator, misalnya *growth factor*, dan suplai nutrisi untuk sel germinal, misalnya laktat. Hasil penelitian Fu'adil (2011) dengan metode pemberian inhibin B pada tikus (*Rattus norvegicus*) strain wistar secara eksogenus dengan dosis yang beragam (25, 50, 100 pg/200 g BB) menunjukkan bahwa ekspresi CREM menurun pada tubulus seminiferus pada kelompok yang diperlakukan pemberian inhibin B, tetapi tidak terjadi pada sel Leydig. Adanya ekspresi CREM pada sel Leydig ini menunjukkan bahwa *cAMP-mediated signaling pathway* masih berjalan normal pada sel Leydig karena target inhibin B adalah sel Sertoli dalam tubulus seminiferus. Penurunan ini dimungkinkan karena pemberian inhibin B mampu menghambat sekresi FSH sehingga *signaling* dalam merespon FSH berkurang, salah satunya *cAMP-mediated signaling pathway*. FSH merupakan hormon yang mampu menghasilkan



cAMP yang lebih dominan dibandingkan dengan hormon testosteron di dalam sel Sertoli (Walker dan Cheng, 2005).

Testosteron merupakan hormon yang disekresikan oleh sel Leydig pada testis dengan stimulasi LH (*Luteinizing hormone*). Testosteron memiliki peran penting dalam spermatogenesis, menginduksi karakteristik seks sekunder, dorongan seks normal (libido) dan kapasitas koitus (*potential coeundi*) pada individu jantan. Testosteron juga menstimulasi peningkatan massa sel pada individu jantan sehingga laki-laki memiliki tubuh yang lebih besar dibandingkan perempuan (Despopoulus & Silbernagl, 2003). Hal ini menjadikan LH dan testosteron harus dipertahankan dalam upaya pengembangan kontrasepsi hormonal sehingga tidak mempengaruhi perkembangan karakteristik seks sekunder, libido dan kapasitas koitus. Jadi pemberian inhibin B tidak berpengaruh terhadap sekresi hormon testosteron dan rata-rata jumlah sel Leydig, namun tahapan spermatogenesis mengalami gangguan sehingga spermatozoa mengalami penurunan konsentrasi dan motilitas. Hal ini menjadikan pemberian inhibin B berpotensi sebagai alat kontrasepsi hormonal.



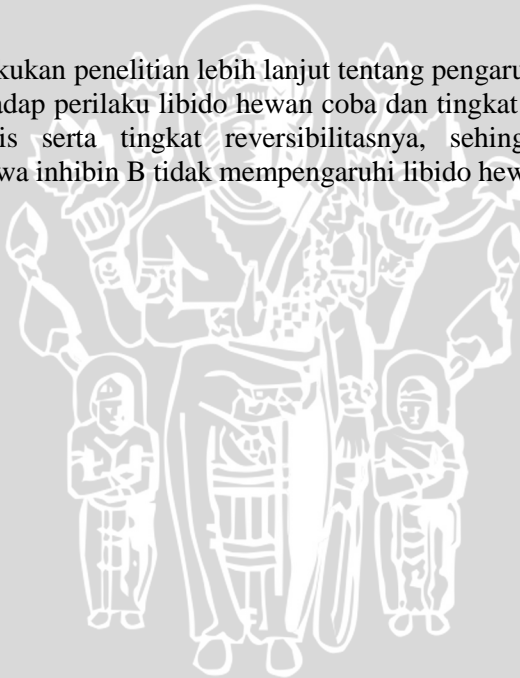
## BAB V KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Kesimpulan

1. Pemberian inhibin B secara IM (*Intra Muscular*) dengan dosis 100 pg/200 gr BB pada tikus (*Rattus norvegicus*) strain wistar tidak mempengaruhi kadar hormon testosterona pada serum tikus (*Rattus norvegicus*) strain wistar.
2. Pemberian inhibin B secara IM (*Intra Muscular*) dengan dosis 100 pg/200 gr BB pada tikus (*Rattus norvegicus*) strain wistar tidak mempengaruhi rata-rata jumlah sel Leydig pada testis.

### 5.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang pengaruh paparan inhibin B terhadap perilaku libido hewan coba dan tingkat gangguan spermatogenesis serta tingkat reversibilitasnya, sehingga dapat dipastikan bahwa inhibin B tidak mempengaruhi libido hewan coba.



## Daftar Pustaka

- Amory, K.J. and W.J. Bremner. 2005. Oral Testosterone in Oil Plus Dutasteride in Men: A Pharmacokinetic Study. *The Journal of Endocrinology dan Metabolism*, 90(5): 2610-2617.
- Anderson, R.A. and D.T. Baird. 2002. Male Contraception. *Endocrinology Review*, 23(6): 735-762.
- Anhb, 2011, <http://www.lab.anhb.uwa.edu.au/mb140/corepages/malerepro/malerepro.htm>. Diakses pada tanggal 12 September 2001.
- Aoki V.M., Emery B.R., Liu L., and Carell D.T. 2006. Protamine Levels Vary between Individual Sperm Cells of Infertility Human Male and Correlate with Viability and DNA Integrity. *Journal of Andrology*, 27(6): 890-898.
- Aulanni'am dan Chanif mahdi. 2010. *Inhibin B : Spermatogenesis dan Pengembangan Kontrasepsi Pria*. Universitas Brawijaya. Malang.
- Aulanni'am. 2011. *Inhibin B: Struktur dan Karakter Biokimiawi Sebagai Kandidat Kontrasepsi Pria*. Airlangga University Perss. Surabaya.
- Baker, P.J., H. Johnson, M. Abel. H.M. Charlton, and P.J. O'Shaughnessy. 2003. Differentiation of adult-type Leydig cells occurs in gonadotrophin-deficient mice. *Reproductive Biology and Endocrinology* 1:4
- Boepple, P.A., F.J. Hayes, A.A. Dwyer., T. Raivio, H. Lee, W.F. Crowley Jr and N. Pitteloud. 2008. Relative Roles of Inhibin B and Sex Steroid in the Negatif Feedback Regulation of Follicle-Stimulating Hormon in Men Across the Full Spectrum of Seminiferus Epithelium Function. *J. Clin EndocrinMetab*, 93 (5): 1809-1814.
- Chada, M., R. Prusa, J. Bronsky, K. Sidlova, M. Pechova and L. Lisa. 2003. Inhibin B, Follicle Stimulating Hormon, Luteinizing Hormon and Testosterone During Childhood and Puberty in Males: Changes in Serum Concentration in Relation to Age Stage of Puberty. *Physiol Res*, 52: 45-51.
- Chen, J., D.J. Hwang, C.E. Bohl, D.D. Miller, and J.T. Dalton. 2005. A Selective Androgen Receptor Modulator for Hormonal Male Contraception. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 312: 546-553.

- Data Statistik-Indonesia. 2011. [http://www.datastatistik-indonesia.com/component/option,com\\_staticx/staticfile,depan.php/Itemid,17/](http://www.datastatistik-indonesia.com/component/option,com_staticx/staticfile,depan.php/Itemid,17/). Diakses pada Tanggal 11 Agustus 2011.
- DeSoto, M.C., R.T. Hitlan, R.S. Doel, and D. McAdams. 2009. Testosterone Fluctuation in Young Men: The Difference Between Interacting With Like and Not-Like Others. *Evolutionary psychology*, 8(2): 173-188.
- Despopoulos, A. and S. Silbernagl. 2003. *Color Atlas of Physiology*. Thieme. New York.
- Eblen, A., S. Bao, Z.M. Lei, S.T. Nakajima and C.V. Rao. 2001. The Presence of Functional Luteinizing Hormon/Chorionic Gonadotropin Resceptors in Human Sperm. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 86: 2643-2648.
- Fu'adil, M.H. 2011. Studi Potensi Inhibin B Sebagai Knadidat Kontrasepsi Pria Berdasarkan Kualitas Spermatozoa, Ekspresi *cAMP Response Element Modulator* (CREM) dalam Testis dan Kadar *Luteinizing Hormon* (LH) dalam Serum *Rattus norvegicus*. Tesis Program Studi Magister Biologi. Universitas Brawijaya. Malang.
- GrisWold, M.D. 1998. The Central Role of Sertoli Cells in Spermatogenesis. *Seminars in Cell and Development Biology*, 9: 411-416.
- Handelsman, D.J. 2003. Hormonal Male Contraception-Lesson from the East When the Western Market Fails. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 88: 559-561.
- Heckert, L.L., and M.D. Griswold. 2002. The Expression of the Follicle-Stimulating Hormon Receptors in Spermatogenesis. *Recent Progress in Hormon Research*, 57: 129-148.
- Holdcraft, R.W. and Braun, R.E. 2004. Hormonal Regulation of Spermatogenesis. *International Journal of Andrology*, 27: 335-342.
- Knight G.P. and Claire Glister, 2001, Potential Local Regulatory Function of Inhibins, Activin and Follistatin in the Ovary, *Reproduction*, 121: 503-512.
- Kumanov P., K. Nandadipati, A. Tomova, and A. Agarwal. 2006. Inhibin B is a Better Marker of Spermatogenesis than other Hormons in the Evaluation of Male Factor Infertility. *World Heath*, 86 (2).



- Ldysinger, 2011, [http://www.ldysinger.com/ThM\\_599d\\_Beg/02\\_Biology/02\\_spermat-oogen.htm](http://www.ldysinger.com/ThM_599d_Beg/02_Biology/02_spermat-oogen.htm), Diakses pada tanggal 11 September 2011
- Lei, Z.M., S. Mishra, W. Zou, B. Xu, M. Foltz, X. Li, and C.V. Rao. 2001. Targeted Disruption of Luteinizing Hormon/ Human Chorionic Gonadotropin Receptor Gene. *Molecular Endocrinology*, 15:184-200.
- Luisi S., P. Florio, F.M. Reis and F. Petraglia. 2005. Inhibin in Female and Male reproductive Physiology: Role in Gametogenesis, Conception, Implantation and Early Pregnancy. *Human Reproduction update*, 11 (2): 123-135.
- Martin, C.W., R.A. Anderson, L. Cheng, P.C. Ho, Z.van der Spuy, K.B. Smith, A.F. Glasier, D. Everington, and D.T. Baird. 2000. Potential Impact of Hormonal Male Contraception: Cross-Cultural Implications for Development of Novel Preparation. *Human Reproduction*, 15(3): 637-645.
- Matzuk M.M., 2000, Editorial: In Search of Binding-Identification of Inhibin Receptors, *Endocrinology*, 141 (7).
- McLachlan, R.L., L. O'Donnel, S.J. Maechen, P.G. Stanton, D.M. Kretser, K. Pratis and D.M. Robertson. 2002. Identification of Spesific Sites of Hormonal Regulation in Spermatogenesis in Rats, Monkey, and Man. *Recent Progress in Hormon Research*, 57:149-179.
- Meachem S.J., E. Nieschalg and M. Simoni, 2001, Inhibin Bin Male Reproduction: Pathophysiology and Clinical Relevance, *European Journal of Endocrinology*, 145: 561-571.
- Mendis-Handagama, S.M. 1997. Luteinizing Hormon on Leydig Cell Structure and Function. *Histology and Histopathology*, 12: 869-882.
- Mendis-Handagama, C.S.M.L. and H.B.S. Ariyaratne. 2001. Differentiation of the Adult Leydig Cell Population in the Postnatal Testis. *Biology of Reproduction*, 65: 660-671.
- Meriggiola, C.M., A. Costantino, W.J. Bremmer, and A.M. Morselli-Labate. 2002. Higher Testosterone Dose Impairs Sperm Suppression Induce by a Combined Androgen-Progestin Regimen. *Journal Andrology*, 23(5).
- Nantel, F., L. Monaco., N.S. Foulkes., D. Masquillier., M. LeMeur., K. Hendriksen., A. Dierich., M. Parvinen and P. Sassone-



- Corsi. 1996. Spermiogenesis deficiency and germ-cell apoptosis CREM-mutant mice. *Nature (London)*, 380:159-162.
- Nieschlag, E., Behre H.M., Nieschlag S. 2004. Testosterone Third Edition. Cambridge University Press. UK.
- Rodriguez, H., Navaro E.O., Sarabia L., Tamayo C., Sepulveda M., Inostroza J., Araya J.C., Moriguchi K. 2008. Histological and Function Organization in Human Testicle: Expression of Receptor c-kit and Androgen. *Int. J. Morphol*, **26 (3)** 603-608.
- Ogawa, T., K. Kita and Y. Kubota. 2006. Proliferation of Spermatogonial Stem Cells and Spermatogenesis in Vitro. *Reproductive Medicine and Biology*, 5:169-174.
- Pasqualotto, F.F, A.M. Lucon, E.B. Pasqualotto, and S. Arap. 2003. Trend in Male Contraception. *Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. S.Paulo*, 58 (5): 500-505.
- Plin.Barry, 2011, [http://snhs-plin.barry.edu/Research/What\\_is\\_Inhibin.htm](http://snhs-plin.barry.edu/Research/What_is_Inhibin.htm). Diakses pada Tanggal 12 September 2011.
- Robertson D.M., H.G. Burger and P.J. Fuller, 2004, Inhibin/Activin and Ovarian Cancer, *Endocrine-Related Cancer*, 11: 35-49.
- Romabauts,I., D. Vanmontfort, G. Verhoeven, and E. Decuupere, 1992, Immunoreactive Inhibin B in Plasma, Amniotic fluid, and Gonadal Tissue of Male and Female Chick Embryos, *Biology Of Reproduction*, 46: 1211-1216.
- Ross, M.H., Kaye, G., Pawlina, W. 2002. *Histologi, a Text and Atlas*, fourth edition. Lippincott Williams Wilkins. English.
- Roth, M.Y., and J.K. Amory. 2010. Pharmacologic Development of Male Hormonal Contraceptive Agents. *Clinical Pharmacology dan Therapeutics*, 96.
- Singh, R., Deepa S.R., Madhavi S., Gupta N.J., Chakravarty B., Singh L., Thangaraj K. 2006. Male Infertility : No Evidence of Involvement of Androgen Receptor Gene Among Indian Men. *Journal of Andrology*, 27 1.
- Sturmhofel, S.H., Bartke A. 1998. *The Endocrine System. An Overview*, 22 3.

- Vander, A.J., J.H. Sherman, and D.S. Luciano. 2001. Human Physiology: The Mechanism of Body Function, Eighth Edition. The McGraw Hill Companies.
- Walker, W.H. L. Fucci and J.F. Habener. 1995. Expression of gene encoding transcription factor cyclic adenosine 3',5', monophosphate (cAMP) response element-binding protein (CREB); regulation by follicle stimulating hormone-induced cAMP signaling in primary rat sertoli cells. *Endocrinology*, 136: 3534-3545.
- Walker, W.H and J.F. Habener. 1996. Role of transcription factors CREB and CREM in cAMP-regulated transcription during spermatogenesis. *Trends Endocrinol Metab*, 7:133-138.
- Walker, W.H., P.B. Daniel and J.F. Habener. 1998. Inducible cAMP early repressor ICER down-regulation of CREB gene expression in Sertoli cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 143:167-178.
- Walker, W.H. 2009. Molecular Mechanisms of Testosterone Action in Spermatogenesis. *Steroid*, 74: 602-607.
- Walker, W.H. and J. Cheng. 2005. FSH and Testosterone Signaling in Sertoli Cells. *Reproduction*, 130: 15-28.
- Weinbauer, G.F., S. Schlatt, V. Walter and E. Nieschlag. 2001. Testosterone-Induced Inhibition of Spermatogenesis is More Closely Related to Suppression of FSH than to Testicular Androgen Levels in the Cynomolgus Monkey Model (macaca fascicularis). *Journal of Endocrinology*, 168: 25-38.
- Winters J.S., C. Wang, E. Abdelrahman, V. Hadeed, M.A. Dyky and A. Brufsky. 2006. Inhibin-B Level in Healthy Young Adult Men and Prepubertal Boys: Is Obesity the Cause for the Contemporary Decline in Sperm Count Because of Fewer Sertoly Cells?, *Journal of Andrology*, 27(4).

## Lampiran 1. Komposisi Bahan

Larutan	Bahan-bahan
100 mL NaCl Fisiologis 0,9%	4.5 gram NaCl Akuades
1 M PBS pH 7,4	0.14 M NaCl 2.7 mM KCl 8.1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O 1.5 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Akuades
500 mL PFA 10%	134,14 mL Formaldehid 37% NaCl Fis 0,9%

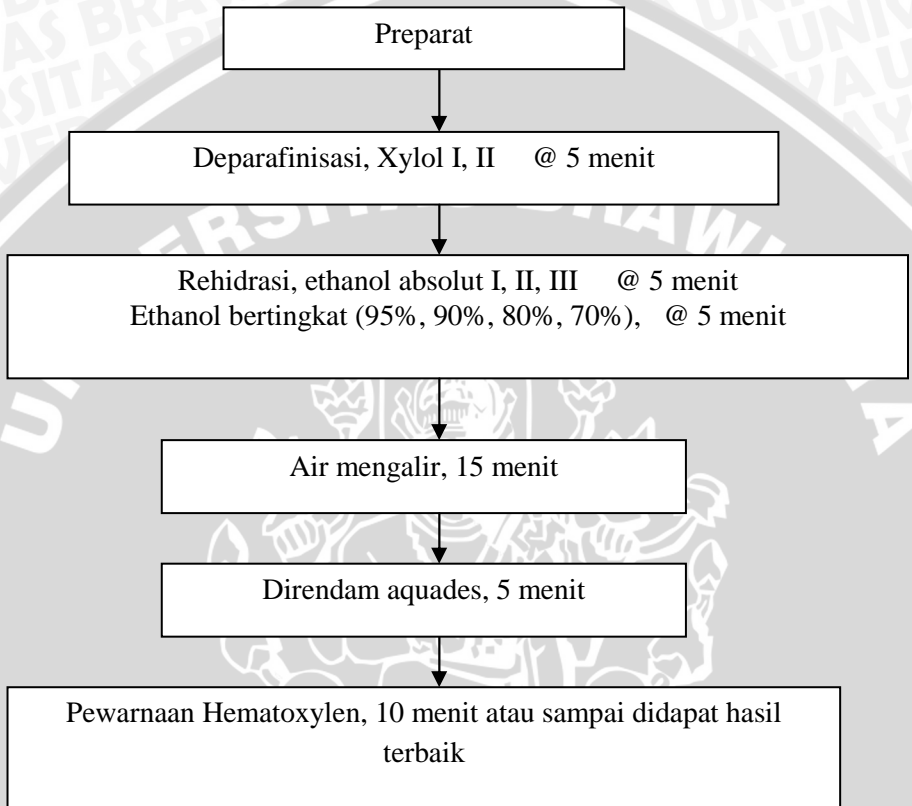
## Lampiran 2. Diagram Alir Pengukuran Testosteron dengan Testosteron ELISA Kit

Well mikroplate

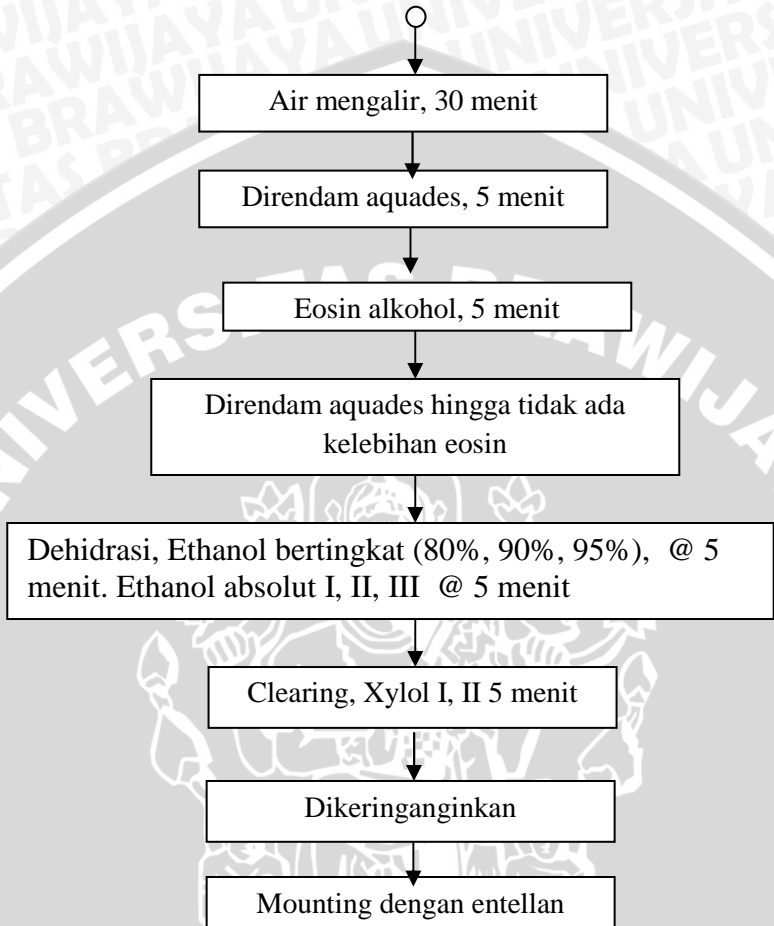
- Dimasukkan 50  $\mu\text{L}$  primary antibody solution (kecuali well untuk NSB)
- Diinkubasi selama 1 jam pada suhu ruang dan dishaker pada 500 rpm
- Dicuci dengan wash buffer sebanyak empat kali
- Ditambah 100  $\mu\text{L}$  Calibrator Dliuent ke dalam well NSB dan standart blanko
- Ditambah sampel ke dalam well lainnya
- Dimasukkan 50  $\mu\text{L}$  testosteron conjugate ke dalam semua well
- Dinkubasi selama 3 jam pada suhu ruang
- Dicuci dengan wash buffer sebanyak empat kali
- Ditambah substrat solution 200  $\mu\text{L}$  ke dalam masing-masing well
- Diinkubasi selama 30 menit
- Ditambah 50  $\mu\text{L}$  stop solution pada masing-masing well
- Dibaca dengan ELISA reader pada panjang gelombang 450 nm

Hasil

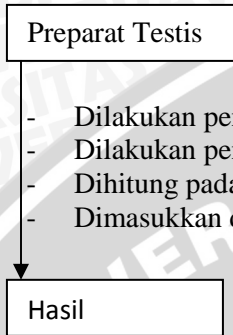
**Lampiran 3.** Diagram Alir Pewarnaan Hematoxylen dan Eosin (H&E)







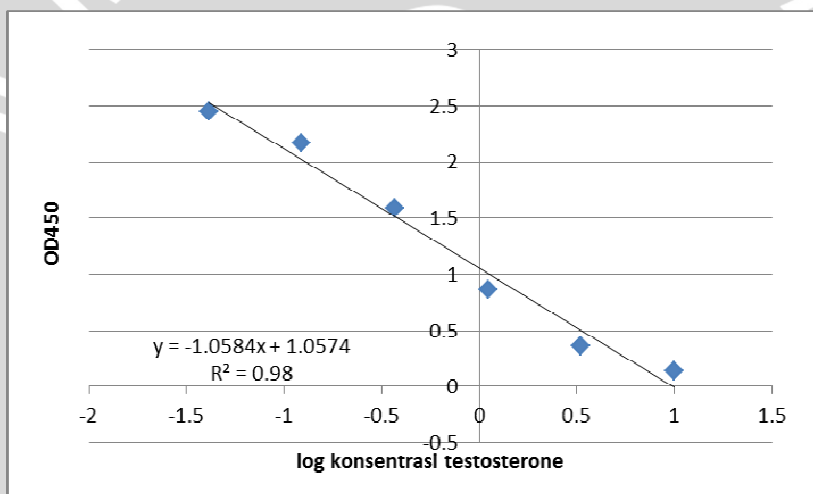
**Lampiran 4.** Diagram Alir Penghitungan Sel Leydig pada Preparat Testis



## Lampiran 5. Kurva Standar Testosteron

**Tabel L.5** Kurva Standart Testosteron

Kadar satandart testosteron	Absorbansi
0	2.625
0.41	2.274
0.123	2.19
0.37	1.612
1.11	0.891
3.33	0.389
10	0.162



**Gambar L.5** Kurva Standar Testosteron

**Lampiran 6.** Hasil Uji t-independent untuk pengaruh pemberian inhibin B terhadap rata-rata jumlah sel Leydig

**Tabel L.6** Hasil Uji t-independent untuk pengaruh pemberian inhibin B terhadap rata-rata jumlah sel Leydig

## T-Test

[DataSet0]

**Group Statistics**

	kelo m...	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Jumlah	1	3	22.5333	.50332	.29059
	2	3	23.0667	.81445	.47022

**Independent Samples Test**

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
Jumlah	Equal variances assumed	1.458	.294	-.965	4	.389	-.53333	.55277	-2.06807	1.00140
	Equal variances not assumed			-.965	3.333	.399	-.53333	.55277	-2.19708	1.13042

**Lampiran 7.** Hasil Uji t-independent untuk pengaruh pemberian inhibin B terhadap kadar testosteron

**Tabel L.7** Hasil Uji t-independent untuk pengaruh pemberian inhibin B terhadap kadar testosteron

**Group Statistics**


	kelompok	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
ELISA	kontrol	3	2.3997	.07379	.04260
	perlakuan	3	2.3390	.05356	.03092

**Independent Samples Test**

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
ELISA	Equal variances assumed	.674	.458	1.152	4	.313	.06067	.05264	-.08549	.20682
	Equal variances not assumed			1.152	3.650	.319	.06067	.05264	-.09119	.21252



## Lampiran 8. Sertifikat Laik Etik Penelitian



**KOMISI ETIK PENELITIAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK  
"ETHICAL CLEARENCE"**

**No: 88-KEP-UB**

**KOMISI ETIK PENELITIAN (ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE)  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG  
DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA:**


**PENELITIAN BERJUDUL** : STUDI PAPAN HORMON INHIBIN B TERHADAP  
PROFIL HORMON TESTOSTERON DAN JUMLAH SEL  
LEYDIG PADA *Rattus norvegicus*

**PENELITI** : NOER MUHAMMAD DLIYAU HAQ

**UNIT/LEMBAGA/TEMPAT** : BIOLOGI S-1/F-MIPA/UNIVERSITAS BRAWIJAYA

**DINYATAKAN** : LAIK ETIK

Malang, 20 Juni 2012  
Ketua Komisi Etik Penelitian  
Universitas Brawijaya

  
**Prof. Dr. drh. Aulanni'am, DES.**  
NIP. 19600903 198802 2 001

**Gambar L.8** Sertifikat Laik Etik Penelitian