

repository.ub.ac.id

**PERBANDINGAN PEMBERIAN EKSTRAK TERONG  
CEPOKA (*Solanum torvum*) DENGAN EKSTRAK BIJI KAPUK  
(*Ceiba pentandra*) TERHADAP INFERTILITAS TIKUS (*Rattus  
novergicus*) MELALUI EKSPRESI NFkB DAN DIAMETER  
TUBULUS SEMINIFERUS**

SKRIPSI

Oleh:

**Husayn Satria Nugroho**  
**155130100111037**



**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER HEWAN  
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2019**



repository.ub.ac.id

**PERBANDINGAN PEMBERIAN EKSTRAK TERONG CEPOKA  
(*Solanum torvum*) DENGAN EKSTRAK BIJI KAPUK (*Ceiba  
pentandra*) TERHADAP INFERTILITAS TIKUS (*Rattus novergicus*)  
MELALUI EKSPRESI NFκB DAN DIAMETER TUBULUS  
SEMINIFERUS**

**SKRIPSI**

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar

Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh:

**Husayn Satria Nugroho**

**155130100111037**



**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER HEWAN  
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2019**

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

**LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI****PERBANDINGAN PEMBERIAN EKSTRAK TERONG CEPOKA (*Solanum torvum*) DENGAN EKSTRAK BIJI KAPUK (*Ceiba pentandra*) TERHADAP INFERTILITAS TIKUS (*Rattus novergicus*) MELALUI EKSPRESI NFkB DAN DIAMETER TUBULUS SEMINIFERUS****Oleh:****Husayn Satria Nugroho****155130100111037**

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji  
pada tanggal 2 Mei 2019  
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

**Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES**

NIP. 19600903 1898802 2 001

**drh. Yudit Oktanella, M.Si**

NIK. 201405 881022 001

Mengetahui,

Dekan Fakultas Kedokteran Hewan

Universitas Brawijaya

**Dr. Ir. Sudarminto Setvo Yuwono, M.App.Sc**

NIP. 19631216 1988803 1 002

**LEMBAR PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Husayn Satria Nugroho  
NIM : .155130100111037  
Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan  
Penulis Skripsi berjudul :

Perbandingan Pemberian Ekstrak Terong Cepoka (*Solanum Torvum*) dengan Ekstrak Biji Kapuk (*Ceiba pentandra*) Terhadap Infertilitas Tikus (*Rattus Novergicus*) Melalui Ekspresi NFkB dan Diameter Tubulus Seminiferus.

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 17 Mei 2019

Yang menyatakan,

**Husayn Satria Nugroho**

NIM. 155130100111037

**Perbandingan Pemberian Ekstrak Terong Cepoka (*Solanum torvum*) dengan Ekstrak Biji Kapuk (*Ceiba pentandra*) terhadap Infertilitas Tikus (*Rattus norvegicus*) melalui Ekspresi NFkB dan Diameter Tubulus Seminiferus**

**ABSTRAK**

Biji kapuk (*Ceiba pentandra*) dan terong cepoka (*Solanum torvum*) merupakan bahan tanaman yang memiliki efek terhadap fertilitas. Senyawa solasodin dan gosipol dari ekstrak terong cepoka dan biji kapuk yang di hasilkan diduga dapat berfungsi sebagai bahan kontrasepsi herbal pada hewan jantan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak terong cepoka (*Solanum torvum*) dan biji kapuk (*Ceiba pentandra*) terhadap infertilitas tikus (*Rattus norvegicus*) melalui ekspresi NFkB dan diameter tubulus seminiferus. Hewan coba yang digunakan berupa tikus jantan strain wistar umur 3 bulan dengan berat 150-200 gram. Rancangan percobaan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 3 kelompok perlakuan, masing-masing menggunakan 6 ekor tikus. K (-) : Tikus tidak diberi perlakuan induksi senyawa gosipol atau solasodin. P1 : Tikus diberi perlakuan induksi senyawa solasodin dengan dosis 1g/kgBB. P2: Tikus diberi perlakuan induksi senyawa gosipol dengan dosis 0,1 g/kgBB. Ekstrak biji kapuk dan terong cepoka diekstraksi dengan metode maserasi pelarut etanol 70%. Pemeriksaan ekspresi NFkB diperiksa menggunakan metode imunohistokimia (IHK) yang dianalisis dengan software *immunorasio*. Preparat histopatologi (HE) diameter tubulus seminiferus dianalisis dengan software *image raster 3*. Analisis data dalam penelitian ini menggunakan uji *One Way ANOVA* dan uji lanjutan *Tukey* dengan tingkat kepercayaan 95% ( $\alpha = 0,05$ ). Hasil penelitian menunjukkan pemberian ekstrak terong cepoka dapat meningkatkan ekspresi NFkB secara signifikan ( $p < 0,05$ ) dengan jumlah rata-rata  $87,22 \pm 6,89$  dosis pemberian 1 g/kgBB. Ekstrak biji kapuk dapat menurunkan diameter tubulus seminiferus dengan rata-rata  $0,31 \pm 0,016$  pada dosis 0,1 g/kgBB. Kesimpulan penelitian ini adalah ekstrak buah terong cepoka dan biji kapuk dapat digunakan sebagai kandidat bahan kontrasepsi herbal.

**Kata kunci:** Solasodin, gosipol, infertilitas, NFkB, diameter tubulus seminiferus.

repository.ub.ac.id

**Comparison of Oral Administration of Eggplant Cepoka Extract (*Solanum torvum*) and Cotton Seeds (*Ceiba pentandra*) toward Infertility Rats (*Rattus norvegicus*) Through NFkB Expression and Diameter of Seminiferous Tubules**

**ABSTRACT**

Cotton seeds (*Ceiba pentandra*) and eggplant cepoka (*Solanum torvum*) are plant ingredients that have an effect on fertility. Solasodine and gossypol compounds from the extract of eggplant cepoka and cotton seeds produced are thought to be used as herbal contraceptives in male animals. This study aimed to determine the effect of cepoka eggplant extract (*Solanum torvum*) and cotton seeds (*Ceiba pentandra*) on the infertility of male rats (*Rattus norvegicus*) through NFkB expression and diameter of the seminiferous tubules. The experimental animals were used male westar strains aged 3 month, weight of 150-200 grams. The experimental design used a completely randomized design (CRD) with 3 treatment groups, for each using 6 male rats. K (-): Rats are not treated with induction of gossypol or solasodine compounds. P1: Rats are treated with induction of solasodine compounds with dose of 1 g/kg BW. P2: Rats were given an induction treatment of gossypol compounds with dose of 0.1 g/kg BW. Cotton seeds and eggplant cepoka extracted by maceration method with 70% ethanol. The examination of NFkB expression using immunohistochemical methods and analyzed by software immunoratio. The Histopathological examination (HE) of seminiferous tubule diameter was analyzed by software image raster 3. Data used the *One Way ANOVA* test *Tukey* to follow-up test with a confidence level of 95% ( $\alpha = 0.05$ ). The results showed administration of eggplant cepoka extract can be significantly increase NFkB expression ( $P < 0,05$ ) average number  $87,22 \pm 6,89$  with a dose of 1 g/kg BW. Cotton seed extract can be reduce the diameter of seminiferous tubules with an average  $0.31 \pm 0.016$  with a dose of 0.1 g/kg BW. The conclusion of this research is eggplant cepoka and cotton seeds extract can be used as candidates of herbal contraceptive ingredients.

**Kata kunci:** Solasodine, gossypol, infertility, NFkB, diameter of seminiferous tubules

## KATA PENGANTAR

Puji syukur alhamdulillah penulis haturkan kehadiran Tuhan Yang Maha Esa karena atas limpahan rahmat, hidayah dan pertolongan-Nya lah sehingga penulis mampu menyelesaikan proposal skripsi yang berjudul Perbandingan Pemberian Ekstrak Terong Cepoka (*Solanum torvum*) dan Ekstrak Biji Kapuk (*Ceiba pentandra*) terhadap Infertilitas Tikus (*Rattus norvegicus*) Melalui Ekspresi NFkB dan Diameter Tubulus Seminiferus dengan lancar.

Selama proses penulisan dan penyusunan proposal ini penulis banyak mendapat bantuan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada:

1. Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES selaku pembimbing I yang selalu memberikan dukungan tiada henti demi kemajuan FKH UB tercinta.
2. drh. Yudit Oktanella, M.Si selaku pembimbing II yang telah banyak memberikan bimbingan, nasehat, arahan, serta saran kepada penulis.
3. drh. Aulia Firmawati, M.Vet dan drh. Tiara Widyaputri, M.Si selaku penguji yang telah memberikan banyak masukan dan nasehat.
4. Dr. Ir. Sudarminto Setyo Yuwono, M.App.Sc selaku dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya yang selalu memberikan dukungan bagi kemajuan proses akademik maupun non akademik seluruh mahasiswa
5. Seluruh staf dan karyawan FKH UB, yang telah membantu jalannya proses administrasi dalam membuat tugas akhir.
6. Keluarga yang selalu semangat dan saling menyemangati dalam berbagai kondisi.
7. Kelompok skripsi : Hevin, Kama, Taufiq, Afwan, dan Liza atas segala dukungan dan kerjasamanya.
8. Teman-teman classy yang selalu memberi semangat dan support dalam berbagai kondisi.
9. Teman-teman asisten lab repro dan kontrakan 833 yang telah membantu doa dan support atas kelancaran skripsi ini

10. Semua pihak yang telah membantu dalam pelaksanaan dan penyusunan laporan ini yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Akhir kata, penulis berharap semoga Allah SWT membalas segala kebaikan yang telah diberikan dan proposal skripsi ini dapat memberikan manfaat dan menambah pengetahuan tidak hanya bagi penulis tetapi juga bagi pembaca.

Malang, 17 Mei 2019

Penulis



## DAFTAR ISI

	<b>Halaman</b>
<b>HALAMAN JUDUL .....</b>	<b>i</b>
<b>LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI .....</b>	<b>ii</b>
<b>LEMBAR PERNYATAAN .....</b>	<b>iii</b>
<b>ABSTRAK .....</b>	<b>iv</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>v</b>
<b>KATA PENGANTAR.....</b>	<b>vi</b>
<b>DAFTAR ISI.....</b>	<b>viii</b>
<b>DAFTAR GAMBAR.....</b>	<b>x</b>
<b>DAFTAR TABEL .....</b>	<b>xi</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN .....</b>	<b>xii</b>
<b>DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG .....</b>	<b>xiii</b>
<b>BAB 1 PENDAHULUAN</b>	
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	3
1.3 Batasan Masalah.....	3
1.4 Tujuan Penelitian.....	4
1.5 Manfaat Penelitian.....	5
<b>BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1 Sistem Reproduksi Tikus Jantan .....	6
2.2 Testis .....	7
2.3 Spermatogenesis.....	9
2.4 Ekstrak Terong Cepoka.....	11
2.5 Ekstrak Biji Kapuk .....	13
2.6 Ekspresi NFkB ( <i>Nuclear Factor kappa-B</i> ) .....	16
<b>BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN</b>	
3.1 Kerangka Konsep .....	19
3.2 Hipotesa Penelitian .....	22
<b>BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN</b>	
4.1 Waktu dan Tempat Penelitian .....	23
4.2 Alat dan Bahan Penelitian .....	23
4.3 Sampel Penelitian .....	24
4.4 Rancangan Penelitian .....	24
4.5 Variabel Penelitian .....	25
4.6 Prosedur Kerja.....	25

4.6.1	Persiapan Hewan Coba.....	25
4.6.2	Pembuatan Ekstraksi Biji Kapuk ( <i>Ceiba pentandra</i> ) .....	26
4.6.3	pembuatan Ekstraksi Terong Cepoka ( <i>Solanum torvum</i> ).....	27
4.6.4	Pemberian Ekstrak Biji Kapuk dan Terong Cepoka.....	27
4.6.5	Euthanasia dan koleksi Testis.....	28
4.6.6	Pembuatan Preparat Histopatologi Tubulus Seminiferus.....	28
4.6.7	Pembuatan Preparat Imunohistokimia dan Analisa Ekspresi NFkB (IHK) .....	31
4.6.8	Perhitungan Preparat HE diameter Tubulus Seminiferus.....	32
4.6.9	Analisis Data .....	32
<b>BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN</b>		
5.1	Perbandingan Pemberian Ekstrak Terong Cepoka ( <i>Solanum torvum</i> ) dengan Biji Kapuk ( <i>Ceiba pentandra</i> ) terhadap Infertilitas Tikus ( <i>Rattus norvegicus</i> ) melalui Ekspresi NFkB Tubulus Seminiferus.....	33
5.2	Perbandingan Pemberian Ekstrak Terong Cepoka ( <i>Solanum torvum</i> S.) dengan Biji Kapuk ( <i>Ceiba pentandra</i> G.) terhadap Gambaran Histologi Diameter Tubulus Seminiferus Tikus ( <i>Rattus norvegicus</i> ) .....	40
<b>BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN</b>		
6.1	Kesimpulan .....	45
6.2	Saran .....	45
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>		46
<b>LAMPIRAN.....</b>		50

## DAFTAR GAMBAR

<b>Gambar</b>	<b>Halaman</b>
2.1 Struktur Anatomis Tikus Jantan.....	5
2.2 Anatomi testis .....	7
2.3 Proses Spermatogenesis.....	8
2.4 Terong Cepoka ( <i>Solanum torvum</i> ).....	10
2.5 Gambar Biji Kapuk ( <i>Ceiba prntandra</i> ).....	13
3.1 Kerangka Konsep .....	17
5.1 Immunohistokimia Tubulus Seminiferus.....	32
5.2 Histologi Tubulus Seminiferus tikus .....	38



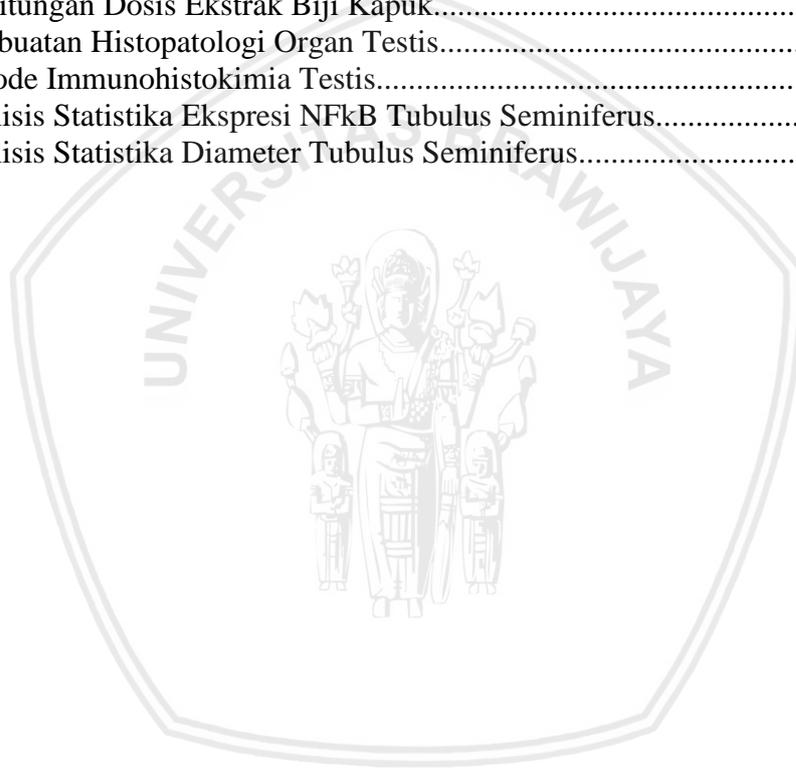
## DAFTAR TABEL

<b>Tabel</b>	<b>Halaman</b>
4.1. Rancangan Penelitian .....	25
5.1 Perbandingan pemberian ekstrak terong cepoka dengan biji kapuk terhadap ekspresi NFkB pada tubulus seminiferus (%).....	33
5.2 Penurunan diameter tubulus seminiferus (mm) yang diberikan ekstrak terong cepoka dengan biji kapuk.....	39



## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Kerangka Operasional Rancangan Penelitian.....	51
2. Surat Layak Etik.....	52
3. Surat Keterangan Ekstraksi Terong Cepoka.....	53
4. Surat Keterangan Ekstraksi Biji Kapuk.....	54
5. Perhitungan Dosis Ekstrak Terong Cepoka.....	55
6. Perhitungan Dosis Ekstrak Biji Kapuk.....	56
7. Pembuatan Histopatologi Organ Testis.....	57
8. Metode Immunohistokimia Testis.....	59
9. Analisis Statistika Ekspresi NFkB Tubulus Seminiferus.....	60
10. Analisis Statistika Diameter Tubulus Seminiferus.....	63



## DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

%	: persen
±	: plus-minus
μL	: mikroliter
BSA	: <i>Bovine Serum Albumin</i>
DAB	: <i>Diamano Benzidine</i>
DNA	: <i>deoxybonucleic acid</i>
HE	: Hematoksilin Eosin
IHK	: Imunohistokimia
mg/kgBB	: miligram per kilogram berat badan
mL	: mili liter
NaCl	: Natrium klorida
NK	: <i>Natural Killer</i>
°C	: derajat celcius
pH	: <i>power oh hidrogen</i>
RAL	: Rancangan Acak Lengkap
NFκB	: <i>Nuclear Factor kappa B</i>
IκB	: <i>Inhibitor kappa B</i>
TLR4	: <i>Toll Like Receptor 4</i>
Cx-43	: <i>Connexin 43</i>
3β-HSD	: 3β-hidroksisteroid dehidrogenase
ABP	: Androgen Binidng Protein
FSH	: <i>Folikel Stimulating Hormon</i>
LH	: <i>Luteizing Hormon</i>

## BAB 1 PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Ledakan populasi anjing di daerah rawan penyakit zoonosis dapat menimbulkan keresahan bagi masyarakat karena dapat memicu terjadinya rabies. Populasi anjing liar di kota besar seperti Denpasar Timur memiliki perbandingan rasio 13,2 : 1, dengan jumlah anjing 96 dan jumlah penduduk 1272 yang mengalami peningkatan dari tahun 2008-2009 (Puja dan Kardena, 2012). Populasi anjing liar yang tidak terkontrol dapat menyebabkan resiko penularan penyakit dari sesama hewan ataupun dari hewan ke manusia.

Upaya yang dilakukan dalam pengendalian populasi anjing liar diantaranya dengan cara operasi, dan eliminasi. *Ovariohysterectomy* dan kastrasi merupakan metode pengendalian populasi anjing liar yang telah sering digunakan, namun hal tersebut dirasa masih kurang efektif dikarenakan memakan waktu, biaya yang mahal dan terbatasnya tenaga ahli di daerah-daerah. Eliminasi hewan liar tidak lagi sesuai dengan prinsip *animal welfare*, sehingga perlu dikembangkan metode pengendalian populasi dengan menggunakan senyawa herbal yang lebih efektif.

Terong cepoka (*Solanum torvum*) dan biji kapuk (*Ceiba Pentandra*) merupakan salah satu bahan tanaman yang memiliki efek terhadap fertilitas. Terong cepoka (*Solanum torvum*) termasuk dalam famili *Solanaceae*. Ekstrak buah cepoka mengandung solasodin yang diduga berpotensi sebagai bahan kontrasepsi dan mengandung alkaloid steroid solasodine yang diduga dapat dimanfaatkan sebagai

bahan kontrasepsi pria (Siriati, 2009). Pemberian solasodin yang di isolasi dari ekstrak buah terong cepoka dapat berperan dalam infertilitas tikus jantan yang ditunjukkan dengan jumlah dan motilitas spermatozoa menurun. Solasodin juga diduga memiliki aktifitas yang dapat menekan fungsi hipofisis anterior untuk mensekresikan FSH dan LH. Penurunan LH menyebabkan penurunan produksi testosteron pada sel leydig (Oktariani dkk., 2014, Rafiq, dkk., 2013).

Gosipol diperoleh dari ekstrak kapuk randu dan dapat menyebabkan gangguan pada sistem reproduksi, selain itu gosipol dapat mengganggu faktor transkripsi (p53, p50 dan p65) sehingga menghambat pembentukan hormon yang diperlukan untuk reproduksi (Moon *et al.*, 2011). Pengaruh pemberian ekstrak kapuk dalam pakan domba juga mampu menurunkan jumlah sel leydig dan menyebabkan ukuran testis menjadi lebih kecil (Cunha, *et al.*, 2012). Senyawa gosipol yang ditemukan di dalam darah menimbulkan kerusakan jaringan pada testis. Kerusakan jaringan pada testis memicu terjadinya mekanisme inflamasi, sehingga mengakibatkan peningkatan apoptosis sel yang ditandai dengan adanya ekspresi *Nuclear Factor kappa-B* (NFκB) yang terdapat pada sel sertoli (Pentikainen, 2002).

NFκB (*Nuclear Factor kappa B*) memiliki peranan penting dalam mengaktifkan respon inflamasi dan proliferasi sel. Inflamasi terjadi pada sel sertoli dan sel leydig mengaktifasi ekspresi NFκB (*Nuclear Factor kappa-B*) yang menyebabkan peningkatan apoptosis sel sehingga menyebabkan penurunan spermatogenesis pada sel sertoli mengakibatkan terjadinya infertilitas pada reproduksi jantan (Brocas *et al.*, 1997).

Berdasarkan latar belakang di atas maka dilakukan penelitian mengenai pengaruh ekstrak biji kapuk dan terong cepoka sebagai kandidat kontrasepsi pada tikus jantan (*Rattus norvegicus*) melalui ekspresi NFκB dan diameter tubulus seminiferus.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka rumusan masalah yang didapat adalah:

- 1) Apakah pemberian ekstrak terong cepoka (*Solanum torvum*) dengan biji kapuk (*Ceiba pentandra*) secara peroral dapat memberikan efek infertilisasi pada tikus (*Rattus norvegicus*) dengan meningkatkan ekspresi NFκB pada testis ?
- 2) Apakah pemberian ekstrak terong cepoka (*Solanum torvum*) dengan biji kapuk (*Ceiba pentandra*) secara peroral dapat menurunkan diameter tubulus seminiferus pada tikus (*Rattus norvegicus*) ?

## 1.3 Batasan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka penelitian ini dibatasi pada:

- 1) Hewan model yang didapatkan adalah tikus (*Rattus norvegicus*) jantan strain *wistar* umur 75-90 hari dengan berat 150-200 gram. Penggunaan hewan telah mendapat persetujuan dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya dengan No. 967-KEP-UB (**Lampiran 2**)

- 2) Pengamatan dan pengukuran diameter tubulus seminiferus dilakukan menggunakan software *image raster 3 imacos*.
- 3) Pemberian ekstrak terong cepoka (*Solanum torvum*) dan biji kapuk (*Solanum torvum*) dilakukan secara peroral dengan dosis 1 g/kgBB dan 0,1 g/kgBB (Susilo dan Akbar, 2016)
- 4) Pengamatan ekspresi NFκB menggunakan metode Imunohistokimia menggunakan aplikasi imunorasio dengan hasil berbentuk persen (%).
- 5) Variabel yang diamati dalam penelitian antara lain pada ekspresi NFκB dan diameter tubulus seminiferus.

#### 1.4 Tujuan Penelitian

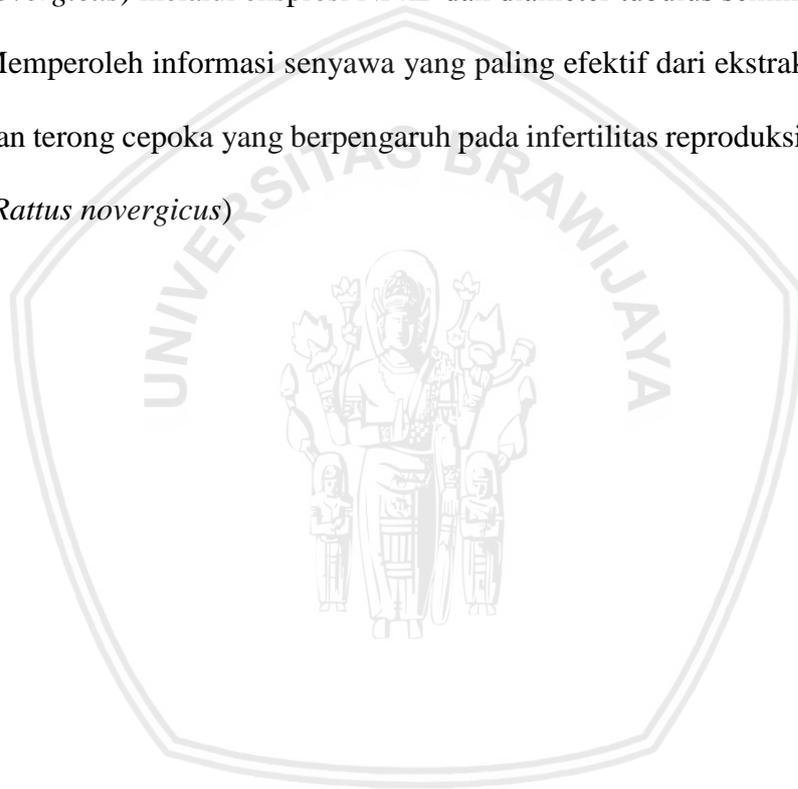
Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka tujuan penelitian adalah:

- 1) Mengetahui perbandingan pengaruh pemberian ekstrak terong cepoka (*Solanum torvum*) dengan biji kapuk (*Ceiba pentandra*) secara peroral pada tikus (*Rattus norvegicus*) terhadap peningkatan ekspresi NFκB dan pada testis.
- 2) Mengetahui perbandingan pengaruh pemberian ekstrak terong cepoka (*Solanum torvum*) dan biji kapuk (*Ceiba pentandra*) secara peroral terhadap penurunan diameter tubulus seminiferus pada tikus (*Rattus norvegicus*).

### 1.5 Manfaat Penelitian

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka manfaat penelitian adalah:

- 1) Memperoleh informasi mengenai pengaruh pemberian ekstrak biji kapuk dan terong cepoka terhadap kejadian infertilitas tikus jantan (*Rattus novergicus*) melalui ekspresi NFκB dan diameter tubulus seminiferus.
- 2) Memperoleh informasi senyawa yang paling efektif dari ekstrak biji kapuk dan terong cepoka yang berpengaruh pada infertilitas reproduksi tikus putih (*Rattus novergicus*)

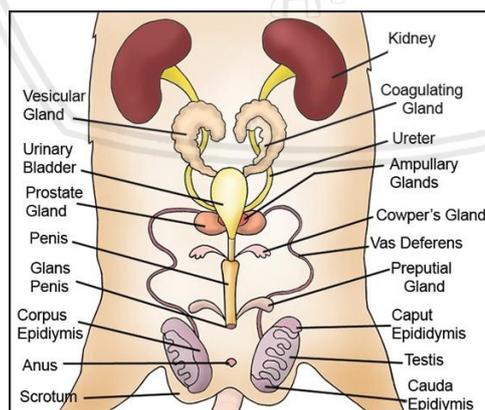


## BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Sistem Reproduksi Tikus Putih Jantan

Tikus (*Rattus norvegicus*) albino atau yang dikenal sebagai “tikus putih” adalah hewan yang paling sering digunakan sebagai model dalam penelitian biomedis. karena dapat mewakili sistem biologis mamalia, maka hewan ini tepat untuk dijadikan sebagai hewan coba dalam kajian pra-klinik. Salah satu galur yang paling banyak digunakan adalah tikus Wistar (*Wistarat*) yang mulai dikembangbiakkan di *Wistar Institute* sejak 1906 (Sengupta, 2013).

Testis merupakan kelenjar utama dalam sistem reproduksi jantan yang bertanggung jawab terhadap produksi gamet jantan atau spermatozoa (spermatogenesis) dan sintesis hormon jantan atau androgen (steroidogenesis). Testis berjumlah sepasang, terletak di inguinal, tersimpan dalam kantung skrotum. (Gambar 2.1).



**Gambar 2.1.** Struktur anatomis tikus jantan (Chapin dan Bjorn, 2003).

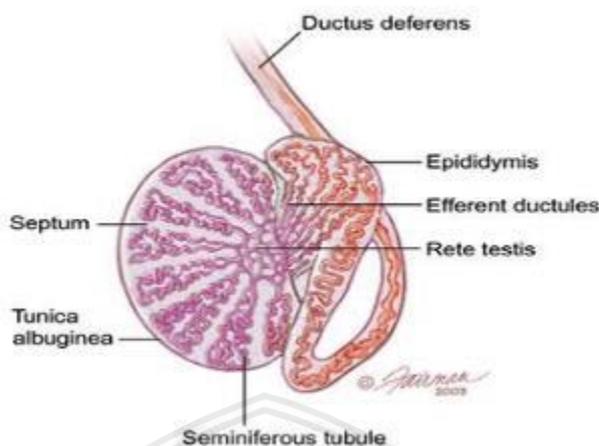
Anatomi pada mamalia, testis turun dan keluar dari rongga abdomen (peritoneal) menuju posisi ekstrakorporeal dan akhirnya masuk ke dalam skrotum (inguinoskrotal). Proses ini dikenal sebagai *descensus testiculorum* yang

dikendalikan oleh androgen. Dengan posisi ini temperatur testis menjadi lebih rendah daripada temperatur tubuh (sekitar 2–4<sup>0</sup>C) yang diperlukan untuk spermatogenesis (Hughes dan Acerini, 2008). Selain testis, terdapat kelenjar kelamin aksesorius, diantaranya adalah vesikula seminalis, prostat, dan *bulbouretralis* (kelenjar Cowper).

Kelenjar aksesorius ini berfungsi menghasilkan berbagai sekret yang berperan dalam transportasi spermatozoa, *buffer*, suplai nutrien dan substrat metabolik untuk kehidupan spermatozoa terutama motilitas dan fertilitas, fungsi lubrikasi, dan membentuk *vaginal plug*. Sekret yang dihasilkan *accessory sex glands* bersama-sama dengan spermatozoa dan sekret epididimis disebut semen.

## 2.2 Testis

Testis merupakan organ utama dari sistem reproduksi jantan (gambar 2.2) yang terletak dalam kantung skrotum. Testis berperan dalam steroidogenesis dan spermatogenesis dalam pertumbuhan sel germinal haploid. Pertumbuhan sel germinal tersebut terjadi pada sel leydig dan tempat pembentukan sperma di tubulus seminiferus. Testis dilindungi oleh *tunica vaginalis* yang di dalamnya terdapat *ductus epididimis* dan *ductus deferens*, pada bagian luar berbentuk convex dan licin. Tubulus seminiferus mengandung sel leydig yang terletak didalam dan berfungsi menghasilkan hormon testosteron. Tubulus seminiferus contortus menuju ke tubulus seminiferus rectus membentuk rete testis yang menyalurkan spermatozoa ke ductus epididimis (Fox, 2002)

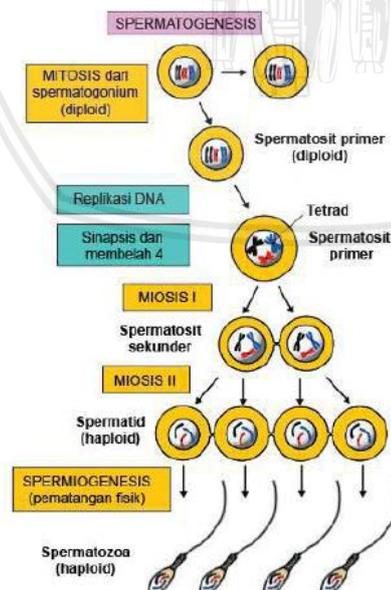


**Gambar 2.2** Anatomi testis (Faranita, 2009).

Testis memiliki dua fungsi, yaitu untuk memproduksi hormon androgen, testosteron dan dihidrotestosteron, dan untuk memproduksi spermatozoa. Spermatozoa dibentuk dari sel germinal primitif di sepanjang dinding tubulus seminiferus dalam proses yang disebut spermatogenesis. Tubulus seminiferus terdapat sel Sertoli yang memiliki fungsi membantu sel germinal dalam memelihara suasana agar sel tersebut dapat berkembang dan menjadi *mature*, dan berfungsi mengirimkan sinyal untuk memulai spermatogenesis dan mempertahankan perkembangan spermatid. Sel Leydig yang terdapat di tubulus seminiferus, merupakan sel interstitial berfungsi untuk mensekresikan hormon testosteron ke dalam pembuluh darah. Selain itu di dalam tubulus seminiferus juga terdapat sel Sertoli, yang berperan secara metabolik dan struktural untuk menjaga spermatozoa yang sedang berkembang dan memfagosit sitoplasma spermatid yang telah dikeluarkan. Sel Sertoli mensekresikan *Androgen Binding Protein (ABP)*, *Inhibin* dan *Mullerian Inhibiting Substance (MIS)* (Faranita, 2009).

## 2.3 Spermatogenesis

Spermatogenesis merupakan suatu proses pembentukan spermatozoa (sel gamet jantan) yang terjadi di dalam tubulus seminiferus terletak di testis. Spermatozoa yang dihasilkan oleh tubulus seminiferus dikeluarkan melalui saluran reproduksi jantan (Susilawati, 2011). Tubulus seminiferus merupakan tempat berlangsungnya spermatogenesis. Proses spermatogenesis terjadi 2 proses pembelahan. Pembelahan pertama mitosis dan meiosis disebut dengan spermatositogenesis ( $2n$  menjadi  $2n$ ), yaitu pembelahan dari spermatogonium sampai dengan spermatosit primer. Meiosis I adalah pembelahan dari spermatosit primer ke spermatosit sekunder ( $2n$  menjadi  $n$ ), sedangkan meiosis II adalah pembelahan dari spermatosit sekunder menjadi spermatid ( $n$  menjadi  $n$ ) (gambar 2.3). Pembelahan yang kedua merupakan perubahan spermatid menjadi spermatozoa disebut dengan spermiogenesis.



**Gambar 2.3.** Proses spermatogenesis ( Susilawati, 2011).

Tubulus seminiferus memiliki sel-sel spermatogonium hingga spermatozoa, selain itu juga terdapat sel sertoli yang secara umum disebut berfungsi menutrisi spermatozoa, tetapi juga berfungsi sebagai *blood testes barrier*, penghasil hormon inhibin dan aromatisasi hormon testosteron menjadi estradiol  $17\beta$  (estrogen), sedangkan di antara tubulus terdapat sel interstitial diantaranya terdapat sel leydig. Sel leydig berfungsi menghasilkan hormon testosteron yang berfungsi untuk proses spermatogenesis dan juga berfungsi didalam pematangan spermatozoa dalam epididimis serta meningkatkan libido untuk mengawini betina (Susilawati, 2011).

Spermatogenesis terdiri atas spermatositogenesis dan spermiogenesis. Spermatositogenesis merupakan tahap pembelahan mitosis dan meiosis dari  $2n$  menjadi  $n$  kromosom. Spermatositogenesis terjadi pada spermatogonium hingga spermatosit sekunder. Spermiogenesis merupakan tahapan metamorfosis spermatozoa dari spermatid menjadi spermatozoa di lumen tubulus seminiferus. Tahapan spermiogenesis meliputi tahap terjadinya pembentukan akrosomal cap, pembentukan ekor dan flagellar apparatus. Spermatogonium memperbanyak diri (proliferasi) secara kontinyu melalui proses mitosis, menghasilkan spermatogonium dalam jumlah besar (Campbell *et al.*, 2006).

Proses pembentukan spermatozoa dan fungsi hormon steroid diatur oleh gonadotropin yang disekresi oleh sel adenohipofisis yang dikeluarkan secara pulsatif. Spermatogenesis yang normal sinergis dengan aktifitas *Luteinizing Hormon* (LH), pada jantan juga disebut dengan *Interstitial Cell Stimulating Hormone* (ICSH), *Folikel Stimulating Hormone* (FSH), prolaktin, dan androgen. LH berfungsi untuk

menstimulasi aktivitas steroidogenesis dan fungsi pembentukan sel gamet. LH berfungsi langsung pada sel leydig didalam menghasilkan hormon testosteron. FSH berfungsi pada spermiogenesis yang aktifitasnya hasil sekresi dari sel sertoli. sel sertoli dan sel germinal terdapat reseptor IGF-1 dan untuk *insulin Like Growth Factor-2* (IGF-2). IGF-1 juga diproduksi oleh sel sertoli yang berperan penting pada *blood testis barrier* (Susilawati, 2011).

#### **2.4 Ekstrak Terong Cepoka (*Solanum torvum*)**

Terong cepoka (*Solanum torvum*) merupakan salah satu bahan tanaman obat tradisional untuk pengobatan berbagai penyakit. Terong cepoka (*Solanum torvum*) termasuk dalam famili *Solanaceae*, dan beberapa daerah mengenal dengan sebutan terong pipit, terong rimbang (Melayu), takokak (Jawa Barat) dan terong cepoka (Jawa Tengah). Kandungan kimia yang terdapat pada terong cepoka terdapat pada buah, daun dan akar tanaman. Buah dan daunnya mengandung alkaloid steroid jenis solasodin, salosonin, chlorogenin dan berbagai vitamin (Sirait, 2009).

Tanaman ini termasuk tanaman perdu yang tumbuh tegak, tinggi tanaman sekitar 3 m yang mempunyai karakteristik batang bulat, berkayu, bercabang, berduri jarang dan percabangan simpodial berwarna putih kotor. Daunnya berbentuk tunggal, berwarna hijau, tersebar, berbentuk bulat telur, bercangap, tepi rata, ujung meruncing dan panjang sekitar 27 - 30 cm dan lebar 20 - 24 cm, pertulangan menyirip dan ibu tulang berduri.



**Gambar 2.4.** Terong Cepoka (*Solanum torvum*) (Sirait, 2009).

Menurut beberapa penelitian, senyawa alkaloid pada tanaman ini bekerja spesifik sebagai antifertil adalah solasodin (Astri, 2012). Selain terdapat kandungan senyawa yang berpotensi dapat menyembuhkan berbagai penyakit, buah dan daun takokak juga mengandung senyawa lain yang diduga berpotensi sebagai alat kontrasepsi karena dalam buahnya mengandung alkaloid steroid solasodine 0.84 %. Buah takokak yang mengandung senyawa *Solasodine*, diduga dapat dimanfaatkan sebagai alat kontrasepsi pria (Siriat, 2009). Senyawa solasodin diduga memiliki aktifitas yang dapat menekan fungsi hipofisis anterior dalam mensekresikan FSH dan LH melalui umpan balik negatif terhadap poros hipotalamus-hipofisis-testis. Penurunan LH menyebabkan penurunan produksi testosteron pada sel leydig dan penurunan FSH akan menghambat sel sertoli mensintesis ABP, oleh karenanya spermatogenesis juga akan terhambat dan kualitas sperma yang dihasilkan menurun (Rafiq, dkk., 2013).

Flavanoid mempunyai banyak jenis senyawa turunan baik dari yang bentuk kompleks sampai yang sederhana. Salah satu flavanoid yang berpotensi berpengaruh terhadap fertilitas adalah senyawa solasodin. Senyawa solasodin

memiliki aktifitas yang dapat menekan fungsi hipofisis anterior untuk mensekresikan FSH dan LH. Solasodin merupakan senyawa yang bersifat estrogenik yang dapat menghambat keseimbangan gonadotropin hormon oleh hipotalamus dan dapat menghambat sekresi LH dan FSH oleh hipofisis anterior sehingga menyebabkan produksi sel sperma menurun (Reni, dkk., 2011).

Solasodin bersifat kompetitif terhadap reseptor *Folicle Stimulating Hormon* (FSH) sehingga pelepasan FSH dari hipofisis akan terganggu. *Folicle Stimulating Hormon* berperan sebagai mediator untuk mengikat androgen dalam spermatogenesis, apabila FSH terganggu maka spermatogenesis menjadi terhambat dan menurunkan kualitas spermatozoa yang dihasilkan. Kualitas spermatozoa yang dihasilkan akan menentukan fertilitas. Kualitas spermatozoa yang mengalami penurunan mengakibatkan penurunan fertilitas. Pemberian solasodin yang diisolasi dari buah takokak dapat berperan dalam infertilitas tikus jantan yang ditunjukkan oleh jumlah dan motilitas spermatozoa menurun (Oktariani dkk., 2014).

### **2.5 Ekstrak Biji Kapuk (*Ceiba pentandra*)**

Kapuk randu (*Ceiba pentandra*) merupakan pohon tropis memiliki ordo *Malvaceae*. Kata 'kapuk' digunakan untuk menyebut serat yang dihasilkan dari bijinya. Pohon ini juga dikenal sebagai Kapas Jawa atau Kapok Jawa. Morfologi daun pohon kapuk randu berbentuk majemuk, pangkal tumpul, ujung runcing, tepi rata, memiliki panjang sekitar 5-16 cm, lebar 2-3 cm, pertulangan menyirip, dan bertangkai panjang. Daun kapuk randu mengandung gula pereduksi, saponin, poliuronoid, polifenol, tanin, plobatanin (Zahid *et al.*, 2003). Sedangkan daun

mudanya mengandung fenol, alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, phytate, oxalate, trypsin inhibitor, dan hemagglutinin (Cunha *et al.*, 2012). Gosipol merupakan senyawa polifenolik yang dihasilkan oleh kelenjar pigmen tumbuhan genus *Gossypium* (gambar 2.5). Konsentrasi gosipol terbesar ditemukan dalam biji dibandingkan bagian kapas lainnya. Biji kapas mengandung 20 sampai 25% gosipol (Gadelha *et al.* 2014).



**Gambar 2.5.** Gambar biji kapuk (*Ceiba pentandra*) (Gadelha, 2014).

Biji kapuk randu mengandung senyawa kimia seperti alkaloid, saponin, flavonoid, tanin, triterpenoid, dan gosipol (Choubey, 2011). Berdasarkan beberapa senyawa kimia yang ada dalam biji kapuk randu, gosipol digunakan sebagai bahan utama dalam penelitian ini karena menyebabkan gangguan pada sistem reproduksi ternak, selain itu gosipol dapat mengganggu faktor transkripsi (p53, p50 dan p65) sehingga menghambat pembentukan enzim dan hormon yang diperlukan untuk reproduksi (Moon *et al.*, 2011). Beberapa penelitian yang telah dilakukan untuk melihat pengaruh senyawa gosipol yang mengganggu sistem reproduksi ternak. Pemberian biji kapas yang mengandung gosipol pada pakan ternak menyebabkan

gangguan fertilitas seperti pengurangan jumlah sperma pada sapi jantan, morfologi sperma abnormal dan penurunan motilitas pada kambing (Zahid *et al.*, 2003). Pengaruh pemberian pakan biji kapas yang mengandung gosipol pada domba juga mampu menurunkan jumlah sel leydig dan menyebabkan ukuran testis menjadi lebih kecil dan terjadi atropi pada tubulus seminiferus sehingga proses spermatogenesis terganggu sehingga menyebabkan hewan menjadi infertil (Cunha, *et al.*, 2012).

Senyawa gosipol merupakan senyawa yang dapat mengikat asam amino khususnya lisin, sehingga gosipol dapat menurunkan ketersediaan protein. Penurunan ketersediaan protein ini akan menyebabkan inaktivasi enzim-enzim yang penting bagi tubuh (Guedes dan Benito, 2010). Senyawa gosipol yang ditemukan di dalam darah juga menimbulkan kerusakan jaringan pada testis. Kerusakan jaringan pada testis memicu terjadinya mekanisme inflamasi, sehingga mengakibatkan peningkatan apoptosis sel yang ditandai dengan adanya ekspresi *Nuclear Factor kappa-B* (NF $\kappa$ B) yang terdapat pada sel sertoli (Pentikainen, 2002).

Beberapa penelitian lainnya menyatakan pula bahwa senyawa gosipol menyebabkan terganggunya proses spermatogenesis yang mengakibatkan penurunan motilitas dan jumlah spermatozoa sebagai akibat dari degenerasi jaringan testis. Terganggunya proses spermatogenesis mengakibatkan persentase sperma yang abnormal mengalami peningkatan (Thomas *et al.*, 1991). Gosipol bekerja sebagai penghambat dalam proses penghasilan energi (ATP) pada mitokondria. Mitokondria memiliki tingkat afinitas tertinggi dengan gosipol dibandingkan dengan organel sel lainnya. Gosipol selain menghambat proses

metabolisme oksidatif juga mengganggu kerja laktat dehidrogenase X (LDH-X). Laktat dehidrogenase X yaitu enzim yang berpartisipasi dalam sistem transpor ion hidrogen dari sitosol ke mitokondria. Gangguan pada penghasilan energi dapat mengakibatkan terganggunya proses perkembangan spermatozoa (Gadelha *et al.* 2014).

Senyawa gosipol menyebabkan peroksidasi lipid pada membran sel sehingga senyawa gosipol dapat masuk ke dalam sel dan mengganggu sistem kerja enzim sehingga terjadi perubahan struktur fungsional dari sel, selain itu pada konsentrasi yang tinggi gosipol dapat merusak enzim pada membran mitokondria sperma. Hambatan pada proses kerja enzim–enzim ini menyebabkan hormon-hormon steroid yang dihasilkan dalam konsentrasi sedikit sehingga menghambat proses reproduksi. Inflamasi terjadi pada sel sertoli yang mengaktifkan ekspresi NFκB (*Nuclear Factor kappa-B*) yang menyebabkan penurunan spermatogenesis sehingga jumlah sperma yang dihasilkan berkurang dan terjadi apoptosis pada sel sertoli mengakibatkan terjadinya infertilitas pada reproduksi jantan (Brocas *et al.*, 1997).

## **2.6 Ekspresi NFκB (*Nuclear Factor kappa-B*)**

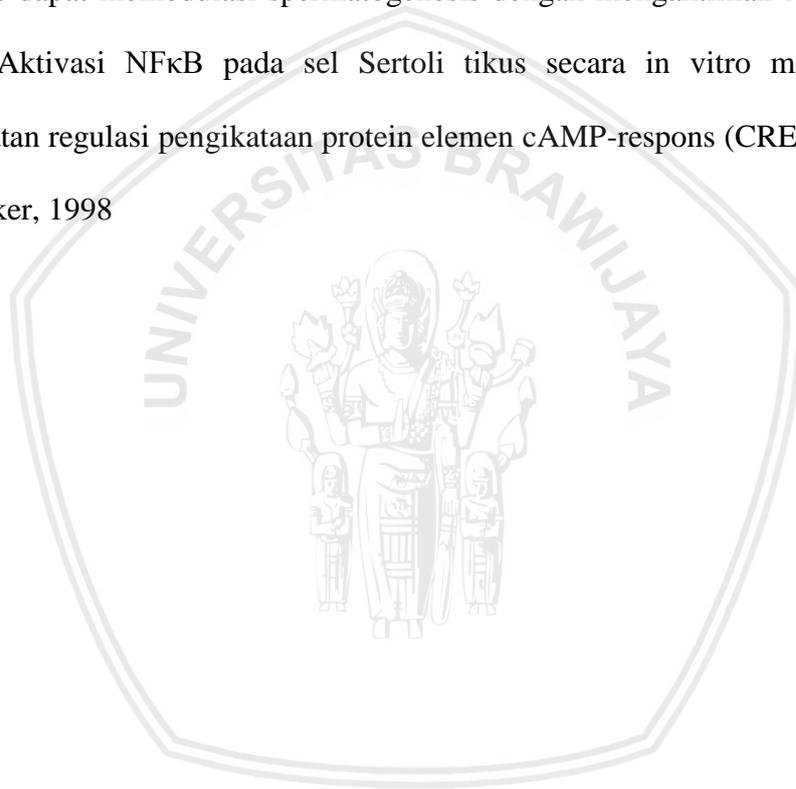
*Nuclear factor kappa B* (NFκB) merupakan faktor transkripsi yang mengatur ekspresi pengkodean gen sitokin, kemokin, adhesi sel molekuler, dan beberapa protein fase akut dalam kesehatan. NFκB diaktifkan oleh beberapa agen diantaranya, sitokin, oksidan radikal bebas, partikel yang mudah terhirup, iradiasi ultraviolet, dan bakteri atau produk viral (Chen, *et al.*, 1999).

NFκB memiliki peranan penting dalam menginduksi regulasi berbagai macam gen dalam respon inflamasi dan proliferasi sel. NFκB pada keadaan normal berada dalam keadaan inaktif karena ikatan dengan Inhibitor IκB (IκB) dan berada di sitoplasma (Riawan dan Samodijanti, 2006). Setelah aktivasi seluler oleh rangsangan ekstraseluler, IκB difosforilasi dan terdegradasi secara proteolitik atau diproses oleh proteasom dan protease lainnya. Proses proteolitik ini mengaktifkan NFκB, kemudian mentranslokasi ke dalam nukleus. NFκB di dalam nukleus dapat mengatur transkripsi respon awal gen dengan mengikat dalam motif decameric yang ditemukan pada bagian promotor gen spesifik (Chen, *et al.*, 1999). Selama terjadi inflamasi, aktivasi NF-κB dikaitkan dengan ekspresi gen pro-inflamasi dan anti-apoptosis, aktivasi tersebut dikaitkan dengan ekspresi gen anti-inflamasi dan induksi apoptosis (Lawrence *et al.*, 2001)

*Nuclear factor-kappa B* merupakan bagian dari faktor transkripsi yang terlibat dalam respons stres termasuk apoptosis pada sel Leydig dan sertoli. NFκB berperan sebagai homo atau heterodimer yang ditemukan di dalam sitoplasma dari sebagian besar sel mamalia. Subunit yang paling umum adalah NF-κB (p50) dan RelA (p65). N-terminus atau Rel homolog domain, merupakan mediator interaksi NF-κB dengan IκB (faktor penghambat), dimerisasi, ikatan DNA, dan translokasi ke dalam nukleus. Istilah "Rel" bermula dari ditemukannya fakta bahwa subunit ini hasil homologi dengan produk dari *c-rel oncogene*, sehingga membentuk Rel atau NF-κB bagian dari faktor transkripsi (Mathur, *et al.*, 2011).

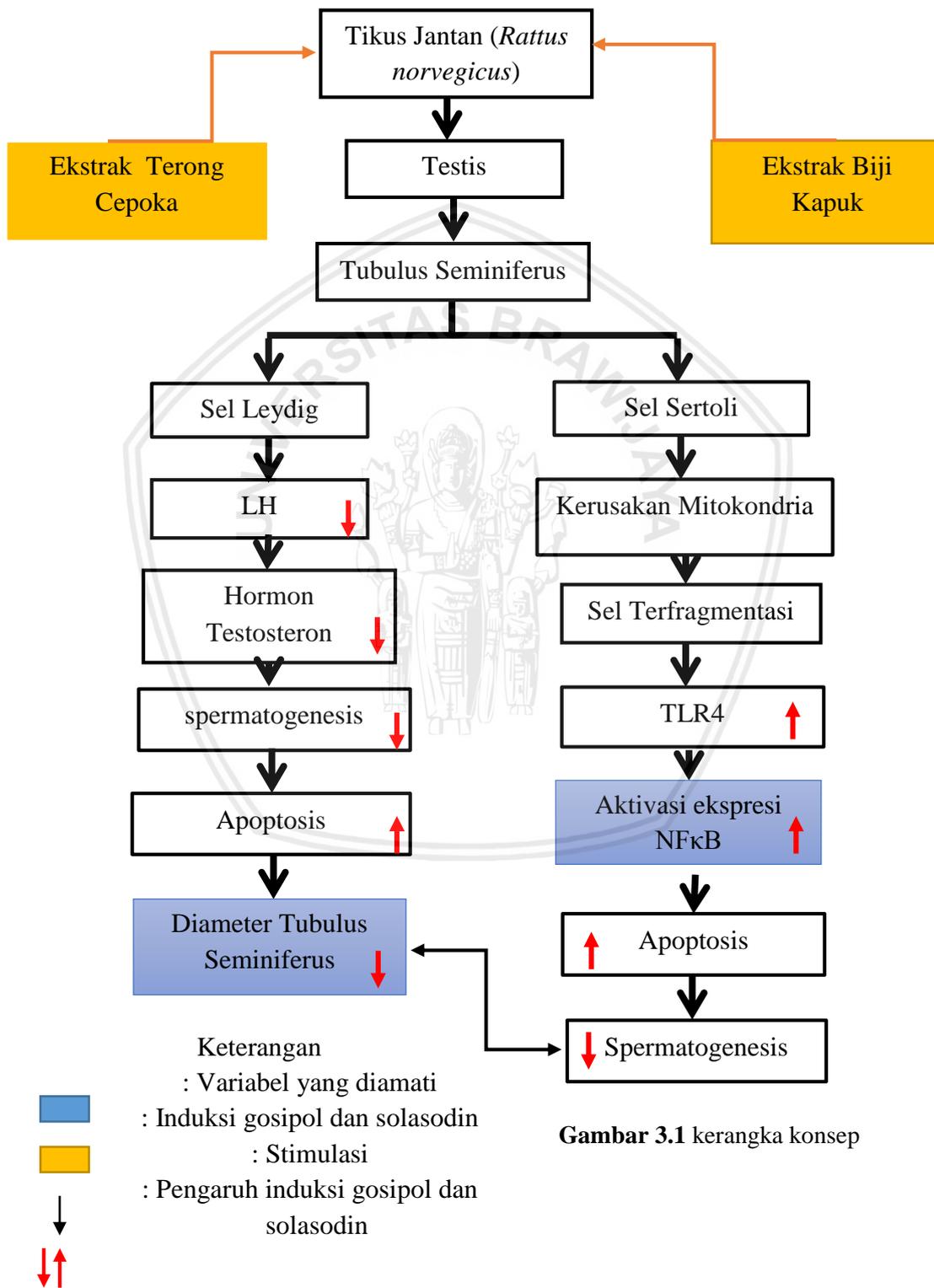
Ekspresi NFκB pada testis berdasarkan penelitian dapat digunakan mengatur spermatogenesis hewan pengerat. Testis tikus jantan memiliki kompleks NF-κB

dari RelA dan protein p50 secara konstitutif yang diekspresikan di dalam inti sel sertoli pada semua tahap spermatogenesis. Selain itu, NF $\kappa$ B terdapat secara spesifik dalam tahapan spermatosit dan spermatid. Sel ertoli tikus yang telah dikultur, peningkatan aktivitas ikatan DNA dan NF $\kappa$ B dalam  $\kappa$ B-dependent transcription dapat diinduksi oleh TNF $\alpha$ . mekanisme parakrin yang telah diteliti, di mana turunan *germ cell* dapat memodulasi spermatogenesis dengan mengaktifkan NF $\kappa$ B di sel Sertoli. Aktivasi NF $\kappa$ B pada sel Sertoli tikus secara in vitro mengarah ke peningkatan regulasi pengikatan protein elemen cAMP-respons (CREB) (Delfino dan Walker, 1998



**BAB 3. KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN**

**3.1 Kerangka Konsep**



**Gambar 3.1** kerangka konsep

Induksi senyawa gossipol, dikenal sebagai agen antifertilitas non steroid enzime inhibitor secara ireversibel. Gossipol dapat mengganggu hubungan antar sel homolog yang berpasangan dari kultur sel manusia atau tikus. Gosipol dapat mengakibatkan perubahan struktur epididimis, menurunkan ukuran testis, regresi sel sertoli dan sel leydig, merusak membran plasma dan menyebabkan abnormalitas spermatozoa. Gosipol juga mengakibatkan berkurangnya diameter tubulus seminiferus pada tikus dan mencit jantan (Bai *et al.*, 2002).

Induksi senyawa gosipol dan solasodin mempengaruhi pelepasan hormon GnRH yang berperan dalam pelepasan FSH dan LH. Terganggunya pelepasan hormon FSH untuk menghasilkan ABP dan LH dsebagai penghasil testosteron akan mengakibatkan pada terganggunya proses spermatogenesis. Sel leydig berfungsi dalam menghasilkan hormon testosteron, apabila terjadi penurunan jumlah sel leydig akan mengakibatkan penurunan produksi hormon testosteron dan mengakibatkan terganggunya spermatogenesis. Gosipol bersifat reaktif sehingga dapat berikatan dengan protein connexin 43(Cx-43) pada sel sertoli, yang mengakibatkan penurunan produksi hormon Androgen binding protein (ABP) (Herve *et al.*, 1996). Yurekli *et al.* (2009) mengemukakan bahwa gosipol juga dapat mengganggu steroidogenesis dengan menghambat aktivitas enzim sitokrom p450, 3 $\beta$ -hidroksisteroid dehidrogenase (3 $\beta$ -HSD), 5 $\alpha$ -reduktase, dan aromatase. Hambatan pada mekanisme kerja enzim tersebut menyebabkan hormon steroid yang dihasilkan menjadi turun, sehingga menghambat proses reproduksi (Muray *et al.*, 2006).

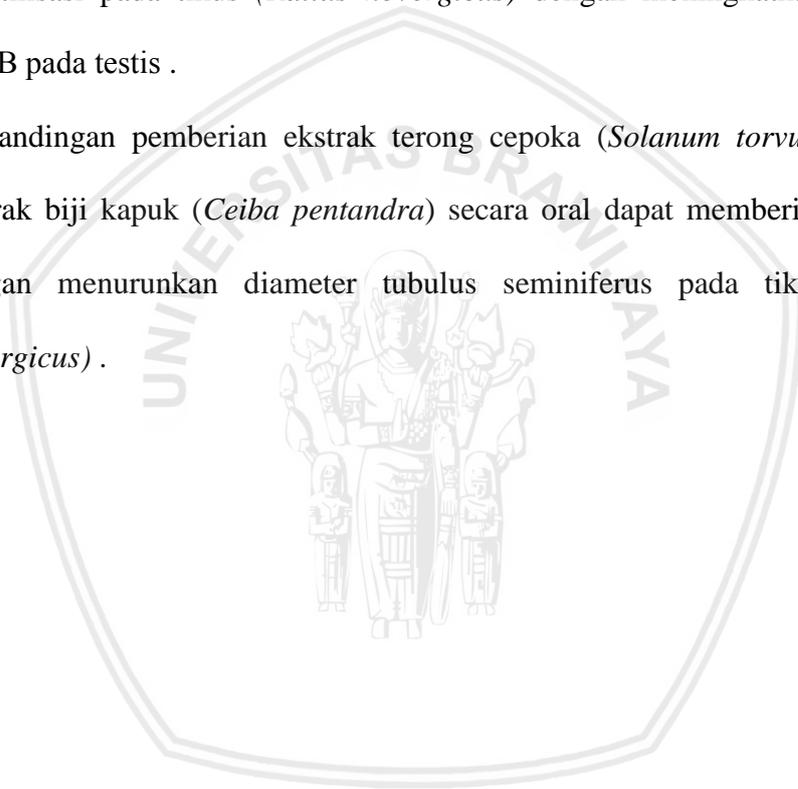
Solasodine merupakan senyawa yang bersifat anti androgenik. Senyawa ini dapat menghambat aksi testosteron, sebagai senyawa anti androgen dengan mencegah ikatan antara testosteron dengan ABP, sehingga akan menyebabkan testosteron yang diikat menjadi rendah dan menghambat spermatogenesis. Senyawa solasodine diduga mampu menurunkan jumlah spermatogenik yang meliputi spermatogonium, dan jumlah keseluruhan sel sperma serta menurunkan ukuran diameter tubulus seminiferus. Solasodin dapat juga menghambat *Folicle Stimulating Hormon* (FSH) yang mengakibatkan pelepasan FSH dari hipotalamus terganggu. *Folicle Stimulating Hormon* berperan sebagai mediator mengikat androgen dalam spermatogenesis, apabila pelepasannya terhambat maka spermatogenesis menjadi terganggu dan menurunkan kualitas spermatozoa yang dihasilkan (Ogbuewu *et al.*, 2011).

Nuclear Faktor kappa-B (NFκB) dapat berperan dalam proses kematian sel berupa apoptosis melalui jalur ekstrinsik. Hal itu dapat terekspresi akibat adanya aktivitas gosipol pada sel sertoli dan sel leydig dalam menghambat kerja enzim yang mengakibatkan kerusakan mitokondria. Senyawa solasodin dan gosipol mengakibatkan kerusakan mitokondria pada sel germinal menyebabkan reseptor TLR4 teraktivasi. Ekspresi NFκB mengakibatkan terjadinya peningkatan apoptosis sel sertoli yang disebabkan oleh induksi senyawa yang bersifat toxic. Peningkatan apoptosis sel spermatogenik menyebabkan penurunan proses spermatogenesis. Penghambatan proses spermatogenesis secara terus menerus akan mengakibatkan penurunan ukuran testis yang diawali dengan penurunan diameter tubulus seminiferus.

### 3.2 Hipotesa Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah yang telah dijabarkan, maka hipotesis dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Perbandingan pemberian ekstrak terong cepoka (*Solanum torvum*) dengan ekstrak biji kapuk (*Ceiba pentandra*) secara oral dapat memberikan efek infertilisasi pada tikus (*Rattus novergicus*) dengan meningkatkan ekspresi NFκB pada testis .
2. Perbandingan pemberian ekstrak terong cepoka (*Solanum torvum*) dengan ekstrak biji kapuk (*Ceiba pentandra*) secara oral dapat memberikan respon dengan menurunkan diameter tubulus seminiferus pada tikus (*Rattus novergicus*) .



## BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

### 4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Agustus 2018 hingga September 2018. Pembacaan hasil penelitian dilakukan pada bulan Februari 2019 hingga Maret 2019. Penelitian ini telah mendapatkan persetujuan Pemeliharaan, perlakuan hewan coba, pembuatan preparat IHK NFκB, dan pembuatan preparat histopatologi diameter tubulus seminiferus dilaksanakan di beberapa laboratorium, diantaranya: pembacaan hasil preparat histologi testis di Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya. Pembuatan preparat Immunohistokimia (IHK) dan preparat histopaologi (HE) di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga dan pemeliharaan dan perlakuan hewan coba dilakukan di laboratorium Embriologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.

### 4.2 Alat dan Bahan Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya adalah sonde, timbangan digital, kandang tikus, spuit 1 mL, cawan petri, mikroskop, gelas ukur, peralatan bedah dan pot organ.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya adalah tikus putih (*Rattus novergicus*) jantan strain Wistar umur 75-90 hari dengan berat 150-200 g, makanan dan minuman tikus, vaselin album 95%, alkohol (70%, 80%, 90%, 95%, 100%), NaCl fisiologis 0,9%, PBS pH 7,4, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%, *object glass*, formalin buffer

70%, antibodi NFκB, ekstraksi biji kapuk, ekstraksi terong cepoka pewarna Hematoksilin Eosin (HE), akuades, parafin, eter 70%, xylol, dan klorofom.

### 4.3 Sampel Penelitian

Hewan model pada penelitian ini menggunakan tikus (*Rattus novergicus*) jantan strain Wistar umur 75-90 hari dengan berat 150-200 gram. Hewan coba diaklimatisasi selama tujuh hari untuk menyesuaikan dengan kondisi di laboratorium. Estimasi besar sampel dihitung berdasarkan rumus (Montgomery dan Kowalsky, 2011) :

$$p(n-1) \geq 15$$

$$3(n-1) \geq 15$$

$$3n - 3 \geq 15$$

$$3n \geq 18$$

$$n \geq 6$$

Keterangan:

p : jumlah perlakuan

n : jumlah ulangan yang diperlukan

kelompok perlakuan membutuhkan jumlah ulangan minimal 6 kali sehingga dibutuhkan minimal 18 ekor hewan coba.

### 4.4 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik yang menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Subyek penelitian ini dibagi menjadi 3 kelompok secara acak dan setiap kelompok terdiri dari 6 tikus. Kelompok perlakuan pada penelitian ini dapat dilihat pada **Tabel 4.1**.

KN : Tikus diberikan pakan standart beserta air minum *ad libitum* tidak diberi perlakuan induksi ekstrak gosipol dan solasodine dengan pelarut etanol.

KP1 : Tikus diberikan pakan standart beserta air minum *ad libitum* dan diinduksi ekstrak solasodine dengan dosis 1 g/kgBB secara per oral.

KP2 : Tikus diberikan pakan standart beserta air minum *ad libitum* dan diinduksi ekstrak gosipol dengan dosis 0,1 g/kgBB secara per oral.

**Tabel 4.1.** Rancangan Penelitian

Kelompok	Perlakuan
Kontrol Negatif (KN)	Kontrol, tikus tidak diberi perlakuan peroral ekstrak gosipol dan solasodin, hanya diberi pakan dan minum <i>ad libitum</i> selama 10 hari
Kelompok Perlakuan (KP1)	Ekstrak terong cepoka 1 g/kgBB
Kelompok Perlakuan (KP2)	Ekstrak biji kapuk 0,1 g/kgBB

#### 4.5 Variabel Penelitian

Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah:

Variabel bebas : dosis *solasodine* dan *gossipol*

Variabel terikat : diameter tubulus seminiferus dan ekspresi NFκB testis

Variabel kontrol : tikus, jenis kelamin, berat badan, umur, pakan, kandang

#### 4.6 Prosedur Kerja

##### 4.6.1 Persiapan Hewan Coba

Hewan coba tikus yang dipakai dalam penelitian ini terlebih dahulu diaklimatisasi selama 7 hari dengan pemberian pakan standar. Air minum diberikan secara *ad libitum*. Estimasi besar sampel dihitung berdasarkan rumus  $p(n-1) \geq 15$  keterangan p : jumlah perlakuan, n : jumlah ulangan yang diperlukan (Montgomery

dan Kowalsky, 2011), tikus dibagi menjadi 3 perlakuan, masing-masing kelompok terdiri 6 tikus.

Pemeliharaan tikus dilakukan dalam kandang kelompok dengan jumlah 6 tikus perkandang. Alas kandang diberi sekam kayu untuk menjaga kelembaban dan kebersihan kandang. Kandang ditempatkan pada tempat yang jauh dari kebisingan dan polutan dengan ventilasi udara yang memadai.

#### 4.6.2 Ekstraksi Biji Kapuk

Biji kapuk diperoleh dari Goa Ngerong Tuban. Sebanyak 3 kg biji kapuk diekstraksi dengan cara maserasi menggunakan pelarut ethanol 70%. Pembuatan ekstrak biji kapuk melalui dua tahapan yaitu pembuatan serbuk simplisia dan pembuatan ekstrak etanol dengan metode maserasi (perendaman). Surat keterangan ekstraksi biji kapuk dapat dilihat pada **lampiran 4**. Biji kapas dicuci dengan air yang mengalir kemudian dikeringkan dengan menjemur dibawah sinar matahari selama dua hari. Biji kapas kering ditimbang sebanyak 2 kg, kemudian digerus menggunakan lumpang dan alu serta disaring untuk diambil serbuk simplisianya. Selanjutnya dilakukan ekstraksi dengan metode maserasi dengan merendam 3 kg dalam 8000 ml pelarut etanol 70% selama dua hari. Penggantian pelarut dilakukan setiap hari hingga pelarut berwarna bening (Chandrashekar *et al.* 2013). Filtrat dari penyaringan dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 50 °C, menggunakan kecepatan *rotary* 60 rpm selama 2 jam hingga diperoleh ekstrak pekat. Volume ekstraksi biji kapuk yang didapatkan sebanyak 700 ml (Pratiwi, 2017).

#### 4.6.3 Ekstraksi Terong Cepoka

Terong cepoka diperoleh dari pasar dalam keadaan segar sebanyak 5 kg. Metode ekstraksi dilakukan dengan cara maserasi terong cepoka. Pembuatan ekstrak terong cepoka melalui dua tahapan yaitu pembuatan serbuk simplisia dan pembuatan ekstrak etanol dengan metode maserasi (perendaman). Surat keterangan ekstraksi terong cepokak dapat dilihat di **lampiran 3**. Terong cepoka dicuci dengan air yang mengalir kemudian dikeringkan dijemur dibawah sinar matahari selama dua hari. Terong cpoka kering ditimbang sebanyak 5 kg, kemudian digerus menggunakan lumpang dan alu serta disaring untuk diambil serbuk simplisianya. Selanjutnya dilakukan ekstraksi dengan metode maserasi dengan merendam 5 kg dalam 10.000 mL pelarut etanol 70% selama dua hari. Penggantian pelarut dilakukan setiap hari hingga pelarut berwarna bening (Chandrashekar *et al.* 2013). Filtrat dari penyaringan dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 50 °C, menggunakan kecepatan *rotary* 60 rpm selama 3 jam hingga diperoleh ekstrak pekat. Hasil yang diperoleh berupa sediaan cair dengan volume ekstraksi yang didapatkan sebesar 2000 mL (Pratiwi, 2017).

#### 4.6.4 Pemberian Ekstrak Biji Kapuk dan Terong Cepoka

Ekstrak biji kapuk diberikan secara oral dengan sonde 1 kali dalam sehari, pagi sebelum tikus diberi makan dengan dosis 0,1 g/kg berat badan. Ekstrak terong cepoka diberikan secara oral dengan sonde 1 kali dalam sehari, pagi sebelum tikus diberi makan dengan dosis 1 g/kg berat badan. Perhitungan dosis dapat dilihat pada **Lampiran 5 dan 6**.

#### 4.6.5 Pembedahan Tikus dan Koleksi Sampel Organ

Euthanasi pada tikus dilakukan pada hari ke 11 pemeliharaan dengan metode pemberian klorofom inhalasi. Setelah dilakukan euthanasi, dilakukan pembedahan dengan insisi pada bagian linea abdominalis, lalu di koleksi sepasang testis. Bagian testis yang akan dijadikan preparat histologi dan immunohistokimia dipisahkan dari epididimis lalu dicuci dengan NaCl fisiologis 0,9%. Sampel dimasukkan ke dalam pot yang telah berisi formalin buffer, kemudian disimpan pada suhu ruang dan dikirim ke tempat pembuatan preparat histopatologi dan immunohistokimia.

#### 4.6.6 Pembuatan Prepatat Histopatologi Diameter Tubulus Seminiferus

Pembuatan preparat histopatologi menggunakan metode pewarnaan dengan *Hematoxylen Eosin* (HE). Langkah-langkah pembuatan preparat histopatologi meliputi fiksasi, *dehidrasi*, *clearing*, *embedding* atau *infiltrasi* parafin, *blocking*, *sectioning*, *staining*, *mounting* dan *labeling* (Jusuf, 2009).

Pembuatan preparat histopatologi testis diawali dengan fiksasi sampel testis direndam dalam larutan formalin 10% selama 24 jam yang bertujuan untuk melindungi struktur fisik sel dan melindungi jaringan dari enzim atau bakteri. Testis dicuci menggunakan air mengalir kemudian direndam menggunakan larutan fenol 4% dalam akuades selama 1-3 hari. Fiksasi bertujuan untuk mencegah perubahan morfologi sel dan mengeraskan jaringan.

Proses selanjutnya dehidrasi, dilakukan pemotongan jaringan testis 0,3–0,5 mm dan disusun diatas *tissue cassette* lalu dimasukkan ke dalam basker. Testis direndam ke dalam larutan ethanol dengan kadar 70%, 80%, 90% dan ethanol

absolut I serta ethanol absolute II masing-masing selama 2 jam. Dehidrasi dimaksudkan untuk mempertahankan testis dari pengerutan sampel dan untuk menarik air dari jaringan. Setelah dikeluarkan dari cairan dehidran, jaringan dimasukkan dalam cairan penjernih, pada akhir proses ini dihasilkan suatu jaringan yang transparan menggunakan xylol I dan xylol II selama 2 jam (Miranti, 2010).

*Infiltrasi* atau *impregnasi* merupakan proses pengisian parafin ke dalam pori-pori jaringan. Pengisian ini dimaksudkan untuk mengeraskan jaringan agar mudah dipotong dengan pisau mikrotom. Proses infiltrasi parafin dapat menggunakan parafin cair I dan parafin cair II masing-masing 2 jam. Parafin cair ditempatkan sedikit pada cetakan, kemudian jaringan dimasukan dalam cetakan dengan cepat lalu parafin cair dituangkan kemali pada cetakan hingga penuh.

*Embedding* atau *blocking* merupakan proses penanaman jaringan kedalam blok parafin. Proses ini dilakukan dengan suhu 59 - 60 °C selama 30 menit, setelah itu blok parafin dicetak dengan cara menuangkan parafin cair diatas cetakan blok parafin hingga jaringan terendam sempurna lalu dibekukan dan disimpan di dalam freezer.

Sectioning merupakan proses pemotongan jaringan. Pemotongan jaringan pada block parafin menggunakan mikrotom dengan ketebalan 3 - 5  $\mu m$ . Jaringan selanjutnya dipindahkan perlahan ke atas air pada *waterbath* pada suhu 55°C agar hasil potongan mudah dirapikan. Kemudian diletakkan diatas objek glass yang telah diolesi *Ewith* sebagai bahan perekat. Sediaan kemudian di letakan pada gelas objek dan disimpan dalam inkubator dengan suhu 37°C selama 24 jam (Jusuf, 2009).

Menurut Talley *et al.*, (2011) proses pewarnaan preparat histopatologi diwarnai dengan pewarna *Hematoxyline Eosin* (HE) yang bertujuan untuk membuat warna biru (basofilik) pada inti sel dan merah muda (eosinofilik) pada sitoplasma dan jaringan penyambungannya. Pewarnaan dilakukan dengan deparaffinisasi dengan xylol I dan xylol II selama 3 menit digunakan untuk menghilangkan parafin pada objek sehingga pewarna akan meresap dengan sempurna. Proses selanjutnya rehidrasi dengan ethanol absolute I dan ethanol absolute II selama 3 menit, kemudian dilanjutkan dengan ethanol 90% dan ethanol 80% selama 3 menit. Kemudian dibilas dengan air mengalir selama 1 menit, selanjutnya dicelupkan pada larutan hematoksilin selama 6-7 menit. Proses selanjutnya dilakukan pembilasan dengan air aquades selama 1 menit, kemudian dicelupkan larutan asam alkohol selama 1 menit dan selanjutnya dicelupkan kedalam larutan eosin selama 1-5 menit. Proses selanjutnya dilakukan dehidrasi kembali dengan ethanol 80%, ethanol 90% dan ethanol absolute masing-masing selama 10 celupan selama 1 menit. Proses selanjutnya dilakukan tahap clearing dengan larutan xylol I, xylol II, xylol III selama 3 menit.

*Mounting* merupakan tahapan terakhir dalam pembuatan preparat histopatologi dengan larutan entelan sebanyak 1 tetes, kemudian ditutup dengan *coverglass*. Preparat yang sudah jadi dapat dilakukan pengamatan dibawah mikroskop. Proses pembuatan preparat histopatologi HE dapat dilihat pada **(Lampiran 7)**.

#### 4.6.7 Pembuatan Preparat Immunohistokimia dan Analisa Ekspresi (IHK)

Pembuatan preparat immunohistokimia (IHK) diawali dengan perendaman slide preparat pada xylol 1, xylol 2, xylol 3 dan etanol bertingkat (100%, 96%, 90%, 80%, 70%). Slide kemudian dicuci dengan air mengalir selama 3 menit lalu ditetesi dengan 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> selama 20 menit. PBS dicuci kembali selama 5 menit sebanyak 2 kali dan diberikan trypsin selama 15 menit dalam inkubator dengan temperatur 37<sup>0</sup>C, kemudian diblok dengan ultra V selama 5 menit pada suhu ruang. Slide preparat dicuci memakai PBS langsung, dan diinkubasi dengan antibodi primer anti rat NFκB 5% yang telah diencerkan dengan diluent selama 60 menit serta dicuci memakai PBS selama 5 menit sebanyak 2 kali. *biotinylated link (yellow)* Kemudian diberi drops selama 30 menit dan dicuci memakai PBS sebanyak 2 kali selama 5 menit. Kemudian diberi *streptavidin (red)* drops selama 30 menit dan dicuci memakai PBS selama 5 menit sebanyak 2 kali. DAB (*diaminbenziddine chromogen*) diencer 2% dengan DAB plus substrate 6 hingga 10 menit kemudian dicuci memakai PBS selama 5 menit sebanyak 2 kali. Selanjutnya dilakukan dipping aquades selama 5 menit.

*Counterstaining* dilakukan menggunakan *Mayer Hematoxylen* selama 10 menit. Preparat dicuci dengan air mengalir selama 5 menit dan air amonia selama 3 menit kemudian dibilas dengan akuades lalu dikeringkan. Preparat dimounting dengan entelan lalu ditutup dengan *cover glass*. Proses pembuatan preparat Immunohistokimia (IHK) dapat dilihat pada (**Lampiran 8**). Pengamatan ekspresi NFκB dapat dilakukan pada lima bidang pandang dengan perbesaran 400x.

Pengukuran persentase area ekspresi NF $\kappa$ B menggunakan *software Immunoratio* (pentikainen, 2002).

#### **4.6.8 Perhitungan Preparat Histopatologi (HE) Diameter Tubulus Seminiferus**

Perhitungan diameter tubulus seminiferus dilakukan dengan mengamati preparat histologi yang telah terwarnai dibawah mikroskop dilakukan pada lima lapang pandang dengan perbesaran 100x. Pengukuran diameter tubulus seminiferus dilakukan menggunakan *software image raster 3 imacros* dengan satuan milimeter (mm). Pengukuran diameter tubulus seminiferus dengan cara menarik garis vertikan dan horizontal pada tepi tubulus seminiferus.

#### **4.6.9 Analisis Data**

Data variabel yang diamati dalam penelitian berupa data kuantitatif dianalisa dengan *one way ANOVA* dengan tingkat ketelitian 95%, dengan ketentuan data homogen dan normal. Uji lanjutan dengan uji Tukey untuk melihat ada atau tidaknya perbedaan perlakuan antar perlakuan ( $\alpha= 5\%$ ).

## BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

### 5.1 Perbandingan Pemberian Ekstrak Terong Cepoka (*Solanum torvum*) dengan Biji Kapuk (*Ceiba pentandra*) terhadap Infertilitas Tikus (*Rattus norvegicus*) melalui Ekspresi NFκB Tubulus Seminiferus

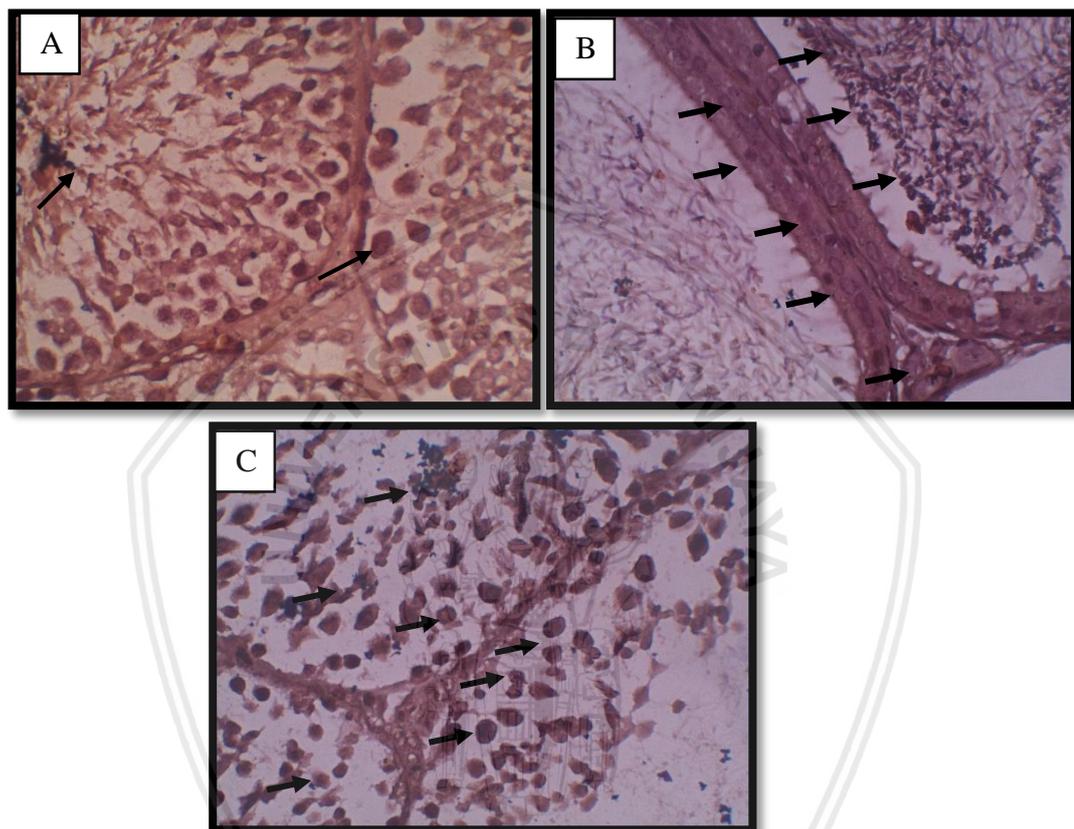
Perbandingan pemberian ekstrak terong cepoka dan biji kapuk terhadap infertilitas tikus (*Rattus norvegicus*) melalui ekspresi NFκB dan diameter tubulus seminiferus dapat diamati menggunakan metode immunohistokimia (IHK). Hasil gambaran IHK testis ditandai dengan adanya ekspresi NFκB pada tikus jantan. Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop perbesaran 400x dengan 5 kali lapang pandang pada area tubulus seminiferus. Ekspresi NFκB ditandai dengan adanya warna coklat pada jaringan akibat adanya ikatan antara antibodi primer anti *rat* NFκB dengan antibodi sekunder berlabel biotin, anti *Rabbit IgG biotin labeled*, dengan tambahan Substrat *DAB (Diaminobenzididine)*. Pengamatan NFκB dilakukan pada semua kelompok perlakuan, yaitu kelompok kontrol negatif (KN), kelompok perlakuan 1 ekstrak terong cepoka dengan dosis 1 g/kg BB (KP1), dan kelompok perlakuan 2 ekstrak biji kapuk dengan dosis 0,1 g/kg BB (KP2).

*Nuclear Factor kappa B* (NFκB) merupakan bagian dari faktor transkripsi yang mengatur ekspresi pengkodean gen sitokin, kemokin, dan beberapa protein fase akut dalam kesehatan, yang memiliki peranan penting dalam menginduksi regulasi berbagai macam gen dalam respon inflamasi dan proliferasi sel. *Nuclear Factor kappa B* (NFκB) pada keadaan normal berada dalam keadaan inaktif karena ikatan dengan Inhibitor IκB (IκB) dan berada di sitoplasma (Riawan dan Samodijanti, 2006).

Induksi ekstrak terong cepoka dan biji kapuk berperan sebagai mediator inflamasi dapat menyebabkan aktivasi receptor *Toll Like Receptor (TLR)* yang digunakan untuk mengaktifkan NF $\kappa$ B dalam memicu terjadinya apoptosis pada sel germinal.

Ekspresi NF $\kappa$ B pada jaringan testis kelompok kontrol negatif (KN) dalam keadaan normal memiliki kadar yang rendah, ditandai dengan sedikitnya area yang berwarna coklat pada jaringan **Gambar 5.1.A**. NF $\kappa$ B (Nuclear Faktor kappa-B) tetap ditemukan dalam keadaan normal, karena dalam kondisi ini tetap terjadi apoptosis pada sel germinal untuk menghilangkan sel-sel germinal yang cacat dan membawa mutasi DNA (Pentikainen, 2002). Ekspresi NF $\kappa$ B pada kelompok perlakuan 1 (KP1) ditemukan dalam kadar yang tinggi, ditandai dengan banyaknya area yang berwarna coklat **Gambar 5.1.B**. NF $\kappa$ B (*Nuclear Faktor kappa-B*) pada kelompok perlakuan 1 yang diinduksi ekstrak terong cepoka dengan dosis 1 g/kgBB ditemukan dalam jumlah yang tinggi karena dalam buah terong cepoka terdapat kandungan alkaloid steroid berjenis solasodin, solasonin, dan *chlorogenin*. Kandungan solasodin menyebabkan gangguan androgen dalam sel germinal yang berperan dalam proses spermatogenesis, sehingga mengaktifasi NF $\kappa$ B untuk melakukan apoptosis pada sel germinal. Ekspresi NF $\kappa$ B pada kelompok perlakuan 2 (KP2) ditemukan dalam keadaan yang relatif rendah, ditandai dengan sedikitnya area yang terwarnai coklat **Gambar 5.1.C**. Kelompok perlakuan 2 yang diinduksi ekstrak biji kapuk dengan dosis 0,1 g/kgBB memiliki intensitas warna coklat pada jaringan testis yang tampak lebih rendah dibandingkan dengan **Gambar 5.1.B** kelompok perlakuan 2 (KP2). Ekstrak kasar dari biji kapuk memiliki kandungan alkaloid, flavonoid, saponin dan tanin yang menunjukkan aktivitas antibakteri

(Chekuboyina *et al.*, 2012). Aktivitas sitotoksik yang disebabkan oleh kandungan gosipol diduga berkurang dan tidak terjadi kerusakan antar sel, sehingga ekspresi NFκB yang terdapat dalam testis menjadi rendah.



**Gambar 5.1** Immunohistokimia Jaringan Testis (perbesaran 400x)

A = Kelompok Kontrol Negatif

B = Kelompok Perlakuan 1 ( Pemberian ekstrak terong cepoka 1 g/ kgBB)

C = Kelompok Perlakuan 2 ( pemberian ekstrak biji kapuk 0,1 g/ kgBB)

Keterangan =  $\longrightarrow$  ( Ekspresi NFκB)

Hasil akumulasi ekspresi NFκB dianalisis menggunakan software SPSS secara statistik dengan uji *one way ANNOVA*. Hasil penelitian menunjukkan perbedaan yang signifikan ( $P < 0,05$ ) antara kontrol negatif dengan kelompok perlakuan. Kelompok perlakuan 1 (KP1) memiliki rata-rata ekspresi NFκB lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol negatif dan kelompok perlakuan 2 (KP2) (**Tabel 5.1**).

**Tabel 5.1** Perbandingan pemberian ekstrak terong cepoka dengan biji kapuk terhadap ekspresi NFκB pada tubulus seminiferus (%)

Kelompok	Rata-Rata Presentase Ekspresi NFκB ± SD	Peningkatan Terhadap Kontrol Negatif (%)
Kontrol Negatif	64,38 ± 13,84 <sup>a</sup>	-
KP 1 (1 g/kg BB)	87,22 ± 6,89 <sup>b</sup>	26,18
KP 2 (0,1 g/kg BB)	85,52 ± 6,94 <sup>b</sup>	24,71

Ketreangan : Notasi a dan b menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan (  $P < 0,05$  )

Hasil uji normalitas dan homogenitas menunjukkan signifikansi ( $P > 0,05$ ), hal itu menunjukkan bahwa data yang di gunakan mempunyai distribusi yang normal dan homogen, sehingga di lanjutkan dengan uji *one way ANNOVA*. Hasil analisa statistik *one way ANNOVA* **Tabel 5.1** menunjukkan perbedaan yang signifikan ( $P < 0,05$ ) antara kelompok kontrol negatif (KN) dengan kelompok perlakuan 1 (KP1) dan kelompok perlakuan 2 (KP2). Hasil uji *post hoc tukey* menunjukkan kelompok kontrol negatif (KN) memiliki perbedaan yang signifikan dengan kelompok perlakuan 1 (KP1) dan kelompok perlakuan 2 (KP2) ( $P < 0,05$ ), yang ditunjukkan dengan adanya perbedaan notasi (**Tabel 5.1**). Hasil perhitungan statistik antara kelompok kontrol negatif (KN) dengan perlakuan 1 (KP1) dan perlakuan 2 (KP2) dapat dilihat pada **lampiran 9**.

Kelompok kontrol negatif (KN) pada **Tabel 5.1** memiliki rata-rata ekspresi NFκB paling rendah dibandingkan dengan kelompok perlakuan lain ( $64,38 \pm 13,84$ ). Hal ini dikarenakan tikus yang digunakan hanya diberikan pakan dan minum secara *ad-libitum* dan tidak mendapatkan paparan senyawa toxic sebagai

mediator inflamasi. Ekspresi NFκB tetap ditemukan dalam kondisi tikus normal, karena dalam kondisi normal tetap terjadi apoptosis pada sel germinal untuk menghilangkan sel germinal yang cacat dan membawa mutasi DNA (Pentikainen, 2002). Kelompok perlakuan 1 (KP1) pada **Tabel 5.1** memiliki rata-rata paling besar ( $87,22 \pm 6,89$ ) dan mengalami peningkatan sebesar 26,18% dari kelompok kontrol negatif (KN), sedangkan kelompok perlakuan 2 (KP2) memiliki rata-rata sebesar ( $85,52 \pm 6,94$ ) dengan peningkatan 24,71% dari kelompok kontrol negatif (KN).

Hasil penelitian ini membuktikan bahwa kelompok perlakuan 1 (KP1) yang diinduksi ekstrak terong cepoka dosis 1 g/kgBB mampu menghambat proses spermatogenesis dan dapat meningkatkan ekspresi NFκB pada jaringan testis. Selaras dengan penelitian sebelumnya yang telah dilakukan Susilo (2016), didapatkan penurunan motilitas spermatozoa yang diinduksi buah takokak dengan dosis 1 g/kg BB merupakan dosis efektif dalam menurunkan jumlah spermatozoa sebesar 20,33 juta/ml. Buah terong cepoka yang mengandung senyawa solasodine diduga dapat digunakan untuk meningkatkan infertilitas pada tikus jantan. Senyawa solasodine diduga memiliki aktifitas yang dapat menekan fungsi hipofisis anterior dalam mensekresikan FSH dan LH melalui umpan balik negatif terhadap Hipotalamus - Hipofisis anterior - Testis (Sirait, 2009).

Penurunan LH menyebabkan penurunan produksi testosteron pada sel Leydig dan penurunan FSH akan menghambat sel sertoli mensintesis ABP, oleh karenanya spermatogenesis juga akan terhambat sehingga jumlah sperma yang dihasilkan menurun (Rafiq dkk, 2013). Selama proses spermatogenesis telah terjadi proses apoptosis yang diatur oleh ekspresi gen P53, P21, caspase, dan bcl-2.

Infertilitas pada hewan jantan dilaporkan berhubungan dengan gangguan pada DNA mitokondria (mtDNA) dan apoptosis. Mitokondria normal diperlukan untuk spermatogenesis mamalia, dan gangguan yang dihasilkan dari mutasi mtDNA dapat menyebabkan infertilitas pada hewan jantan. Kerusakan DNA pada fase awal perkembangan sperma dapat disebabkan oleh rendahnya kualitas spermatozoa (Nakada *et al.*, 2006).

Induksi senyawa solasodine dari ekstrak buah terong cepoka dengan dosis 1 g/kgBB dapat mengaktifkan ekspresi NF $\kappa$ B dalam tubulus seminiferus testis dengan ditandai adanya warna coklat pada jaringan testis (**Gambar 5.1.B**). NF $\kappa$ B merupakan faktor transkripsi yang memainkan peranan penting dalam menginduksi berbagai macam gen dalam respon inflamasi (Riawan dan Wibowati, 2006). Aktivasi NF $\kappa$ B yang disebabkan oleh senyawa solasodine memicu pengaturan apoptosis dalam sel germinal pria, dengan tingginya tingkat apoptosis yang terjadi diduga terjadi peningkatan presentase sperma dengan kerusakan genetik dan immotil yang lebih tinggi (Pentikainen, 2002; Susilo, 2016).

Hasil penelitian ini kelompok perlakuan 2 (KP2) memiliki rata-rata yang lebih rendah **Tabel 5.1** daripada kelompok perlakuan 1 (KP1) sebesar (85,52  $\pm$  6,94), berdasarkan analisa statistik uji *post hoc tukey* diketahui nilai ( $P > 0,05$ ) yang berarti antara kelompok perlakuan 1 dan perlakuan 2 tidak berbeda signifikan. Hasil yang lebih rendah daripada kelompok perlakuan 1 (KP1) diduga kandungan senyawa gopipol dalam hasil ekstraksi lebih sedikit dibandingkan senyawa solasodine dalam ekstrak terong cepoka. Senyawa gopipol diketahui terkandung dalam pemberian induksi ekstrak biji kapuk pada tikus jantan. Gadelha *et al* (2014)

menyatakan bahwa gosipol dapat bertindak sebagai antifertilitas, antisteroidogenik. Gosipol dapat mengakibatkan perubahan struktur epididimis, diameter tubulus seminiferus testis, merusak membran plasma dan regresi sel sertoli serta sel leydig. Hasil penelitian menunjukkan adanya ekspresi NFκB pada kelompok perlakuan 2 (KP2) yang ditandai dengan adanya warna coklat pada jaringan testis (**Gambar 5.1.C**).

Mekanisme kerja senyawa gosipol memiliki efek sitotoksik dan bersifat reaktif yang dapat mengganggu dan merusak aktivitas seluler. Gosipol dapat berikatan dengan protein connexin 43 (Cx-43) pada sel sertoli dan menghambat produksi hormon gonadotropin dengan mengganggu kerja hormon FSH dan LH pada hipofisa anterior. Gosipol juga mempengaruhi faktor transkripsi (NFκB, p53, p50 dan p65) sehingga mengganggu pembentukan hormon dan enzim yang diperlukan dalam reproduksi (Moon *et al.*, 2011). Gosipol juga dapat mengganggu steroidogenesis dengan menghambat aktivitas enzim sitokrom p450, 3β-hidroksisteroid dehidrogenase (3β-HSD), 5α-reduktase, dan aromatase. Hambatan pada mekanisme kerja enzim tersebut menyebabkan hormon steroid yang dihasilkan menjadi turun, sehingga spermatogenesis terganggu (Yurekli *et al.*, 2009).

Hasil penelitian ini menunjukkan perbandingan pemberian ekstrak terong cepoka (*Solanum torvum*) dengan biji kapuk (*Ceiba pentandra*) sebagai kandidat senyawa kontrasepsi herbal memiliki nilai keefektifan yang berbeda. Ekstrak terong cepoka (*Solanum torvum*) dengan dosis pemberian 1 g/kg BB mampu meningkatkan ekspresi NFκB (*Nuclear Faktor kappa-B*) yang lebih signifikan

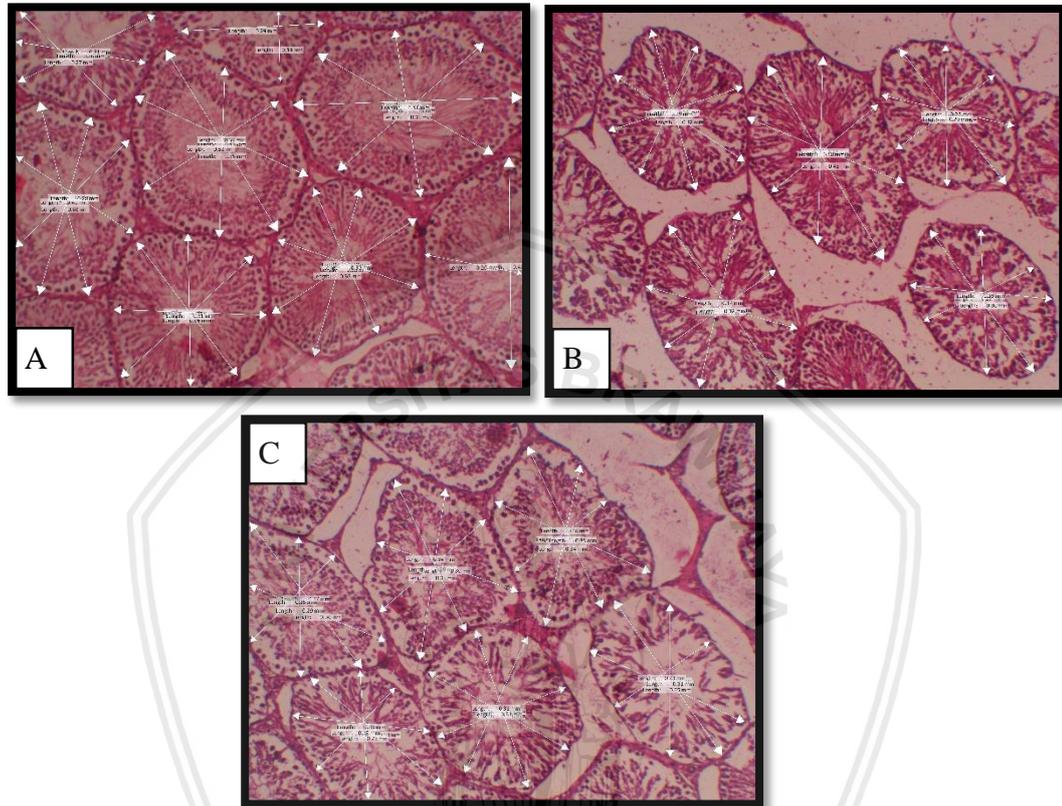
pada tubulus seminiferus dengan cara memacu peningkatan apoptosis dan menghambat proses spermatogenesis pada tikus putih (*Rattus norvegicus*).

## 5.2 Perbandingan Pemberian Ekstrak Terong Cepoka (*Solanum torvum* S.) dengan Biji Kapuk (*Ceiba pentandra* G.) terhadap Gambaran Histologi Diameter Tubulus Seminiferus Tikus Putih

Hasil penelitian perbandingan pemberian ekstrak terong cepoka (*Solanum torvum*) dengan ekstrak biji kapuk (*Ceiba pentandra*) terhadap gambaran histologi diameter tubulus seminiferus tikus putih dengan pewarnaan Hematoxylen Eosin (HE) dianalisis menggunakan mikroskop cahaya perbesaran 100x dengan 5 kali lapang pandang. Analisa diameter tubulus seminiferus dilakukan dengan bantuan software *image raster 3* untuk mengetahui perbedaan diameter tubulus seminiferus antar kelompok perlakuan.

Hasil pewarnaan Hematoxylen Eosin (HE) menunjukkan jaringan tubulus seminiferus yang normal **Gambar 5.2.A**, pada gambaran histologi tubulus seminiferus menunjukkan struktur membran basal terlihat jelas dengan susunan sel-sel spermatogonium tampak padat dan rapat. Sel spermatogonium masih menempel pada membran basalis tubulus seminiferus. Penurunan ketebalan diameter pada kelompok perlakuan 1 (KP1) terlihat pada **Gambar 5.2.B**, terdapat sel spermatogonium terlepas dari membran basalis dan terjadi pelebaran lumen pada bagian tubulus seminiferus. Kelompok perlakuan 2 (KP2) mengalami penurunan penebalan diameter yang ditandai dengan bentuk histologi tubulus seminiferus yang sudah tidak bulat lagi, dan mengalami atrofi **Gambar 5.2.C**. Morfologi testis yang mengalami atrofi menunjukkan tidak adanya perkembangan sel spermatogenik dan

mengalami penipisan lapisan epitel membran basalis, dan penurunan jumlah sel interstitial pada testis (Epstein, 2012).



**Gambar 5.2** Histologi tubulus seminiferus tikus (perbesaran 100x)

A = penampang melintang testis kontrol negatif (KN)

B = kelompok perlakuan 1 (dosis 1g/kg BB)

C = kelompok perlakuan 2 (dosis 0,1 g/kg BB)

Keterangan : (  $\longleftrightarrow$  ) berwarna putih menunjukkan ketebalan diameter tubulus seminiferus

Hasil akumulasi data kuantitatif diameter tubulus seminiferus dianalisis menggunakan bantuan software SPSS dengan metode *one way ANNOVA*. Hasil penelitian menunjukkan perbedaan yang signifikan ( $P < 0,05$ ) antara kelompok kontrol negatif (KN), kelompok perlakuan 1 (KP1) dan kelompok perlakuan 2 (KP2). Pemberian ekstrak terong cepoka dosis 1 g/kg BB dan biji kapuk dosis 0,1 g/kgBB dapat menurunkan diameter tubulus seminiferus pada tikus **Tabel 5.2**.

**Tabel 5.2.** Penurunan diameter tubulus seminiferus (mm) yang diberikan ekstrak terong cepoka dengan biji kapuk

Kelompok	Rata-Rata Diameter Tubulus Seminiferus $\pm$ SD	Penurunan Terhadap Kontrol Negatif (%)
Kontrol Negatif	0,44 $\pm$ 0,016 <sup>a</sup>	-
Kelompok Perlakuan 1 (1 g/kg BB)	0,40 $\pm$ 0,033 <sup>b</sup>	9,1
Kelompok Perlakuan 2 (0,1 g/kg BB)	0,31 $\pm$ 0,016 <sup>c</sup>	29,5

Keterangan : Perbedaan notasi menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ( $P < 0,05$ )

Hasil uji normalitas dan homogenitas menunjukkan nilai signifikansi ( $P > 0,05$ ), hal itu menunjukkan bahwa data yang di gunakan mempunyai distribusi normal dan homogen, sehingga di lanjutkan dengan uji *one way ANNOVA*. Hasil analisa statistik *one way ANNOVA* menunjukkan perbedaan yang signifikan ( $P < 0,05$ ) antara kelompok kontrol negatif (KN) dengan kelompok perlakuan 1 (KP1), dan kelompok perlakuan 2 (KP2) dan antara kelompok perlakuan 1 (KP1) dengan kelompok perlakuan 2 (KP2) ( $P < 0,05$ ). Hasil uji *post hoc tukey* menunjukkan kelompok perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan kelompok kontrol negatif (KN) dengan kelompok perlakuan 1 (KP1) dan kelompok perlakuan 2 (KP2), yang ditunjukkan melalui perbedaan notasi (**Tabel 5.2**). Hasil perhitungan statistik antara kelompok kontrol negatif (KN) dengan perlakuan 1 (KP1) dan perlakuan 2 (KP2) dapat dilihat pada **lampiran 10**.

Hasil pengukuran diameter tubulus seminiferus menunjukkan adanya penurunan rata-rata diameter tubulus kelompok kontrol negatif dengan kelompok perlakuan 1 (KP1) sebesar 9,1%. Kelompok kontrol memiliki jumlah rata-rata dan

standar deviasi ( $0,44 \pm 0,016$ ), sedangkan kelompok perlakuan 1 (KP1) sebesar ( $0,40 \pm 0,033$ ). Hasil pengukuran diameter tubulus ini membuktikan bahwa ekstrak terong cepoka (*Solanum torvum*) dan biji kapuk (*Ceiba pentandra*) dapat mengakibatkan penurunan diameter tubulus seminiferus dan menyebabkan gangguan pada proses spermatogenesis. Histologi tubulus seminiferus pada kelompok kontrol lebih tebal dibandingkan dengan kelompok perlakuan 1 dan perlakuan 2, pemberian pakan standar tidak menekan kadar testosteron secara intratestikular yang berfungsi untuk perkembangan sel spermatogenik (Ismail, 2018).

Gambaran histologi tubulus seminiferus pasca induksi ekstrak terong cepoka pada kelompok perlakuan 1 (KP1) menunjukkan memperlihatkan terjadinya penurunan jumlah sel spermatogenik pada area membran basalis, hal ini diduga senyawa solasodine dan kandungan steroid dalam buah terong cepoka (*Solanum torvum*) menekan kadar testosteron yang mengakibatkan gangguan perkembangan sel spermatogenik sehingga menyebabkan ketebalan diameter tubulus seminiferus menjadi mengecil (Ismail, 2018). Kandungan senyawa solasodine dalam buah terong cepoka (*Solanum torvum*) mengakibatkan meningkatnya konsentrasi testosteron dalam darah sehingga memunculkan efek umpan balik (*feedback*) negatif terhadap kelenjar hipofisis, dan berdampak terhambatnya sekresi *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) dan *Luteinizing Hormone* (LH) (Hidayati dan Nofianti, 2014).

Kelompok perlakuan 2 (KP2) memiliki pengaruh paling tinggi dalam menurunkan diameter tubulus seminiferus dengan presentase penurunan sebesar

29,5% dan rata-rata ( $0,31 \pm 0,016$ ). Kelompok perlakuan 2 yang diberikan ekstrak biji kapuk (*Ceiba pentandra*) memiliki perbedaan yang signifikan dengan kelompok kontrol negatif (KN) dan perlakuan 1 (KP1). Histologi tubulus kelompok perlakuan 2 **Gambar 5.2.C** mengalami penurunan diameter yang ditandai dengan bentuk histologi tubulus seminiferus yang sudah tidak bulat lagi, dan mengalami atrofi. Beberapa penelitian lainnya menyatakan bahwa senyawa gosipol menyebabkan terganggunya proses spermatogenesis yang mengakibatkan penurunan motilitas dan jumlah spermatozoa sebagai akibat dari degenerasi jaringan testis. Terganggunya proses spermatogenesis akan mengakibatkan meningkatnya presentase sperma yang abnormal mengalami. Peningkatan sperma yang abnormal dan degenerasi jaringan testis oleh senyawa gosipol disebabkan karena rusaknya mitokondria pada ekor sperma dan rusaknya epitel germinal pada tubulus seminiferus (Wirastuti dkk., 2018).

Berdasarkan hasil pengukuran diameter tubulus seminiferus pada penelitian ini didapatkan pemberian dosis 1 g/kgBB ekstrak terong cepoka (*Ceiba pentandra*) dan dosis 0,1 g/kgBB ekstrak biji kapuk (*Solanum torvum*) dapat menyebabkan penurunan diameter tubulus seminiferus dan menyebabkan gangguan fertilitas pada tikus putih (*Rattus norvegicus*). Pemberian paling efektif pada ekstrak biji kapuk dengan dosis 0,1 g/kgBB dalam menurunkan diameter tubulus seminiferus.

## BAB 6. KESIMPULAN DAN SARAN

### 6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa :

1. Pemberian ekstrak terong cecpoka (*Solanum torvum*) dengan biji kapuk (*Ceiba pentandra*) dosis pemberian 1 g/kgBB dan 0,1 g/kg BB secara peroral dapat meningkatkan ekspresi NFκB pada tubulus seminiferus tikus putih, dengan dosis terbaik 1 g/kgBB.
2. Pemberian ekstrak terong cecpoka (*Solanum torvum*) dengan biji kapuk (*Ceiba pentandra*) secara peroral menurunkan diameter tubulus seminiferus tikus putih, dengan dosis terbaik ekstrak biji kapuk (*Ceiba pentandra*) 0,1 g/kgBB.

### 6.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan yang telah dilakukan, dapat diberikan saran yaitu :

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut menggunakan dosis yang berbeda untuk mengetahui dosis efektif dan toksik pada ekstrak terong cecpoka dan biji kapuk, sehingga dapat memberikan hasil yang optimal sebagai kandidat kontrasepsi herbal.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut hubungan peningkatan ekspresi NFκB (*Nuclear Factor kappa B*) terhadap pemberian ekstrak terong cecpoka dan biji kapuk pada tikus putih.

## DAFTAR PUSTAKA

- Bai J, Y. Shi. 2002. Inhibition of T-type  $\text{Ca}^{2+}$  currents in mouse spermatogenic cells by gossypol, an antifertility compound. *Eur Pharmacol*. 440(2):1-6.
- Brocas, C. M., R. Rivera., F.F.P. Lopes., L.R. McDowell., M.C. Calhoun., C.R. Staples., N.S. Wilkinson., A.J. Boning., and P.J. Chenoweth 1997. Deleterious Actions Of Gossypol on Bovine Spermatozoa, Oocytes, and Embryos. Agriculture Research Center. Texas.
- Campbell N.A, L.G Mitchell, J.B Reece, M.R Taylor, dan E.J Simon. 2006. Biology, 5th ed. Benjamin Cummings Publishing Company.Inc. Redword City: England.
- Chapin, Robert, T. Bjorn. 2003. Development and Maturation Male Reproduction System. *Birth Defect Research*. Vol 68: (125-136)
- Chen, Fei, C. Vince, S. Xiangling. 1999. New Insights into the Role of Nuclear Factor- $\kappa\text{B}$ , a Ubiquitous Transcription Factor in the Initiation of Diseases. *Journal Clinical chemistry* 45:1 (7-17).
- Choubey A. 2011. In Vitro Growth and Inhibition Studies of *Ceiba Pentandra* on Monosodium Urate Monohydrate Crystals. *Pharmacology Online* 2.
- Cunha, M. D. G., G.C.M. Gonzalez., F.F. R. Carvalho and A.T. Soares. 2012. Effect of Diets Containing Whole Cottonseed on The Quality of Sheepsemen. *Acta Scientiarum. Animal Sciences Maring* 34 (3): 305-311.
- Delfino, F dan W.H Walker. 1998. Stage-specific nuclear expression of NF- $\kappa\text{B}$  in mammalian testis. *Mol Endocrinol* 12: 1696-1707.
- Epstein, J.I. 2012. The Lower Urinary Tract and Male Genital System. 8th ed. Saunders, Philadelphia
- Faranita, O. V. 2009. Kualitas Spermatozoa pada Tikus Wistar Jantan Diabetes Melitus [Skripsi]. Semarang: Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.
- Gadelha, ICN, N.B.S Fonsesa, S.C.S Oloris, M.M Melo, S.B Blanco. 2014. Gossypol toxicity from cottonseed products. *Sci World*. 14 (1):1-9.
- Ghosh S, Karin M. 2002. Missing pieces in the NF- $\kappa\text{B}$  puzzle. *Cell* 109 *Suppl*: 81-96.
- Hansen. 1997. Deleterious Actions of Gossypol on Bovine Spermatozoa, Oocytes, and Embryos. *Biol Reprod* 57(7): 901-90



- Herve, J. Claude., F. Pluciennik., B. Bastide., L. Cronier., F. Verrechia. 1996. Contraceptive gossypol blocks cell-to-cell communication in human and rat cells. *Laboratoires de Physiologic Cellulaire*. France
- Hidayati, N.L.D. dan Nofianti, T. 2014. Pengaruh Infusa Buah Terong Cepoka Terhadap Konsentrasi Spermatozoa Tikus Putih Jantan. *Jurnal Kesehatan Bakti Tunas Husada* 12(1): 202-210.
- Hughes, I.A. and C.L. Acerini. 2008. Factors controlling testis descent. *European Journal of Endocrinology* 159: 575–582.
- Ismail, Wan Muhammad. 2018. Histopatologi Epitel Tubulus Seminiferus Testis, Kualitas dan Kuantitas Sel Sperma Tikus Hiperkolesterolemia yang diberi Vitamin C. *Buletin Farmatera: Vol 3 (3)*
- Nakada, K., A. Sato, K. Yoshida, T. Morita. 2006. Mitochondria-Related Male Infertility. *PNAS: Vol 103 (41): 15148-15153*
- Nisa, Khoirun dan A. N. Indrianingsih. 2013. Penentuan Aktifitas Antioksidan Dan Kadar Fenolik Total Daun Randu (*Ceiba pentandra*) Dari Gunungkidul Yogyakarta. BPPTK LIPI Gunung Kidul: Yogyakarta.
- Reni, K, R. Aryani dan S. Ibrahim. 2011. Jumlah dan motilitas spermatozoa mencit (*Mus musculus*L.) yang dipapari obat nyamuk elektrik berbahan aktif d-allethrin. *Mulawarman Scientifie*. Vol.10 (2): 133-138.
- Lawrence T., D.W Gilroy., P.R Colville-Nash., and D.A Willoughby. 2001. Possible new role for NFkB in the resolution of inflammation. *Nat Med* 7: 1291-1297.
- Mathur, Premendu P, M. Francispillai, S. Vaithinatan, dan A. Agrawal. 2013. NFkB in Male Reproduction: A Boon or a Bane? *The Open Reproductive Science Journal (3): 85-91*
- Moon, D.O., Y.H. Choi., S.K. Moon., W.J Kim., and G.D Kim. 2011. Gossypol decreases tumor necrosis factor a-induced intercellular adhesion molecule-1 expression via suppression on NF-kB activity. *Food Chem Toxicol*.49(11):999-1008.
- Murray RK, D.K Granner, V.W Rodwell. 2006. Biokimia Harper, penerjemah; Wulandari N, Dwijayathi L, Liena, Dany F, Rachman Ly, editor. Jakarta (ID): EGC. Terjemahan dari: Harper's Illustrated Biochemistry. Ed ke-27.
- Ogbuewu, I. P., I.C. Unamba-Oparah., V.U. Odoemenam, I.F. Etuk, and I.C. Okoli. 2011. The potentiality of medicinal plants as the source of new contraceptive principles in males. *North American Journal of Medical Science*. 3(6): 255–263.

- Pentikainen, V. 2002. Regulation Of Male Germ Cell Apoptosis. Biomedicum Helsinki. University Of Helsinki: Finland.
- Pointis, G, G. Jerome, C. Diane, S. Dominique. 2011. Testicular Connexin 43, A Precocious Molecular Target For The Effect Of Environmental Toxicants On Male Fertility. University Sophia Antipolis. France.
- Pratiwi, R. Hidayati. 2017. Potensi Ekstrak Etanol Batang Kapuk Randu Sebagai Antibakteri. Jurusan Pendidikan Biologi, FTMIPA. Universitas PGRI Indraprasta. Denpasar.
- Puja, I ketut, I. Made Kardena. 2012. Ekologi dan Demografi Anjing di Kecamatan Denpasar Timur. *Jurnal Indonesia Medicus Veterinus. Vol 1 (2) : 162-170.*
- Rafiq, A. Ramadhan dan D. Tureni. 2013. Pengaruh Pemberian Ekstrak Buah Terung Belanda (*Solanum bataceum*) Terhadap Morfologi Dan Motilitas Spermatozoa Mencit (*Mus musculus*) Galur Ddy. *E-Jipbiol. Vol 1: 50-56.*
- Astri, Reisa. 2012. Aktivitas Antioksidan Ekstrak Buah Takokak (*Solanum torvum* Swartz.). [Skripsi]. Fakultas Teknologi Pertanian. ITB. Bogor.
- Riawan, Wibi, W. Samodijanti. 2006. Pengaruh Pemberian Ox-Ldl Terhadap Aktivasi NFkB Dan PPARy Serta Apoptosis Pada Kultur Huvec's. Lab LDL. *Jurnal Kedokteran Brawijaya, Vol. XXII, (1).*
- Sengupta, P. 2013. The laboratory rat: Relating its age with human's. *International Journal of Preventive Medicine 4(6): 624–630.*
- Sirait, Nursalam. 2009. Terong Cepoka (*Solanum torvum*) Herba yang Berkhasiat sebagai Obat. *Warta Penelitian dan Pengembangan Tanaman Industri. 15 (1) : 11-13.*
- Sirois, J. 2005. Laboratory Animal Medicine: Principles and Procedure. Elsevier. United States of America.
- Susilawati, T. 2011. Spermatology. Malang: UB Press.
- Susilo dan B. Akbar. 2016. Pengaruh Ekstrak Buah Takokak (*Solanum torvum* S.) terhadap Jumlah dan Motilitas Spermatozoa Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Galur Sprague Dawley. *Jurnal Biomedika. Vol 9 (2).*
- Sutyarso, Busman. H. 2003, Hubungan Keadaan Hormon Testosteron Dengan Jumlah Dan Kualitas Spermatozoa Pria Infertil Idiopatik. *J Sains Tek. Vol 9(3) : 29-34.*
- Thomas, K. D, A. E. C. Martins., A. A. Elujoba dan O. O. Oyelola. 1991. Effects of an Aqueous Extract of Cotton Seed (*Gossypium barbadense* Linn.) on Adult Male Rats. *Adv Contracept 7 (4) : 353-362.*

- Wallis, C.J. 1974. *Practical zoology: For advanced level and intermediate students*. Sixth Ed. Butterworth-Heinemann Pub. Oxford, 283-290.
- Widiastuti, Astrid. 2015. Penembakan Laserpunktur Terhadap Laju Pertumbuhan Ayam Broiler [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga.
- Yurekli B, Karaca B, Cetinkalp S, Uslu R. 2009. Can gossypol be a hope for transsexual patients (male to female) before sex reassignment surgery. *Med Hypoth.* 73(623):1-6.
- Zahid, I. A, L. A. Lodhi., Z. I. Qureshi., N. U. Rehman., M. S. Akhtars. 2003. Effects of Gossypol on Semen Characteristics of Teddy Male Goats. *Pakistan Veterinary Journal*, 23( 4): 173-176.
- Zhang Q, *et al.* 2010. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature*; 464:104–108. [PubMed: 20203610].

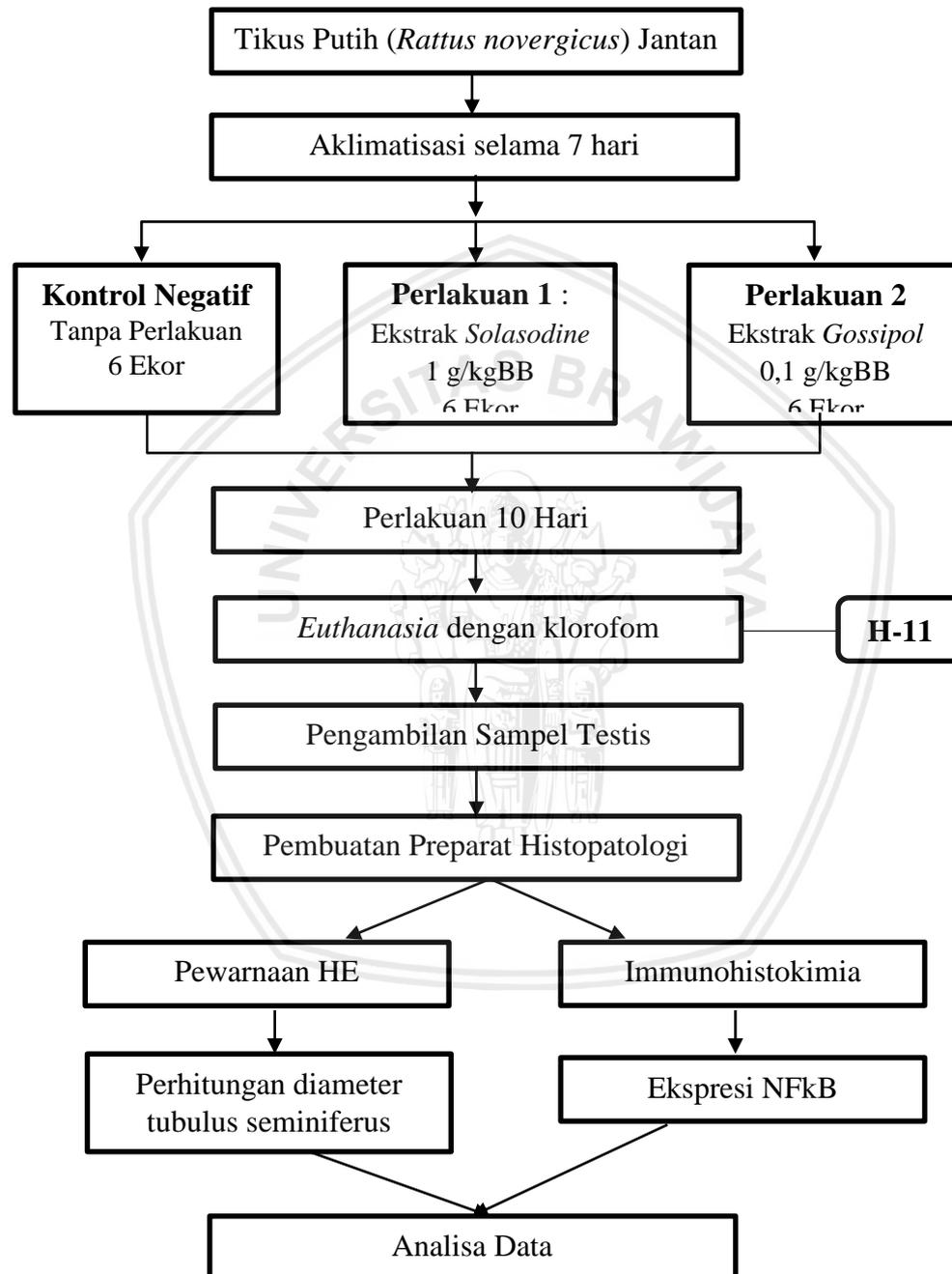


# LAMPIRAN



## Lampiran 1. Kerangka Operasional Rancangan Penelitian

### A. Rancangan Operasional



## Lampiran 2. Surat Layak Etik



### KOMISI ETIK PENELITIAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA

#### KETERANGAN KELAIKAN ETIK "ETHICAL CLEARANCE"

No: 967-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** : POTENSI SENYAWA SOLASODINE DAN GASIPOL  
SEBAGAI KANDIDAT KONTRASEPSI PADA HEWAN  
MODEL DALAM MENGHAMBAT REPRODUKSI TIKUS  
PUTIH (*Rattus norvegicus*) BETINA MELALUI  
EKSPRESI GROWTH DIFFERENTIATION FACTOR 9,  
SIKLUS BIRAH DAN FOLIKULOGENESIS

**PENELITI** : DESI WULANSARI

**UNIT/LEMBAGA/TEMPAT** : UNIVERSITAS BRAWIJAYA

**DINYATAKAN** : LAIK ETIK

Malang, 22 Mei 2018

Ketua Komisi Etik Penelitian  
Universitas Brawijaya



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

**Lampiran 3. Surat Keterangan Ekstraksi Terong Cepoka (*Solanum torvum* S.)**



**PEMERINTAH PROVINSI JAWA TIMUR  
DINAS KESEHATAN  
UPT MATERIA MEDICA BATU**  
Jalan Lahor No.87 Telp/Fax (0341) 593396. Batu  
KOTA BATU

65313

**SURAT KETERANGAN EKSTRAK**  
No. 074 / 123C / 102.7 / 2018

Bersama ini kami sampaikan hasil ekstraksi berikut ini :

**1. Identitas Pemohon**

Nama : LIZA SADDA CAKRAWATI  
Nim : 155130100111008  
Instansi : FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

**2. Identitas Sampel**

Nama daerah sampel : Biji kapuk  
Nama latin : Ceiba pentandra  
Bagian sampel : Biji  
Bentuk sampel : Serbuk  
Asal sampel : Malang  
Jumlah sampel : 3 kilogram  
Tanggal penerimaan : -

**3. Hasil**

No.	Parameter	Hasil
1	Proses	
	a. Metode	Maserasi
	b. Jumlah perlakuan	1 Kali
	c. Pelarut	Etanol 70%
	d. Jumlah pelarut	8000 mL
	e. Waktu evaporasi	2 jam
2	Hasil	
	a. Bentuk sediaan	Cair
	b. Bahan tambahan	-
	c. Jumlah bahan tambahan	-
	d. Berat / volume	700 ml



#### Lampiran 4. Surat keterangan ekstraksi biji kapuk (*Ceiba pentandra*)



**PEMERINTAH PROVINSI JAWA TIMUR**  
**DINAS KESEHATAN**  
**UPT MATERIA MEDICA BATU**  
 Jalan Lahor No.87 Telp/Fax (0341) 593396. Batu  
**KOTA BATU**

65313

#### 4. Identitas Sampel

Nama daerah sampel : Terong cepoka  
 Nama latin : Solanum torvum  
 Bagian sampel : Buah  
 Bentuk sampel : Segar  
 Asal sampel : Malang  
 Jumlah sampel : 5 kilogram  
 Tanggal penerimaan : -

#### 5. Hasil

No.	Parameter	Hasil
1	Proses	
	a. Metode	Maserasi
	b. Jumlah perlakuan	1 Kali
	c. Pelarut	Etanol 70%
	d. Jumlah pelarut	10.000 mL
	e. Waktu evaporasi	3 jam
2	Hasil	
	a. Bentuk sediaan	Cair
	b. Bahan tambahan	-
	c. Jumlah bahan tambahan	-
	d. Berat / volume	2000 ml

#### 6. Pustaka

- Ditjen POM, 1986. "Sediaan Galenik", Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta.
- Sudjadi, 1986. "Metode Pemisahan", UGM Press, Yogyakarta.
- Nugroho, Agung. 2017. "Teknologi Bahan Alam". Lambung Mangkurat University Press. Banjarmasin.

Demikian disampaikan untuk dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

Batik, 2 Agustus 2018  
 Kepala UPT Materia Medica Batu



Dr. Husein RM, Drs., Apt., MKes.  
 NIP.19611102 199103 1 003



**Lampiran 5. Perhitungan dosis ekstrak terong cepoka**

Dosis terapi = 1 g/kg BB

Berat tikus = 0,2 kg

Dosis yang diberikan = Dosis terapi x berat badan

$$= 1 \text{ g/kg BB} \times 0,2 \text{ kg} = 0,2 \text{ g/ekor}$$

Konsentrasi ekstrak terong cepoka adalah absolut (100 g/ 100mL)

Volume ekstrak yang disiapkan = dosis yang diberikan x konsentrasi x jumlah tikus  
x lama perlakuan

$$0,2 \text{ g/ekor} \times 1 \text{ g/mL} \times 6 \text{ ekor} \times 10 \text{ hari} = 12 \text{ mL}$$

Volume total ekstrak = volume pemberian x jumlah tikus x lama perlakuan

$$1 \text{ mL/ekor} \times 6 \text{ ekor} \times 10 \text{ hari} = 60 \text{ mL}$$

Volume aquades yang ditambahkan = vlome total – volume ekstrak

$$60 \text{ mL} - 12 \text{ mL} = 48 \text{ mL}$$

Konsentrasi ekstrak terong cepoka setelah diencerkan sebesar 0,2 g/mL. Sehingga volume pemberian sonde sebesar 1 mL dan terdapat 0,2 g ekstrak terong cepoka.

**Lampiran 6. Perhitungan dosis ekstrak biji kapuk**

Dosis terapi = 0,1 g/kg BB

Berat tikus = 0,2 kg

Dosis yang diberikan = Dosis terapi x berat badan

$$= 0,1 \text{ g/kg BB} \times 0,2 \text{ kg} = 0,02 \text{ g/ekor}$$

Konsentrasi ekstrak biji kapuk adalah absolut (100 g/ 100mL)

Volume ekstrak yang disiapkan = dosis yang diberikan x konsentrasi x jumlah tikus  
x lama perlakuan

$$0,02 \text{ g/ekor} \times 1 \text{ g/mL} \times 6 \text{ ekor} \times 10 \text{ hari} = 1,2 \text{ mL}$$

Volume total ekstrak = volume pemberian x jumlah tikus x lama perlakuan

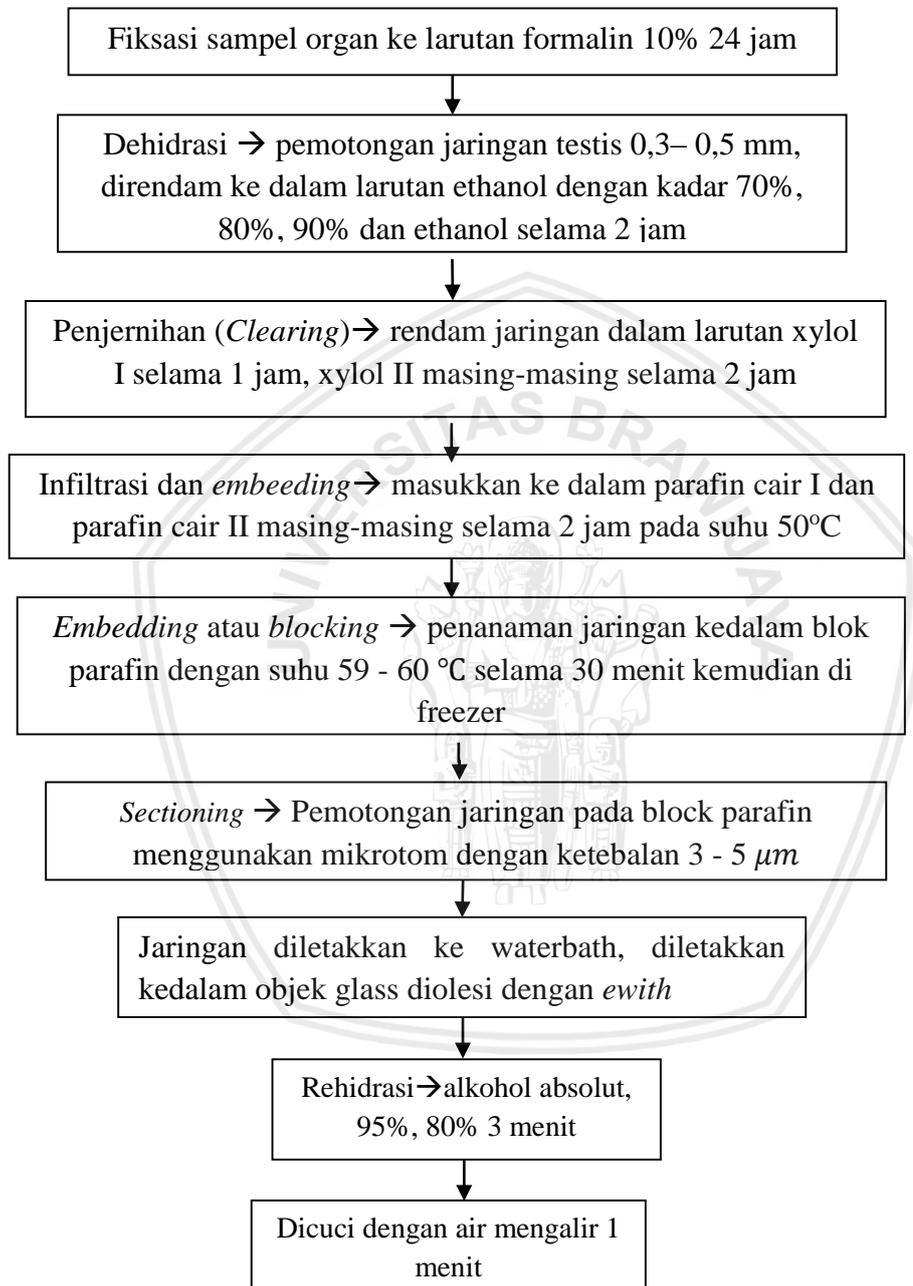
$$1 \text{ mL/ekor} \times 6 \text{ ekor} \times 10 \text{ hari} = 60 \text{ mL}$$

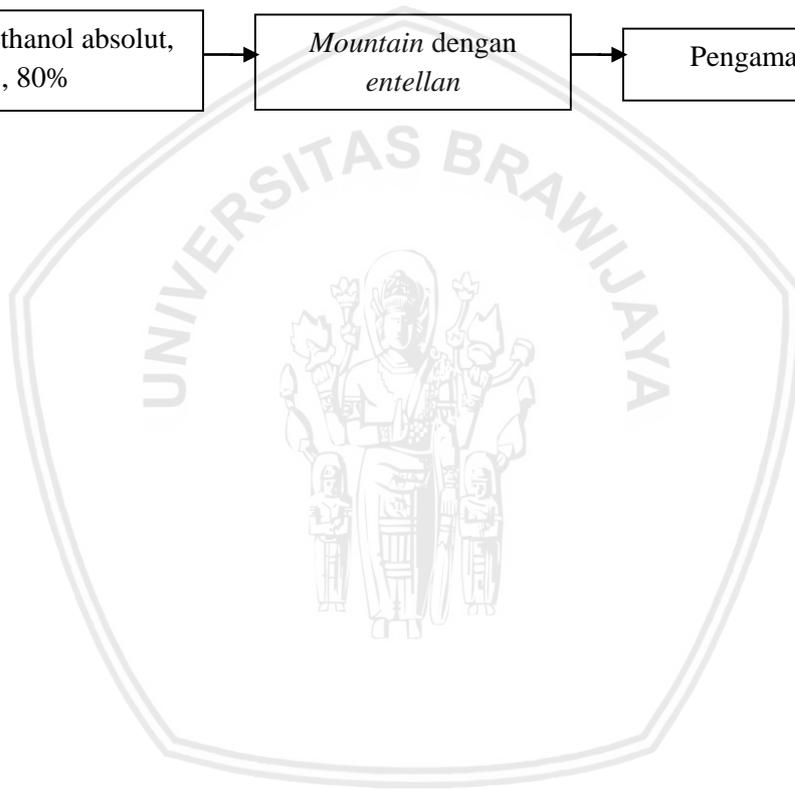
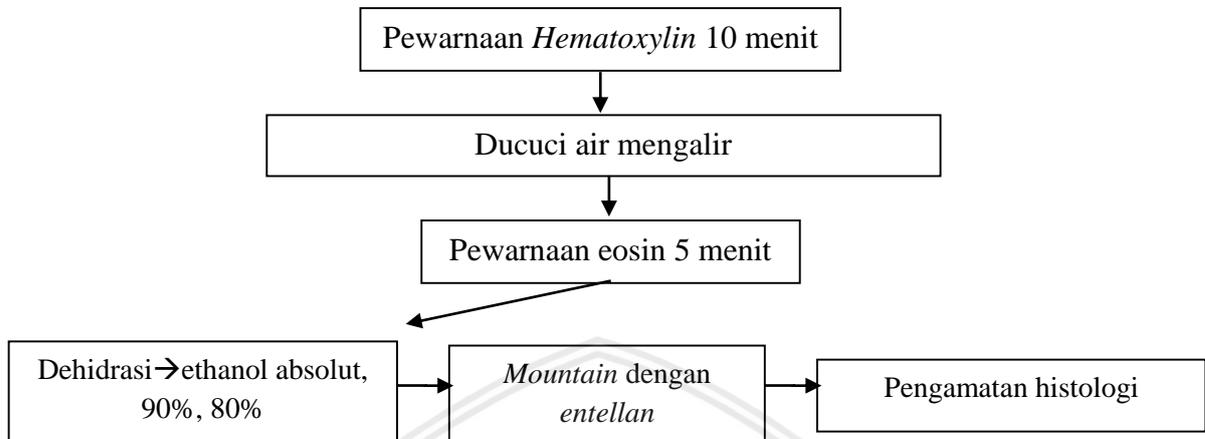
Volume aquades yang ditambahkan = volume total – volume ekstrak

$$60 \text{ mL} - 1,2 \text{ mL} = 58,8 \text{ mL}$$

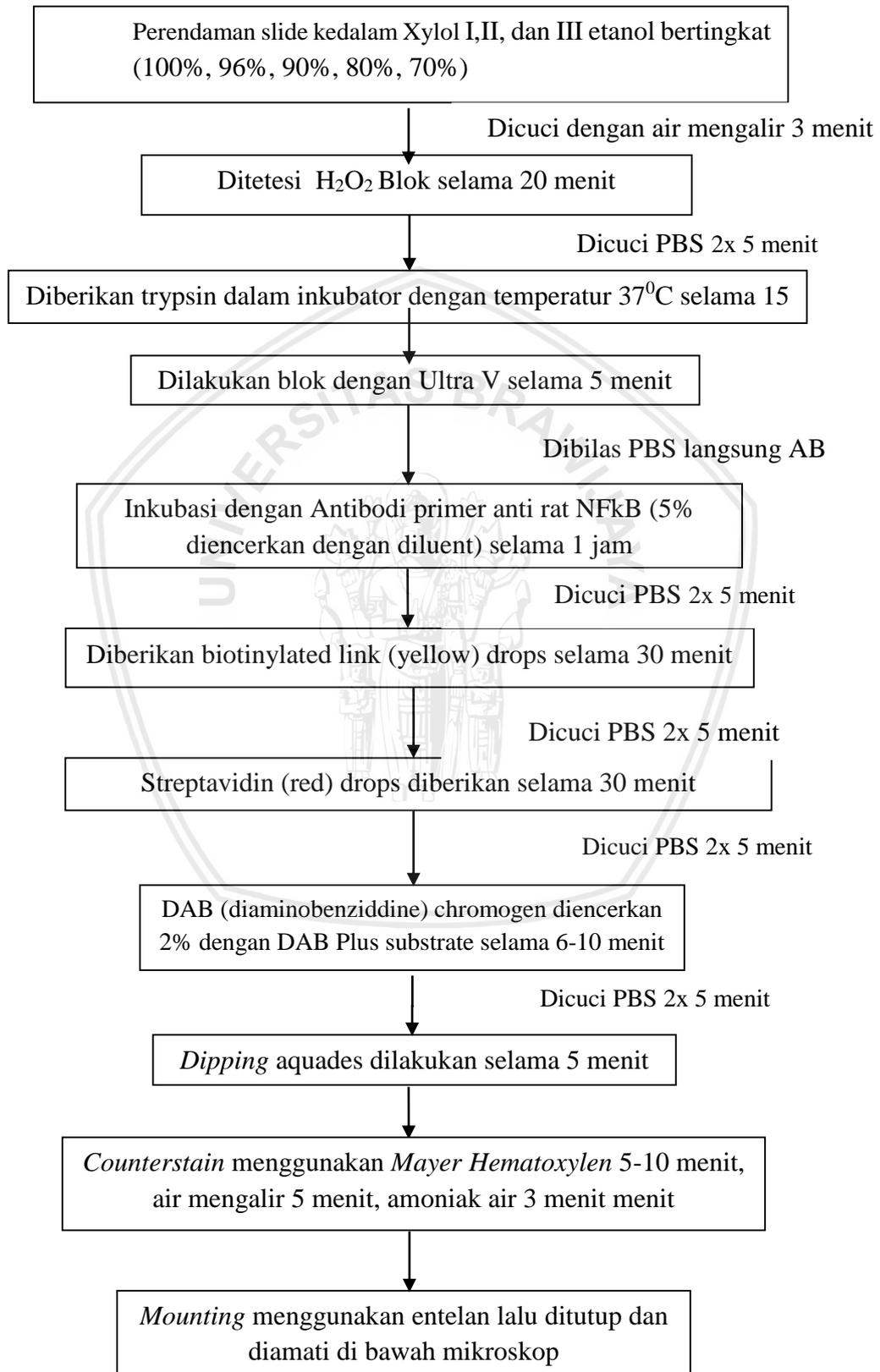
Konsentrasi ekstrak biji kapuk setelah diencerkan sebesar 0,2 g/mL. Sehingga volume pemberian sonde sebesar 1 mL dan terdapat 0,02 g ekstrak biji kapuk.

### Lampiran 7. Pembuatan Histopatologi Organ Testis dengan Pewarnaan HE





### Lampiran 9. Metode Imunohistokimia



## Lampiran 9. Analisis Statistika Ekspresi NFkB Tubulus Seminiferus

Data Immunorasio Ekspresi NFkB (%)

No	Kode Preparat	LP1	LP2	LP3	LP4	LP5	rerata
1	K (-).1	69,70	71,30	70,50	95,00	84,20	78,14
2	K (-).2	36,10	91,10	34,40	33,40	32,10	45,42
3	K (-).3	70,70	80,10	76,10	84,00	36,00	69,38
4	K (-).4	69,70	71,30	70,50	95,00	84,20	78,14
5	K (-).5	43,70	56,80	48,80	52,30	50,40	50,40
6	K (-) 6	63,30	69,00	58,10	63,50	70,00	64,78
RERATA							64,38
10	P1.1	91,20	88,20	88,40	79,60	90,30	87,54
11	P1.2	83,20	88,50	96,00	83,20	91,10	88,40
12	P1.3	97,30	93,60	98,90	93,60	97,30	96,14
13	P1.4	59,50	64,70	78,80	94,90	83,90	76,36
14	P1.5	94,20	92,60	91,20	82,80	98,40	91,84
15	P1.6	82,60	85,50	76,40	85,10	85,60	83,04
RERATA							87,22
18	P2.1	69,00	75,90	90,10	83,25	68,00	77,25
19	P2.2	86,20	94,10	91,60	83,20	95,10	90,04
20	P2.3	94,30	93,70	91,30	94,90	95,65	93,97
21	P2.4	62,60	90,40	85,30	81,05	86,60	81,19
22	P2.5	91,70	84,50	92,60	53,30	76,65	79,75
23	P2.6	86,20	91,90	97,50	93,10	85,80	90,90
RERATA							85,52

### 9.1 Uji normalitas data

Tests of Normality

PERLAKUAN	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
1. KONTROL	,178	6	,200 <sup>*</sup>	,891	6	,325
2. EKSTRAK TERONG	,185	6	,200 <sup>*</sup>	,980	6	,950
3. EKSTRAK BIJI KAPUK	,243	6	,200 <sup>*</sup>	,891	6	,324

\*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Berdasarkan uji normalitas data diatas dinyatakan normal ( $P > 0,05$ ). Hal ini membuktikan bahwa data diatas dinyatakan terdistribusi dengan normal

## 9.2 Uji homogenitas data

### Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1. KONTROL	6	64,3767	13,84743	5,65319	49,8447	78,9087	45,42	78,14
2. EKSTRAK TERONG	6	87,2200	6,89663	2,81554	79,9824	94,4576	76,36	96,14
3. EKSTRAK BIJI KAPUK	6	85,5167	6,94567	2,83556	78,2276	92,8057	77,25	93,97
Total	18	79,0378	14,10262	3,32402	72,0247	86,0508	45,42	96,14

### Test of Homogeneity of Variances

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2,671	2	15	,102

Berdasarkan analisa deskriptif dan homogenitas menunjukkan data diatas homogen ( $P > 0,05$ ), dengan nilai signifikansi ( $P$ )= 0,102. Pengujian nilai homogenitas dan normalitas telah memenuhi asumsi, maka dilanjutkan dengan *uji one way ANNOVA*

## 9.3 Uji *one way ANNOVA*

**ANOVA**

RATAAN

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1943,238	2	971,619	10,137	,002
Within Groups	1437,787	15	95,852		
Total	3381,024	17			

Hasil one way ANNOVA ( $\alpha=0,05$ ) menunjukkan nilai signifikansi sebesar  $p= 0,02$ , sehingga diperoleh  $P<0,05$ . Dapat disimpulkan bahwa terdapat satu atau lebih kelompok yang memiliki perbedaan signifikan, maka dapat dilanjutkan *post hoc* dengan uji *tukey*

**9.4 Uji Tukey**

Tukey HSD

PERLAKUAN	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
KONTROL	6	64,3767	
EKSTRAK TERONG	6		85,5167
EKSTRAK BIJI KAPUK	6		87,2200
Sig.		1,000	,951

Hasil uji *tukey* menunjukkan adanya perbedaan signifikan antara kelompok kontrol negatif dengan kelompok perlakuan 1 (KP1) ekstrak terong cepoka dan kelompok perlakuan 2 (KP2) ekstrak biji kapuk.

## Lampiran 10. Analisis Statistik Diameter Tubulus Seminiferus

**Tabel Pengukuran Diameter Tubulus Seminiferus**

No	Kode Preparat	LP1	LP2	LP3	LP4	LP5	Rerata
1	K (-).1	0,58	0,31	0,39	0,4	0,4	0,42
2	K (-).2	0,44	0,5	0,55	0,4	0,39	0,46
3	K (-).3	0,49	0,46	0,45	0,44	0,43	0,45
4	K (-).4	0,52	0,42	0,44	0,43	0,41	0,44
5	K (-).5	0,45	0,47	0,45	0,44	0,45	0,45
6	K (-) 6	0,50	0,43	0,46	0,42	0,42	0,44
7	P1.1	0,44	0,36	0,51	0,37	0,51	0,44
8	P1.2	0,44	0,35	0,48	0,42	0,47	0,43
9	P1.3	0,39	0,38	0,36	0,37	0,39	0,38
10	P1.4	0,34	0,33	0,33	0,36	0,42	0,36
11	P1.5	0,45	0,38	0,37	0,33	0,34	0,37
12	P1.6	0,41	0,36	0,41	0,37	0,43	0,40
13	P2.1	0,32	0,34	0,31	0,26	0,24	0,29
14	P2.2	0,3	0,35	0,32	0,34	0,37	0,34
15	P2.3	0,33	0,29	0,28	0,31	0,3	0,30
16	P2.4	0,29	0,27	0,33	0,32	0,34	0,31
17	P2.5	0,32	0,28	0,27	0,29	0,31	0,29
18	P2.6	0,29	0,32	0,34	0,31	0,33	0,32

### 10.1 Uji Normalitas

**Tests of Normality**

PERLAKUAN	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
KONTROL	,237	6	,200*	,927	6	,554
EKSTRAK TERONG	,195	6	,200*	,920	6	,505
EKSTRAK BIJI KAPUK	,172	6	,200*	,912	6	,452

Berdasarkan uji normalitas data terdistribusi normal dengan nilai signifikansi  $P > 0,05$ .

## 10.2 Uji Homogenitas

### Test of Homogeneity of Variances

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3,405	2	15	,060

Berdasarkan uji homogenitas nilai signifikansi  $P > 0,05$  sehingga dapat disimpulkan data terdistribusi normal dan homogen. Oleh karena itu dapat dilanjutkan dengan uji *one way ANNOVA*

## 10.3 Uji *one way ANNOVA* dan *Tukey*

### ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,056	2	,028	51,912	,000
Within Groups	,008	15	,001		
Total	,065	17			

## 10.4. Uji *Post Hoc Tukey*

### Tukey HSD

PERLAKUAN	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
EKSTRAK BIJI KAPUK	6	,3083		
EKSTRAK TERONG	6		,3967	
KONTROL	6			,4433
Sig.		1,000	1,000	1,000

Berdasarkan data diatas dapat disimpulkan bahwa setiap perlakuan memiliki perbedaan yang nyata dengan perlakuan lainnya.