

**STUDI EKSPRESI GnRH (*Gonadotropin Releasing
Hormone*) DAN SEL BASOFIL DI HIPOFISIS
ANTERIOR PADA TIKUS JANTAN
(*Rattus norvegicus*) PASCA PAPARAN
LASERPUNKTUR**

SKRIPSI

Oleh

SARFIAH AINI
105130112111001



**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER HEWAN
PROGRAM KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2014**

**STUDI EKSPRESI GnRH (*Gonadotropin Releasing
Hormone*) DAN SEL BASOFIL DI HIPOFISIS
ANTERIOR PADA TIKUS JANTAN
(*Rattus norvegicus*) PASCA PAPARAN
LASERPUNKTUR**

SKRIPSI

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Memperoleh Gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh

SARFIAH AINI
105130112111001



**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER HEWAN
PROGRAM KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2014**

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

Studi Ekspresi GnRH (*Gonadotropin Releasing Hormone*) Dan Sel Basofil Di
Hipofisis Anterior Pada Tikus Jantan (*Rattus Novergicus*)

Pasca Paparan Laserpuntu

Oleh :

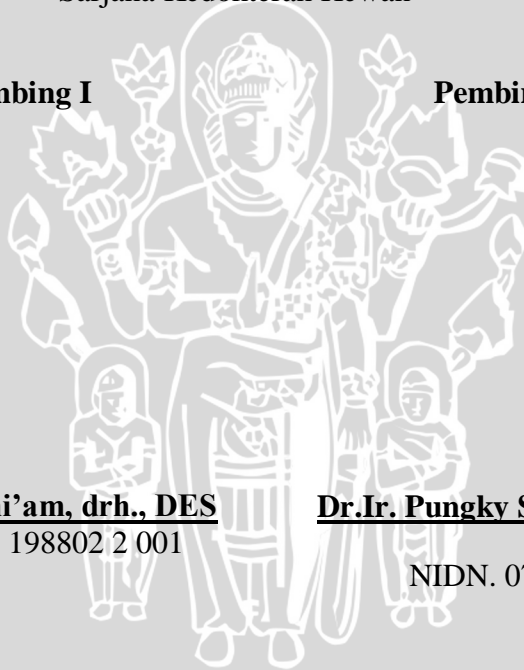
SARFIAH AINI

105130112111001

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal 21 Februari 2014
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk Memperoleh Gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II



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

NIP. 19600903 198802 2 001

Dr.Ir. Pungky Slamet WK, M.Si

NIDN. 0728075701

Mengetahui,

Ketua Program Studi Pendidikan Dokter Hewan
Program Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya

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

NIP. 19600903 198802 2 001

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertandatangan dibawah ini:

Nama : SarfiahAini

NIM : 105130112111001

Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan

Penulis Skripsi berjudul :

Studi Ekspresi GnRH (*Gonadotropin Releasing Hormone*) dan Sel Basofil di Hipofisis Anterior Pada Tikus Jantan (*Rattus Novergicus*) Pasca Paparan Laserpunktur

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, 21 Februari 2014
Yang Menyatakan,

Sarfiah Aini

NIM. 105130112111001

STUDI EKSPRESI GnRH(*Gonadotropin Releasing Hormone*) DAN SEL BASOFIL DI HIPOFISIS ANTERIOR PADA TIKUS JANTAN (*Rattus novergicus*) PASCA PAPARAN LASERPUNKTUR

ABSTRAK

Laserpunktur merupakan metode terapeutik dengan menggunakan cahaya laser sebagai sumber rangsangan pada titik akupunktur. Pemanfaatan paparan laserpunktur salah satunya digunakan untuk meningkatkan fertilitas yang ditandai dengan peningkatan ekspresi GnRH (*Gonadotropin - realising hormone*) dan peningkatan jumlah sel basofil dihipofisis anterior. Tujuan penelitian ini yaitu untuk mengetahui pengaruh paparan laserpunktur terhadap peningkatan level ekspresi GnRH, dan mengetahui peningkatan jumlah sel basofil di hipofisis anterior pada tikus (*Rattus novergicus*) jantan, penelitian tikus dibagi menjadi dua kelompok kontrol (A) dan kelompok (B) yang dipapar laserpunktur pada 6 titik akupunktur *dexter* dan *sinister* yang terbagi 2 titik BL 22 (*sanjiaoshu*), 2 titik BL 23 (*shenshu*) dan 2 titik GV 4 (*mingmeng*) dengan energi 0,375 joule /titik selama 15detik. Parameter yang diamati pada penelitian ini adalah ekspresi GnRH diamati dengan metode immunohistokimia dan jumlah sel basofil yang diamati metode pewarnaan Hematoxilen Eosin (HE). Hasil penelitian menunjukkan rata-rata presentase ekspresi GnRH kelompok A sebesar 2.78 ± 1.41 dan kelompok B sebesar 5.96 ± 1.92 , sedangkan rata-rata jumlah sel basofil kelompok A adalah 92.36 ± 24 dan kelompok B adalah 140.16 ± 31.46 . Paparan laserpunktur memberikan pengaruh yang signifikan ($p < 0,05$) terhadap peningkatan ekspresi GnRH dan peningkatan jumlah sel basofil.

Kata kunci : laserpunktur, GnRH, sel basofil, titik akupunktur.

STUDY OF GNRH (*Gonadotropin Releasing Hormone*) EXPRESSION AND BASOPHIL CELLS OF THE ANTERIOR PITUITARY IN MALE RATS (*Rattus novergicus*) POST- LASERPUNCTURE EXPOSURE

ABSTRACT

Laserpuncture is a therapeutic method using laser as a source of stimulation to the acupuncture points. One of the utilization of laserpuncture exposure is used for increasing fertility marked by increasing of GnRH (*Gonadotropin - realising hormone*) expression and number of basophil cells of the anterior pituitary . The purpose of this study is to determine the effect of laserpuncture exposure to increase the GnRH expression levels, and determine the increase of basophiles in the anterior pituitary cells of male rats (*Rattus novergicus*), the rats were divided into two groups: control (A) and group (B) which were exposed by laserpuncture on 6 acupuncture points dexter and sinister consisted of 2 points BL 22 (*sanjiaoshu*), 2 points BL 23 (*shenshu*) and 2 points GV 4 (*mingmeng*) with 0,375 joules/point energy for 15 seconds. Parameters observed in this study is the expression of GnRH observed using immunohistochemistry and basophil counts were observed using hematoxilen eosin staining methods (HE). The results show the average percentage of GnRH expression in group A is 2.78 ± 1.41 and group B 5.96 ± 1.92 , while the average number of basophil cells in group A is 92.36 ± 24 and group B is 140.16 ± 31.46 . Laserpuncture exposure give a significant effect ($p < 0.05$) on increasing the expression of GnRH and the number of basophil cells.

Keywords: laserpuncture, GnRH, basophil cell, acupoints.

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Tuhan Yang Maha Kuasa, karena atas rahmat, karunia, dan hidayahNya, skripsi yang berjudul “Studi Ekspresi GnRH (*Gonadotropin Releasing Hormone*) Dan Sel Basofil di Hipofisis Anterior pada Tikus Jantan (*Rattus Novergicus*) Pasca Paparan Laserpunktur” dapat selesai disusun.

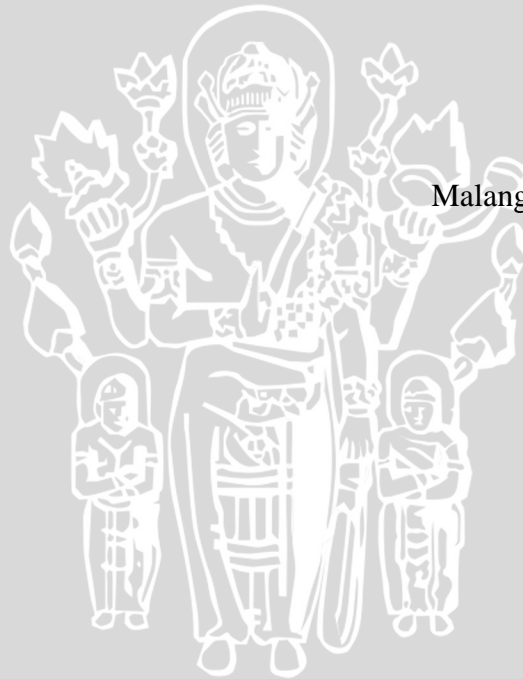
Pada penulisan skripsi ini penulis tidak lupa mengucapkan terima kasih kepada:

1. Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES, selaku ketua program studi pendidikan dokter hewan dan selaku dosen pembimbing I atas atas bimbingan, kesabaran, fasilitas dan waktu selama penulisan skripsi ini.
2. Dr.Ir. Pungky Slamet WK, M.Si selaku dosen pembimbing II atas bimbingan, kesabaran, fasilitas dan waktu dalam penulisan skripsi ini.
3. drh. Analis Wisnu Wardhana M.Biomed dan drh. Aulia Firmawati, M.Vet selaku dosen penguji atas koreksi, kritik, saran, kesabaran dan waktu.
4. Dr. Agung Pramana Warih Mahendra, MS selaku Ketua Program Kedokteran Hewan yang selalu memberikan dukungan untuk kemajuan PKH UB.
5. Analis dan Staf Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia, Laboratorium Molekuler Jurusan Biologi FMIPA Malang, yang telah membantu penulis dalam penelitian.
6. Orang tua penulis, Hj. Kusnawiyah dan alm. H. Kasman,S.Pd tercinta yang senantiasa memberikan doa, dukungan dan semangat yang tiada henti demi

keberhasilan putrinya, serta adik Niswan sundari dan Nazwa nuril yang selalu memberikan doa dan dukungan.

7. Teman – teman LASERPUNKTUR “Bagas, Mar’atus, Gilang dan Nawir”
8. Semua pihak yang telah membantu dalam penyelesaian penulisan karya tulis ini yang tidak mungkin penulis sebutkan satu persatu.

Penulis menyadari bahwa dalam penulisan skripsi ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu penulis membuka diri untuk segala saran dan kritik yang membangun.



Malang, 21 Februari 2014

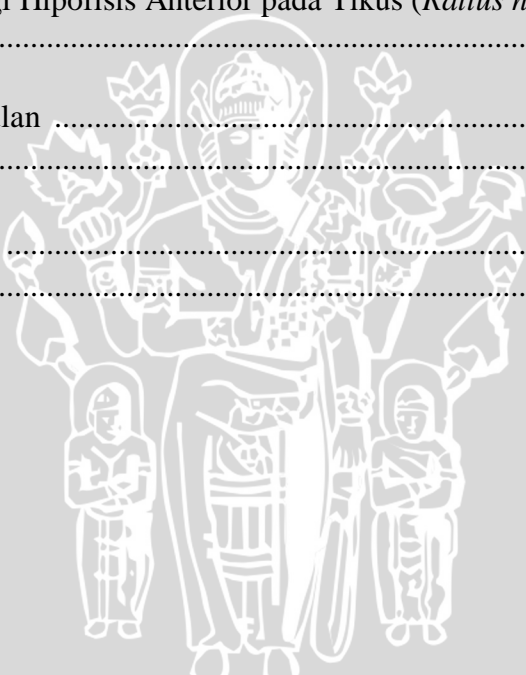
Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
HALAMAN PERNYATAAN.....	iv
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL.....	x
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	4
1.3. Batasan Masalah	4
1.4. Tujuan Penelitian	5
1.5. Manfaat Penelitian	5
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Laserpunktur	6
2.1.1 Titik Akupunktur	8
2.1.2 Mekanisme Aktivitas Seluler	10
2.2 Tikus Putih (<i>Rattus novergicus</i>)	11
2.3 Reproduksi Tikus Jantan	13
2.3.1 Sistem Reproduksi	13
2.3.2 Regulasi Hormon Reproduksi Tikus Jantan	14
2.3.3 Histologi Hipofisis Anterior	16
BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN	19
3.1 Kerangka Konsep	19
3.2 Hipotesis Penelitian	22
BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN	23
4.1 Waktu dan Tempat Penelitian	23
4.2 Alat dan Bahan	23
4.3 Tahapan Penelitian	24

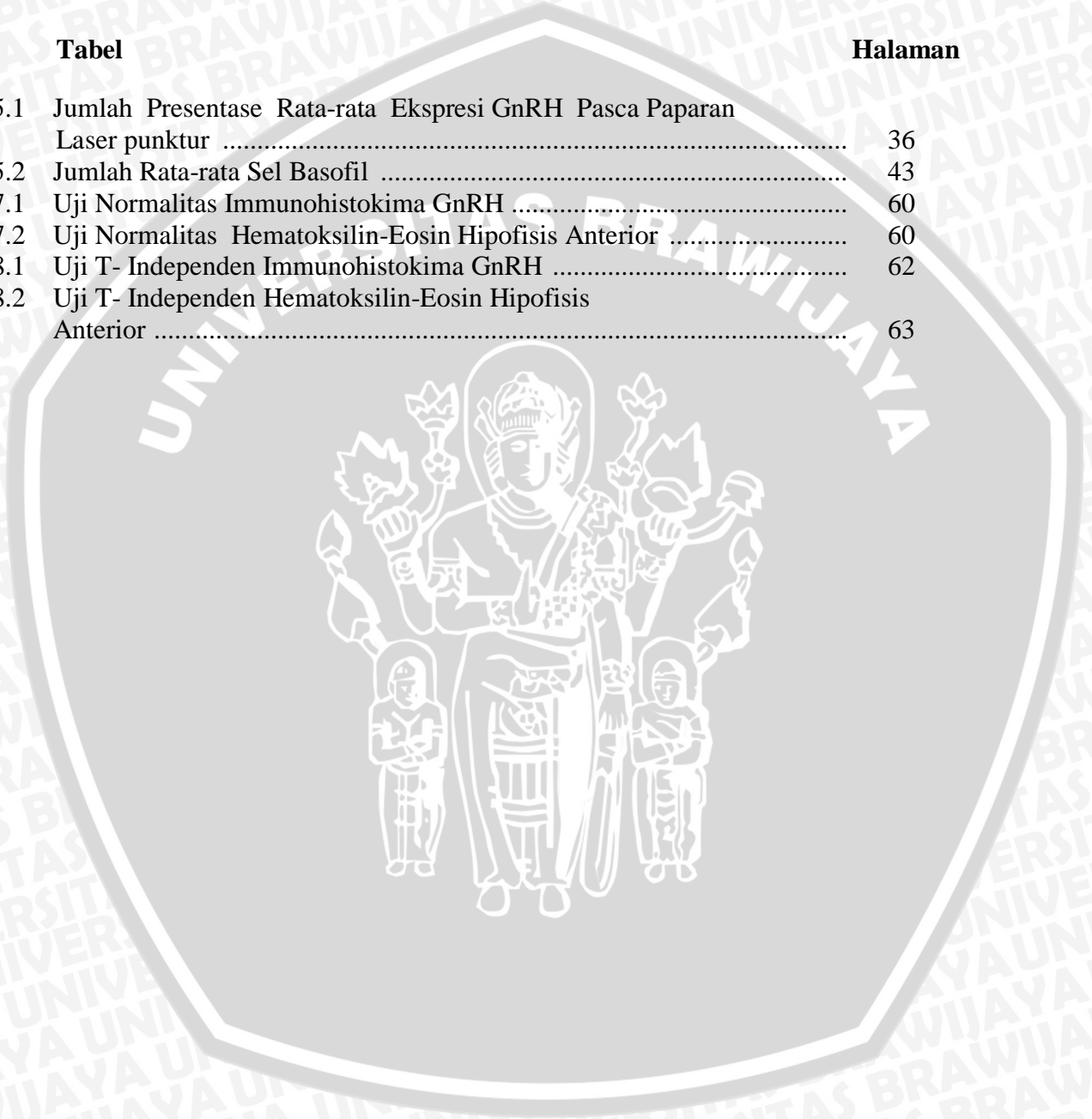


4.4	Prosedur Kerja	24
4.4.1	Rancangan Penelitian	25
4.4.2	Persiapan Hewan Coba	26
4.4.3	Penentuan Energi dan Titik Induksi Laserpunktur	26
4.4.4	Paparan Laserpunktur	27
4.4.5	Pengambilan Sampel	28
4.4.6	Pembuatan Preparat Histologi Otak	29
4.4.7	Immunohistokimia	31
4.4.8	Pengamatan Immunohistokimia	32
4.5	Analisis Data	33
BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN		
5.1	Pengaruh Paparan Laserpunktur terhadap Ekspresi GnRH pada Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>) Jantan	34
5.2	Pengaruh Paparan Laserpunktur terhadap Gambaran Histologi Hipofisis Anterior pada Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>) Jantan	40
BAB 6 PENUTUP		
6.1	Kesimpulan	45
6.2	Saran	45
DAFTAR PUSTAKA		46
LAMPIRAN		51



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
5.1 Jumlah Presentase Rata-rata Ekspresi GnRH Pasca Paparan Laser punktur	36
5.2 Jumlah Rata-rata Sel Basofil	43
7.1 Uji Normalitas Immunohistokima GnRH	60
7.2 Uji Normalitas Hematoksin-Eosin Hipofisis Anterior	60
8.1 Uji T- Independen Immunohistokima GnRH	62
8.2 Uji T- Independen Hematoksin-Eosin Hipofisis Anterior	63



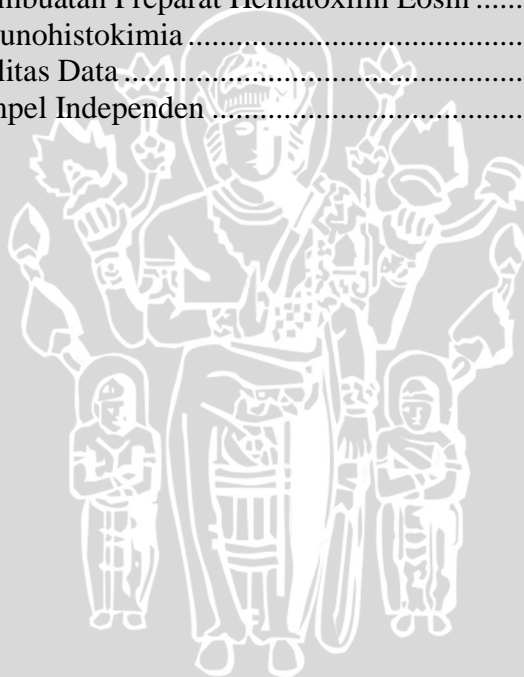
DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Alat Laserpunktur	7
2.2 Letak Titik Akupunktur yang diinduksi	9
2.3 Organ Reproduksi Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>) Jantan	14
2.4 Histologi Hipofisis Anterior (sel basophil)	18
4.1 Penginduksian Laserpunktur pada Titik Akupunktur <i>Shanjiaoshu</i>	28
5.1 Ekspresi GnRH pada otak Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>) Jantan	35
5.1.1 Mekanisme neurotransinter (Biologi)	37
5.2 Histologi Hipofisis Anterior Otak Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>) Jantan	42



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1 Sertifikat Laik Etik Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya	52
2 Sertifikat Laik Etik Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya (Nama Anggota)	53
3 Kerangka Operasional Penelitian	54
4 Palpasi dan Penandaan Titik Akupunktur	55
5 Pemotongan Rambut disekitar Titik Akupunktur	56
6 Pembuatana Larutan	57
7 Metode Pembuatan Preparat Hematoxilin Eosin	58
8 Metode Imunohistokimia	59
9 Uji Normalitas Data	60
10 Uji t-2 Sampel Independen	62



DAFTAR ISTILAH DAN SINGKATAN

µl	Mikroliter
ABP	<i>Androgen Binding Protein</i>
BSA	<i>Bovine Saline Albumin</i>
cAMP	<i>Cyclic Adenosine Monophosphate</i>
CaSR	<i>Calcium Sensing Reseptor</i>
cGMP	<i>Cyclic Guanosine Monophosphate</i>
DAB-Cromogen	<i>Cromogen 3,3-Diaminobenzidine tetrahydrochloride</i>
DAG	<i>Diasil Gliserol</i>
FSH	<i>Folikel Stimulating Hormone</i>
FSH-R	<i>Folikel Stimulating Hormone-Receptor</i>
GABA	Gama Amino Butirik Acid
GnRH	<i>Gonadotropin Releasing Hormone</i>
GAD	<i>Glutamic acid decarboxylase</i>
HE	<i>Hematoxilin-Eosin</i>
He-Ne	<i>Helium-Neon</i>
HPG	<i>Hypothalamic Pituitary Gonadal</i>
ICSH	<i>Interstitial Cell Stimulating Hormone</i>
IHK	<i>Imunohistokimia</i>
IP ₂	<i>Inositol Bifosfat</i>
IP ₃	<i>Inositol Trifosfat</i>
Laser	<i>Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation</i>
LH	<i>Luteinizing Hormone</i>
LH-R	<i>Luteinizing Hormone-Receptor</i>
NaCl	Natrium klorida
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PFA	<i>Paraformaldehyde</i>
PIP ₂	Fosfatidil Inositol Bisfosfat
PKA	Protein Kinase A
PKC	Protein Kinase C
PKG	Protein Kinase G
RE	Retikulum Endoplasmik
SA-HRP	<i>Strep Avidin Horseradish Peroksidase</i>
VGCC	<i>Voltage-gated Ca²⁺ channe</i>

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Hewan kesayangan semakin banyak diminati oleh masyarakat di Indonesia, dan setiap tahun jumlah kepemilikannya kian bertambah. Hewan yang umum dimiliki seperti anjing dan kucing, salah satunya yang paling banyak diminati yaitu anjing. Anjing dikenal keramahannya oleh masyarakat dan banyak digunakan sebagai anjing penjaga, anjing kesayangan dan anjing kontes. Rasa perhatian yang besar ini tentunya dimanfaatkan oleh para *breeder* anjing untuk berlomba-lomba memenuhi permintaan anjing dimasyarakat.

Pembibitan hewan kesayangan dengan kualitas dan mutu genetik yang baik menjadi harapan para kelompok penggemar hewan kesayangan. Para *breeder* saat ini lebih sering memakai cara konvensional untuk perkembangbiakan hewan kesayangannya, dengan membawa anjing jantan untuk dikawinkan secara alamiah dengan anjing betina, hal ini tentu saja dianggap menjadi kurang praktis (Wicaksono & Arifiantni, 2008). Dalam usaha perkembangbiakan hewan, faktor pejantan memegang peranan penting karena kualitas pejantan yang digunakan menentukan kualitas anak yang dihasilkan (Herdis, 2010). Penelitian untuk meningkatkan fertilitas pada hewan kecil di Indonesia ternyata belum banyak dilakukan terutama dengan pemanfaatan teknologi laserpunktur. Rangsangan akupunktur pada hewan kecil juga dapat dilakukan untuk mengatasi kendala infertilitas (Klide dan Kung, 1977).

Teknologi laserpunktur merupakan teknik stimulasi pada titik akupunktur dengan menggunakan laser sebagai alat yang mempunyai efek sebagai stimulator (Adikara, 2001). Penerapan dari paparan laserpunktur merupakan metode mutakhir yang efektif untuk merespon birahi yang cepat dan serempak (Guntoro dkk., 2002). Respon dari ransangan pada akupunktur bisa melalui sistem central (saraf tepi) yang diatur oleh hipotalamus dan hipofisis atau sistem perifer yang langsung dihasilkan dan dimanfaatkan oleh organ. Sistem central ransangan akupunktur akan merangsang hipotalamus mengeluarkan *Gonadotropin Releasing Hormon* (GnRH) yang bekerja pada sel basofil dari hipofisa anterior untuk mendorong sintesa dan sekresi hormon gonadotrophin yaitu *Luteinizing Hormone* (LH) atau pada jantan disebut *Interstitial Cell Stimulating Hormone* (ICSH) dan *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) (Lestari, 2007).

Menurut Lin *et al.*, (2001), beberapa penelitian membuktikan bahwa perlakuan akupunktur efektif dapat mengatasi masalah reproduksi dan bebas dari efek samping, stimulasi terhadap titik tertentu yang berhubungan dengan reproduksi secara signifikan mempengaruhi hormon seks seperti *Lutenizing Hormon* (LH), *Folikel Stimulating Hormon* (FSH), esterogen dan testosteron dalam plasma. Stimulasi menggunakan laser pada titik akupunktur telah dicobakan pada berbagai ternak antara lain ayam dan sapi guna peningkatan produksi telur maupun daging (Fatimah, 2010). Penelitian yang dilakukan oleh Herdis (2010) tentang aplikasi teknologi laserpunktur dalam meningkatkan libido pejantan domba garut (*ovis aries*) membuktikan bahwa teknologi laserpunktur

pada titik-titik reproduksi dapat meningkatkan libido pejantan domba. Teknologi laser juga dapat digunakan untuk meningkatkan kemampuan reproduksi, sehingga stimulasi laser pada sasaran titik reproduksi diharapkan akan meningkatkan penampilan reproduksi. Metode laser ini dapat meningkatkan keuntungan dibidang reproduksi terutama dalam proses mempercepat terjadinya ferilitas pada hawan jantan (Adikara, 2001).

Penelitian laserpunktur menggunakan hewan model tikus (*Rattus norvegicus*) jantan dikarenakan tergolong hewan mamalia dengan umur dewasa kelamin yang tidak lama serta perkawinannya tidak tergantung musim (Kusumawati, 2004). Sebelum melakukan paparan pada anjing ras jantan sebagai pembuktian mengenai pengaruh dan efektivitas dari teknologi laserpunktur perlu dilakukan pengkajian dengan melakukan paparan laserpunktur pada tikus (*Rattus norvegicus*) jantan terlebih dahulu. Diharapkan penggunaan laserpunktur mampu mempercepat dan meningkatkan fertilitas tikus (*Rattus norvegicus*) jantan.

Pentingnya peranan fertilitas pejantan dalam pengembangbiakkan hewan kecil serta mengetahui manfaat teknologi laserpunktur untuk bidang reproduksi sangat penting dipelajari untuk memberikan informasi yang bermanfaat dalam usaha membantu mengembangkan potensi, populasi dan mutu genetik hewan jantan melalui aplikasi bioteknologi termasuk penerapan teknologi reproduksi dan laserpunktur. Berdasarkan uraian diatas, maka peneliti tertarik untuk mengangkat penelitian ini dengan judul Studi Ekspresi GnRH dan Gambaran

Histologi Hipofisis Anterior pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Jantan Pasca Paparan Laserpunktur.

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah paparan laserpunktur pada tikus (*Rattus norvegicus*) jantan di titik akupunktur reproduksi dapat meningkatkan ekspresi GnRH?
2. Apakah terjadi peningkatan jumlah sel basofil dihipofisis anterior pada tikus jantan (*Rattus norvegicus*) pasca dipapar laserpunktur?

1.3 Batasan Masalah

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

1. Hewan coba yang digunakan adalah tikus (*Rattus norvegicus*) jantan *Strain* Wistar, umur antara 12-13 minggu dengan berat badan sekitar 150 gram yang diperoleh dari Unit Pengembangan Hewan Percobaan (UPHP) Universitas Gajah Mada Yogyakarta. Penggunaan hewan coba dalam penelitian ini telah mendapatkan sertifikat laik etik oleh Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya No. 170-KEP-UB.
2. Perlakuan laserpunktur diberikan pada 6 titik akupunktur reproduksi yang terbagi dalam 2 titik akupunktur BL 22 atau *sanjiaoshu* (antara *processus transversus vertebralis lumbalis* 2-3), 2 titik akupunktur BL 23 atau *shenshu* (antara *processus transversus vertebralis lumbalis* 3-4), 2 titik

akupunktur GV 4 atau *mingmeng* (dorsal persendian *processus spinosus vertebralis lumbalis* 4-5) dengan durasi selama 15 detik setiap titik secara tegak lurus.

3. Spesifikasi alat laserpunktur jenis soft laser Helium-Neon (He-Ne) dengan power 5 mW dan panjang gelombang 632,8 nm.
4. Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah ekspresi *gonadotropin releasing hormone* (GnRH) dan peningkatan jumlah sel basofil di hipofisis anterior tikus (*Rattus norvegicus*) jantan.

1.4 Tujuan

1. Mengetahui pengaruh paparan laserpunktur pada tikus (*Rattus novergicus*) jantan di titik akupunktur reproduksi terhadap peningkatan ekspresi GnRH.
2. Mengetahui peningkatan jumlah sel basofil di hipofisis anterior pada tikus (*Rattus novergicus*) jantan setelah dipaparan laserpunktur.

1.5 Manfaat

Manfaat dari penelitian ini untuk menginformasikan kepada Breeder pengaruh paparan laserpunktur pada tikus (*Rattus novergicus*) jantan di titik akupunktur reproduksi terhadap peningkatan ekspresi GnRH (*Gonadotropin-realisig hormone*) dan peningkatan jumlah sel basofil dihipofisis anterior sebagai salah satu indikator terjadinya fertilitas.

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Laserpunktur

Laser adalah singkatan dari *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation* atau penguatan cahaya melalui emisi radiasi yang dirangsang (Cember, 1983). Ditinjau dari sifatnya, laser dikategorikan menjadi dua jenis yaitu *hard* laser dan *soft* laser. *Hard* laser adalah laser yang biasa digunakan untuk senjata perang, sedangkan *soft* laser adalah laser yang biasa digunakan dalam bidang kesehatan termasuk akupunktur (Sukarto, 1994).

Laserpunktur merupakan metode terapeutik dengan menggunakan cahaya laser sebagai sumber rangsangan pada titik akupunktur (Susan, 2001). Titik akupunktur merupakan area kecil di permukaan tubuh yang mempunyai karakteristik, antara lain :

- a. Sifat fisika mempunyai potensial tinggi, dengan hambatan rendah dibandingkan jaringan sekitarnya.
- b. Kepekaan terhadap rangsangan lebih tinggi dibandingkan dengan daerah sekitarnya (Saputra, 2000).

Sistem meridian adalah jalur hubungan antara permukaan tubuh dengan organ dalam tubuh. Dalam satu meridian terdapat beberapa titik akupunktur yang dimanfaatkan sebagai pintu masuk rangsangan ke meridian. Dalam meridian terdapat titik-titik akupunktur yang banyak jumlahnya, dan titik ini dapat dirangsang untuk mengembalikan atau merekayasa fungsi organ tubuh (Mann, 1994).

Laser merupakan sinar yang dihasilkan oleh suatu proses stimulasi radiasi melalui sistem semikonduktor dan mempunyai karakteristik yang spesifik, yaitu :

- a. Koheren, memiliki gelombang-gelombang dalam fase yang sama sehingga gelombang selalu sejajar meskipun telah menempuh jarak jauh (Saputra, 2000).
- b. Monokromatik, memiliki spektrum panjang gelombang yang sempit sehingga hanya satu warna dan tidak dapat diuraikan lagi (Saputra, 2000).
- c. Absorpsi dan mempunyai panjang gelombang tertentu (Saputra, 2000)
- d. Unidireksional, memiliki sinar yang tidak atau sangat sedikit menyebar sehingga dapat menempuh jarak jauh dengan tetap mempertahankan intensitasnya (Hardjatno, 2001)

Spesifikasi alat laserpunktur yang biasanya digunakan untuk melakukan induksi akupunktur yaitu jenis *soft* laser Helium-Neon (He-Ne) dengan power 5-30mW dan panjang gelombang 632,8nm (Adikara, 2001) yang diinduksikan pada tiap titik akupunktur selama 15 detik (Kusuma, 2000).



Gambar 2.1 Alat Laserpunktur (koleksi pribadi).

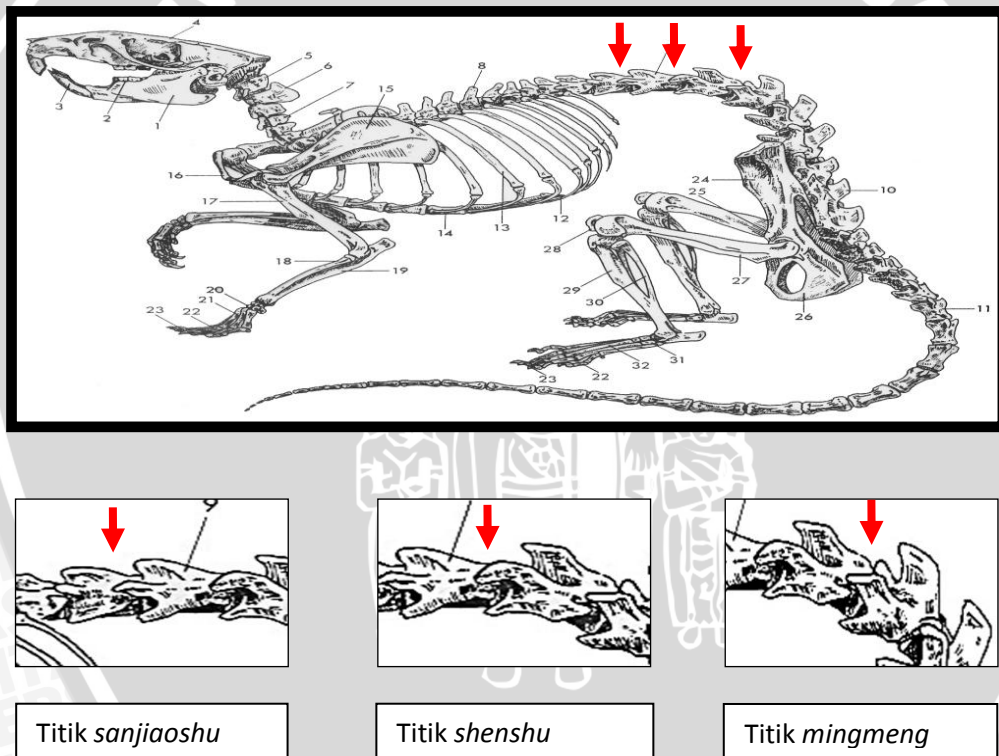
Stimulasi menggunakan laser pada titik akupunktur telah dicobakan pada berbagai ternak antara lain ayam dan sapi guna peningkatan produksi telur maupun daging (Fatimah, 2010). Selain itu teknologi laser juga dapat digunakan untuk meningkatkan kemampuan reproduksi. Jika stimulasi laser dilakukan pada sasaran titik reproduksi maka diharapkan penampilan reproduksi akan meningkat. Dengan metode laser ini biaya produksi dapat ditekan dan nilai keuntungan dapat meningkat (Adikara, 1995). Percobaan dengan laser untuk sinkronisasi estrus telah dilakukan juga pada ternak kerbau (Guntoro dan Yasa, 2002) dan ternak kambing Peranakan Etawa (*Capra aegagrus*) (Yasa *et al.*, 2004).

Menurut Lin *et al.*, (2001) beberapa penelitian membuktikan bahwa perlakuan akupunktur efektif dapat mengatasi masalah reproduksi dan bebas dari efek samping. Stimulasi terhadap titik tertentu yang berhubungan dengan reproduksi secara signifikan memengaruhi hormon seks seperti *Luteinizing hormone* (LH), *Folicle Stimulating Hormon* (FSH), estradiol dan progesterone dalam plasma.

2.1.1 Titik Akupunktur

Titik akupunktur merupakan titik yang dapat memberikan tanggapan terhadap berbagai jenis rangsangan. Rangsangan tersebut dapat berupa rangsangan mekanis, termis, listrik, magnet maupun perpaduan dari berbagai rangsangan tersebut, misalnya optika (Suhariningsih, 1995).

Titik induksi laserpunktur dilakukan pada 6 titik akupunktur terutama untuk induksi birahi yaitu, stimulasi titik-titik akupunktur BL 22 atau *sanjiaoshu* (antara *processus transversus vertebralis lumbalis* 2-3) dexter dan sinister, BL 23 atau *shenshu* (antara *processus transversus vertebralis lumbalis* 3-4) dexter dan sinister, GV 4 atau *mingmeng* (dorsal persendian *processus spinosus vertebralis lumbalis* 4-5) dexter dan sinister (Herdis, 2010).



Gambar 2.2. Letak Titik paparan Laserpunktur (Sumber: Carolina, 1996)

Keterangan : Anak panah merah letak titik induksi BL 22 atau *sanjiaoshu* (antara *processus transversus vertebralis lumbalis* 2-3) dexter dan sinister, BL 23 atau *shenshu* (antara *processus transversus vertebralis lumbalis* 3-4) dexter dan sinister, GV 4 atau *mingmeng* (dorsal persendian *processus spinosus vertebralis lumbalis* 4-5) dexter dan sinister (Herdis, 2010).

2.1.2 Mekanisme Aktivitas Seluler

Laserpunktur yang diinduksikan pada titik akupunktur akan menimbulkan rangsang (Miligan, 1994). Rangsangan menyebabkan protein G subunit α membran sel syaraf mengalami fosforilisasi untuk mengaktifkan enzim fosfolipase C (PLC) di membran plasma, sehingga Enzim fosfolipase C selanjutnya menghidrolisa fosfatidil inositol bisfosfat (PIP₂) menjadi inositol trifosfat (IP₃) dan diasil gliserol (DAG). Keduanya berperan dalam transduksi signal sebagai *second messenger*. Selanjutnya, IP₃ akan berikatan dengan reseptor spesifik pada retikulum endoplasmik (RE) yang terkait dengan kanal Ca²⁺ memicu pelepasan Ca²⁺ dari RE ke sitosol sehingga meningkatkan kadar Ca²⁺ intraseluler. Aktivasi reseptor melalui jalur fosfolipase, diperoleh beberapa *second messenger*, yaitu DAG, IP₃ dan Ca²⁺. DAG memiliki dua peran dalam signaling, yaitu dapat diurai lebih lanjut menghasilkan asam arakidonat, dan DAG bersama-sama dengan Ca²⁺ mengaktifasi protein kinase C (PKC). PKC berperan dalam sintesis gen-gen tertentu. Ca²⁺ intraseluler akan mengaktifasi calcineurin. Calcineurin bersama dengan PKC berperan dalam signaling dalam pelepasan neurotransmitter. Jalur aktivitas seluler akibat induksi laserpunktur seperti tersebut ini dikenal sebagai jalur metabotropic (Kusuma *et al.*, 2013).

Paparan laserpunktur pada titik reproduksi dapat juga melalui jalur ionotropik, induksi sinar laser laserpunktur mengenai titik reproduksi akan diubah menjadi sinyal listrik. Sinyal listrik menyebabkan depolarisasi membran sel syaraf. Membran sel syaraf kemudian merespon dengan terbukanya saluran ion.

Ca^{2+} ekstraseluler akan masuk melalui *calcium sensing receptor* (CaSR) atau melalui *voltage-gated Ca^{2+} channels* (VGCC). Masuknya Ca^{2+} ekstraseluler ini kemudian bertemu dengan gelembung-gelembung sinaptik dan membran terbuka untuk melepaskan neurotransmitter ke celah sinaptik dengan cara eksositosis selanjutnya ditangkap oleh reseptor postsinap, yang kemudian berperan dalam signaling yaitu melanjutkan sinyal listrik dari presinap menuju postsinap sampai akhirnya menuju otak. Didalam otak akan menimbulkan reaksi berantai seperti merangsang calcineurin dan PKC untuk mengaktifkan enzim *Glutamic acid decarboxylase* (GAD-65). Aktifnya GAD-65 ini akan merangsang neuron GABAergic untuk mensintesis GABA (Kusuma *et al.*, 2013). GABA akan merangsang neuron hipotalamus untuk melepas GnRH. GnRH akan merangsang pelepasan hormon gonadotropin (LH dan FSH).

2.2 Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

Menurut Sistem klasifikasi tikus putih (*Norway rats*) berdasarkan Myers dan Armitage (2004) adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Subfilum	: Vertebrata
Kelas	: Mammalia
Ordo	: Rodensia
Famili	: Muridae
Subfamili	: Murinae
Genus	: <i>Rattus</i>
Species	: <i>Rattus norvegicus</i>

Tikus merupakan spesies pertama mamalia yang didomestikasi untuk tujuan ilmiah karena memiliki daya adaptasi yang baik. Tikus yang diproduksi

sebagai hewan percobaan dan hewan peliharaan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*). *Rattus norvegicus* merupakan salah satu hewan percobaan yang paling sering digunakan dalam penelitian, karena memiliki karakter fungsional yang baik sebagai model bagi hewan mamalia (Hedrich 2000).

Keunggulan tikus putih dibandingkan tikus liar antara lain lebih cepat dewasa, tidak memperlihatkan perkawinan musiman, dan umumnya lebih cepat berkembang biak. Kelebihan lainnya sebagai hewan laboratorium adalah sangat mudah ditangani, dapat ditinggal sendirian dalam kandang asal dapat mendengar suara tikus lain dan berukuran cukup besar sehingga memudahkan pengamatan. Tikus memasuki masa pubertas pada 50-60 hari setelah kelahiran. Usia pubertas pada hewan jantan ditandai dengan adanya penurunan testis dari abdominal ke skrotum (Smith & Mangkoewidjojo, 1988). Tikus memasuki usia dewasa kelamin dan siap untuk dikawinkan pada usia 10-12 minggu. Penggunaan tikus dalam penelitian reproduksi karena panjang waktu siklus birahi yang pendek, yaitu 4-5 hari dan lama kebuntingannya hanya selama 21-23 hari (Malole & Pramono, 1989).

Rattus norvegicus memiliki ciri antara lain rambut tubuh berwarna putih dan mata yang merah, panjang tubuh total 440 mm, panjang ekor 205 mm dan bobot *Rattus norvegicus* pada usia dewasa adalah sekitar 250-500 gram (Potter, 2007).

2.3 Reproduksi Tikus Jantan

2.3.1 Sistem Reproduksi

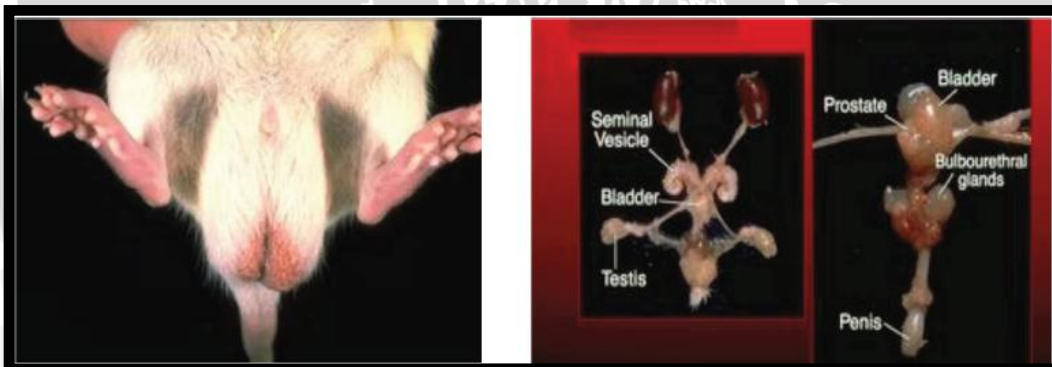
Sistem reproduksi jantan terdiri atas banyak organ-organ individual yang bekerja sama memproduksi spermatozoa terdiri dari organ kelamin primer, sekunder dan aksesoris (Yusuf, 2012). Organ kelamin primer terdiri dari testis yang terbungkus oleh skrotum yang di daerah inguinal (Hafez, 2000). Organ kelamin sekunder terdiri dari jaringan duktus sebagai transportasi spermatozoa dari testis menuju ke luar tubuh dan didalamnya termasuk duktus efferent, epididimis, vas deferens urethra dan penis (Bearden *et al.*, 2004). Organ aksesoris terdiri dari kelenjar prostat, vesikula seminalis dan kelenjar bulbo-urethralis (*Cowper's*) (Yusuf, 2012).

Testis adalah organ utama dalam sistem reproduksi jantan. Testis terletak di dalam sebuah kantung yang dinamakan skrotum dan menggantung di bawah tubuh hewan. Testis bertanggung jawab atas steroidogenesis dan spermatogenesis, steroidogenesis merupakan proses pembentukan hormon-hormon terutama, androgens, sedangkan spermatogenesis merupakan proses pembentukan spermatozoa (Cunningham, 2002).

Testis berfungsi menghasilkan hormon testosteron. Peranan dan hadirnya hormon ini di dalam tubuh dipengaruhi oleh beberapa hormon lain, yaitu hormon GnRH, FSH, dan LH. Pada hewan jantan, *gonadotrophin releasing hormone* (GnRH) disekresikan dari hipotalamus untuk menstimulasi pelepasan *lutensizing*

hormone (LH) dan *follicle stimulating hormone* (FSH) dari pituitari anterior. (Hernawati 2007).

Epididimis (caput, corpus dan cauda) berperan sebagai tempat pematangan sperma, kapasitasi, dan penyimpanan sperma yang sudah matang. Duktus deferent berfungsi menyalurkan spermatozoa ke uretra. Kelenjar aksesoris menghasilkan semen yang berfungsi memberi makan spermatozoa. Penis berfungsi sebagai organ kopulasi, mengantar semen masuk ke organ reproduksi betina. Skrotum melapisi testis, dan preputium melapisi penis (Cunningham, 2002).



Gambar 2.3. Organ Reproduksi Tikus Jantan (Moore, 2000).

2.3.2 Regulasi Hormon Reproduksi Tikus Jantan

Fisiologi reproduksi hewan jantan dikontrol secara endokrin oleh sekresi *Hypothalamic Gonadotropin Releasing Hormone* (GnRH) pada tingkat *paracrine* di hipotalamus. Hipothalamus mengeluarkan GnRH dengan proses sekresinya setiap 90-120 menit melalui aliran portal hipotalamohipofisial. Setelah sampai di hipofisis anterior, GnRH akan mengikat sel gonadotrop dan merangsang pengeluaran FSH (*Follicle Stimulating Hormone*) dan LH (*Lutheinizng*

Hormone) (Braunstein, 1997). GnRH merangsang kelenjar hipofisis anterior untuk mengekskresikan dua hormon gonadotropin, yaitu *Luteinizing Hormone* (LH) dan *Follicle Stimulating Hormone* (FSH). Hipofisis anterior bertanggung jawab untuk mengontrol berbagai aktivitas fisiologis hormon. LH merupakan perangsang utama testosteron yang di sekresikan oleh sel-sel leydig di dalam testis. Jumlah testosteron yang diekskresikan akan berbanding lurus dengan jumlah LH yang tersedia. Sedangkan FSH merupakan perangsang utama terjadinya spermatogenesis. FSH akan berikatan dengan reseptor-reseptor FSH spesifik yang melekat pada sel-sel sertoli dalam tubulus seminiferus. Pengikatan ini mengakibatkan sel-sel tumbuh dan mengekresikan berbagai unsur spermatogenik. Secara bersamaan testosteron yang berdifusi ke dalam tubulus dari sel-sel leydig di dalam ruang interstisial mempunyai efek tropik yang kuat terhadap spermatogenesis. Untuk mendorong terjadinya spermatogenesis dibutuhkan FSH maupun testosteron. Walaupun rangsangan awal testosteron yang terjadi sedikit, selanjutnya testosteron akan mempertahankan spermatogenesis untuk waktu yang lama (Guyton & Hall 2006).

Aktivitas saraf yang menyebabkan pelepasan GnRH secara pulsatif terjadi dibagian mediobasal hipotalamus, khususnya di nukleus arkuatus. Daerah tersebut mengendalikan aktivitas seksual baik pada jantan maupun betina (Jhonson & Everrit, 1995). GnRH dalam aplikasinya tidak disekresikan secara terus menerus oleh hipotalamus, namun secara pulsatil selama beberapa menit dan terjadi secara periodik 1 sampai 3 jam sekali (Guyton & Hall 1996).

Tujuan pemeriksaan GnRH adalah untuk melihat fungsi sekresi hormon yang dikeluarkan oleh hipotalamus dan mekanisme fisiologis umpan balik dari organ target yaitu testis dan ovarium pada hipogonadism, pubertas prekoks, menopause, kegagalan diferensiasi testis, orchitis, seminoma, acromegall, sidroma Turner. Serta menurun pada keadaan insufisiensi hipotalamus, disfungsi gonad, anovulasi, insufisiensi hipofisis, dan tumor ovarium. Faktor yang mempengaruhi kadarnya adalah obat-obatan seperti steroid, kontrasepsi oral, progesteron, estrogen, dan testoteron (Howaritz *et al.*, 2001 ; Demers, 1999).

2.3.3 Histologi Hipofisis Anterior

Kelenjar hipofisis adalah kelenjar endokrin yang paling penting disebut juga “*a master endocrine gland*” dan namanya sering juga disebut “*Pituitary gland* atau *Pineal Body*”. Kelenjar hipofisis merupakan suatu kelenjar endokrin yang sangat penting pada hampir setiap fungsi tubuh. Kelenjar hipofisis, yang juga disebut sebagai hipofisis, merupakan kelenjar kecil, berdiameter sekitar 1 sentimeter dan beratnya 0,5 sampai 1 gram, yang terletak di sela tursika, *os sphenoid*, rongga tulang pada basis otak, dan dihubungkan dengan hipotalamus oleh tangkai hipofisis (atau hipofisial). Dipandang dari sudut fisiologi, kelenjar hipofisis dibagi menjadi dua bagian yang berbeda yaitu hipofisis anterior, yang juga dikenal sebagai adenohipofisis, dan hipofisis posterior, yang juga dikenal sebagai neurohipofisis. Di antara kedua bagian ini terdapat daerah kecil, yang relatif avaskuler yang disebut sebagai pars intermedia. Hipofisis anterior dan posterior tidak memiliki persamaan selain lokasi mereka. Hipofisis posterior

dihubungkan ke hipotalamus melalui jalur saraf, sementara hipofisis anterior dihubungkan ke hipotalamus melalui pembuluh darah (Nurdjaman, 2004). Struktur dan penampakan bentuk kelenjar hipofisa tikus (*Rattus norvegicus*) jantan seperti.

Hipofisis (kelenjar hipofisis) terdiri dari dua sub divisi utama yaitu adnohipofisis dan neurohipofisa. Adnohipofisis dibagi lagi menjadi pars distalis (lobus anterior), pars tubelaris, dan pars intermedia. Neurohipofisis (hipofisis posterior) dibagi menjadi pars nervosa atau prosesus infundibularis, dan tangkai infundibulum (neural). Pars distalis adalah bagian terbesar dari keempat subdivisi hipofisis dan mengandung dua jenis utama sel yaitu sel kromofob dan sel kromofil. Kromofil dibagi menjadi asidofil (sel alfa) dan sel basofil (sel beta) keduanya terlihat pada pembesaran kuat (Eroschenko, 2003). Sel basofil memiliki ciri-ciri granula lebih kasar, inti tidak bersegmen dan inti berwarna ungu. Plasma dari sel basofil bersifat basa, itulah sebabnya plasma akan berwarna keunguan jika ditetesi larutan basa.



Gambar 2.4. Histologi Hipofisis Anterior (sel basofil) (Kuehnel, 2003).

Keterangan : Perbesaran 400x, Pewarnaan Hematoxilen Eosin (HE). Tanda panah menunjukkan sel basophil, sel acidophil, sel chromophobes.

Gonadotrophin Releasing Hormon (GnRH) yang dihasilkan dari hipotalamus bekerja mendorong sintesa sel basofil dari hipofisa anterior untuk mensekresi hormon gonadotrophin (Lestari, 2007). Terdapat 2 hormon yang disekresikan dari sel-sel hipofisis anterior *gonadotroph* yaitu FSH (*Follicle Stimulating Hormone*) dan LH (*Luteinizing Hormone*). FSH merangsang spermatogenesis dan sekresi protein pengikat androgen oleh sel sertoli kedalam tubuli seminiferous testis. LH memelihara dan merangsang sel intrtisial (Leydig) di dalam testis untuk menghasilkan hormon testosteron (Kuehnel, 2003).

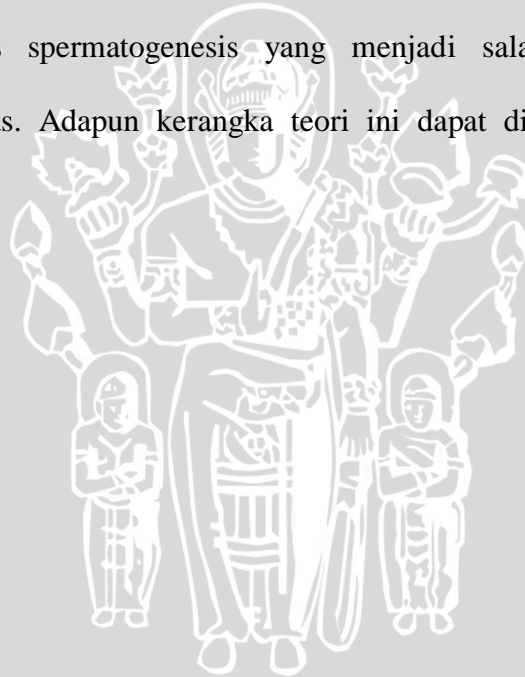
BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

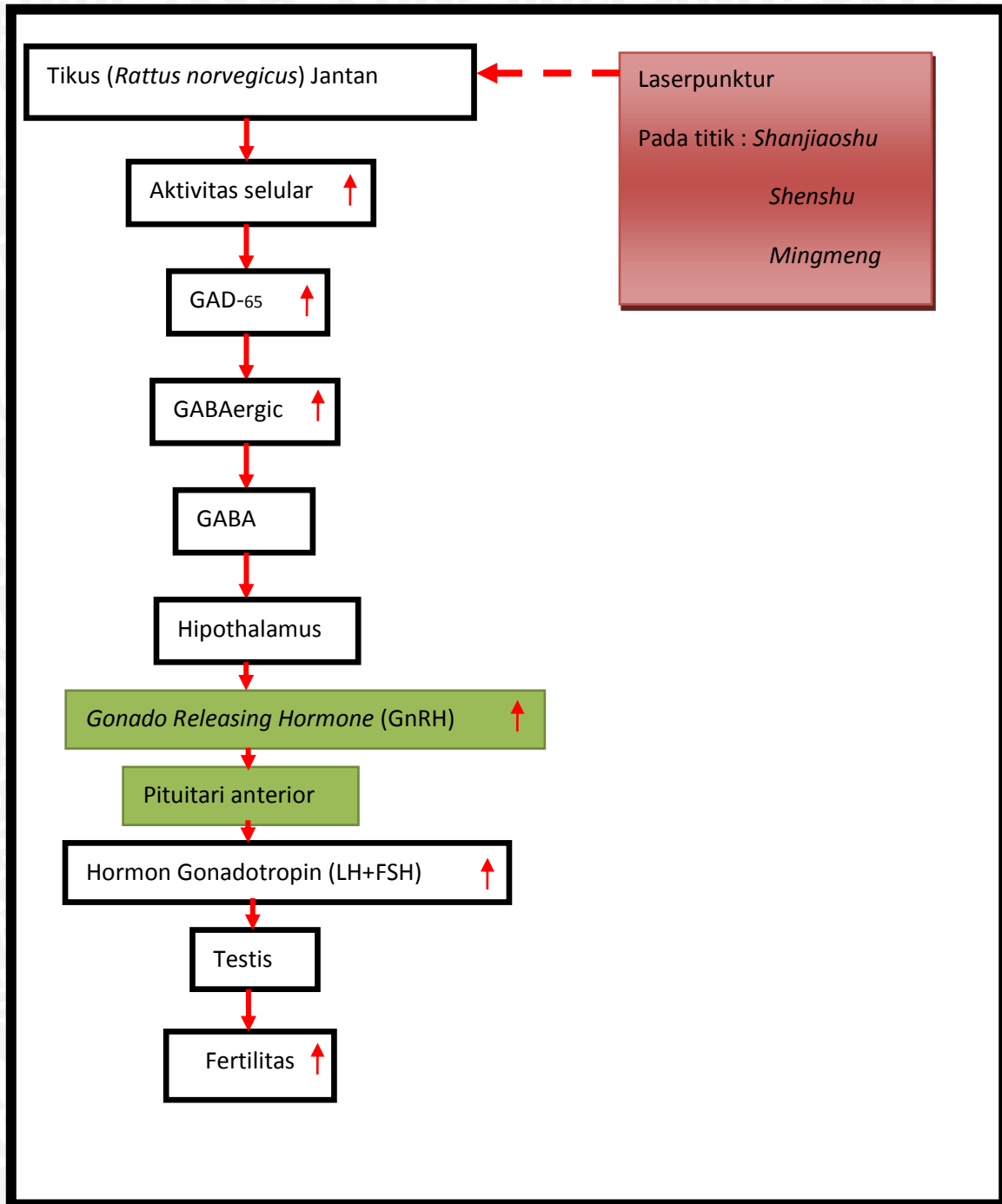
3.1 Kerangka Konseptual

Paparan terhadap hewan model tikus (*Rattus norvegicus*) jantan pada titik akupunktur BL 22 atau *sanjiaoshu*, BL 23 atau *shen-shu*, GV 4 atau *mingmeng* menggunakan laserpunktur dengan power 5 mW dan panjang gelombang 632,8 nm (Adikara, 2001) yang dipaparkakan pada tiap titik akupunktur selama 15 detik/ titik (Kusuma, 2000). Induksi tersebut akan diterima oleh sel signaling dan berikatan dengan reseptor pada membran sel membentuk kompleks ligand-reseptor (Palaniapan, 2010).

Rangsangan laserpunktur yang diberikan akan menstimulus peningkatan aktivitas selular, selanjutnya akan diteruskan melalui membran saraf yang akhirnya menuju otak. Didalam otak akan menimbulkan reaksi berantai seperti merangsang calceneurin dan PKC untuk mengaktifkan enzim *Glutamic acid decarboxylase* (GAD-65). Aktifnya GAD-65 ini akan merangsang neuron GABAergic untuk mensintesis GABA. Produk dari GABAergic berupa GABA memiliki efek stimulasi pada pelepasan *Gonadotropin-releasing hormone* (GnRH) dari hipotalamus. Hipotalamus mengeluarkan hormon dari ujung serabut saraf hipotalamus untuk meningkatkan sekresi *Gonadotropin-releasing hormone* (GnRH). *Gonadotropin-releasing hormone* (GnRH) merangsang kelenjar hipofisis anterior untuk mengekskresikan dua hormon gonadotropin, yaitu *Luteinizing Hormone* (LH) dan *Follicle Stimulating Hormone* (FSH). *Luteinizing Hormone* (LH) yang disekresikan akan menstimulus peningkatan jumlah sel leydig pada testis dan

berikatan *Luteinizing Hormone Receptor* (LH-R) sehingga menstimulus produksi testosteron (Shirwood, 2001). *Folicle Stimulating Hormone* (FSH) yang disekresikan oleh pituitari anterior akan meningkatkan jumlah sel sertoli yang memproduksi *Androgen Binding Protein* (ABP). *Androgen Binding Protein* (ABP) tersebut berikatan dengan testosteron yang digunakan dalam proses spermatogenesis. Paparan laserpunktur menimbulkan daya stimulasi yang cepat dan spontan akan meningkatk sekresi *Gonado Releasing Hormone* (GnRH) dan memepercepat proses spermatogenesis yang menjadi salah satu indikator meningkatnya fertilitas. Adapun kerangka teori ini dapat dilihat pada bagian diberikut ini :





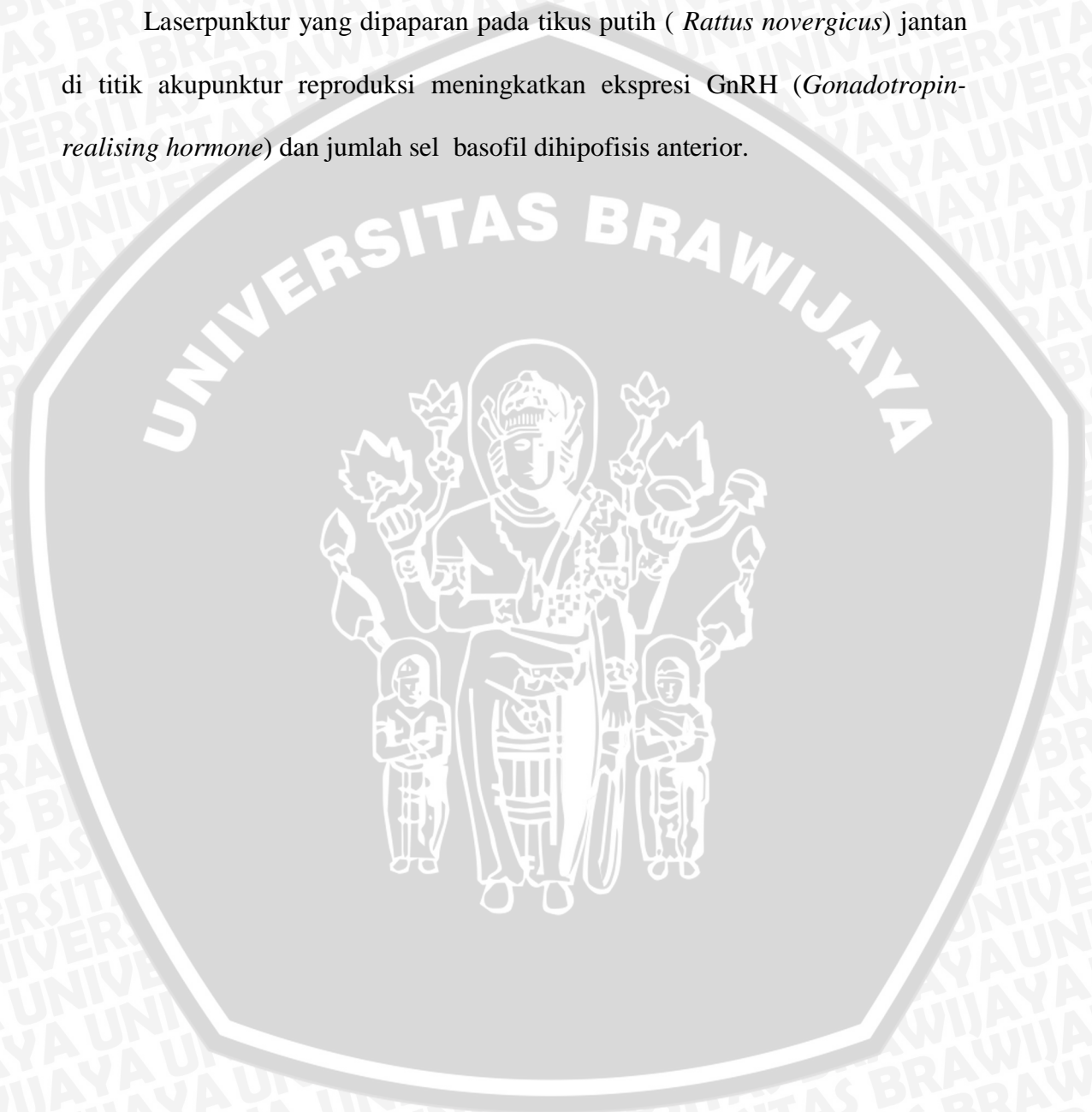
Gambar 3.1 Kerangka Konseptual

Keterangan :

- ← : Menginduksi
- : Menstimulasi
- █ : Variabel bebas
- █ : Variabel terikat
- ↑ : Meningkatkan

3.1 Hipotesis

Laserpunktur yang dipaparan pada tikus putih (*Rattus novvergicus*) jantan di titik akupunktur reproduksi meningkatkan ekspresi GnRH (*Gonadotropin-releasing hormone*) dan jumlah sel basofil dihipofisis anterior.



BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

4.1.1 Waktu

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juni – Desember 2013.

4.1.2 Tempat

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biokimia, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang.

4.2 Alat dan Bahan

4.2.2 Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain, kandang untuk tikus putih terbuat dari plastik berbentuk persegi panjang dengan ukuran 17,5 x 23,75 x 17,5 cm yang beralaskan sekam dan ditutup dengan kasa, botol minum tikus, sarung tangan, laserpunktur jenis *soft* laser Helium-Neon (He-Ne) dengan power 5 mW dan panjang gelombang 632, 8nm, gunting bedah dengan ujung tajam-tajam dan tajam tumpul, *standard forceps*, *debakey forceps*, cawan petri, mikro pipet 1000 μ l, plastik klip, objek dan *cover glass*, inkubator, penjepit (*block holder*), mikroskop cahaya *Olympus BX51*.

4.2.3 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus (*Rattus norvegicus*) jantan *Strain* Wistar umur antara 12-13 minggu, berat badan sekitar 150 gram yang diperoleh dari Unit Pengembangan Hewan Percobaan (UPHP) UGM Yogyakarta, NaCl fisiologis 0,9 %, *Paraformaldehida* (PFA) 10 %, *Phosphate Buffer Saline* (PBS) Azida, alkohol 70 %, 80 %, 90 %, xylol 1-2, paraffin, aquades, pewarna *Hematoxylenen Eosin* (HE), *slide*, *cover slide*, antibodi primer *Anti GnRH Rabbit Polyclonal IgG*, antibodi sekunder *Anti Rabbit IgG Biotin Labelled*, *Strep Avidin-Horseradish Peroxidase* (SA-HRP), *cromogen 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride* (DAB *Cromogen*), *Counterstain* (*Hematoksilen*), *Bovine Saline Albumin* (BSA) 1 %.

4.3 Tahapan Penelitian

Tahapan penelitian yang dilakukan sebagai berikut :

1. Rancangan penelitian dan persiapan tikus (*Rattus norvegicus*) jantan.
2. Paparan laserpunktur pada tikus (*Rattus norvegicus*) jantan.
3. Pengambilan organ otak tikus (*Rattus norvegicus*) jantan.
4. Pembuatan preparat histologi hipofisis anterior dari organ otak dengan pewarnaan Hematoksilin-Eosin (HE).
5. Pewarnaan organ otak dengan Immunohistokimia (IHK)
6. Perhitungan pengamatan ekspresi GnRH jumlah sel basofil.

4.4 Prosedur Kerja

4.4.1 Rancangan Penelitian dan Preparasi Tikus

Sampel penelitian menggunakan tikus spesies *Rattus norvegicus* jantan strain Wistar berumur 12-13 minggu dengan berat badan sekitar 150 gram sebagai hewan percobaan. *Rattus norvegicus* dipakai karena merupakan hewan mamalia dengan umur dewasa kelamin yang tidak lama serta perkawinannya tidak tergantung musim. Adapun variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah :

Variabel bebas : Paparan laserpunktur selama 15 detik

Variabel terikat : Ekspresi GnRH dan jumlah sel basofil

Variabel kontrol : Jenis kelamin, umur, berat badan, *Rattus norvegicus* Strain Wistar

Preparasi tikus dilakukan dengan mengelompokkan menjadi dua kelompok dan masing-masing kelompok terdiri atas dua ekor tikus. Kelompok satu merupakan kelompok kontrol normal yang selama perlakuan hanya diberi pakan normal. Kelompok dua merupakan kelompok yang dipapar dengan laserpunktur pada titik akupunktur reproduksi selama 15 detik.

Estimasi besar sampel dihitung berdasarkan rumus:

Menurut Bahri (2005), perhitungan besar sampel yang digunakan untuk uji statistik t dengan 2 sample independent diperlukan jumlah sampel atau ulangan minimal 14 ekor tikus setiap kelompok. Maka untuk 2 kelompok perlakuan diperlukan jumlah ulangan paling sedikit 14 kali dalam setiap kelompok, sehingga dibutuhkan 28 ekor tikus.

4.4.2 Persiapan Hewan Coba

Tikus yang digunakan untuk penelitian diadaptasi terhadap lingkungan selama tujuh hari (Lina, dkk., 2003), diberi air secara *ad libitum* setiap ekor per hari dan pemberian makanan berupa ransum basal pada semua tikus. Komposisi ransum basal disusun berdasarkan standar *Association of Analytical Communities* (AOAC) (2005) yaitu mengandung karbohidrat, protein 10%, lemak 3%, mineral, vitamin, dan air 12 %.

Hewan coba dikandangan dalam kandang kelompok yang berukuran 17.5 x 23.75 x 17.5 cm, dengan jumlah sesuai dengan jumlah tikus yang digunakan. Kandang terbuat dari bak plastik dan ditutupi dengan penutup berbahan kawat. Kandang tikus berlokasi pada tempat yang bebas dari suara ribut dan terjaga dari asap industri serta polutan lainnya. Lantai kandang mudah dibersihkan dan disanitasi. Suhu optimum ruangan untuk tikus adalah 22-24 °C dan kelembaban udara 50-60% dengan ventilasi yang cukup.

4.4.3 Penentuan Energi dan Titik Paparan Laserpunktur

Penentuan energi paparan laserpunktur dilakukan dengan penelitian Adikara (2001) yang dipaparkan pada tiap titik akupunktur selama 15 detik. Energi yang dikeluarkan oleh neon laser yang melalui titik laserpunktur dihitung dengan rumus:

$$\text{Energi} = P.t/d$$

$$= 0,005.15/0,2$$

$$= 0,375 \text{ Joule/titik akupunktur}$$

Keterangan :

P= daya=5mW= 0,005 Watt

t= waktu lamanya induksi i= 15 detik

d= diameter sinar laserpunktur= 0,2 cm

Titik paparan laserpunktur dilakukan pada 6 titik akupunktur yaitu, stimulasi titik-titik akupunktur BL 22 atau *sanjiaoshu* (antara *processus transversus vertebralis lumbalis 2-3) dexter dan sinister*, BL 23 atau *shenshu* (antara *processus transversus vertebralis lumbalis 3-4) dexter dan sinister*, GV 4 atau *mingmeng* (dorsal persendian *processus spinosus vertebralis lumbalis 4-5) dexter dan sinister* (Herdis, 2010).

4.4.4 Paparan Laserpunktur

Perlakuan paparan laserpunktur dilakukan dengan spesifikasi alat laserpunktur yang digunakan yaitu jenis *soft* laser Helium-Neon (He-Ne) dengan power 5 mW dan panjang gelombang 632,8 nm (Adikara, 2001) yang diinduksikan pada tiap titik akupunktur selama 15 detik (Kusuma, 2000). Penggunaan waktu paparan selama 15 detik/ titik mengacu pada pada trail dan error yang telah dilakukan, waktu optimal untuk menstimulus terjadinya peningkatan fertilitas yaitu 15 detik/ titik.

Paparan laserpunktur diawali dengan palpasi dan penandaan pada sekitar *os.thoracic vertebrae*, *os. lumbar vertebrae* dan *os sacrum* untuk menentukan titik akupunktur reproduksi. Palpasi dilakuan dengan mengacu pada salah satu ciri *os vertebrae* yang memiliki *processus transversus* yang lebih lebar an *os.costae fluktuantes* yang terakhir yang menjadi indicator, kemudian dihitung ke arah *caudal* menuju *processus transversus vertebralis lumbalis 2*. Titik akupunktur tersebut adalah BL 22 atau *sanjiaoshu*, BL 23 atau *shenshu* dan GV 4 atau *mingmeng* seperti pada Lampiran 3, kemudian dilakukan pemotongan rambut

tikus disekitar titik akupunktur yang telah ditandai seperti pada Lampiran 4. Paparan laserpunktur kemudian dilakukan pada titik akupunktur reproduksi seperti Gambar 4.1. Induksi laserpunktur harus dipastikan tepat terletak di antara *processus transversus vertebralis lumbalis* 2-3, 3-4 dan 4-5 untuk dapat menstimulus peningkatan fertilitas yang ditandai dengan timbulnya birahi.



Gambar 4.1. Penginduksian Laserpunktur pada Titik Akupunktur *Shanjiaoshu*.

Timbulnya birahi diamati selama 6 jam pasca paparan laserpunktur, yang akan tampak pembesaran testis dan kemudian tikus dikorbankan untuk pengambilan organ testis.

4.4.5 Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel organ dilakukan 6 jam setelah tikus diinduksi laserpunktur. Tikus dimatikan dengan cara *cervicalis dislocatio* lalu abdomen dan bagian kepala tikus dibedah dan organ diambil dengan sangat hati-hati untuk menghindari kerusakan jaringan. Sampel otak dicuci dengan menggunakan NaCl

fisiologis 0.9% dan direndam dalam larutan Paraformaldehid (PFA) 4 % untuk preparat HE dan disimpan pada *freezer*.

4.4.6 Pembuatan Preparat Histologi Otak (Hipofisis Anterior)

Langkah-langkah dalam proses pembuatan preparat histologi berdasarkan Lemanepa (2005), yaitu:

4.4.6.1 Fiksasi

Fiksasi dilakukan untuk mengawetkan dan mengeraskan jaringan. Tikus dikorbankan dengan cara dislokasi leher, selanjutnya dibedah dan ambil organ testis. Potongan tersebut dimasukkan dalam larutan *Paraformaldehida* (PFA) 4%.

4.4.6.2 Dehidrasi

Dehidrasi proses pengeluaran air dari dalam jaringan yang telah difiksasi. Jaringan dimasukkan dalam aquades selama 1 jam kemudian didehirasi dengan alkohol bertingkat 30%, 50%, 70%, 80%, 90% sampai alkohol absolut.

4.4.6.3 Penjernihan (*Clearing*)

Penjernihan (*Clearing*) merupakan proses mengeluarkan alkohol dari jaringan dan menggantinya dengan suatu larutan yang dapat berikatan dengan parafin. Jaringan dimasukkan kelarutan alkohol xylol selama 1 jam, larutan xylol murni selama 2 x 2 jam, parafin cair 2 x 2 jam.

4.4.6.4 Embedding

Embedding merupakan proses untuk mengeluarkan cairan *clearing agent* dari jaringan dan diganti dengan parafin. Jaringan otak dicelupkan kedalam parafin cair yang telah dituang ke dalam wadah hingga parafin memadat.

4.4.6.5 Pemotongan (*Sectioning*) dan Penempelan pada Gelas Objek

Jaringan dipotong dengan blok parafin dengan mikrotom setebal $\pm 4 \mu\text{m}$, secara cross section / melintang. Irisan diletakkan pada poly-l-lysin slide. Potongan terpilih dikeringkan dan diletakkan di atas *hot plate* $38-40^{\circ}\text{C}$ sampai kering. Selanjutnya preparat disimpan dalam inkubator pada suhu $38-40^{\circ}\text{C}$ lalu siap diwarnai dengan pewarnaan Hematoksilin-Eosin (HE).

4.4.6.6 Pewarnaan Hematoksilin-Eosin (HE)

Pewarnaan HE ini terdiri dari zat warna yaitu hematoklin dan eosin. Preparat dimasukkan dalam larutan xylol 1 dan 2 selama 5 menit, kemudian dimasukkan dalam etanol bertingkat yang dimulai dari etanol absolut, 95 %, 90 %, 80 %, dan 70 % selama 5 menit. Jaringan kemudian direndam dalam aquades selama 5 menit. Preparat selanjutnya diwarnai dengan pewarna hematoksilin selama 10 menit kemudian dicuci dengan air mengalir selama 30 menit dan dibilas aquades selama 5 menit. Setelah itu, preparat diwarnai dengan pewarna eosin selama 5 menit dan dicuci kembali dengan air mengalir selama 10 menit dan dibilas aquades selama 5 menit. Setelah preparat diwarnai, preparat dimasukkan pada alkohol dari 80 %, 90 %, dan 95 % hingga alkohol absolut. Selanjutnya

preparat dimasukkan kedalam larutan xylol 1-3 selama 3 menit dan dikering anginkan. Terakhir, dilakukan perekatan menggunakan balsam canada serta ditutup menggunakan *coverglass*.

4.4.6.7 Pengamatan Preparat Histologi Otak (Hipofisis Anterior)

Pengamatan dilakukan terhadap sel-sel basofil pada organ otak dengan mikroskop cahaya. Pertama, Jumlah sel basofil diamati serta difoto pada perbesaran 40x dan 400x dalam 5 lapangan pandang untuk setiap kelompok. Kedua, dilakukan skoring dan penghitungan jumlah sel basofil per lapangan pandang untuk setiap kelompok dengan *software ImageJ*.

4.4.7 Imunohistokimia (IHK)

Organ otak direndam dalam larutan fiksatif paraformaldehid 4% selama 1-7 hari, kemudian dilakukan proses dehidrasi. Setelah itu sampel kemudian dimasukkan ke dalam larutan xylol untuk proses clearing selama semalam. Proses selanjutnya adalah infiltrasi menggunakan parafin xylol dan parafin dengan perbandingan 1 : 1 selama 30 menit. Jaringan kemudian diselubungi dengan parafin untuk membentuk blok parafin, kemudian jaringan dimasukkan ke dalamnya dan ditunggu sampai parafin memadat. Langkah selanjutnya adalah proses pemotongan dengan ketebalan 5 μ m. Irisan jaringan yang telah berbentuk pita kemudian ditempelkan pada gelas objek yang telah dioleh Mayer Albumin. Proses selanjutnya yaitu deparafinasi.

Preparat direndam kedalam xylol I, xylol II, etanol bertingkat (100%, 90%, 80%, 70%), dan aquadest secara berurutan, masing-masing direndam selama

5 menit. Dicuci dalam PBS selama 3x 5 menit. Ditetesi H₂O₂ 3 % selama 20 menit, dicuci dengan PBS selama 3 x 5 menit. Direndam dalam 5% BSA dalam PBS selama 30 menit dan dicuci dalam PBS selama 3 x 5 menit.

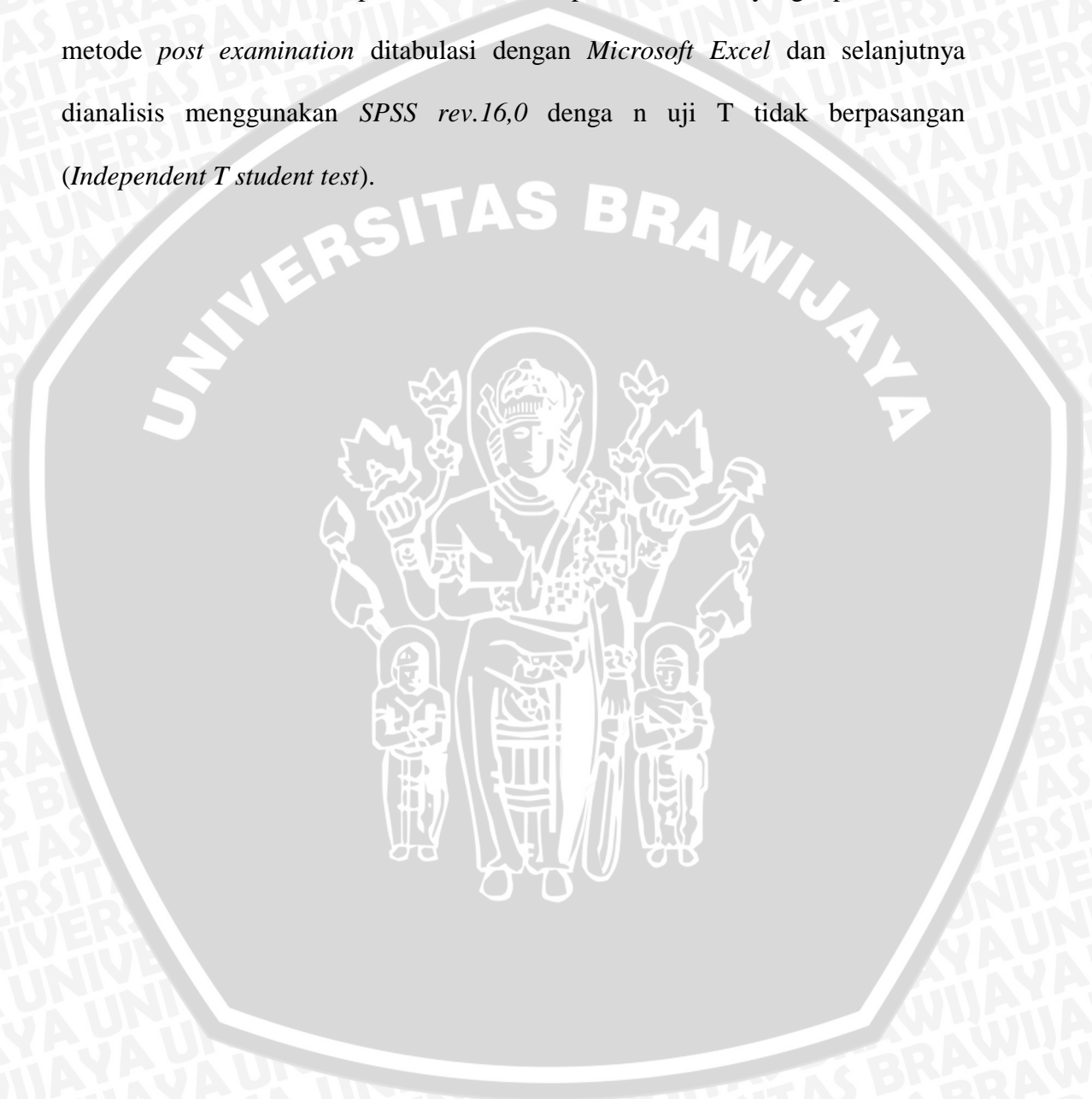
Preparat kemudian direaksikan dengan antibodi primer (*Anti rat GnRH*) selama 24 jam dengan suhu 4°C dan dilakukan pencucian kembali dengan PBS pH 7,4 selama 3 x 5 menit. Berikutnya direaksikan dengan antibodi sekunder berlabel biotin (*Anti Rabbit biotin labeled*) selama 1 jam dengan suhu ruang. Dicuci kembali dengan PBS selama 3 x 5 menit. Ditambahkan SA-HRP selama 40 menit dan dicuci dengan PBS 3 x 5menit. Substrat DAB ditambahkan dan inkubasi selama 10 menit lalu dicuci dengan PBS 3x 5menit. Counterstain dilakukan dengan Hematoxylen selama 5 menit pada suhu ruang, lalu dicuci dengan air, dikering anginkan dan terakhir mounting dengan entellan dan pengamatan dilakukan dengan mikroskop cahaya perbesaran 400x.

4.4.8 Pengamatan Ekspresi GnRH dengan Immunohistokimia

Pengamatan dilakukan terhadap ekspresi GnRH pada organ otak dengan mikroskop cahaya. Pertama, ekspresi GnRH diamati serta difoto pada perbesaran 40x dan 400x dalam 5 lapangan pandang untuk setiap kelompok. Kedua, dilakukan presentase ekspresi GnRH per lapangan pandang untuk setiap kelompok dengan *software Axio Vision*.

4.5 Analisis Data

Data kuantitatif ekspresi GnRH dan Hipofisis Anterior yang diperoleh dari metode *post examination* ditabulasi dengan *Microsoft Excel* dan selanjutnya dianalisis menggunakan *SPSS rev.16,0* dengan uji T tidak berpasangan (*Independent T student test*).



BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

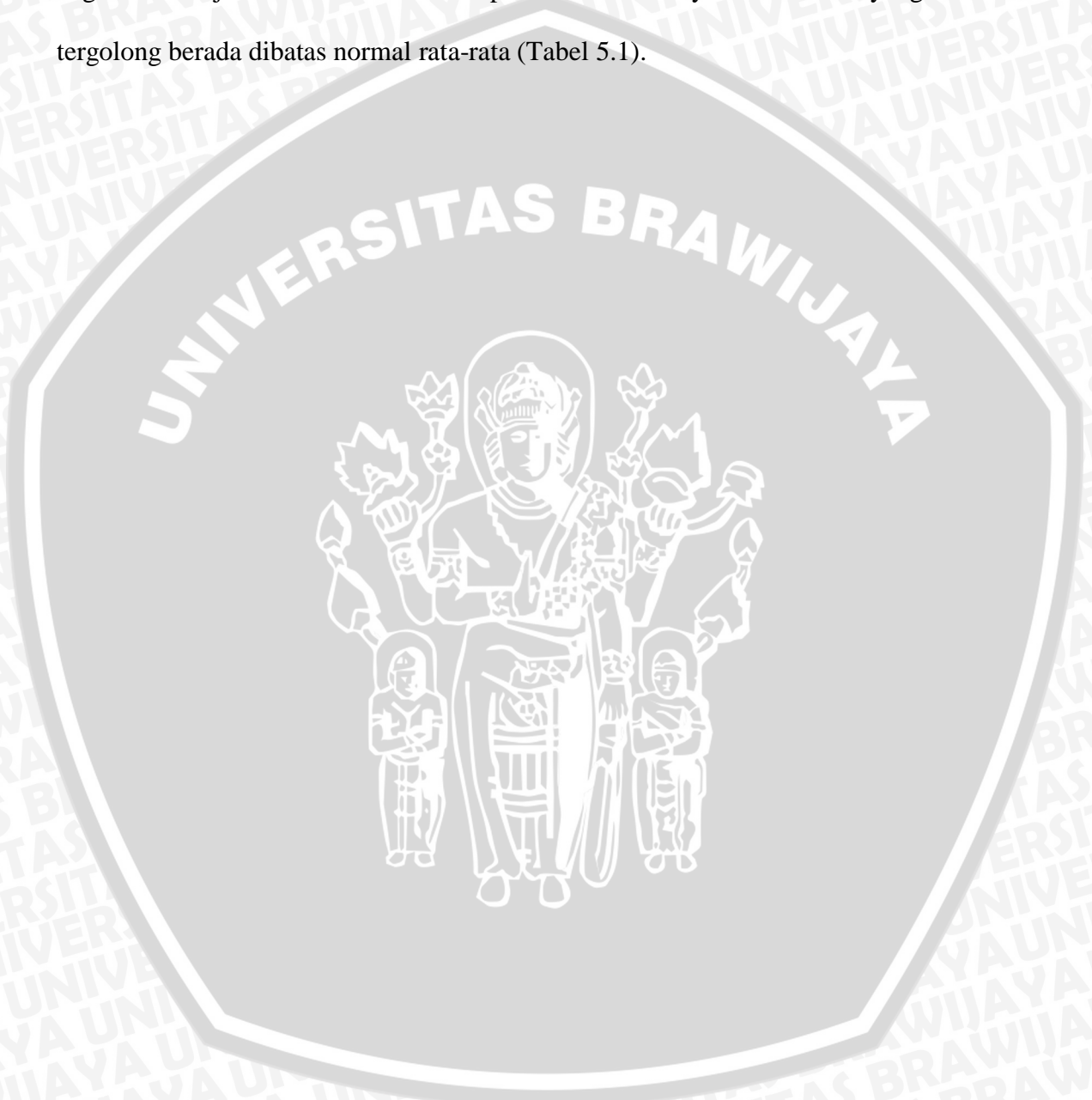
5.1 Pengaruh Paparan Laserpunktur terhadap Ekspresi GnRH pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Jantan

Pusat pengintegrasian poros reproduktif hormonal adalah hipotalamus. Hipotalamus merupakan tempat produksi *Gonadotrophin Releasing Hormone* (GnRH) yang akan merangsang adenohipofisis (Aulanni'am, 2011). Rangsangan GnRH, menyebabkan pituitari mensekresikan dan melepaskan sejumlah hormon gonadotropik, yaitu FSH dan LH (Gingrich & Patterson, 2007). Hasil perhitungan ekspresi GnRH tikus (*Rattus norvegicus*) jantan pasca paparan laserpunktur didapatkan jumlah rata-rata ekspresi GnRH seperti yang ditampilkan pada Tabel 5.1. Pengaruh dari induksi laserpunktur pada penelitian ini mampu meningkatkan fertilitas hewan jantan melalui peningkatan jumlah rata-rata ekspresi GnRH.

Tabel 5.1 Jumlah Presentase Rata-rata Ekspresi GnRH Pasca Paparan Laserpunktur

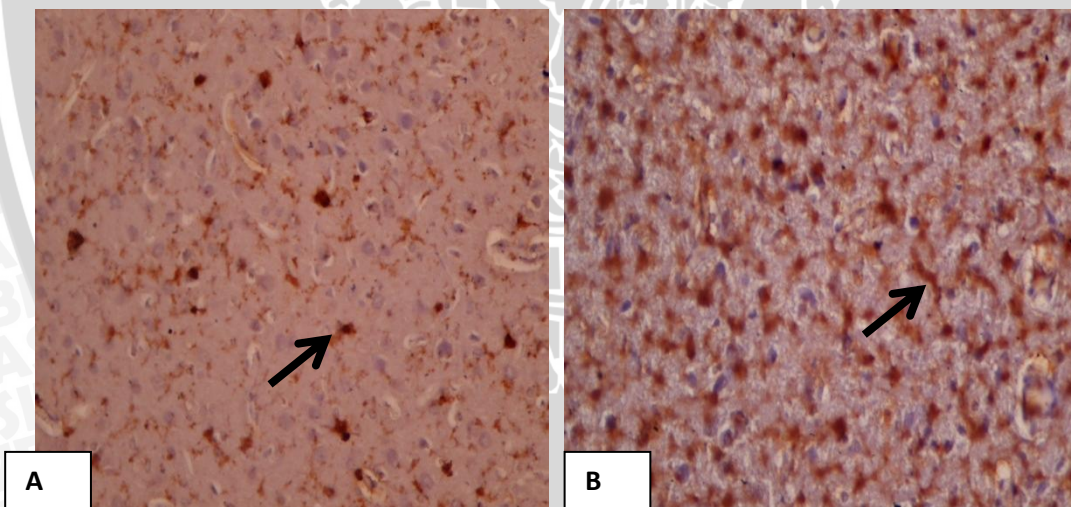
Kelompok Tikus	Jumlah Rata-rata (% area) GnRH \pm SD
A (Tikus Kontrol)	2.78 \pm 1.41
B (Tikus Induksi Laserpunktur)	5.96 \pm 1.92

Ekspresi GnRH pada Kelompok A yang tidak diberi perlakuan sebagai kontrol negatif menunjukkan hasil rata-rata ekspresi GnRH sebanyak 2.78 ± 1.41 yang tergolong berada dibatas normal rata-rata (Tabel 5.1).



Ekspresi GnRH kelompok B dengan perlakuan paparan laserpunktur menunjukkan rata-rata ekspresi GnRH sebanyak 5.96 ± 1.92 yang berada diatas batas normal rata-rata ekspresi GnRH. Jika dibandingkan antara kelompok A dan B, pada kelompok B terjadi peningkatan sebesar 53 % ekspresi GnRH pasca paparan laserpunktur. Sekresi akibat adanya Berdasarkan hasil analisis lanjutan dengan uji T tidak berpasangan (*Independent sample T test*), diketahui bahwa terdapat perbedaan ekspresi GnRH yang signifikan ($p < 0,05$) antara kelompok A kontrol dan kelompok B perlakuan pasca dipaparan dengan laserpunktur.

Pengamatan ekspresi GnRH dilakukan dengan *software Axio Vision*. Pengamatan dilakukan dari hasil penelitian seperti pada Gambar 5.1



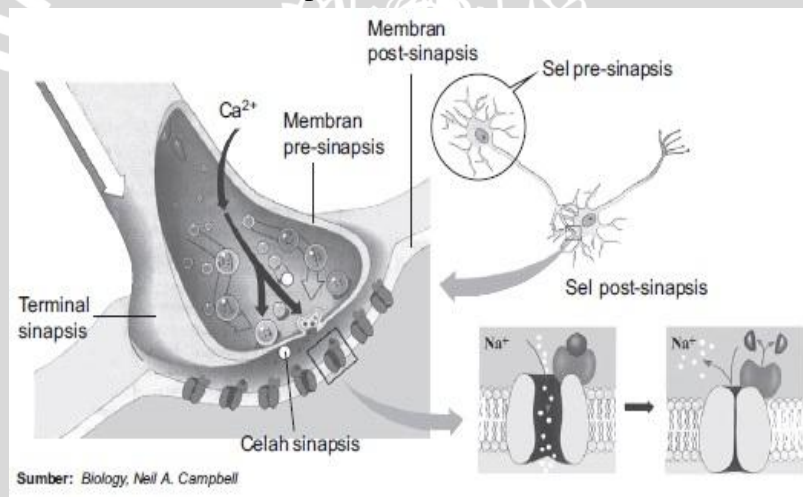
Gambar 5.1 Ekspresi GnRH pada otak Tikus (*Rattus norvegicus*) Jantan.

Keterangan : Perbesaran 400x. A menunjukkan kelompok kontrol. B menunjukkan kelompok perlakuan. Pewarnaan imunohistokimia (IHK). Tanda panah menunjukkan ekspresi GnRH.

Peningkatan ekspresi GnRH pasca paparan laserpunktur selama 15 detik pada titik reproduksi protein G sub unit α membrane saraf akan mengalami fosforilisasi untuk mengaktivasi enzim fosfolipase C (PLC). Enzim fosfolipase C selanjutnya akan menghidrolisa fosfatidil inositol bisfosfat (PIP₂) menjadi inositol trifosfat (IP₃) dan diasil gliserol (DAG). Aktivasi reseptor melalui jalur fosfolipase, diperoleh beberapa *second messenger*, yaitu DAG, IP₃ dan Ca²⁺. DAG memiliki dua peran dalam signaling, yaitu dapat diurai lebih lanjut menghasilkan asam arakidonat, dan DAG bersama-sama dengan Ca²⁺ mengaktivasi protein kinase C (PKC). PKC berperan dalam sintesis gen-gen tertentu. Ca²⁺ intraseluler akan mengaktivasi calcineurin. Ca²⁺ bersama dengan PKC berperan dalam signaling dalam pelepasan neurotransmitter.

Sinyal listrik yang ditimbulkan oleh paparan laserpunktur menyebabkan depolarisasi membran sel saraf. Depolarisasi membran sel syaraf ini menyebabkan potensial aksi dan membran sel syaraf akan merespon dengan terbukanya saluran ion Ca²⁺ ekstraseluler. Ca²⁺ ekstraseluler akan masuk melalui *Calcium Sensing Reseptor* (CaSR) atau melalui *Voltage-gated Ca²⁺ channels* (VGCC). Masuknya Ca²⁺ ekstraselular ini akan bertemu dengan gelembung-gelembung sinaptik dan membran sinaptik akan terbuka untuk melepaskan neurotransmitter ke celah sinaptik dengan cara eksositosis, selanjutnya neurotransmitter akan bergerak menuju ke reseptor postsinap apabila ikatan reseptor dengan neurotransmitter ini cocok maka impuls atau ransangan akan dilanjutkan sampai menuju otak. Di otak kemudian menimbulkan reaksi berantai seperti merangsang calcineurin dan PKC

untuk mengaktifkan enzim *Glutamic acid decarboxylase* (GAD-65). Aktifnya GAD-65 ini akan merangsang neuron GABAergic untuk mensintesis GABA (Kusuma, 2013). GABA kemudian langsung menyampaikan pesan melalui adanya kontak antar neuron GABAergic dan neuron hipotalamus inilah yang memungkinkan terjadinya pelepasan GnRH di hipotalamus. Produk dari neuron GABAergic berupa GABA memiliki efek stimulasi pada pelepasan hormon gonadotropin dari hipofisa (Kah *et al.*, 1992; Sloley *et al.*, 1992; Trudeau *et al.*, 1993a,b ; Trudeau *et al.*, 2000; Popescu *et al.*, 2008).



Gambar 5.1.1. Mekanisme neurotransmiter (Biologi)

GABA kemudian merangsang neuron hipotalamus untuk melepaskan GnRH. Rangsangan GnRH, menyebabkan pituitari mensekresikan dan melepaskan sejumlah hormon gonadotropik, yaitu FSH dan LH. LH pada hewan jantan merangsang produksi testosteron dari sel interstitial testis (sel leydig) (Hardijanto, 2010). FSH merangsang pertumbuhan testis dan mempertinggi

produksi *androgen binding protein* (ABP) oleh sel sertoli, yang merupakan komponen tubulus testis (Meachem *et al.*, 2001). ABP tersebut menyebabkan konsentrasi testosterone yang tinggi pada sperma dan merupakan faktor penting dalam spermatogenesis (Greenspan *et al.*, 1994).

Penelitian ini menggunakan Laser dengan power 5 mW sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Kert & Rose (1989) & Karu (2000) yang menggunakan Laser berdaya rendah (*soft laser*) helium neon (He-Ne) 5 mW yang dipaparkan dapat memberikan stimulus biologi seperti meningkatkan aktivitas seluler dengan mengubah potensi listrik membran sel dan, membran menjadi selektif permeabel untuk ion natrium, ion kalium dan ion kalsium, selain itu dapat meningkatkan aktivitas enzim, daya regenerasi syaraf, baik sentral maupun perifer serta kemampuan produksi hormon. Menurut Sukarto (1992), daya sinar laser 4-5 mW yang disinarkan ke permukaan kulit dapat menembus lapisan epidermis dan dermis yang selanjutnya menimbulkan rangsangan. Efek ransangan yang ditimbulkan oleh sinar laser adalah *electrobioluminense*, yaitu jika sinar laser mengenai jaringan akan merangsang sel secara listrik.

Timbulnya birahi diamati setelah 6 jam pasca paparan laserpunktur. Pemakaian waktu 6 jam mengacu pada penelitian Trudeau (2000), mengenai aktivitas seluler akibat paparan laserpunktur pada titik reproduksi. Dimana aktivitas GAD-65 melimpah setelah 6 jam paparan laserpunktur. Aktivitas GAD-65 menentukan sintesis GABA dineuron GABAergic. Produk dari GABAergic berupa GABA memiliki efek stimulasi pada pelepasan hormon gonadotropin dari

hipotalamus. Menurut Kusuma (2013) pasca 6 jam pemaparan laserpunktur pada titik reproduksi dapat meningkatkan pelepasan hormon gonadotrophin dengan mekanisme perangsangan GnRH melalui jalur syaraf. Terbukti dengan hasil pra-penelitian yang menunjukkan terjadinya peningkatan aktivitas seluler pasca 6 jam pemaparan.

Pengaruh paparan laserpunktur pada tikus B menyebabkan terjadinya peningkatan sekresi GnRH yang kemudian menyebabkan terjadinya peningkatan sekresi FSH dan LH, LH yang dihasilkan akan menstimulasi peningkatan jumlah sel leydig pada testis dan berikatan *Luteinizing Hormone Receptor* (LH-R) untuk mengaktifkan *cyclic adenosine monophosphate* (cAMP) sehingga menstimulus produksi testosteron. FSH bekerja untuk mempengaruhi tubulus dan sel sertoli, sel sertoli berfungsi dalam proses pembentukan ABP (*Androgen Beinding Protein*) yang fungsinya sebagai reseptor untuk mengikat testosteron bebas dalam darah untuk proses spermatogenesis (Shirwood, 2001).

Hasil penelitian ini sesuai dengan hasil penelitian Kusuma (2013), paparan laserpunktur akan meningkatkan kadar hormon gonadotropin dipengaruhi oleh *gonadotropin releasing hormon* (GnRH) yang dilepas di hipotalamus, dimana GnRH ini sangat dipengaruhi oleh faktor lingkungan yang bekerjanya melalui sistem syaraf pusat. Menurut Tjipto (2010), pada mamalia ransangan yang diberikan dikirim ke otak dan ditranslasikan pada hipotalamus untuk memproduksi GnRH (*Gonadotropin Releasing Hormon*) yang berlanjut pada kelenjar pituitari untuk sekresi LH (*Luteinizing Hormon*) dan FSH (*Folicle*

Stimulating Hormone). *Luteinizing Hormone* (LH) yang disekresikan akan menstimulus peningkatan jumlah sel leydig pada testis dan berikatan *Luteinizing Hormone Receptor* (LH-R) sehingga menstimulus produksi testosteron, sedangkan produksi *Folicle Stimulating Hormone* (FSH) berperan untuk menstimulus perkembangan dan proliferasi sel sertoli yang memproduksi *Androgen Binding Protein* (ABP) (Meachem, *et al.*, 2001). *Androgen Binding Protein* (ABP) tersebut berikatan dengan testosteron yang digunakan dalam spermatogenesis (Greenspan, *et al.*, 1994).

5.2 Pengaruh Paparan Laserpunktur terhadap Gambaran Histologi Hipofisis Anterior pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Jantan

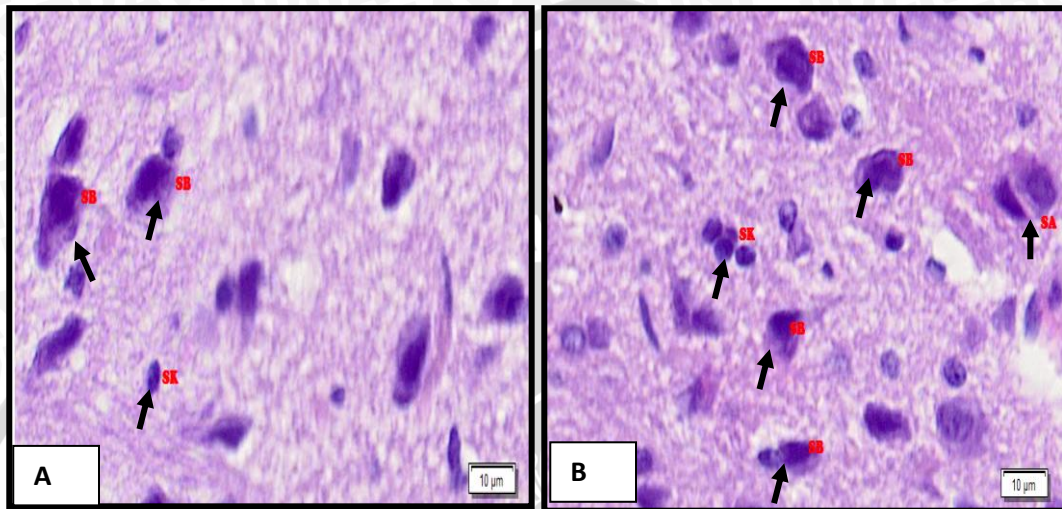
Hasil perhitungan jumlah sel basofil pada histologi hipofisis anterior otak tikus jantan (*Rattus norvegicus*) pasca paparan laserpunktur didapatkan jumlah rata-rata yang ditampilkan pada Tabel 5.2. Sel basofil berperan dalam mensekresikan 2 hormon *gonadotrophin* yaitu FSH (*Follicle Stimulating Hormone*) dan LH (*Lutheinizng Hormone*). Adanya paparan laserpunktur diyakini mampu menstimulus hipotalamus untuk meningkatkan sekresi *Gonado Releasing Hormone* (GnRH) dan menstimulasi pituitari anterior untuk meningkatkan sekresi hormon Gonadotropin.

Tabel 5.2 Jumlah Rata-rata Sel basofil

Kelompok Tikus	Jumlah Rata-rata Sel basofil ± SD
tikus Kontrol)	92.36 ± 24
tikus Induksi Laserpunktur)	140.16 ± 31.46

Hasil penelitian ini menunjukkan kelompok tikus A kontrol dengan jumlah sel basofil pada hipofisis anterior terdapat 92.36 ± 24 sel basofil. Sedangkan pada kelompok tikus B yang dipapar laserpunktur pada titik akupunktur BL 22 atau *sanjiaoshu*, BL 23 atau *shenshu* dan GV 4 atau *mingmeng* selama 15 detik/titik akupunktur terjadi peningkatan jumlah rata-rata sel basofil dalam hipofisis anterior yaitu sebesar 140.16 ± 31.46 , selanjutnya hasil dianalisis lanjutan dengan uji T tidak berpasangan (*Independent sample T test*) menunjukkan terdapat perbedaan signifikan antara kelompok B perlakuan ($p \leq 0,05$) dibandingkan dengan kelompok tikus A normal (Tabel 5.2).

Gambaran histologi hipofisis anterior pada tikus (*Rattus norvegicus*) jantan menggunakan pewarnaan Hemakosilin-Eosin (HE) pada perbesaran 400x disajikan pada Gambar 5.2



Gambar 5.2 Histologi Hipofisis Anterior Otak Tikus Pewarnaan Hematoksilin-Eosin

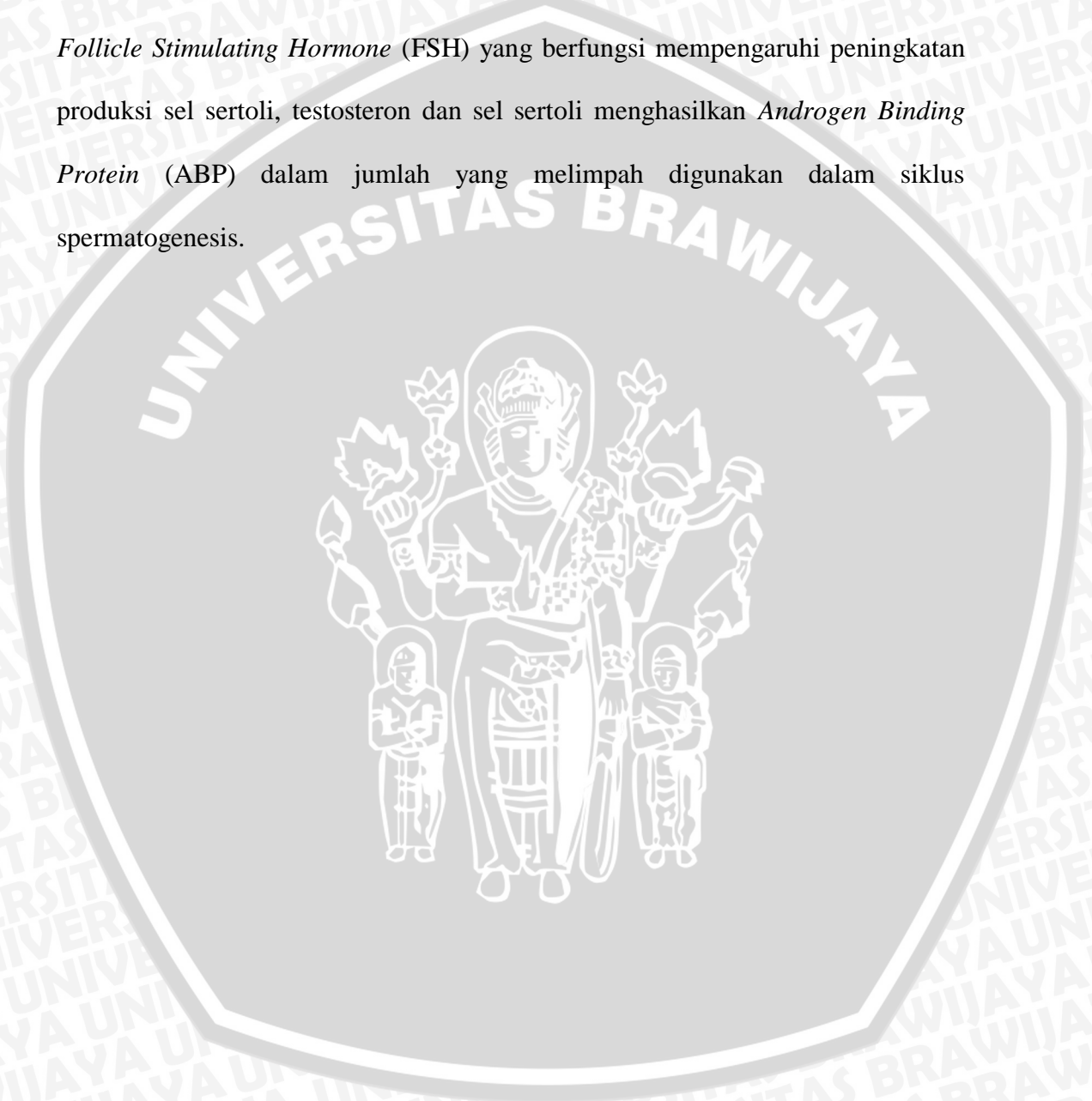
Keterangan : Perbesaran 400x. A menunjukkan kelompok kontrol. B menunjukkan kelompok perlakuan. Pewarnaan Hematoksilin Eosin (HE) . Sel kromofob (SK), Sel basofil (SB).

Peningkatan jumlah sel basofil pada hipofisis anterior kelompok tikus B yang dipapar laserpunktur dikarenakan adanya stimulasi yang cepat dan spontan. Selanjutnya, laser yang disinarkan ke permukaan kulit dapat menembus lapisan epidermis dan dermis yang selanjutnya menimbulkan rangsangan. Maka impuls atau ransangan akan dilanjutkan sampai menuju otak. Di otak kemudian menimbulkan reaksi berantai seperti merangsang calcineurin dan PKC untuk mengaktifkan enzim *Glutamic acid decarboxylase* (GAD-65). Aktifnya GAD-65 ini akan merangsang neuron GABAergic untuk mensintesis GABA (Kusuma, 2013). GABA kemudian langsung menyampaikan pesan melalui adanya kontak

neuron GABAergic dan neuron GnRH yang memungkinkan terjadinya pelepasan GnRH di hipotalamus. (Kah *et al.*, 1992; Sloley *et al.*, 1992; Trudeau *et al.*, 1993a,b ; Trudeau *et al.*, 2000; Popescu *et al.*, 2008). *Gonadotrophin Releasing Hormone* (GnRH) dan dialirkan ke dalam kelenjar pituitari anterior. *Gonadotrophin Releasing Hormone* (GnRH) yang dihasilkan dari hipotalamus mendorong sintesa sel basofil dari hipofisa anterior untuk mensekresi hormon gonadotropik yaitu *Folicle Stimulating Hormone* (FSH) dan *Luteinizing Hormone* (LH) (Meachem *et al.*, 2001).

Meningkatnya jumlah sel basofil pada kelenjar hipofisis anterior mempengaruhi dalam peningkatan sekresi hormon gonadotropik. Menurut Meachem *et al.*, (2001) *Gonadotrophin Releasing Hormone* (GnRH) mendorong sintesa sel basofil dari hipofisa anterior untuk mensekresi hormon gonadotropik yaitu *Folicle Stimulating Hormone* (FSH) dan *Luteinizing Hormone* (LH). *Luteinizing Hormone* (LH) berperan dalam stimulasi sel-sel Leydig untuk memproduksi testosteron, juga berperan dihasilkannya estradiol. *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) merangsang pertumbuhan testis dan mempertinggi produksi protein pengikat androgen (ABP) oleh sel sertoli. Peningkatan ABP ini menyebabkan tingginya konsentrasi testosteron yang penting bagi pembentukan dan pematangan spermatozoa pada proses spermatogenesis. Dengan demikian *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) bekerja menyiapkan kadar androgen yang cukup untuk sel germinal dan memacu pendewasaan spermatozoa di dalam epididimis. Jumlah sel basofil yang meningkat pasca paparan laserpunktur ini

mempengaruhi peningkatan sekresi hormon gonadotropin yaitu *Luteinizing Hormone* (LH) yang berfungsi dalam peningkatan produksi testosteron dan *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) yang berfungsi mempengaruhi peningkatan produksi sel sertoli, testosteron dan sel sertoli menghasilkan *Androgen Binding Protein* (ABP) dalam jumlah yang melimpah digunakan dalam siklus spermatogenesis.



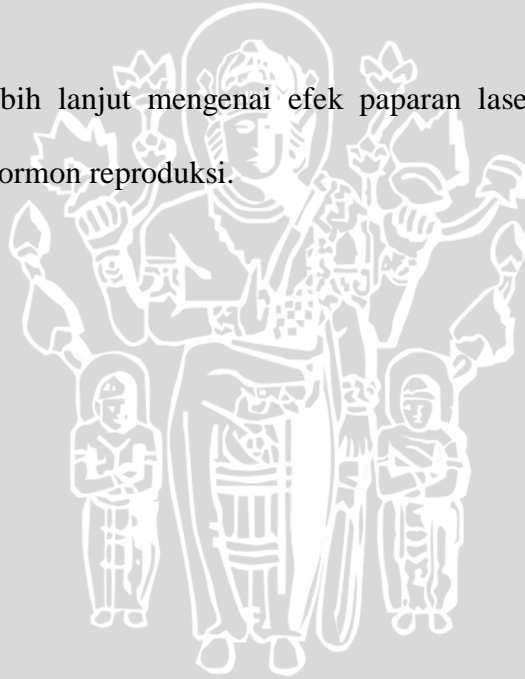
BAB 6 PENUTUP

6.1. Kesimpulan

1. Paparan laserpunktur pada titik reproduksi tikus jantan (*Rattus novvergicus*) dapat meningkatkan jumlah ekspresi GnRH sebesar 53 %.
2. Paparan laserpunktur pada titik reproduksi tikus jantan (*Rattus novvergicus*) dapat meningkatkan jumlah sel basofil pada hipofisis anterior sebesar 45 %.

6.2. Saran

Perlu dikaji lebih lanjut mengenai efek paparan laserpunktur terhadap peningkatan hormon-hormon reproduksi.



DAFTAR PUSTAKA

- Adikara, R.T.S. 2001. *Teknologi Laserpunktur Pada Ternak, Pusat Penelitian Bioenergi*. Lembaga Penelitian . Universitas Airlangga. Surabaya.
- Akusu, M.O., E. Nduka, and G.N. Egbunike. 2006. Peripheral plasma levels of progesterone and oestradiol-17 H during the reproductive cycle of West African Dwarf goats, <http://www.ilri.cgiar.org/InfoServ/Webpub/Fulldocs/AnGenReCD/docs/x5520B/x5520bOp.htm>.
- Aulanni'am. 2011. *Inhibin B: Struktur dan Karakter Biokimiawi sebagai Kandidat Kontrasepsi Pria*. Pusat Penerbitan dan Percetakan Unair. Surabaya.
- Bahtera, T. 2007. *Faktor risiko kejang demam berulang sebagai prediktor bangkitan kejang demam berulang*. Kajian mutasi gen pintu voltase kanal ion natrium. [Disertasi].
- Bearden, H.J, J.W. Fuquy, and S.T. Willard. 2004. *Applied Animal Reproduction 6th Editions*. Pearson Education Inc. New Jersey. Biology Corner. http://www.biologycorner.com/worksheets/rat_external.html [12 Juni 2013].
- Braunstein, G.D.. Testes. 1997. In Francis S.G and ordon J.S (eds), *Basic and Clinical Endocrinology. 5th ed*. London: Prentice-Hall International Inc.
- Carolina, V. M. 1996. *Rat Dissection Guide*. Biological Supply Company. Prague.
- Campbell, J.R., M.D. Kenealy, K.L. Campbell. 2003. *Animal Science. The Biology, Care, and Production of Domestic Animal*. McGraw-Hill Higher Education, Avenue of the America, New York.
- Cummings, T.M., and S. Lindley. 2006. *Essentials of Western Veterinary Acupuncture*. Blackwell Publishing Ltd. Oxford.
- Demers, L.M. 1999. Pituitary function. In Carl- A.13 dan Edward, R.A (eds),. *The textbook of Clinical Chemistry*. 3rd Saunders Company. ed. Philadelphia : WB.

- Fatimah. 2010. *Teknologi Laserpunktur untuk Peningkatan Produksi Unggas*. Available at <http://www.poultryindonesia.com>. Accession date: 02 Januari 2010.
- Gingrich, JR dan Petterson AL. 2007. Male Gonadal disorder. http://www.utm.edu/endocrinology/document/2008-12_Patterson_MaleGonadalDisorder.pdf
- Guyton, A.C. and J.E. Hall. 2006. *Textbook of Medical Physiology*. 11th ed. Philadelphia, PA, USA: Elsevier Saunders.
- Guntoro, S., dan R. Yasa. 2002. *Aplikasi Teknologi Laserpunktur untuk Gertak Birahi pada Kerbau*. Balai Pengkajian Teknologi Pertanian Bali. Denpasar.
- Hafez, E.S. 2000. *Reproductions in Farm Animal 7th Editions*. Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia.
- Hardjatno, T. 2001. *Dasar-dasar Laserpunktur*. Seminar Persatuan Akupunkturis Seluruh Indonesia (PAKSI) 9-10 Juni 2001. Jakarta.
- Harris, D.A. 1995. *Bioenergetics at a Glance*. University Press. Cambridge. Blackwell Science Ltd. : 12-15.
- Herdis. 2010. *Aplikasi Teknologi Laserpunktur dalam Meningkatkan Libido Pejantan Domba Garut (Ovis aries)*. Pusat Teknologi Produksi Pertanian. Jakarta.
- Hendriksen, C. F. M., and H.B. Koeter. 1991. *Animals in Biomedical Research*. Elsevier Science Publisher. Amsterdam.
- Hernawati. 2007. *Perbaikan Kinerja Reproduksi Akibat Pemberian Isoflavon Dari Tanaman Kedelai*. [terhubung berkala].
http://file.upi.edu/Direktori/FPMIPA/JUR._PEND._BIOLOGI/197003311997022-HERNAWATI/FILE_12.pdf [9 November 2013].
- Howaritz, B dan J.B. Henry. 2001. Evaluation of endocrine function. In John, B.H (eds), (7117iCUI Diagnosis and Management by Laboratory Methods. 21 st ed. Philadelphia: WB Saunders Company.

- Idayanti, A. K. dan Saputra. 2002. *Akupuntur Dalam Bidang Kebidanan Dan Kandungan*. Meridian. Indonesia Journal of Acupuncture. 10 : 22-30.
- Johnson, M.H. and B.J. Everitt. 1995. *Essential Reproduction*, 4th ed. Blackwell Science, Oxford.
- Katongole, C.B. and S. Gombe. 2006. *A Study of The Reproductive Hormones of Indigenous Goats in Uganda*. <http://www.fao.org/Wairdocs/ILRI/x5464B/x5464b02.htm>
- Klide, A. and S .H . Kung. 1997 . *Veterinary Acupunture* . University Of Pennsylvania Press.
- Kusuma, P.S.W. 2000. *Pengaruh Penembakan Soft Laser He-Ne Terhadap Siklus Reproduksi Ikan Nila* [Thesis]. Program Pascasarjana Universitas Airlangga.
- Kusumawati, D. 2004. *Bersahabat dengan Hewan Coba*. Universitas Gajah Mada Press. Yogyakarta.
- Lestari, T.D. 2007. *Peran Inhibin pada Proses Reproduksi Ternak* . Laboratorium Reproduksi Ternak Fakultas Peternakan Universitas Padjadjaran. Bandung.
- Litwack G dan T.J. Schmidt. 2002. *Biochemistry of hormones II: Steroid hormones*. Dalam Devlin T.M (Ed.). *Textbook of Biochemistry, with Clinical Correlations*. 5th edition. New York: Wiley Liss, A John Wiley and Sons Inc. Publication.
- Lin, J.H, S.H. Liu, W.W. Chan, L.S. Wu, and W. P. Pi. 1992. Pituitary Responsiveness to Gonadotropin-Releasig-Hormon in Gilts Treated with Electroacupunture. *Proceeding of the Bighteenth Annual International Congress On Veterinary Acupunture* . Pp 39-42. Hawaii
- Mann, F. 1994. *Acupunture Cure of Many Disease*. 2nd edition. Oxford: Butterworth Heinemann Ltd.
- Miligan, G. 1994. *Signal transduction. A practical Approach*. New York. Edited by Rickwood D. Hames BP. IRL. Press at Oxford University Press, : 167-179.

- Montgomery, R., L. DL. C. [Diana](#), A. CA. R. [Camilla](#), L. F. [Loredana](#), E.G.ME.K [Mariette](#), E.DE.H. Daniel., M. DM. A. [Dana mbruzs](#), K. LK. F. Laura., S.A [Selma](#), and T. DT. B. [David](#). 2011. Mouse telomerase reverse transcriptase (mTert) expression marks slowly cycling intestinal stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 179-184.
- Moore DM. 2000. *Laboratory Animal Medicine and Science Series II*. USA: University of Washington.
- Mueller T, P. Vernier, and MF. Wullimann., 2006. A Phylotypic Stage In Vertebrate Brain Development: GABA Cell Patterns In Zebrafish Compared With Mouse. *J Comp Neurol*. 494:620–634.
- Mueller T, MF. Wullimann, and S. Guo., 2008. Early Teleostean Basal Ganglia Development Visualized By Zebrafish *Dlx2a*, *Lhx6*, *Lhx7*, *Tbr2* (*eomesa*), and *GAD67* gene expression. *J Comp Neurol*. 507:1245–1257.
- Natasaputra, I. 2005. *Golden Retriever*. Penebar Swadaya, Jakarta.
- Nurdjaman. 2004. Sistem Endokrin. Dalam: *Lecture Notes Histologi II*. Semarang: FK. UNIP. ; 93-107.
- Palaniapan, R. 2010. *Biological Signal Analysis*. Ventus Publishing. London.
- Potter, WP. 2007. Rats and Mice :Introduction and use In Research. Health Sciences Center for Educational Resources University of Washington.
- Rekling, J.C., G.D. Funk., D.A. Bayliss., XW. Dong., and JL. Feldman. 2000. Synaptic Control of Motoneuronal Excitability. *Physiol Rev* ; 80: 767-852.
- Rathgeber, R. 2007. *Equine Acupuncture*. The Blood-Horse Inc. USA.
- Saputra, K. 2000. *Akupunktur dalam Pendekatan Ilmu Kedokteran*. Airlangga University Press. Surabaya.
- Sheerwood, 2004. *The Reproductive System In Human Physiology From Cell To System (5th Edition)*.
- Sherwood, 2001. *Fisiologi Manusia dari Sel ke Sistem*, Ed. 2, Jakarta, EGC
- Soewolo, Soedjono. 1997. Pengantar Fisiologi Hewan. Jakarta. PGSM.

- Susan G. 2001. *Veterinary Acupuncture, Ancient Art to Modern Medicine Second Edition*. St Louis. Mosby. 53-78.
- Suhariningsih. 1995. *Sifat Rambat Sinyal Listrik pada Meridian Usus Besar*. Meridian Indonesian Journal Acupuncture, Vol. II:115-120.
- Sukarto. 1994. *Penggunaan Laser Untuk Akupunktur*. Meridian Indonesian Journal Acupuncture, I:231-234.
- Tjipto, BW. 2010. *Kajian Terapi Akupunktur Terhadap Kadar Hormon Testosteron Pria Usia Lanjut*. Pusat Penelitian dan Pengembangan Sistem dan Kebijakan Kesehatan. Surabaya.:92-99.
- Trudeau VL, B.D. Sloley and R.E. Peter. 1993c. GABA stimulation of gonadotropin-II release in goldfish: involvement of GABAA receptors, dopamine and sex steroids *American Journal of Physiology* 265 : R348 – R355.
- Veterinary Library. 1996. The labrotary rat. http://www.animalz.co.nz/library/small_pet/rats.html . [20 Mei 2013].
- Yasa, I.M.R., A. Junaidi, dan S. Soebagyo. 2004. *Penggunaan Laserpunktur Untuk Sinkronisasi Estrus Pada Fase Luteal Pada Kambing Peranakan Etawah (PE)*. Agrosains 17(2): 217-226.
- Yusuf, M. 2012. *Ilmu Reproduksi Ternak*. Lembaga Kajian dan Pengembangan Pendidikan Universitas Hasanudin. Makasar.



LAMPIRAN

Lampiran 1. Sertifikat Laik Etik Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya

**KOMISI ETIK PENELITIAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA****KETERANGAN KELAIKAN ETIK
"ETHICAL CLEARANCE"**

No:170 -KEP-UB -

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

PENELITIAN BERJUDUL : STUDI FERTILITAS TIKUS (*Rattus norvegicus*) PASCA
INDUKSI LASER PUNKTUR TERHADAP JUMLAH SEL
SERTOLI DAN EKSPRESI INHIBIN B

PENELITI : BAGAS CHRISTANTA ATMAJA

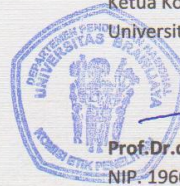
UNIT/LEMBAGA/TEMPAT : UNIVERSITAS BRAWIJAYA

DINYATAKAN : LAIK ETIK

Malang, 01 Juli 2013

Ketua Komisi Etik Penelitian

Universitas Brawijaya



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

NIP. 19600903 198802 2 001

**Lampiran 2. Sertifikat Laik Etik Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya
(nama anggota)**



KOMISI ETIK PENELITIAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
Jl. Veteran Malang 65145
Telp/Fax (0341) 559054, 575836
E-mail : bioetikub@ub.ac.id



Judul Penelitian : STUDI FERTILITAS TIKUS (*Rattus norvegicus*) PASCA INDUKSI LASERPUNKTUR TERHADAP JUMLAH SEL SERTOLI DAN EKSPRESI INHIBIN B

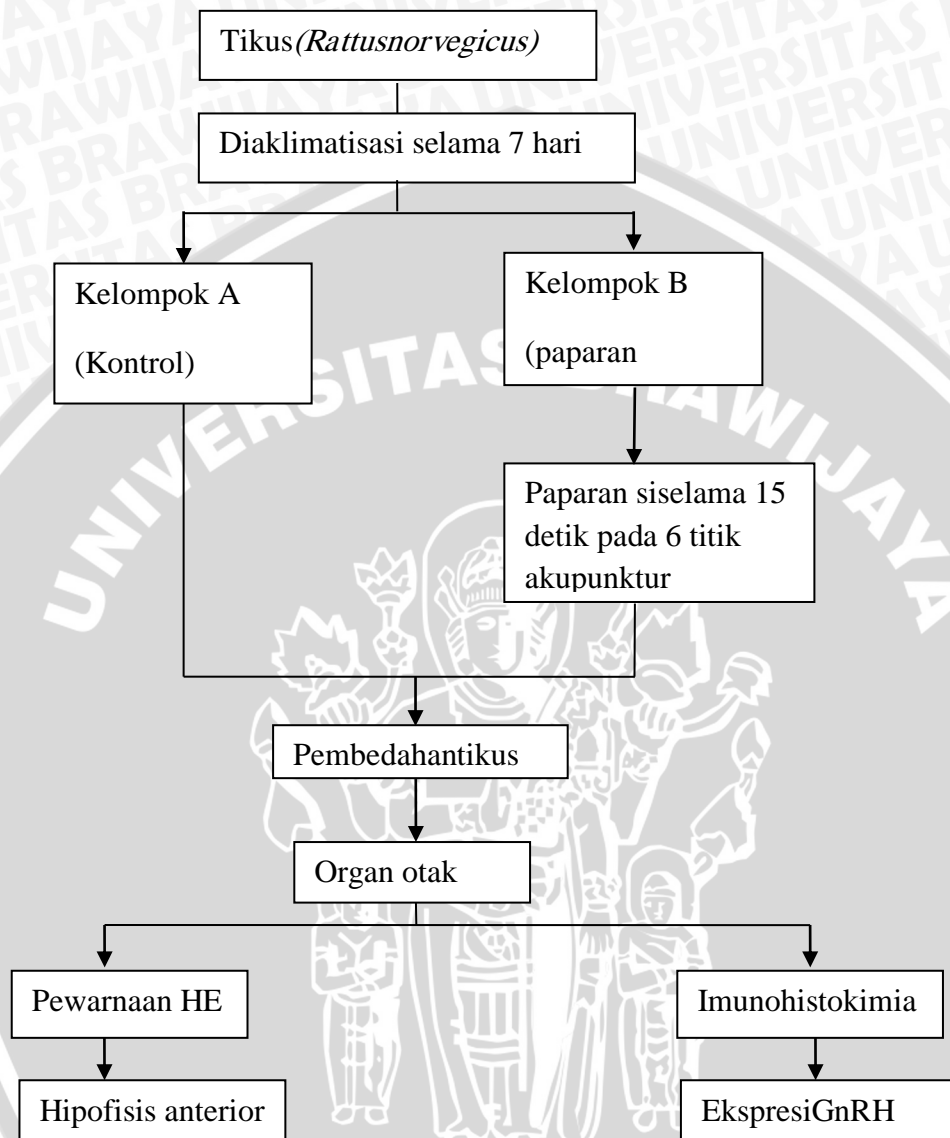
Ketua Peneliti : Bagas Christanta Atmaja
Anggota Peneliti : Sarfiah Aini : 105130112111001
Mar'atus Sakinah : 0911311008
Gilang Romadhon : 0911313022
Romhatul Munawir : 0911313133



Ketua
Komisi Etik Penelitian

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



Lampiran 3. Kerangka Operasional Penelitian

Lampiran 4. Palpasi dan Penandaan Titik Akupunktur



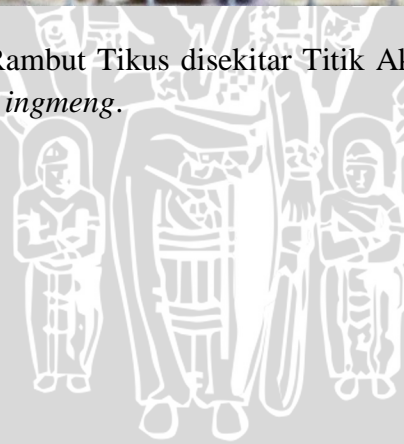
Gambar 1.Palpasidan Penandaan Titik Akupunktur *Shanjiaoshu, Shenshu* dan *mingmeng*



Lampiran 5. Pemotongan Rambut disekitar Titik Akupunktur



Gambar 2. Pemotongan Rambut Tikus disekitar Titik Akupunktur *Shanjiaoshu*, *Shenshu* dan *M ingmeng*.



Lampiran 6. Pembuatan Larutan

5.1 Pembuatan larutan phosphate buffer saline (PBS) pH 7,4

KCL sebanyak 0,1 gram, KH_2PO_4 sebanyak 0,1 gram, NaCl sebanyak 4 gram dan $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ sebanyak 1,08 gram dicampur dan dilarutkan dalam 250 ml aquades steril dan dihomogenkan menggunakan magnetic stirrer dalam gelas kimi 500 ml pH larutan diatur hingga mencapai 7,4 dengan larutan NaOH 1 ml menggunakan pH meter. Kemudian dipindahkan larutan kedalam labu ukur 500 ml dan ditambahkan aquades steril hingga batas.

5.2 Pembuatan PBS – Azida

Diambil 200 ml larutan PBS dengan pH 7,4 dalam gelas kimia 250 ml. kemudian ditambah 8 tetes larutan Azida 1 % dengan menggunakan pipet tetes. Dihomogenkan larutan tersebut dengan magnetic stirrer.

5.3 Pembuatan larutan NaCl – fis 0,9 %

Rumus NaCl-fis 0,9 % = $(0,9/100) \times 500 \text{ ml} = 4,5 \text{ g}$

Ditimbang NaCl sebanyak 4,5 gram dan dilarutkan terlebih dahulu dalam 100 ml aquades steril. Dipindahkan kedalam labu ukur 500 ml dan diencerkan dengan aquades steril hingga tanda batas.

5.4 Pembuatan PFA (Paraformaldehid) 4%

$$V_1 M_1 = V_2 M_2$$

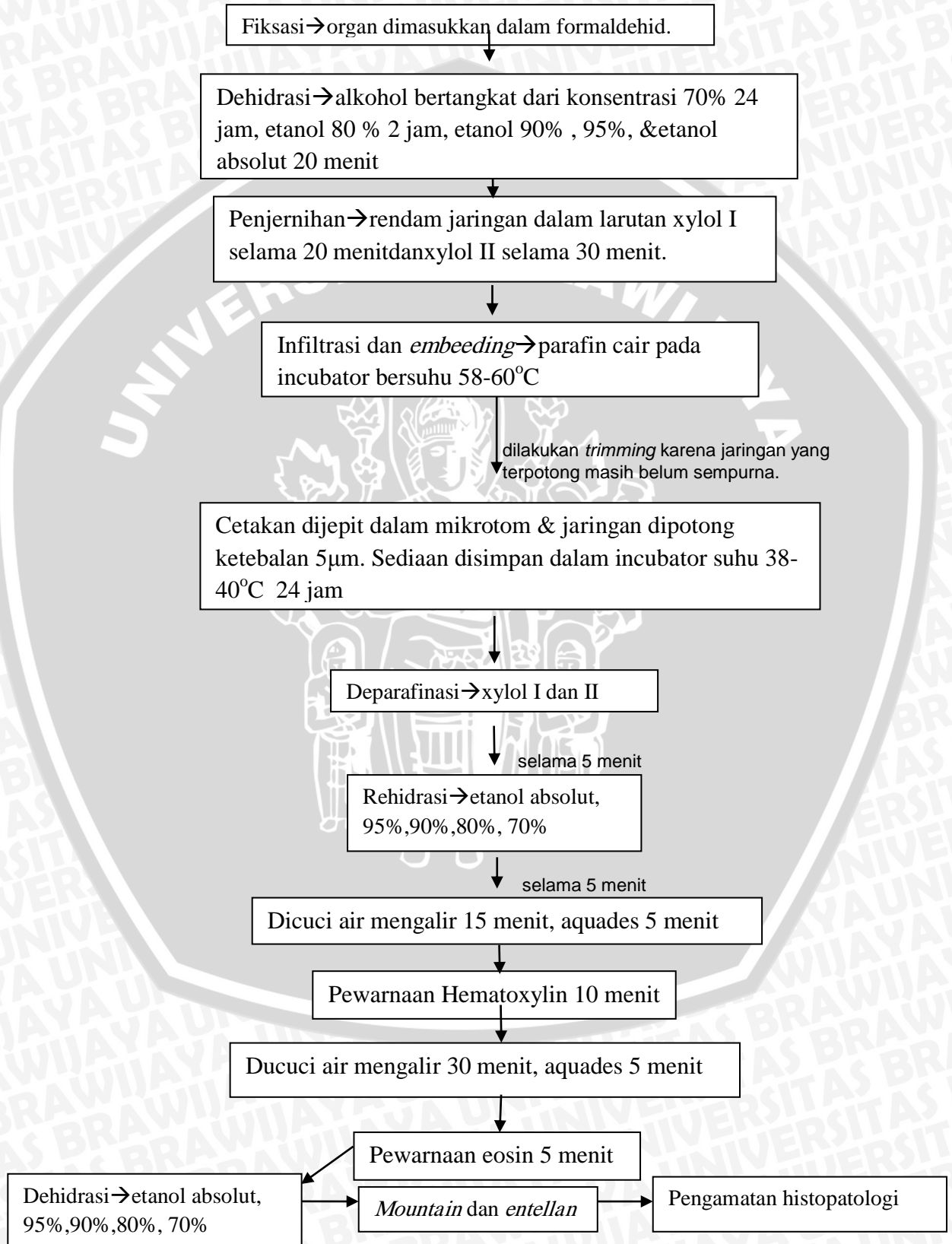
$$V_1 \times 37\% = 100 \text{ mL} \times 4\%$$

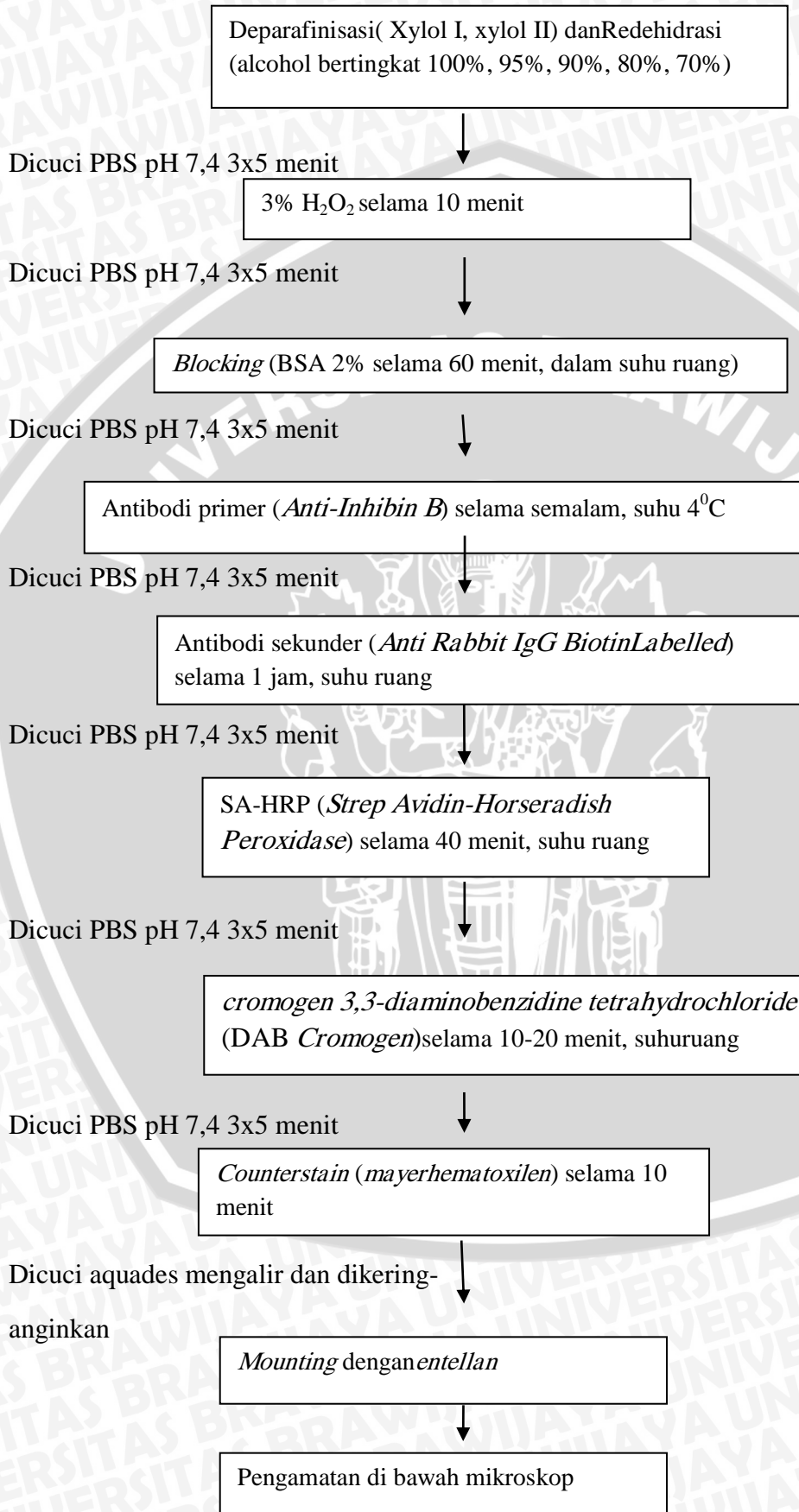
$$V_1 = 10,8 \text{ mL}$$

Langkah pertama yaitu membuat larutan NaCl fisiologis 0,9 % sebagai pelarutnya yaitu ditimbang NaCl sebanyak 1,8 gram lalu dilarutkan dalam 200mL aquades dan distirrer. Larutan PFA 4 % dapat dibuat dengan mengambil 10,8 mL formaldehid 37% dimasukan dalam labu ukur 100 mL dan ditambahkan NaCl fisiologis sampai tanda batas.

Lampiran 7. Metode Pembuatan Preparat Hematoxilin Eosin(HE)

(Jusuf, 2009),(Junquiera, *et al.*, 2007)



Lampiran 8. Metode Imunohistokimia (Ramos, 2005)

Lampiran 9. Uji Normalitas

9.1 Immunohistokima GnRH

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Hasil
N		50
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	4.3740
	Std. Deviation	2.31515
Most Extreme Differences	Absolute	.123
	Positive	.123
	Negative	-.101
Kolmogorov-Smirnov Z		.870
Asymp. Sig. (2-tailed)		.436

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Dari hasil pengujian normalitas pada Tabel 7.1 menunjukkan nilai dari *Kolmogorov – Smirnov Test* dengan nilai signifikan (p) sebesar 0,436. Oleh karena nilai $p > 0,05$, maka H_0 ditolak dan H_1 diterima dapat disimpulkan bahwa data yang digunakan mempunyai distribusi yang tersebar normal.

9.2 Hematoksin-Eosin Hipofisis Anterior

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Hasil
N		50
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	116.2600
	Std. Deviation	36.74446
Most Extreme Differences	Absolute	.130
	Positive	.130
	Negative	-.082
Kolmogorov-Smirnov Z		.919
Asymp. Sig. (2-tailed)		.367

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Dari hasil pengujian normalitas pada Tabel 7.2 menunjukkan nilai dari *Kolmogorov – Smirnov Test* dengan nilai signifikan (p) sebesar 0,367. Oleh karena nilai $p > 0,05$, maka H_0 ditolak dan H_1 diterima dapat disimpulkan bahwa data yang digunakan mempunyai distribusi yang tersebar normal.

Lampiran 10 . Uji T- Independen

9.1 Immunohistokima GnRH

Group Statistics

Jenis_Pengujian	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Hasil Kontrol	25	2.7880	1.41224	.28245
Perlakuan	25	5.9600	1.92570	.38514

Independent Samples Test

	Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
								Lower	Upper
Hasil Equal variances assumed	3.148	.082	-6.641	48	.000	-3.17200	.47761	4.13230	2.21170
Equal variances not assumed			-6.641	44.024	.000	-3.17200	.47761	4.13454	2.20946

9.2 Hemaktosilin Eosin Hipofisis Anterior

Group Statistics

Jenis_Pengujian		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Hasil	Kontrol	25	92.3600	24.00500	4.80100
	Perlakuan	25	140.1600	31.46914	6.29383

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
Hasil	Equal variances assumed	3.130	.083	-6.038	48	.000	-47.80000	7.91592	63.71603	31.88397
	Equal variances not assumed			-6.038	44.866	.000	-47.80000	7.91592	63.74481	31.85519