

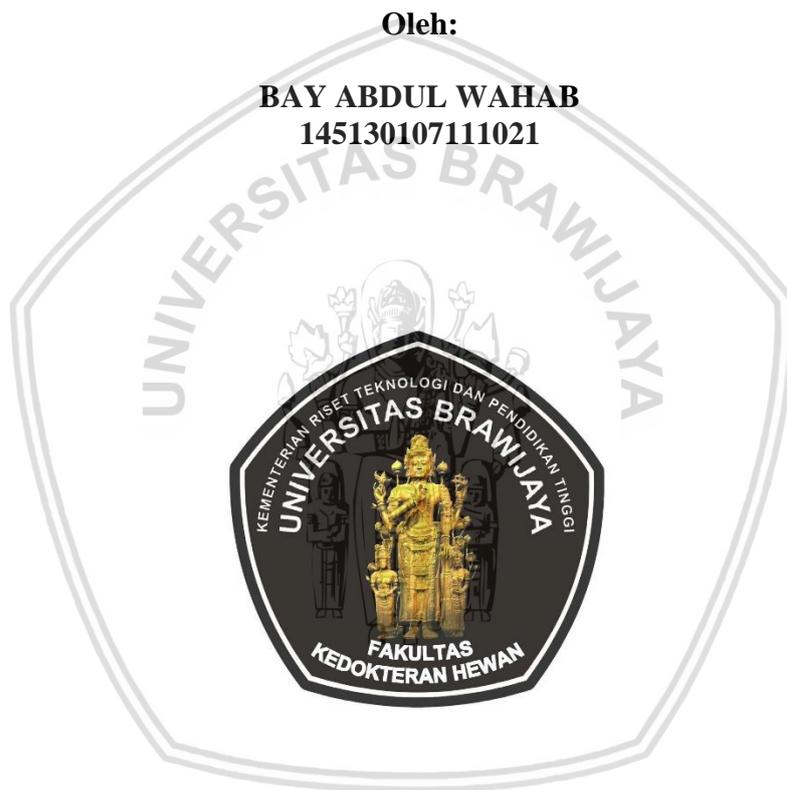
repository.ub.ac.id

**POTENSI EKSTRAK ETANOL TANAMAN PEGAGAN
(*Centella asiatica*) TERHADAP EKSPRESI ESTROGEN
RESEPTOR α DAN ESTROGEN RESEPTOR β
PADA JARINGAN TESTIS TIKUS PUTIH
(*Rattus norvegicus*) USIA TUA**

SKRIPSI

Oleh:

**BAY ABDUL WAHAB
145130107111021**



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**



repository.ub.ac.id

**POTENSI EKSTRAK ETANOL TANAMAN PEGAGAN
(*Centella asiatica*) TERHADAP EKSPRESI ESTROGEN
RESEPTOR α DAN ESTROGEN RESEPTOR β
PADA JARINGAN TESTIS TIKUS PUTIH
(*Rattus norvegicus*) USIA TUA**

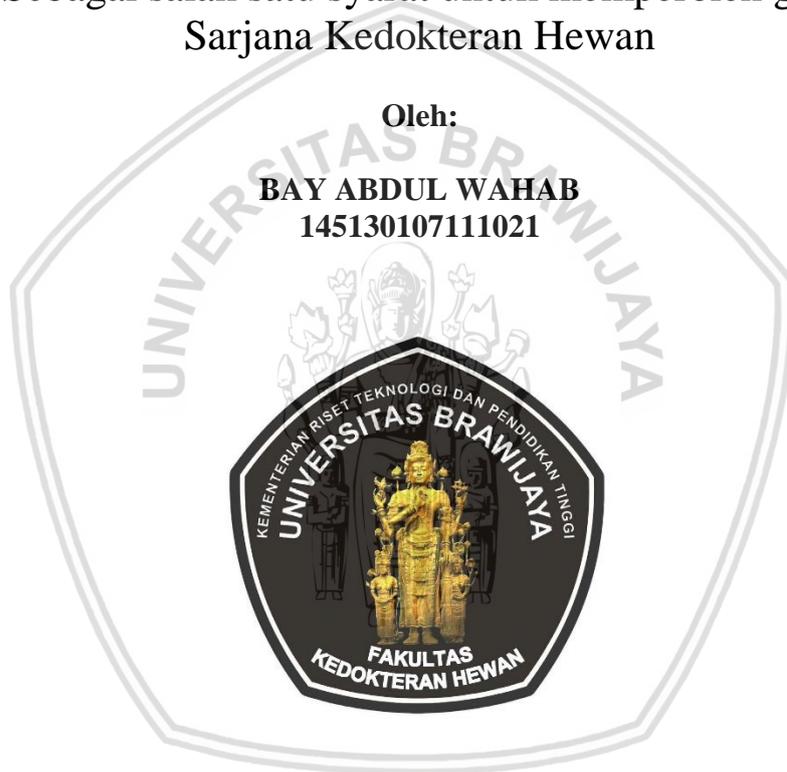
SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh:

BAY ABDUL WAHAB

145130107111021



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

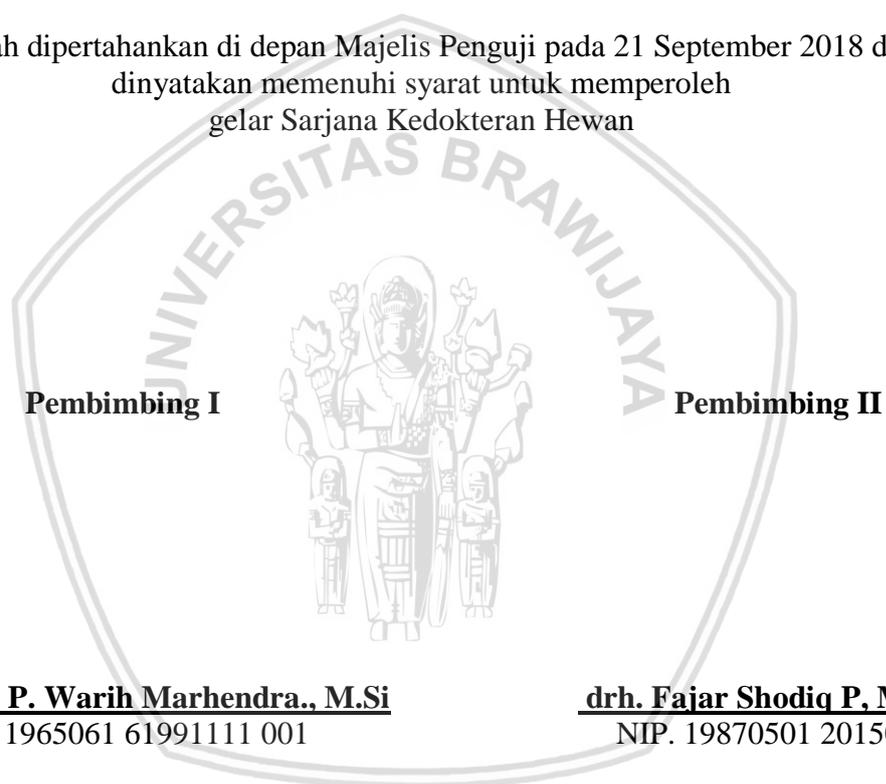


LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

Potensi Ekstrak Etanol Tanaman Pegagan (*Centella asiatica*) terhadap Ekspresi Estrogen Reseptor α dan Estrogen Reseptor β pada Jaringan Testis Tikus Putih (*Rattus novvergicus*) Usia Tua

Oleh :
Bay Abdul Wahab
145130101111067

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji pada 21 September 2018 dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran Hewan



Pembimbing I

Pembimbing II

Dr. Agung P. Warih Marhendra., M.Si
NIP. 1965061 61991111 001

drh. Fajar Shodiq P, M.Biotech
NIP. 19870501 201504 2 001

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Brawijaya

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



LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Bay Abdul Wahab
NIM : 145130107111021
Program Studi : Kedokteran Hewan
Penulis Skripsi berjudul :

Potensi Ekstrak Etanol Tanaman Pegagan (*Centella asiatica*) terhadap Ekspresi Estrogen Reseptor α dan Estrogen Reseptor β pada Jaringan Testis Tikus Putih (*Rattus novergicus*) Usia Tua

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 September 2018
Yang menyatakan,

Bay Abdul Wahab
NIM.145130107111021

Potensi Ekstrak Etanol Tanaman Pegagan (*Centella asiatica*) terhadap Ekspresi Estrogen Reseptor α dan Estrogen Reseptor β pada Jaringan Testis Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Usia Tua

ABSTRAK

Proses penuaan yang alami diakibatkan karena usia makhluk hidup yang bertambah. Penuaan terjadi karena proses fisiologis setiap makhluk hidup yang dimulai sejak lahir. Proses fisiologis tersebut mengakibatkan terjadinya penurunan produksi hormon, hormon yang mengalami penurunan yaitu hormon testosteron, *growth hormon*, dan hormon estrogen, kerja dari estrogen dimediasi oleh aktivasi 2 reseptor spesifik (estrogen reseptor) pada sel target, Estrogen Reseptor α (ER- α), dan Estrogen Reseptor β (ER- β). Ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) mengandung senyawa fitosterol yang bersifat estrogenik dan berfungsi untuk menggantikan hormon estrogen. Penelitian ini menggunakan tikus (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Sparague Dawley* (SD) berusia 2 tahun dengan berat badan sekitar 300 gram yang dibagi menjadi empat kelompok, yaitu : kelompok kontrol negatif, kelompok yang diberi ekstrak etanol *Centella asiatica* sebanyak 1 ml dengan dosis 100 mg/kg BB, kelompok yang diberi ekstrak etanol *Centella asiatica* sebanyak 1 ml dengan dosis 200 mg/kg BB, dan kelompok yang diberi ekstrak etanol *Centella asiatica* sebanyak 1 ml dengan dosis 300 mg/kg BB. Parameter yang diamati adalah ekspresi Estrogen Reseptor α dan ekspresi Estrogen Reseptor β melalui pewarnaan Imunohistokimia (IHK) data ekspresi dianalisis secara statistik dengan *one-way* ANOVA, $\alpha=0,05$. Didapatkan bahwa terjadi peningkatan ekspresi Estrogen Reseptor β , namun terjadi penurunan pada ekspresi Estrogen Reseptor α setelah pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan. Dosis terbaik yang didapatkan untuk meningkatkan ekspresi Estrogen Reseptor β yaitu pada dosis 200 mg/Kg BB

Kata kunci : Penuaan, Ekstrak etanol *Centella asiatica*, Estrogen Reseptor α , dan Estrogen Reseptor β .

Study of *Centella asiatica* With Ethanol Extract on Estrogen Receptor α and Estrogen Receptor β with Immunohistochemical Method On Old White Rat (*Rattus norvegicus*) Testes Tissue

ABSTRACT

The natural process of aging is due to the increasing age of living creatures. Process of aging occurs because of the physiological process of every being living. That begins at birth. The physiological process resulting reduction of hormones production, the decreasing hormones are testosterone, growth hormone, and estrogen. The work of estrogen mediated by activation of 2 specific receptor (estrogen receptor [ER]) at the cell target, Estrogen Receptor α (ER α), and Estrogen Receptor β (ER β). The extract ethanol of Pegagan (*Centella asiatica*) contain fitosterol compounds that are estrogenic and serves to replace oosterogen. This study used a 2-year old Sparague Dawley (*Rattus norvegicus*) male rats weight about 300 grams divided into four groups: positive control group of comparison that is given ethanol extract of *Centella asiatica* 1 ml with dose of 100 mg/kg BW, 200 mg/kg BW, and 300 mg/kg BW. The parameters observed were the expression of Estrogen Receptor α and Estrogen Receptor β through Immunohistochemical Immunization (IHK) expression data were analyzed statistically with one-way ANOVA, $\alpha = 0.05$. The result is showed that ethanol extract of *Centella asiatica* increase ER- β and decrease ER- α expression. The best dosage on this study is 200 mg/Kg BW.

Keyword : Aging, Ethanol Extract of *Centella asiatica*, Estrogen Receptor α (ER α), and Estrogen Receptor β (ER β).

KATA PENGANTAR

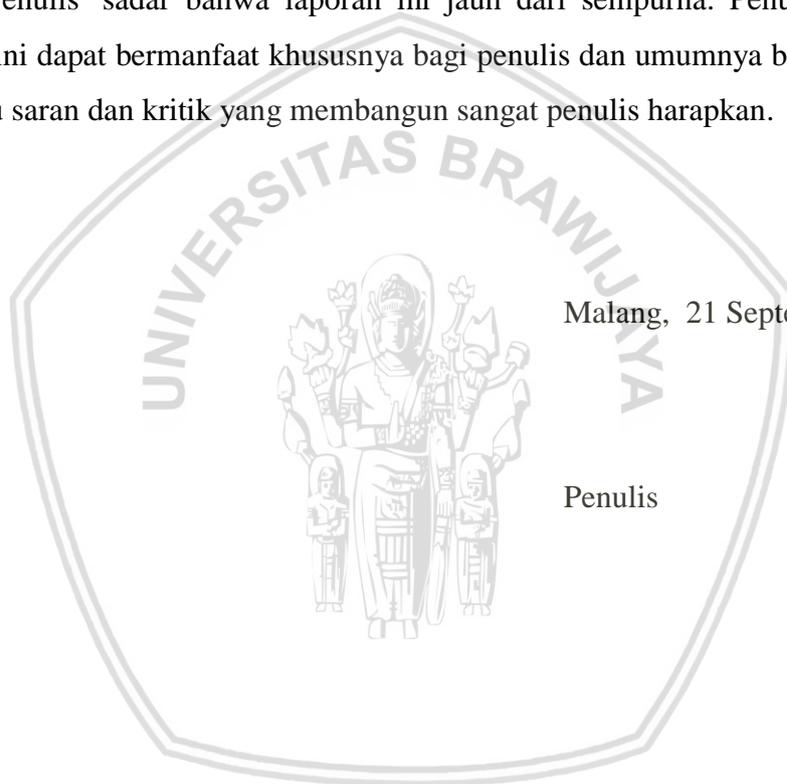
Puji dan syukur penulis panjatkan kehadiran Tuhan Yang Maha Esa yang telah melimpahkan berkat dan anugrah-Nya kepada penulis sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini yang berjudul “Potensi Ekstrak Etanol Tanaman Pegagan (*Centella asiatica*) terhadap Ekspresi Estrogen Reseptor α dan Estrogen Reseptor β pada Jaringan Testis Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Usia Tua” ini dapat terselesaikan.

Selama menyusun skripsi, penulis banyak mendapatkan arahan, bimbingan dan bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada :

1. Keluarga penulis, Ayah Helmi Nasution, Ibu Mahrani Lubis, Kakak Rabiatal Adawiyah, Kakak Maulana Inamul Hasan, Adik Fatimah Azzahra, Adik Umar bin Helmi, dan Adik M. Husein, yang selalu memberi doa, kasih sayang, dorongan dan dukungan untuk menyelesaikan skripsi serta perhatiannya akan kebutuhan saya baik secara moril maupun materi.
2. Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan.
3. Dr. Agung Pramana Warih M., M.Si. selaku dosen pembimbing I yang telah membantu penulis dalam mengarahkan dan memberi bimbingan, kesabaran, fasilitas, dan waktu yang telah diberikan serta dukungan kepada penulis dalam penyusunan dan penyempurnaan skripsi ini.
4. drh. Fajar Shodiq P., M.Biotech selaku dosen pembimbing II yang telah membantu penulis dalam mengarahkan dan memberi bimbingan, kesabaran, fasilitas, dan waktu yang telah diberikan serta dukungan kepada penulis dalam penyusunan dan penyempurnaan skripsi ini.
5. drh. Viski Fitri Hendrawan, M.Vet dan drh. Aulia Firmawati, M.Vet selaku penguji I dan penguji II.
6. Teman-teman Deer (2014 D), khususnya grup mabar Mobile Legend (Putra, Riyan, Adit, Imam, Venny, Kholif, Faiz) yang selalu memberikan motivasi kepada penulis, sampai penulis mempunyai mental yang kuat.

7. Teman-teman SMA Anggara Irawan, Ahmad Handoko dan Nadia Yoneza yang selalu menemani penulis ketika butuh saran.
8. Rekan-rekan kontrakan Deden, Aldi, Febri Komting, Adi PJ yang selalu memberikan keceriaan dan dorongan semangat pada penulis.
9. Rekan sejawat kedokteran hewan Ikke Alma Alukka yang selalu memberikan keceriaan, bantuan dan semangat tersendiri kepada penulis.

Penulis sadar bahwa laporan ini jauh dari sempurna. Penulis berharap laporan ini dapat bermanfaat khususnya bagi penulis dan umumnya bagi pembaca untuk itu saran dan kritik yang membangun sangat penulis harapkan.



Malang, 21 September 2018

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
LEMBAR PERNYATAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG	xiii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Batasan Masalah	3
1.4 Tujuan Penelitian	4
1.5 Manfaat Penelitian	4
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Penuaan (<i>aging</i>)	5
2.1.1 Tahapan proses penuaan	5
2.1.2 Teori penuaan	6
2.2 Tanaman Pegagan (<i>Centella asiatica</i>)	8
2.2.1 Kandungan tanaman pegagan	10
2.2.2 Tanaman pegagan sebagai profertilitas	10
2.3. Hewan coba	11
2.3.1 Konversi umur tikus	13
2.4. Testis	14
2.5. Spermatogenesis	16
2.6. Estrogen	19
2.6.1 Struktur Estrogen	19
2.6.2 Metabolisme Estrogen	21
2.6.3 Reseptor Estrogen	22
2.6.4 Perbedaan ER- α dan ER- β	23
2.6.5 Peran Estrogen pada Sistem Reproduksi Pria	24
2.6.6 Peran Estrogen pada Spermatogenesis	25
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN	26
3.1 Kerangka Konseptual	26
3.2 Hipotesis Penelitian	28

BAB 4 METODE PENELITIAN	29
4.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	29
4.2 Sampel Penelitian	29
4.3 Rancangan Penelitian	30
4.4 Variabel Penelitian Penelitian	31
4.5 Materi Penelitian.....	31
4.5.1 Alat	31
4.5.2 Bahan	31
4.6 Tahapan Penelitian.....	32
4.6.1 Preparasi Hewan Coba.....	32
4.6.2 Pembuatan Ekstrak Etanol <i>Centella asiatica</i>	32
4.6.3 Pemberian Ekstrak Etanol pada Hewan Coba	33
4.6.4 Pengambilan Sampel Organ Testis.....	33
4.6.5 Pembuatan Preparat Histologis Testis	34
4.6.6 Analisis Ekspresi Reseptor Hormon Estrogen α dan β	34
4.6.7 Analisis Data.....	37
BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN	38
5.1 Hasil Pengukuran Ekspresi RE- α	38
5.2 Hasil Pengukuran Ekspresi RE- β	42
BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN	48
6.1 Kesimpulan	48
6.2 Saran	48
DAFTAR PUSTAKA	49

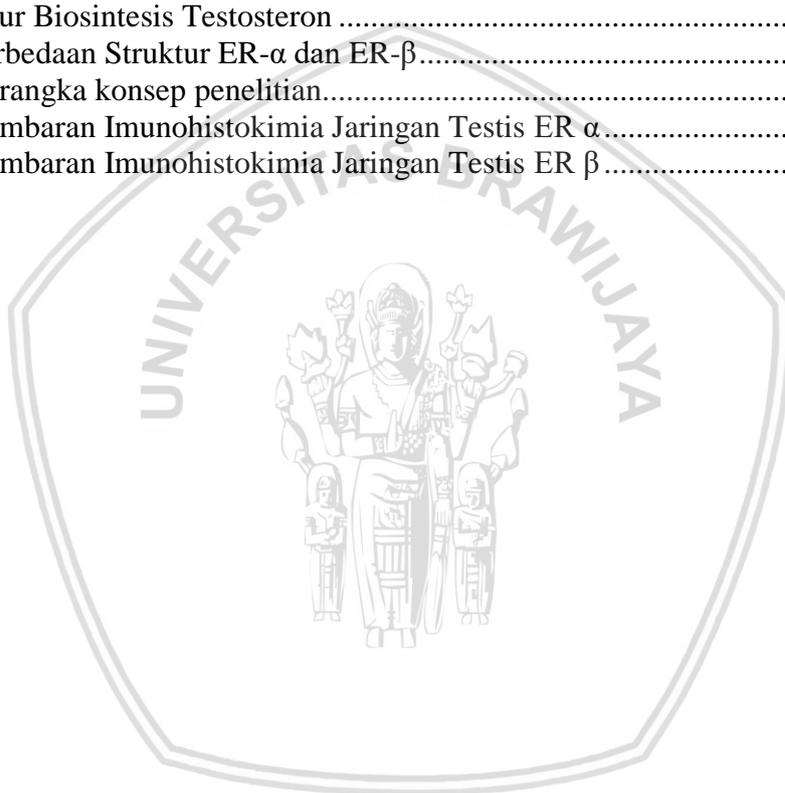
DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
2.1 Kandungan Nutrisi Pegagan.....	10
2.2 Hubungan Antara Umur Tikus dan Umur Manusia.....	13
4.1 Kelompok Perlakuan pada Penelitian	30
5.1 Hasil Uji Tukey Terhadap Ekspresi ER- α	40
5.2 Hasil Uji Tukey Terhadap Ekspresi ER- β	45



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Tanaman Pegagan (<i>Centella Asiatica</i>).....	9
2.2 Tikus Putih.....	11
2.3 Anatomi Testis.....	15
2.4 Penampang histologi sel Leydig.....	15
2.5 Skema Spermatogenesis	17
2.6 Estron, Estradiol, dan Estriol	20
2.7 Jalur Biosintesis Testosteron	22
2.8 Perbedaan Struktur ER- α dan ER- β	24
3.1. Kerangka konsep penelitian.....	26
5.1 Gambaran Imunohistokimia Jaringan Testis ER α	39
5.2 Gambaran Imunohistokimia Jaringan Testis ER β	43



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Skema Penelitian	55
2. Pembuatan Ekstrak Etanol Tanaman Pegagan	56
3. Perhitungan Dosis Terapi Ekstrak Etanol Tanaman Pegagan	57
4. Pembuatan Preparat Histologi Testis	59
5. Metode Imunohistokimia	60
6. Determinasi Tanaman Pegagan	61
7. Sertifikat Laik Etik	62
8. Uji Anova Estrogen Receptor α	63
9. Uji Anova Estrogen Receptor β	66



DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

Ab	: Antibodi
ANOVA	: <i>Analysis of Variance</i>
AOAC	: <i>Association of Official Analytical Chemists</i>
BB	: Berat Badan
DNA	: <i>Deoxyribonucleid Acid</i>
ER- α	: <i>Estrogen Receptor Alpha</i>
ER- β	: <i>Estrogen Receptor Beta</i>
g	: gram
IHK	: Imunohistokimia
kg	: kilogram
KP	: Kontrol Positif
mg	: miligram
mL	: mililiter
NaCl	: <i>Natrium Chloride</i>
PBS	: <i>Phospat Buffered Saline</i>
PFA	: <i>Polysaturated Fatty Acids</i>
Ph	: <i>potential of hydrogen</i>
PO	: Per Oral
RAL	: Rancangan Acak Lengkap
SD	: Sparague Dawley
TEM	: <i>Transmission Electron Microscopy</i>
TLC	: <i>Thin Layer Chromatography</i>
HSP	: <i>Horse Radish Peroxide</i>



BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Penelitian

Peningkatan usia berpengaruh terhadap tingkat abnormalitas spermatozoa, hal ini disebabkan karena pejudantan dengan usia yang semakin tua akan mengalami degenerasi pada sel-sel tubuh termasuk organ reproduksi (Alvionita dkk., 2015). Semua organ akan menyusut dan bermanifestasi dalam bentuk penurunan level hormon, seperti estrogen, progesteron, testosteron, tiroid, dan melatonin (Stoica dkk., 2003).

Pada proses penuaan terjadi penurunan produksi hormon, hormon yang mengalami penurunan yaitu hormon testosteron, *growth hormon*, dan hormon estrogen (Pangkahila, 2007). Estrogen memiliki peran penting dalam memastikan fungsi dari traktus reproduktif jantan berfungsi baik. Sumber utama dari hormon Estrogen tersebut berasal dari proses aromatisasi dari testosteron (Myles dan Cooper, 2009).

Kerja dari esterogen dimediasi oleh aktivasi 2 reseptor spesifik (Estrogen Reseptor α atau β) pada sel target, ER α , dan ER β yang mana memiliki faktor transkripsi *homologous ligand-inducible* faktor yang tinggi meregulasi ekspresi dari gen spesifik, sehingga penurunan produksi estrogen mengakibatkan penurunan estrogen reseptor (O'Donnel, 2001).

Komplek estrogen-reseptor akan memberikan umpan balik negatif pada aksis hipotalamus-hipofisis-testis (Lazari dkk., 2009). Spermatogenesis membutuhkan keseimbangan aksis hipotalamus-hipofisis-testis, dan estrogen

memiliki peran dalam menjaga keseimbangan tersebut (D'Souza dkk., 2005). Estrogen dalam keseimbangan ini memiliki peran sebagai pengaruh tidak langsung terhadap spermatogenesis. Peran secara langsung estrogen pada spermatogenesis adalah mempengaruhi maturasi dari sel germinativum (Carreau dkk., 2011).

Menurut penelitian Lusiana dkk (2013) tanaman pegagan memiliki kemampuan sebagai bahan profertilitas yang dapat mempengaruhi motilitas spermatozoa mencit. Tumbuhan pegagan (*Centella asiatica*) memiliki kandungan yang dapat menyuburkan pembentukan spermatozoa. Salah satu senyawa kimia yang terkandung di dalam tanaman pegagan adalah fitosterol. Fitosterol merupakan turunan senyawa sterol sebagai bahan baku pembentuk hormon seksual. Hal ini dapat menyebabkan pada pembentukan spermatozoa jumlahnya menjadi lebih banyak atau meningkat (Samsiar dkk., 2013).

Penelitian ini diharapkan dapat mengetahui potensi ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) dapat meningkatkan ekspresi Estrogen Reseptor β (ER β) pada jaringan testis tikus putih (*Rattus norvegicus*) usia tua dan ekspresi Estrogen Reseptor α (ER α) dengan metode Imunohistokimia (IHK).

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka dapat dirumuskan masalah sebagai berikut :

1. Apakah pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) dapat mempengaruhi ekspresi Estrogen Reseptor α pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) usia tua?.

2. Apakah pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) dapat mempengaruhi ekspresi estrogen Reseptor β pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) usia tua?.

1.3 Batasan Masalah

Batasan dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Hewan coba yang digunakan yaitu tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) sejumlah 20 ekor dengan usia 2 tahun dan berat badan 300 gram.
2. Dosis pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) sebanyak 100 mg/kgBB, 200 mg/kgBB, 300mg/kgBB yang diberikan secara peroral selama 21 hari (Gohil dkk., 2010).
3. Volume pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) yang diberikan sebanyak 1 mL (1 kali perhari) selama 21 hari yang diberikan secara peroral (PO) sesuai dengan kelompok perlakuanSimplisia tanaman pegagan telah mendapat determinasi tumbuhan dari UPT Materia Mecida Batu No. 074/373/102.7/2017 (Lampiran 6).
4. Pembacaan ekspresi hormon estrogen α dan β dianalisa dengan metode Imunohistokimia (IHK). Pengamatan dilakukan dengan mikroskop cahaya dengan 20 lapang pandang, dengan pembesaran 1000x dan dihitung degan melihat sel yang terwarnai coklat (Aulanni'am, 2011).
5. Analisa hasil menggunakan perhitungan manual yang dianalisis dengan ANOVA menggunakan Microsoft Office Excel dan SPSS untuk Windows dengan $\alpha=0,05$.

1.4 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah :

1. Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) dapat meningkatkan kadar reseptor estrogen α pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) usia tua.
2. Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) dapat meningkatkan kadar reseptor estrogen β pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) usia tua.

1.5 Manfaat Penelitian

Adapun manfaat yang diharapkan oleh penulis dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Penelitian ini dapat digunakan sebagai kajian ilmiah pemanfaatan tanaman pegagan (*Centella asiatica*) untuk meningkatkan reseptor estrogen α dan β .
2. Penelitian ini dapat digunakan sebagai literatur pemanfaatan tanaman pegagan (*Centella asiatica*) sebagai profertilitas dalam dunia kedokteran hewan.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Penuaan

Setiap organisme akan mengalami penuaan atau proses *aging* yang alami diakibatkan oleh bertambahnya usia makhluk hidup. Setelah mencapai usia dewasa, secara alamiah seluruh komponen tubuh tidak berkembang lagi. Dengan semakin bertambahnya usia, maka akan terjadi penurunan berbagai fungsi organ tubuh dan terjadinya perubahan fisik, dari tingkat seluler, organ, hingga sistem karena proses penuaan. Hal ini dapat terjadi pada semua organisme dan tidak dapat dihindari serta berlangsung seiring dengan bertambahnya waktu (Baskoro dan Konthen, 2008).

Penuaan pada pria atau pejantan tidak menyebabkan berkurangnya ukuran dan berat testis tetapi sel yang memproduksi dan memberi nutrisi yaitu sel leydig pada sperma akan berkurang. Penurunan jumlah dan aktivitas sel leydig menyebabkan sperma berkurang hingga 50% dan testoteron juga mengalami penurunan. Hal ini menyebabkan penurunan libido dan kegiatan seksual pada pejantan usia tua (Soejono, 2004).

2.1.1 Tahapan Proses Penuaan

Proses penuaan tidak terjadi begitu saja dengan langsung menampilkan perubahan perubahan fisik dan psikis. Proses penuaan berlangsung melalui tiga tahap sebagai berikut (Pangkahila, 2007) :

1. Tahap Subklinik

Pada tahap ini, sebagian besar hormon di dalam tubuh mulai mengalami penurunan. Hormon yang mengalami penurunan yaitu hormon

testosteron, *growth hormon*, dan hormon estrogen. Pembentukan radikal bebas dapat merusak sel dan DNA mulai mempengaruhi tubuh. Kerusakan ini biasanya tidak tampak dari luar. Maka dari itu, pada usia ini masih dianggap usia muda dan normal.

2. Tahap Transisi

Pada tahap ini kadar hormon menurun sampai 25%. Massa otot mulai berkurang sebanyak satu kilogram setiap tahunnya. Pada tahap ini, organisme mulai merasa tidak muda dan tampak lebih tua. Kerusakan oleh radikal bebas mulai merusak ekspresi genetik yang dapat mengakibatkan penyakit seperti kanker, jantung koroner, diabetes, radang sendi hingga berkurangnya memori pada otak.

3. Tahap Klinik

Pada tahap ini penurunan kadar hormon terus berlanjut yang meliputi melatonin, *growth hormon*, testosteron, estrogen dan juga hormon tiroid. Terjadi penurunan hormon hingga hilangnya kemampuan penyerapan bahan makanan, vitamin dan mineral. Penyakit kronis menjadi lebih nyata dan sistem organ tubuh mulai mengalami kegagalan.

2.1.2. Teori Penuaan

1. Teori *Wear And Tear* (Dipakai dan Rusak)

Teori *Wear And Tear* mengajukan akumulasi sampah metabolik atau zat nutrisi dapat merusak sintesis DNA. August Weissmann berpendapat bahwa sel somatik normal memiliki kemampuan yang terbatas dalam bereplikasi dan

menjalankan fungsinya. Kematian sel terjadi karena jaringan yang sudah tua tidak beregenerasi. Teori *wear and tear* mengungkapkan bahwa organisme memiliki energi tetap yang tersedia dan akan habis sesuai dengan waktu yang diprogramkan (Stanley dkk., 2006).

2. Teori Imunitas

Teori imunitas berhubungan langsung dengan proses penuaan. Selama proses penuaan, sistem imun juga akan mengalami kemunduran dalam pertahanan terhadap organisme asing yang masuk ke dalam tubuh sehingga pada lansia akan sangat mudah mengalami infeksi dan kanker (Stanley dkk., 2006), perubahan sistem imun ini diakibatkan perubahan pada jaringan limfoid sehingga tidak adanya keseimbangan dalam sel T untuk memproduksi antibodi dan kekebalan tubuh menurun (Toni dan Hardiwinoto, 1999).

3. Teori Lipofusin dan Radikal Bebas

Radikal bebas merupakan contoh produk sampah metabolisme yang dapat menyebabkan kerusakan apabila terjadi akumulasi. Normalnya radikal bebas akan dihancurkan oleh enzim pelindung, namun beberapa berhasil lolos dan berakumulasi di dalam organ tubuh. Radikal bebas yang terdapat di lingkungan seperti kendaraan bermotor, radiasi, sinar ultraviolet, mengakibatkan perubahan pigmen dan kolagen pada proses penuaan (Toni dan Hardiwinoto, 1999).

4. Teori Neuroendokrin

Teori neuroendokrin merupakan teori yang mencoba menjelaskan tentang terjadinya proses penuaan melalui hormon. Penuaan terjadi karena adanya keterlambatan dalam sekresi hormon tertentu sehingga berakibat pada sistem saraf.

Hormon dalam tubuh berperan dalam mengorganisasi organ-organ tubuh melaksanakan tugasnya dan menyeimbangkan fungsi tubuh apabila terjadi gangguan dalam tubuh.

Pengeluaran hormon diatur oleh hipotalamus dan hipotalamus juga merespon tingkat hormon tubuh sebagai panduan untuk aktivitas hormonal. Pada lansia, hipotalamus kehilangan kemampuan dalam pengaturan dan sebagai reseptor yang mendeteksi hormon individu menjadi kurang sensitif. Oleh karena itu, pada lansia banyak hormon yang tidak dapat disekresi dan mengalami penurunan efektifitasnya (Miller, 1999).

Penurunan kemampuan hipotalamus dikaitkan dengan hormon kortisol. Kortisol dihasilkan dari kelenjar adrenal (terletak di ginjal) dan kortisol bertanggung jawab untuk stres. Hal ini dikenal sebagai salah satu dari beberapa hormon yang meningkat dengan usia. Jika kerusakan kortisol hipotalamus, maka seiring waktu hipotalamus akan mengalami kerusakan. Kerusakan ini kemudian dapat menyebabkan ketidakseimbangan hormon sebagai hipotalamus kehilangan kemampuan untuk mengendalikan sistem (Dilman, 2006).

2.2. Tanaman Pegagan

Pegagan merupakan tanaman liar yang banyak tumbuh di perkebunan, pematang sawah, tepi jalan dan di ladang. Pegagan tumbuh merayap menutupi tanah serta tidak memiliki batang tanaman. Tanaman pegagan memiliki tinggi sekitar 10 cm hingga 50 cm. Pegagan memiliki daun satu helaian yang tersusun dalam roset akar dan terdiri dari 2 sampai 10 helai daun. Daunnya berwarna hijau

dan berbentuk seperti kipas. Tangkai daun tanaman pegagan berbentuk seperti pelepah yang agak panjang dan berukuran 5 cm hingga 15 cm. Pada tangkai daunnya terdapat daun sisik yang sangat pendek, licin dan tidak berbulu. Pegagan memiliki bunga putih atau merah muda yang tersusun dalam karangan yang berbentuk payung. Buah pegagan berbentuk lonjong atau pipih, rasanya pahit dan panjang buahnya 2 mm sampai 2,5 mm. Buah pegagan berdinding agak tebal, kulitnya keras, berlekuk dua dan berwarna kuning (Winarto dan Surbakti, 2003).



Gambar 2.1. Tanaman pegagan (*Centella asiatica*) (Solihati, 2013).

Berdasarkan deskripsi yang telah diuraikan, berikut adalah klasifikasi dari tanaman pegagan (Newal dkk., 1996) :

- Kingdom : *Plantae*
Divisi : *Spermatophytia*
Famili : *Umbelliferae*
Genus : *Centella*
Species : *Centella asiatica*

2.2.1. Kandungan Tanaman Pegagan

Tanaman pegagan memiliki berbagai macam senyawa aktif yaitu triterpenoid, minyak essensial, flavonoid dan komponen lainnya seperti polisakarida, *polyne-alkaline*, asam amino, asam lemak, alkaloid, sterol, carotenoid, tannin, klorofil, garam inorganik, dll. Telah diketahui bahwa efek farmakologi utama dari pegagan diketahui berasal dari kandungan senyawa triterpenoid. Berikut adalah kandungan nutrisi dari tanaman pegagan (**Tabel 2.1**) (Kormin, 2005) :

Tabel 2.1. Kandungan Nutrisi Pegagan

Tanaman Pegagan (<i>Centella asiatica</i>)	% E.P	Komposisi nutrient per 100g sampel						
		Proximate komposisi						
Kcl	g	g	g	g	g	g	g	
Energy	Air	Protein	Lemak	CHO	Serat	Ash		
37	87,7	2	0,2	6,7	1,6	1,8		
Vitamin								
µg	µg	µg	µg	µg	µg	µg	µg	
Retinol	Karoten	RE	B1	B2	Niacin	C		
0	2649	442	0,09	0,19	0,1	48,5		
Mineral								
mg	mg	mg	mg	mg	-	-		
Ca	P	Fe	Na	K				
171	32	5,6	21	391				

2.2.2 Tanaman Pegagan sebagai Profertilitas

Pegagan merupakan salah satu tanaman obat yang sangat bermanfaat untuk kesehatan. Salah satu senyawa yang terdapat di dalam tanaman pegagan adalah madecocassosida yang bermanfaat dalam memicu produksi kolagen. Kolagen sangat bermanfaat dalam membantu merangsang regenerasi sel kulit. Selain itu, kolagen juga berfungsi meregenerasi sel telur pada betina dan sel sperma pada jantan. Kandungan karoten yang ada di dalam pegagan adalah antioksidan

alami, selain itu, manfaat dari karoten juga meningkatkan kualitas sel telur dan sel sperma.

Menurut penelitian Lusiana dkk (2013) bahwa selain kandungan triterpenoid yang mendominasi, ternyata tanaman pegagan juga mengandung fitosterol yang merupakan turunan senyawa sterol sebagai bahan baku pembentuk hormon seksual. Senyawa fitosterol dapat mempengaruhi sel leydig memproduksi testosteron. Hormon testosteron berfungsi untuk produksi estrogen melalui proses aromatase, kerja dari hormon estrogen dimediasi oleh aktivasi reseptor estrogen α atau β .

2.3 Hewan coba

Hewan coba merupakan hewan yang digunakan sebagai hewan model guna mempelajari dan mengembangkan berbagai macam ilmu dalam skala penelitian dan pengamatan penelitian (Smith dan Mangkoewidjojo, 1998). Ciri-ciri pada tikus putih, yaitu rambut berwarna putih, mata merah, panjang tubuh sepanjang 440 mm, panjang ekor men capai 205 mm serta pada usia dewasa berat bandanya berkisar sekitar 100-105 gram (**Gambar 2.2**) (Akbar, 2010).



Gambar 2.2. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) (Akbar, 2010).

Tikus *Sprague Dawley* merupakan jenis tikus albino serbaguna digunakan secara ekstensif dalam riset medis. Keuntungan utamanya adalah ketenangan dan kemudahan penanganannya. Berat badan dewasa yaitu 250 g sampai 300 g untuk betina, sedangkan pada tikus jantan memiliki ukuran sekitar 450 g sampai 520 g. Tikus ini biasanya memiliki ekor untuk meningkatkan rasio panjang tubuh (Solihati, 2013).

Berikut klasifikasi tikus *Rattus norvegicus* menurut Sugiyanto (1995) :

Kingdom	: <i>Animalia</i>
Kelas	: <i>Mamalia</i>
Ordo	: <i>Rodentia</i>
Famili	: <i>Muridae</i>
Genus	: <i>Rattus</i>
Spesies	: <i>Rattus norvegicus</i>

Mencit juga termasuk mamalia yang dianggap memiliki struktur anatomi pencernaan mirip manusia, mudah ditangani dan mudah diperoleh dengan harga relatif murah dibandingkan hewan uji yang lain (Mangkoewidjojo, 1998). Berat badan mencit jantan dewasa 300-400 gram dan mencit betina dewasa 250-300 gram. Waktu dewasa seksual mencit kurang lebih 60 hari, dan usia maksimum mencit adalah 1-2 tahun. Mencit yang digunakan dalam penelitian adalah mencit laboratorium. Tikus putih yang digunakan untuk percobaan laboratorium yang dikenal ada tiga macam jalur galur yaitu *Sprague Dawley*, *Long Evans* dan *Wistar*. Tikus *Rattus norvegicus* digunakan dalam setiap penelitian karena memiliki keunggulan berupa asam amino, sistem metabolisme dan organnya hampir sama

dengan manusia sehingga memudahkan dalam penelitian, perkembangannya cepat dan mudah dipelihara dalam jumlah yang banyak (Akbar, 2010).

2.3.1. Konversi Umur Tikus

Dalam suatu penelitian yang membutuhkan hewan uji di dalamnya, diperlukan suatu data konversi dosis untuk mengetahui dosis yang penyetaraan dari manusia ke hewan uji dan sebaliknya. Bila dibandingkan dengan manusia, tikus mempunyai waktu hidup yang singkat dan pertumbuhan yang sangat pesat pada masa mudanya. Tikus berkembang pesat pada masa muda dan mulai matang saat umur 6 minggu. Berbeda dengan manusia yang mempunyai pertumbuhan yang lambat dan pubertas pada kisaran umur 12 sampai 13 tahun.

Pada masa dewasa setiap bulan umur tikus setara dengan 2,5 tahun umur manusia. Tikus yang digunakan sebagai hewan uji memiliki usia sekitar 2 tahun sedangkan ekspektasi waktu hidup pada manusia yaitu sekitar 60 tahun (Andreollo dkk., 2012). Hubungan antara umur tikus dalam bulan dan umur manusia dalam tahun pada fase dewasa (**Tabel 2.2**)

Tabel 2.2. Konversi Antara Umur Tikus dan Umur Manusia

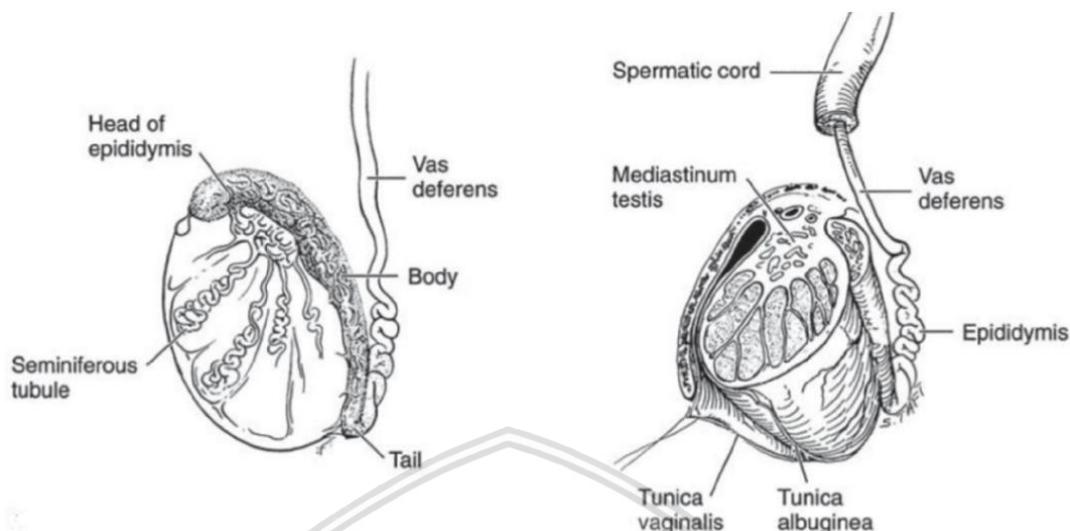
Umur Tikus (bulan)	Umur Manusia (tahun)
6	18
12	30
18	45
24	60
30	75
36	90
42	105
45	113
48	120

(Andreollo dkk., 2012).

2.4 Testis

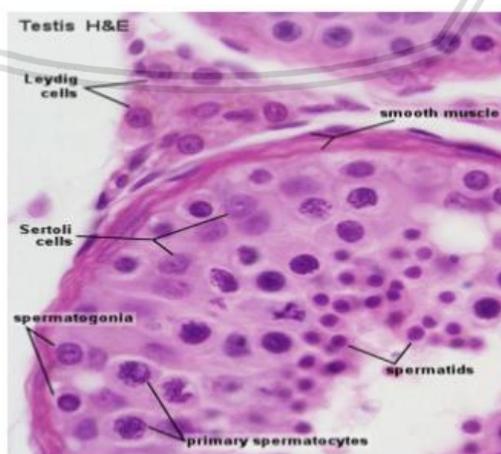
Organ utama dari sistem reproduksi jantan adalah testis. Berada dalam kantung skrotum. Testis bertanggung jawab atas steroidogenesis dan spermatogenesis dalam pertumbuhan sel-sel germinal haploid. Fungsi tersebut terjadi pada sel-sel leydig dan tempat pembentukan sperma tubulus seminiferus. Pada bagian luar berbentuk convex dan licin. Testis dilindungi oleh *tunica vaginalis propina* yang di dalamnya terdapat *ductus epididimis* dan *ductus deferens*. Di dalam tubuli mengandung sel leydig berfungsi menghasilkan hormon testosteron. Tubulus seminiferus *contorti* menuju ke tubulus seminiferus *rectus* yang akan membentuk *rete testis* dan akan menyalurkan spermatozoa ke *ductus epididimis* (Fox, 2002).

Diantara tubulus seminiferus di dalam testis terdapat sel leydig yang merupakan sel *interstitial* berfungsi mensekresikan testosteron ke dalam pembuluh darah. Selain sel germinal, di dalam tubulus seminiferus juga terdapat sel sertoli. Sel ini berperan secara metabolik dan struktural untuk menjaga spermatozoa yang sedang berkembang juga memfagosit sitoplasma spermatid yang telah dikeluarkan. Sel sertoli mensekresikan *Androgen Binding Protein* (ABP), inhibin, dan *Mullerin Inhibiting Substance* (MIS). Sel sertoli mengandung aromatase, enzim yang berperan dalam perubahan androgen menjadi estrogen (Faranita, 2009).



Gambar 2.3 Anatomi Testis, duktus efferen, epididimis, dan duktus deferens (McAninch dkk., 2013).

Sel Leydig adalah sel yang terletak pada pars interstitial dekat dengan kapiler dan di antara tubulus seminiferus. Sel yang memiliki bentuk nukleus bulat dan sitoplasma pucat dengan vakuola lemak ini berasal dari derivat *mesoderm*. Sel ini memiliki retikulum endoplasma halus yang dominan pada sitoplasmanya. Retikulum endoplasma halus ini berkontribusi mensekresi hormon testosteron (Cui, 2011).

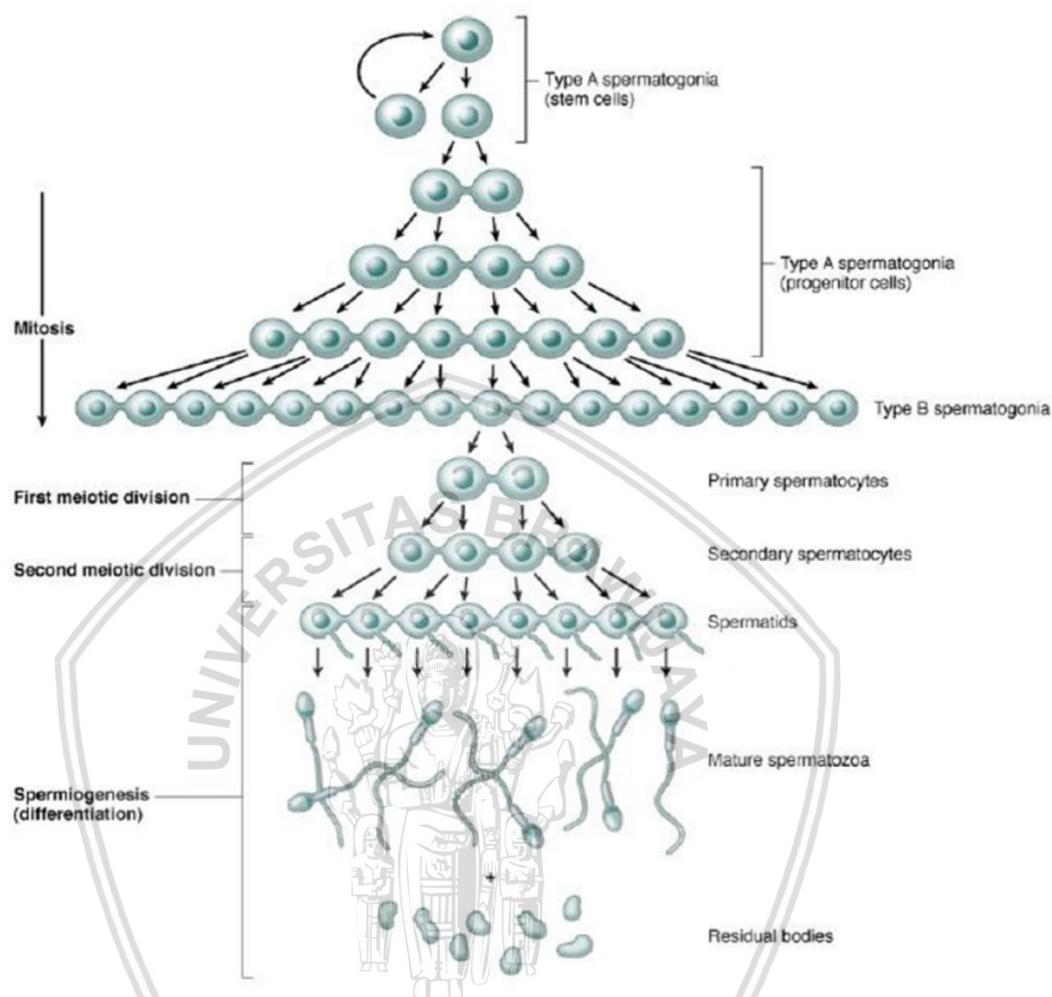


Gambar 2.4 Penampang histologi sel Leydig dan sel Sertoli (Hill dkk., 2004).

Sel sertoli dalam tubulus seminiferus mampu mempertahankan ketersediaan nutrisi selama berlangsungnya spermatogenesis. Sel sertoli yang berfungsi sebagai *Blood testis barrier*, penghasil hormon inhibin dan aromatisasi hormone testosterone menjadi *estradiol 17 β* (estrogen). Dasar sel sertoli menempel pada membran *basalis* dan menjulur menuju lumen tubulus seminiferus. Sel sertoli memanjang dengan inti sel berbentuk oval, di dalamnya berisi satu atau banyak nukleolus, satu bagian bersifat eosinofilik dan atau bagian lainnya bersifat basofilik (Susilawati, 2011).

2.5 Proses Spermatogenesis

Spermatogenesis memiliki empat tahap utama, yaitu: mitosis (spermatogoniogenesis), meiosis, spermiogenesis, dan spermiasi (Weinbauer dkk., 2010). Waktu yang diperlukan untuk spermatogenesis adalah 74 hari (Guyton dan Hall, 2006). Spermatogenesis dimulai dari tahap proliferasi dan diferensiasi spermatogonia. Spermatogonia adalah sel benih primitif yang terletak pada membran basalis tubulus seminiferus. Sel ini memiliki dua tipe, yaitu tipe A dan tipe B. Spermatogonia tipe B berkembang dari tipe A (Cui, 2011). Proses ini berlangsung dengan satu spermatogonia tipe B menyebrang blood testis barrier dan berlanjut sebagai satu spermatosit primer yang memiliki 46 kromosom (44+XY) dan DNA mengandung 4N (tetraploid) melalui proses mitosis (Weinbauer dkk., 2010).



Gambar 2.5 Skema spermatogenesis (Junqueira dkk., 2009).

Spermatogonia tipe A bertindak sebagai sel induk dan akan membelah membentuk sel induk baru dan spermatogonia tipe A lainnya yang merupakan progenitor dari spermatosit. Pembelahan ini menyisakan sitoplasma yang menyatu antar sel (*intercellular bridge*). Spermatosit tipe A membelah secara mitosis dua atau tiga kali, dan pada akhir mitosis membentuk spermatogonia tipe B yang akan menjadi spermatosit primer melalui proses meiosis I. Dari spermatosit primer akan menjadi spermatosit sekunder melalui proses meiosis II. *Intercellular bridge* ini

hilang pada saat spermatid menjadi spermatozoa melalui proses spermiogenesis. Sisa sitoplasma spermatid akan menjadi badan residual yang akan difagositosis sel Sertoli (Junqueira dkk., 2009).

Terbentuknya spermatosit primer merupakan awal dari fase meiosis (Cui, 2011). Satu spermatosit primer akan mengalami meiosis I dan menjadi dua spermatosit sekunder yang memiliki 23 kromosom (23+X, 23+Y) dan tiap sel memiliki dua kromatid jadi jumlah DNA $2N$ (diploid).

Spermatosit sekunder ini sangat cepat masuk pada fase meiosis II, sehingga sel ini sukar untuk diteliti (Cui, 2011). Hasil dari meiosis II adalah empat spermatid. Karena antara meiosis I dan II tidak terdapat fase S (replikasi DNA), sehingga jumlah DNA berkurang menjadi setengah ketika kromatid memisah dan jumlah DNA $1N$ (haploid). Spermatid berdasarkan bentuk nukleusnya diklasifikasikan menjadi spermatid awal, pertengahan, dan akhir (Cui, 2011).

Spermatid akhir ini yang akan mengalami kondensasi dan perubahan nukleus, pembentukan flagel, serta pelepasan sebagian besar sitoplasma melalui proses spermiogenesis. Tahapan pertama dari proses morfologik ini adalah fase golgi, terkumpulnya granula badan golgi spermatid membentuk granula akrosom yang berada di vesikula akrosom. Selama fase akrosom, vesikula akrosom akan menutupi setengah bagian anterior nukleus spermatid yang memadat disebut akrosom. Akrosom mengandung beberapa enzim hidrolitik, seperti *hialuronidase*, *neuraminidase*, *fosfatase asam*, dan *protease* yang memiliki aktivitas seperti tripsin. Enzim-enzim inilah yang memudahkan sperma menembus *corona radiata* dan *zona*

pelusida sel ovum. Pada fase ini membran plasma menuju ke posterior nukleus menutupi flagel dan mitokondria beragregasi membentuk suatu selubung pada bagian *proximal* dari *flagel*.

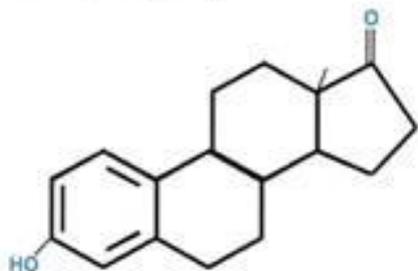
Fase maturasi ditandai dengan pelepasan sisa sitoplasma spermatid menjadi badan residual yang akan difagositosis oleh sel Sertoli (Junqueira dkk., 2009). Fase akhir spermatogenesis adalah spermiasi, yaitu pelepasan spermatozoa dari epitel tubulus seminiferus (Cui, 2011).

2.6 Estrogen

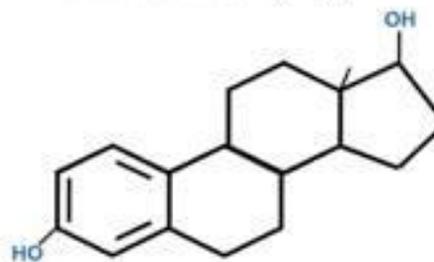
2.6.1 Struktur Estrogen

Estrogen disintesis di adrenal, plasenta, testis, jaringan lemak dan susunan saraf pusat dalam jumlah kecil. *Estradiol* berikatan dengan globulin pengikat hormon seks (*Sex-Hormone Binding Globulin*, SHBG) di dalam serum, sedangkan 2-3% diantaranya merupakan estrogen bebas dan akan berikatan dengan reseptor yang berada di jaringan perifer termasuk kulit. Steroid yang dihasilkan akan masuk ke dalam sistem aliran darah untuk mencapai berbagai jaringan tubuh, dan sebagian steroid akan dikeluarkan dari tubuh (Astuti, 2013).

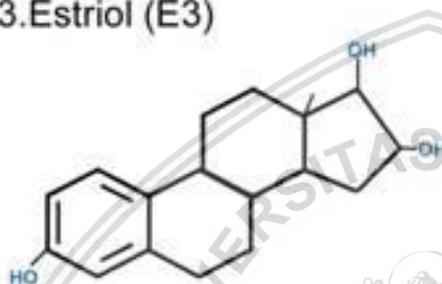
1. Estrone (E1)



2. Estradiol (E2)



3. Estriol (E3)



Gambar 2.6 Estron, Estradiol, dan Estriol (Speroff dan Fritz., 2005).

Keterangan : *Estron* merupakan estrogen lemah yang dibentuk melalui konversi androstenedion. *Estradiol* merupakan estrogen yang secara biologis paling aktif dan penting disekresi ovarium. *Estriol* merupakan estrogen yang lemah (Speroff dan Fritz., 2005).

Estrogen merupakan senyawa steroid yang mampu mengubah aktifitas biologis sel melalui pengikatannya dengan Reseptor Estrogen (RE), sebagian terdapat dalam membran plasma dan inti sel. Potensi estrogen sangat bergantung pada afinitasnya terhadap RE, lamanya berikatan dengan reseptor dan banyaknya hormon bebas yang dapat menembus membran sel. Estrogen sangat larut dalam lemak, oleh sebab itu mudah menembus membran sel, selanjutnya berikatan dengan RE yang sebagian terdapat dalam membran plasma membentuk kompleks ligand-reseptor (Astuti, 2009).

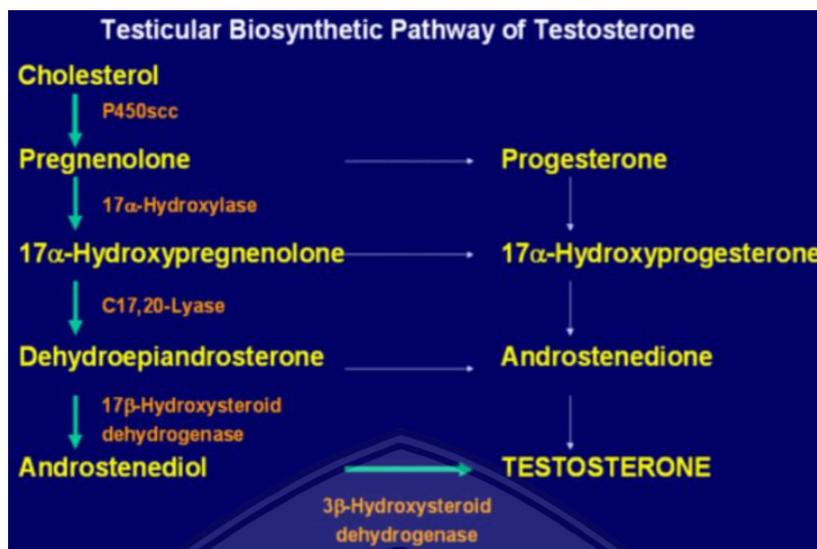
2.6.2 Metabolisme estrogen

Estrogen dilaporkan mempengaruhi pertumbuhan, *differentiasi* dan fungsi dari beberapa jaringan target seperti jaringan pada sistem reproduksi, testis dan prostat. Sebagian besar estrogen diproduksi dalam testis (Astuti, 2009).

Estrogen dibentuk melalui proses aromatisasi testosteron dalam proses kompleks yang memerlukan 3 langkah hidroksilasi, masing-masing memerlukan Oksigen (O^2) dan *Nicotamide Adenine Dinucleotide Phosphate Hydrogenase* (NAPDH). Estron merupakan estrogen utama kedua pada masa reproduksi. Estron diperoleh dari hasil metabolisme *estradiol* dan dari aromatisasi jaringan perifer antara lain hepar, lemak, otot skeletal, dan folikel rambut yang mengubah *androstenedione* dan *testosterone* menjadi estrogen (Gruber, 2002).

Pembentukan hormon testosteron disintesis di jaringan intersisial oleh sel leydig dengan menggunakan prekursor dari kolesterol. Sintesis ini dimulai dengan pengangkutan kolesterol ke membran interna mitokondria oleh protein pengangkut *steroidogenic acute regulatory protein* (STAR). Setelah berada pada posisi yang tepat, kolesterol akan bereaksi dengan enzim pemutus rantai samping P450_{scc} dan menjadi *pregnenolon*. Konversi *pregnenolon* menjadi testosteron dapat terjadi dalam 2 lintasan, yaitu (Sherwood, 2007):

1. lintasan progesteron (gambar 2.7).
2. lintasan dehidroepiandosteron (gambar 2.7).



Gambar 2.7 Jalur Biosintesis Testosteron (Brinkmann, 2009).

2.6.3 Reseptor Estrogen

Aktivitas biologis estrogen diperantarai oleh estrogen reseptor α atau β , yang merupakan bagian dari kelompok reseptor inti, dan berfungsi mengaktifkan faktor transkripsi ligan. Reseptor tersebut mempunyai struktur dan fungsi tertentu yang sesuai dengan ikatan ligan, *Deoxy Ribonucleic Acid* (DNA) dan aktivasi proses transkripsi (Riggs dan Hartmann, 2003). Reseptor estrogen berfungsi untuk mengubah transkripsi gen jika berikatan dengan jaringan spesifik yang bersifat koaktivator atau korepresor (Gruber dkk., 2002).

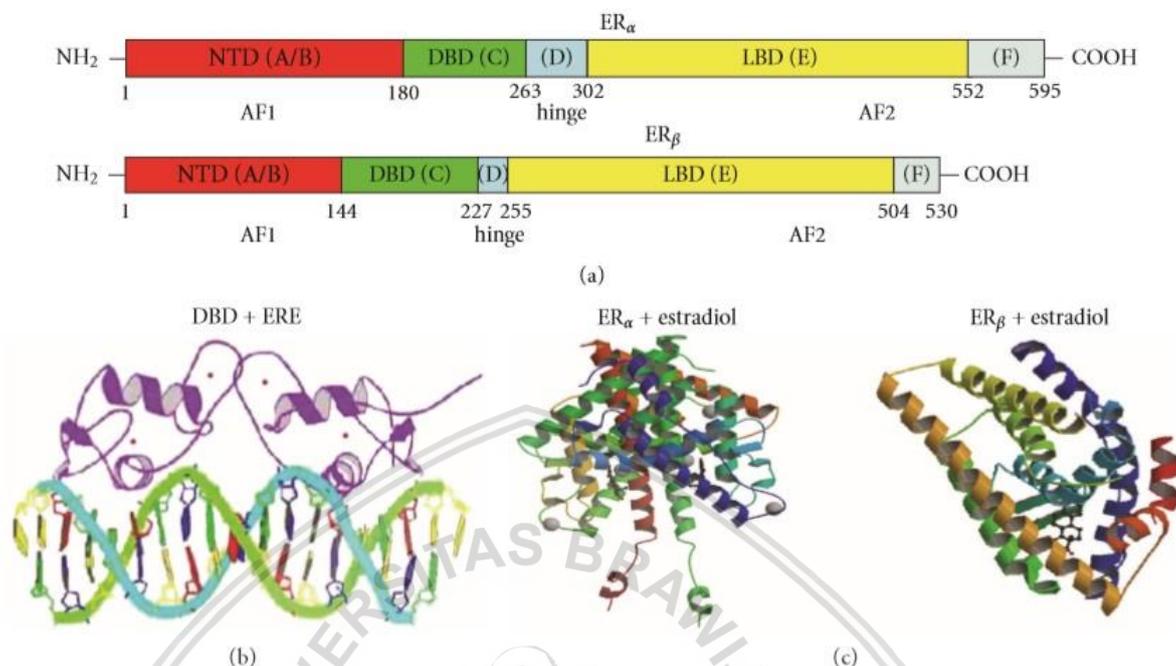
Seiring dengan penemuan estrogen reseptor α (ER- α) dan estrogen reseptor β (ER- β), penelitian untuk mengetahui peran reseptor estrogen semakin berkembang. Defisiensi ER- β merupakan faktor yang mengganggu jalannya proses gametogenesis, namun tidak mengganggu proses *diferensiasi* sel Leydig. Penelitian yang dilakukan pada tikus defisiensi ER α , menunjukkan peningkatan

kadar testosteron karena terjadi hipertrofi pada sel Leydig dan terdapat peningkatan level mRNA untuk StAR, P450c17 dan P450scc di testis (Delbes dkk., 2005).

Reseptor estrogen pertama diisolasi tahun 1960-an. Pada tahun 1966 ER- β diisolasi dari prostat tikus yang ternyata homolog dengan ER- α . ER- α dan ER- β mampu melakukan ekspresi gen bila teraktivasi sama seperti reseptor hormon steroid lainnya. Reseptor estrogen dapat dijumpai di pembuluh darah, vesika urinaria, otak dan tulang. Reseptor tersebut memungkinkan terjadi efek langsung pada pembuluh darah baik pada sel otot polos maupun pada endotel (Mendelsohn dan Karas 1999). ER- β lebih banyak terdapat pada mukosa intestinal, parenchyma paru, sumsum tulang, tulang, otak, sel endothelial dan kelenjar prostat. Sedangkan ER- α lebih banyak pada endometrium, jaringan hipotalamus dan testis (Gruber dkk., 2002).

2.6.4 Perbedaan ER- α dan ER- β

Perbedaan kedua tipe reseptor α dan estrogen reseptor β bervariasi dalam struktur, dan gen-gen pengkode mereka didalam kromosom yang berbeda, dimulai dari NH₂ ke gugus terminus COO (1) *N-terminal domain* (NTD) (2) *DNA-binding domain* (DBD) (3) *ligand-binding domain* (LBD) serta dua *activation function* (AF), AF 1 dan AF 2 yang berlokasi diantara NTD dan LBD yang bertanggung jawab terhadap pengaturan aktivitas transkripsi ER (Gambar 2.8) (Kumar dkk., 2011).



Gambar 2.8 Perbedaan Struktur ER- α dan ER- β

Keterangan : (a) memperlihatkan urutan sekuen dari 2 isoforms estrogen reseptor ER α dan ER β . Perbedaan domain terlihat dari perbedaan warna : NTD—*amino terminal domain* (berwarna merah) ; DBD—*DNA binding domain* (berwarna hijau) ; hinge region (berwarna biru) ; LBD—*ligand binding domain* (berwarna kuning) ; region F berlokasi pada C-terminal sampai ujung (berwarna abu-abu). Posisi sekuen asam amino terdapat pada setiap domain.
 (b) memperlihatkan estrogen reseptor pada bagian DBD dengan ikatan DNA-ERE (estrogen response element).
 (c) memperlihatkan struktur 3 dimensi dari ER α (kiri) dan ER β (kanan) berikatan dengan estradiol.

2.6.5 Peran Estrogen pada Sistem Reproduksi Pria

Estrogen memiliki peran penting dalam perkembangan dan menjaga fungsi reproduksi serta fertilitas pria (Lazari dkk., 2009). Dengan adanya enzim aromatase yang dihasilkan sel Sertoli pada proses akhir steroidogenesis, testosteron akan dirubah menjadi estrogen di sel Leydig (Carreau dkk., 2010). Estrogen dapat bekerja setelah berikatan dengan reseptor estrogen α atau estrogen reseptor β .



Komplek estrogen-reseptor akan memberikan umpan balik negatif pada aksis hipotalamus-hipofisis-testis (Carreau dkk., 2010).

Estrogen disebut sebagai hormon spesifik wanita, namun peranan hormon estrogen pada testis sudah banyak diteliti (Carreau dkk., 2007). Ditemukannya enzim aromatase dan reseptor estrogen α dan β (ER- α dan ER- β) pada sistem reproduksi pria dan penelitian model tikus transgenik dengan estrogen reseptor α *knock out* (ER α KO) atau dengan enzim *aromatase knock out* (ArKO) menunjukkan bahwa estrogen berperan dalam mengendalikan gametogenesis, perkembangan tubulus seminiferus, dan regulasi steroidogenesis pada sel Leydig (Hejmej dkk., 2009). Estrogen juga berperan untuk maskulinisasi pada otak, hal ini dibuktikan dengan ditemukannya aktivitas aromatase dan ER di hipokampus pada awal kelahiran (Hejmej dkk., 2009). Reabsorpsi cairan pada duktus efferen testis juga dijaga oleh estrogen melalui ER- α (Hejmej dkk., 2009).

2.6.6 Peran Estrogen Terhadap Spermatogenesis

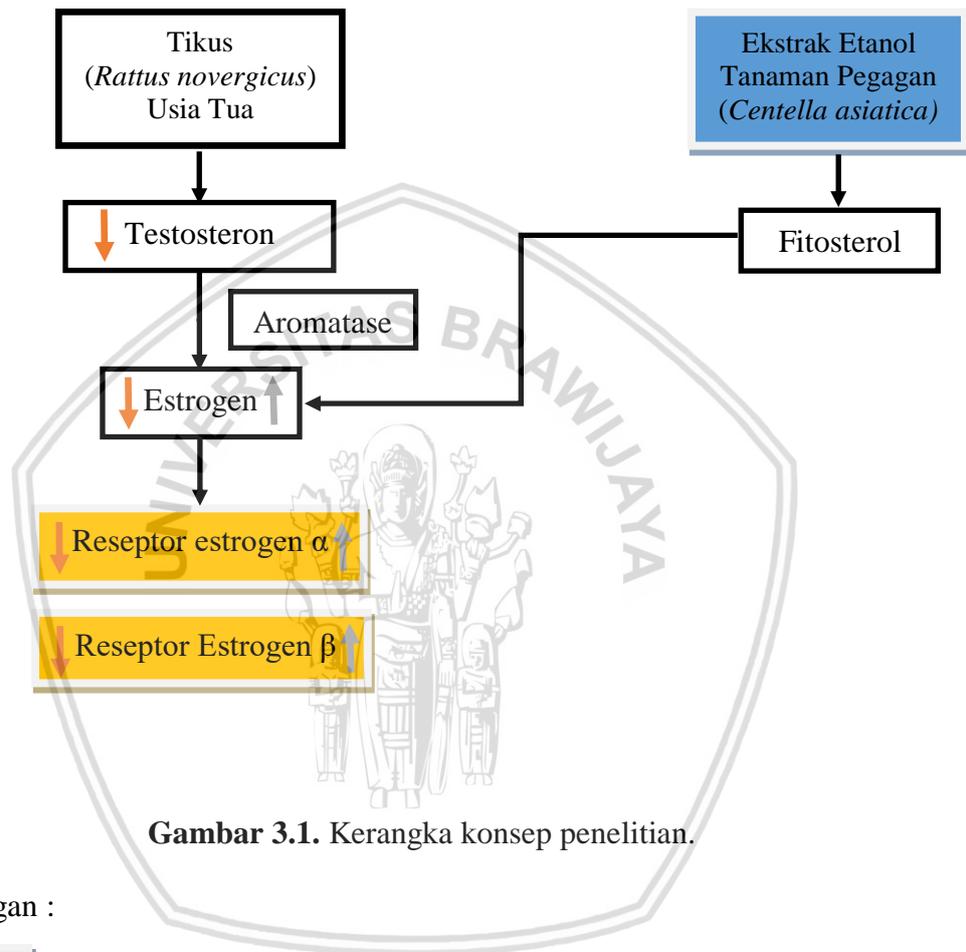
Spermatogenesis membutuhkan keseimbangan aksis hipotalamus-hipofisis-testis, dan estrogen memiliki peran dalam menjaga keseimbangan tersebut (D'Souza dkk., 2005). Spermatogenesis tergantung dari keseimbangan *hypothalamo-pituitary-testis axis*, dan estrogen dalam keseimbangan ini memiliki peran sehingga karena hal ini estrogen mempunyai pengaruh tidak langsung terhadap spermatogenesis. Secara langsung efek estrogen pada spermatogenesis adalah mempengaruhi maturasi dari sel *germinativum* (Carreau dkk., 2011). Hal ini

dikarenakan sel germinativum memiliki reseptor estrogen dan lokal aromatase dalam setiap fase perkembangan dari sel germinativum (Carreau dkk., 2011).



BAB III KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual



Gambar 3.1. Kerangka konsep penelitian.

Keterangan :



: Variabel bebas



: Variabel bergantung



: Kondisi tikus tua (*aging*)



: Efek pemberian *Centella asiatica*



Tikus (*Rattus norvegicus*) yang digunakan merupakan galur SD usia tua yaitu sekitar 2 tahun. Menurut Pangkahila (2007), proses penuaan (*aging*) terjadi penurunan hormon yaitu hormon testosteron, *growth hormon*, dan hormon estrogen. Pada tikus tua sel leydig yang dimilikinya tidak bermasalah, namun produksi testosteron yang mengalami permasalahan, sel leydig kurang baik memanfaatkan kolesterol dan mengubah menjadi pregnolon dan selanjutnya menjadi testosteron, hal ini berkaitan dengan penurunan estrogen pada proses penuaan karena estrogen diproduksi oleh testosteron melalui proses aromatase (Gruber, 2002).

Penurunan hormon estrogen mengakibatkan penurunan ekspresi estrogen reseptor α atau β , karena estrogen dapat bekerja setelah berikatan dengan reseptor (Astuti, 2009).

Estrogen akan memberikan umpan balik negatif pada aksis hipotalamus-hipofisis-testis (Carreau dkk., 2010). Spermatogenesis membutuhkan keseimbangan aksis *hipotalamus-hipofisis-testis*, dan estrogen memiliki peran dalam menjaga keseimbangan tersebut (D'Souza R dkk., 2005), pada hal ini estrogen mempunyai pengaruh tidak langsung terhadap spermatogenesis. Efek estrogen secara langsung pada spermatogenesis adalah mempengaruhi maturasi dari sel *germinativum* (Carreau dkk., 2011). Penurunan hormon estrogen juga mempengaruhi spermatogenesis

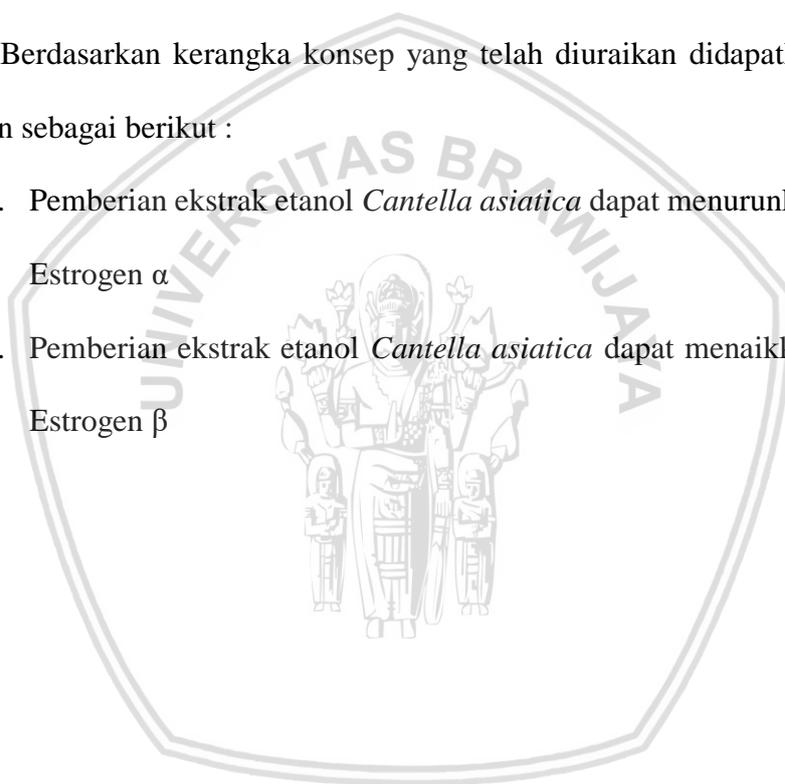
Ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) diberikan pada tikus usia tua melalui sonde peroral. Tanaman pegagan memiliki kandungan fitosterol. Sterol yang terdapat pada tumbuhan dikenal sebagai fitosterol, sedangkan pada

hewan disebut estrogen (Lusiana dkk., 2013). Fitosterol tersebut dapat menggantikan peran estrogen karena bersifat estrogenik dan dapat berikatan dengan Estrogen Reseptor α dan β , sehingga ekstrak tanaman pegagan dapat meningkatkan ekspresi dari Estrogen Reseptor α atau β .

3.2 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan kerangka konsep yang telah diuraikan didapatkan hipotesa penelitian sebagai berikut :

1. Pemberian ekstrak etanol *Cantella asiatica* dapat menurunkan Reseptor Estrogen α
2. Pemberian ekstrak etanol *Cantella asiatica* dapat menaikkan Reseptor Estrogen β



BAB IV METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Juni 2017 hingga bulan Oktober 2017.

Dengan uraian tempat pelaksanaan penelitian sebagai berikut :

- a. Proses ekstraksi *Centella asiatica* dilakukan di Materia Medica, Batu.
- b. Pemeliharaan hewan coba dilakukan di Laboratorim Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
- c. Pengoleksian sampel dilakukan di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
- d. Pembuatan preparat histologi testis (sel sertoli) dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
- e. Pewarnaan imunohistokimia ekspresi estrogen α dan β dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi FKH Universitas Brawijaya Malang.

4.2 Sampel Penelitian

Penelitian ini menggunakan hewan coba tikus putih (*Rattus novergicus*) yang terdiri dari 4 kelompok perlakuan. Estimasi besar sampel dihitung berdasarkan rumus (Kusriningrum, 2008) :

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

$$4(n-1) \geq 15$$

$$4n-4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 5$$

Keterangan :

t = jumlah kelompok

n = jumlah ulangan yang diperlukan

Berdasarkan perhitungan diatas maka untuk empat kelompok hewan coba diperlukan jumlah ulangan paling sedikit lima ekor dalam setiap kelompok sehingga dibutuhkan 20 ekor hewan coba.

4.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan secara eksperimental *post test control design only* menggunakan model Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan membagi hewan coba menjadi 4 kelompok, yaitu kelompok kontrol negatif (KN), kelompok perlakuan 1 (P1), kelompok perlakuan 2 (P2), dan kelompok perlakuan 3 (P3) (Tabel 4.1) :

Tabel 4.1. Kelompok Perlakuan pada Penelitian

Kelompok	Keterangan
Kontrol Negatif	Kontrol tikus hanya diberikan pakan dan minum <i>ad libitum</i> selama 21 hari tanpa diberikan ekstrak <i>Centella asiatica</i>
Perlakuan 1	Tikus tua diberikan ekstrak <i>Centella asiatica</i> dengan volume pemberian 1 mL selama 21 hari dengan dosis 100mg/kg BB
Perlakuan 2	Tikus tua diberikan ekstrak <i>Centella asiatica</i> dengan volume pemberian 1 mL selama 21 hari dengan dosis 200mg/kg BB
Perlakuan 3	Tikus tua diberikan ekstrak <i>Centella asiatica</i> dengan volume pemberian 1 mL selama 21 hari dengan dosis 300mg/kg BB dan dilakukan pembedahan pada hari ke 22

4.4 Variabel Penelitian

Variabel yang diamati pada penelitian ini yaitu :

Variabel bebas : Ekstrak *Centella asiatica*

Variabel tergantung : Ekspresi Estrogen Reseptor α dan β

Variabel kendali : Homogenitas tikus SD (jantan, berat badan dan umur), homogenitas pakan (komposisi ransum pakan disusun berdasarkan standar AOAC yaitu mengandung karbohidrat, protein, lemak, mineral, vitamin, dan air), homogenitas kandang (ukuran, suhu, dan kandang).

4.5 Materi Penelitian

4.5.1 Alat

Alat yang dipakai dalam penelitian ini yaitu bak pemeliharaan hewan coba, tempat makan dan minum tikus, box paparan, sonde, seperangkat alat bedah, cawan petri, gelas objek, pot sampel, *refrigerator*, tabung reaksi, *sentrifugator*, pipet tetes, gelas ukur, *maserator*, *rotary evaporator*, *vacum drying*, TEM, mikrotom, *centellan*, *cover glass*, dan mikroskop cahaya.

4.5.2 Bahan

Bahan-bahan yang dipakai dalam penelitian ini adalah *Centella asiatica*, alkohol, *NaCl fisiologis*, *aquades*, serbuk simplisia, *etanol 70%*, *letichin*, ekstrak pegagan, *aqua bebas CO₂*, PFA 4%, alkohol (70%, 80%, 90%, 95%), xylol, PBS .

4.6 Tahapan Penelitian

4.6.1 Preparasi Hewan Coba

Hewan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain SD (*Sprague Dawley*) umur 2 tahun berjenis kelamin jantan hasil perkembangbiakan yang diperoleh dari Fakultas Kedokteran UB dengan bobot badan awal berkisar 300 gram. Kandang yang digunakan berukuran 17,5 x 23,75 x 17,5 cm. Suhu ruangan diatur pada 22-24°C dengan kelembapan udara 60%-70%. Ransum diberikan sebanyak 20 g per ekor per hari. Air minum diberikan *ad libitum*. Setiap 3 hari dilakukan penimbangan bobot badan per tikus dan pembersihan kandang. Adaptasi tikus terhadap lingkungan selama 7 hari dilakukan pada awal penelitian dengan pemberian ransum yang bebas dari suara ribut dan terjaga dari asap industri serta polutan lainnya. Lantai kandang mudah dibersihkan dan disanitasi (Pratama, 2013).

4.6.2 Pembuatan Ekstrak Etanol Tanaman Pegagan (*Cetella asiatica*)

Phytosome ekstrak tanaman pegagan pada penelitian ini dibuat dengan cara membentuk ekstrak terlebih dahulu. Sebanyak 400 mg serbuk simplisia ditambahkan 500 mL etanol 70%, dicampur dalam maserator dengan pengadukan pelan selama 30 menit pada awal perendaman. Campuran disimpan selama 24 jam dengan sering dilakukan proses remaserasi. Filtrat disaring dan diuapkan dengan *rotary evaporator* dengan suhu sebesar 30°C dan di *vacum drying* untuk menghilangkan kadar air (Adianingsih dkk., 2013).

Ekstrak tanaman pegagan kemudian dibuat bentuk phytosome dengan metode sonikasi (mencampur lecithin, etanol 70%, ekstrak tanaman pegagan) lalu distirrer selama \pm 3 jam dengan *magnetig stirrer* 2000 rpm. Dilakukan penguapan pelarut dengan *rotary evaporator* kemudian dihidrasi dengan aqua bebas CO₂ (Adianingsih dkk., 2013).

4.6.3 Pemberian Ekstrak Etanol Pegagan (*Cetella asiatica*) pada Hewan Coba

Ekstrak etanol tanaman pegagan diberikan dengan dosis bertingkat sesuai Gohil dkk., (2010), 100 mg/kg BB, 200 mg/kg BB, dan 300 mg/kg BB sesuai masing-masing kelompok perlakuan. Pemberian dilakukan secara per oral menggunakan sonde lambung selama 21 hari setiap tikus putih (*Rattus novergicus*) disonde dengan ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) sebanyak 1 mL (1 kali perhari).

4.6.4 Pengambilan Sampel Organ Testis

Pengambilan organ testis dilakukan pada kelompok kontrol positif, kontrol negatif, perlakuan 1, perlakuan 2, dan perlakuan 3 dilakukan pada hari ke 22 setelah pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan. Pada akhir penelitian dilakukan *euthanasi* dengan cara dislokasi leher kemudian tikus diletakkan dengan posisi rebah dorsal pada papan pembedahan. Pembedahan dilakukan dengan membuka muskulus sepanjang abdomen sampai bawah dagu kemudian testis diambil dari scrotum di daerah prepubis dilanjutkan dengan memotong testis kemudian diisolasi. Organ testis lalu dibilas dengan NaCl fisiologis pada cawan petri dan direndam.

Kemudian organ testis dimasukkan dalam larutan *paraformaldehyde* (PFA) 4% (Irawan dkk., 2012).

4.6.5. Pembuatan Preparat Histologi Testis

Setelah hewan dinekropsi kemudian organ testis diambil lalu dicuci dengan 0,9% NaCl fisiologis, dimasukkan ke dalam larutan *paraformaldehyde* (PFA) 4% selama 24 jam. Setelah testis terfiksasi, larutan diganti dengan alkohol 70% yang dikenal sebagai "*stopping point*" dengan pengertian jaringan dapat disimpan lama pada larutan ini. Proses penarikan air dari jaringan (dehidrasi) dilakukan menggunakan alkohol dengan konsentrasi bertingkat mulai 80% sampai dengan 100% dan dijernihkan dengan *xylol* (*clearing*) sebelum akhirnya ditanam dalam parafin (*embedding*). Jaringan dalam blok parafin disayat secara serial menggunakan *mikrotom rotary* dengan ketebalan 5 μ m dilekatkan pada gelas obyek yang telah dilapisi dengan alkohol 70%, kemudian disimpan dalam inkubator 40°C selama 24 jam. Sediaan kemudian dilapisi *poly-L-lysin* untuk pewarnaan dengan metode IHK (Samson dan Unitily, 2014).

4.6.6. Analisis Ekspresi Estrogen Reseptor α dan β pada jaringan testis dengan

Metode IHK

Menurut Samson dan Unitily (2014), pewarnaan imunohistokimia memiliki 3 tahapan yang harus dilakukan, yaitu preparasi gelas obyek yang digunakan untuk penempelan preparat atau sediaan histologis, pembuatan *neufren* (agen penempel) untuk membantu proses *afixing* preparat ke gelas obyek dan

prosedur pewarnaan imunohistokimia itu sendiri. Pewarnaan imunohistokimia meliputi beberapa tahap preparasi, antara lain preparasi gelas obyek, pelapisan (*coating*) gelas obyek dengan *neufren* (agen penempelan), penempelan preparat irisan pada gelas obyek dan prosedur pewarnaan imunohistokimia yaitu dengan memilih preparat irisan yang paling bagus

Proses pertama yang dilakukan adalah deparafinasi (*xylol* I dan II) merupakan proses penghilangan parafin dalam jaringan. Caranya preparat dimasukkan ke dalam *xylol* bertingkat I sampai II masing-masing selama lima menit. Proses ini dimaksudkan untuk mempermudah proses masuknya zat warna ke dalam jaringan. Merupakan suatu proses menghilangkan parafin yang terdapat di dalam jaringan.

Setelah itu dilakukan rehidrasi (alkohol absolut III, II, I – 95%, 90%, 85%, 80%, 70%), DW/milique (MQ) selama 10-15 menit. Kemudian penghilangan peroksidase endogen dengan membloking ezim-enzim endogen agar hasil yang keluar dengan interpretasi yang benar. Bloking enzim dilakukan dengan memberikan *hidrogen peroksidase* (H_2O_2) sebagai substrat *peroksidase* pada slide.

Setelah itu dilakukan pencucian dengan menggunakan mikropipet: (a) DW/MQ sebanyak 100 μ l selama 5-10 menit (2x) dilanjutkan pencucian dengan menggunakan (b) PBS (*phospat buffer saline*) sebanyak 100 μ l selama 5-10 menit (2x). Permukaan sediaan di sekitar jaringan dikeringkan menggunakan kertas tisu dengan tetap menjaga jaringan untuk tidak kering. Sediaan selanjutnya disejajarkan secara mendatar dalam PBS (agar memblok antigen/Ag non spesifik dan tidak

mengacaukan reaksi), kotak kemudian ditutup rapat dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 30-60 menit. Dicuci dengan PBS (100 µl) selama 5 menit (3x).

Proses selanjutnya yaitu dikeringkan kembali sisa-sisa PBS yang masih menempel dan disiapkan antibodi primer yang dilarutkan dalam larutan blotto dengan perbandingan 1:1000. Diberi antibodi/Ab primer anti Estrogen Reseptor α dan anti Estrogen Reseptor β , kemudian diinkubasi dalam *refrigator* suhu 4°C selama 1 malam. Penggunaan Ab primer tersebut disesuaikan dengan senyawa atau bahan bioaktif yang akan dideteksi. Dicuci lagi menggunakan PBS (100 µl) selama 10 menit (3x).

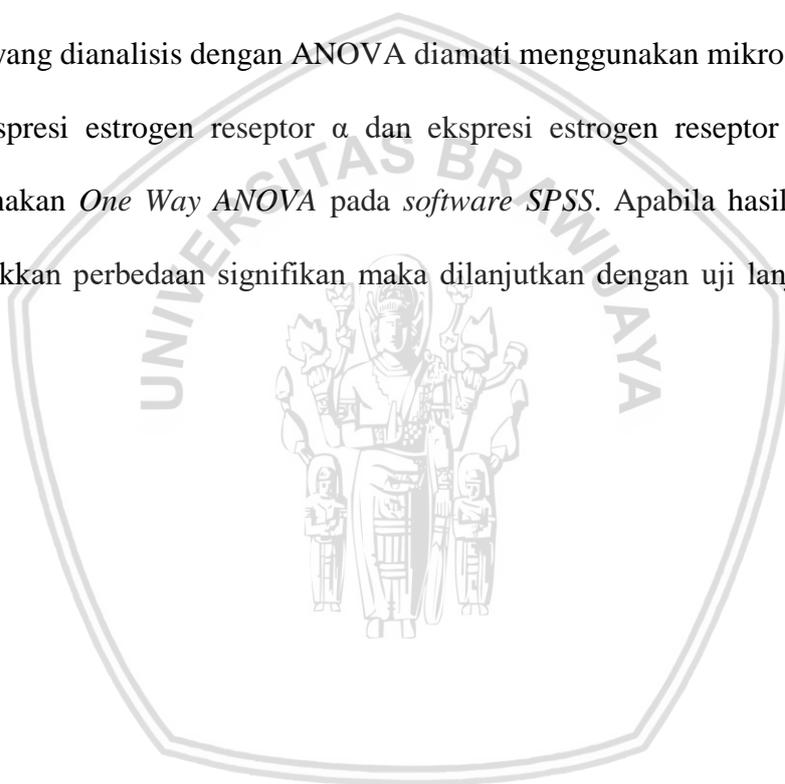
Setelah itu diberi antibodi/Ab sekunder yaitu antibodi menggunakan Scy Tek CRF *Anti-polyvalent HRP Polymer* sebanyak 50-60 atau 80 µl per preparat dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 30-60 menit (tahap ini berlangsung dalam suasana gelap, tidak boleh ada cahaya). Dicuci dengan PBS (100 µl) selama 5 menit (3x). Visualisasi dilakukan dengan menggunakan: DAB (3,3-*diaminobenzidine*) sebanyak 10 mg dalam *tris buffer* (50 cc) yang dicampur dengan H₂O₂ (50 µl). Proses pencampuran ini dilakukan sesaat sebelum preparat dimasukkan dan kemudian ditutup (gelap) selama 25 menit. Bahan bioaktif yang terdeteksi akan terwarnai coklat. Dicuci atau dimasukkan dalam DW/MQ (*stopping point*) selama 10-15 menit.

Proses terakhir yaitu dilakukan dehidrasi (70%, 80%, 85%, 90%, dan 95%) bagian bawah gelas obyek dilap tisu (untuk menghindari terjadinya pengenceran), dilanjutkan ke alkohol absolut I, II, III, bagian bawah gelas obyek dilap dengan tisu lagi, *clearing* (xylol I, II, III) dan *mounting*. Selanjutnya sediaan histologis siap

diamati di bawah mikroskop, direkam dengan menggunakan foto digital sebanyak 20 lapang pandang menggunakan perbesaran 1000x dan dihitung manual.

4.6.7 Analisis Data

Analisis data yang digunakan dalam penelitian ini berupa data kuantitatif untuk mengetahui ekspresi estrogen reseptor α dan ekspresi estrogen reseptor β melalui yang dianalisis dengan ANOVA diamati menggunakan mikroskop cahaya. Data ekspresi estrogen reseptor α dan ekspresi estrogen reseptor β dianalisis menggunakan *One Way ANOVA* pada *software SPSS*. Apabila hasil uji ANOVA menunjukkan perbedaan signifikan maka dilanjutkan dengan uji lanjut BNJ $\alpha = 0,05$.

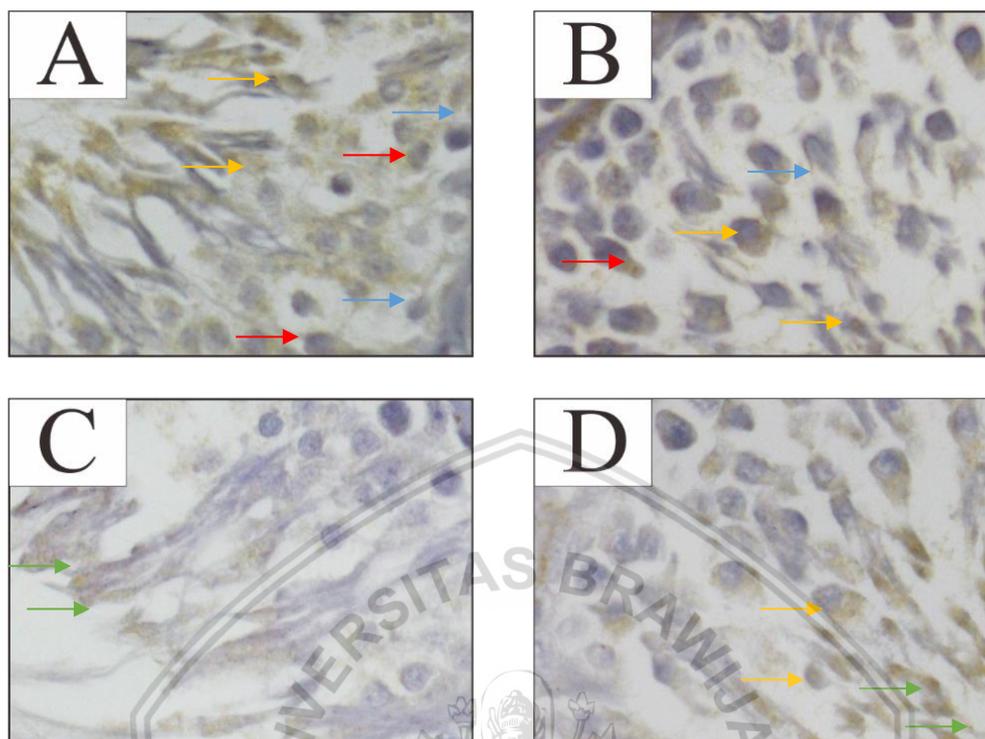


BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian potensi ekstrak tanaman pegagan terhadap ekspresi reseptor estrogen α dan β pada jaringan testis tikus tua dengan pengamatan menggunakan metode immunohistokimia (IHK), diberikan senyawa *labelling* kromagen DAB ditandai dengan adanya warna coklat pada jaringan testis akibat adanya ikatan antigen dengan antibodi primer dan sekunder kemudian divisualisasikan dengan substrat kromagen tersebut akan menimbulkan warna kecoklatan pada area tubulus seminiferus.

5.1 Pengaruh Ekstrak *Centella Asiatica* terhadap Ekspresi Estrogen Reseptor α Pada Jaringan Testis Tikus Tua dengan Metode IHK

Pada jaringan testis tikus tua hewan coba kontrol positif masih terlihat ekspresi ER- α (**Gambar 5.1.A**), hal ini menunjukkan bahwa tikus pada usia tua tetap mengekspresikan ER- α . Pada kelompok perlakuan 1 yaitu dengan pemberian dosis 100 mg/KgBB (**Gambar 5.1.B**) terlihat beberapa sel seperti sel sertoli, spermatogonia, dan spermatosit berwarna coklat yang menunjukkan bahwa terdapat estrogen reseptor α . Pada perlakuan 2 dengan dosis pemberian 200 mg/KgBB (**Gambar 5.1.C**) terlihat sel spermatosit, spermatid berwarna coklat, namun lebih sedikit dibandingkan dengan pemberian dosis 1. Peningkatan tertinggi terjadi pada perlakuan 3 dengan pemberian dosis 300 mg/KgBB (**Gambar 5.1.D**), pada kelompok perlakuan 3 sel spermatosit dan spermatid yang berwarna coklat lebih banyak apabila dibandingkan perlakuan 1 dan 2, namun masih lebih banyak ekspresi yang ditunjukkan tikus kelompok kontrol (**Gambar 5.1.B**).



Gambar 5.1. Gambaran Ekspresi ER- α dengan metode Imunohistokimia Jaringan Testis dengan perbesaran 1000x

- A = Kontrol positif (tikus tua)
- B = Perlakuan 1 (pemberian ekstrak etanol pegagan 100mg/kgBB)
- C = Perlakuan 2 (pemberian ekstrak etanol pegagan 200mg/kgBB)
- D = Perlakuan 3 (pemberian ekstrak etanol pegagan 300mg/kgBB)
- = Sel Sertoli
- = Spermatosit
- = Spermatogonia
- = Spermatid

Ekspresi ER- α pada kelompok perlakuan 1, perlakuan 2, dan perlakuan 3 terjadi penurunan dibandingkan dengan kelompok kontrol. Data yang didapatkan dari hasil ekspresi ER- α menunjukkan kontrol positif lebih besar ($58 \pm 3,80$ sel) jika dibanding dengan kelompok perlakuan 3 ($52 \pm 10,8$ sel), hal tersebut menunjukkan bahwa ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) tidak berpengaruh terhadap ekspresi ER- α pada tikus jantan usia tua (**Tabel 5.1**).

Kelompok kontrol positif menunjukkan ekspresi ER- α pada tikus usia tua masih terbentuk, namun pemberian terapi pegagan tidak mampu meningkatkan

ekspresi ER- α . Seluruh kelompok perlakuan mengalami penurunan ekspresi ER- α jika dibandingkan dengan kelompok kontrol positif setelah diberikan ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*). Kelompok perlakuan 1 dengan dosis ekstrak etanol tanaman pegagan sebesar 100 mg/kg BB mengalami penurunan ekspresi ER- α sebesar 22% ($45,2 \pm 2,86$ sel). Sedangkan pada kelompok perlakuan 2 mengalami penurunan ekspresi ER- α yang sangat signifikan yaitu 46,5% ($31 \pm 5,0$ sel). Pada kelompok perlakuan 3 didapatkan kenaikan ekspresi ER- α yaitu 10,3% ($52 \pm 10,85$ sel), namun masih dibawah hasil kelompok positif. Terjadi penurunan yang signifikan pada kelompok perlakuan 2 (Tabel 5.1).

Tabel 5.1 Hasil Uji Tukey Terhadap Ekspresi ER- α

Kelompok	Rata-rata Ekspresi ER- α (\pm SD) Sel
KP	$58 \pm 3,80^a$
Dosis 1 (100 mg/kg BB)	$45,2 \pm 2,86^b$
Dosis 2 (200 mg/kg BB)	$31 \pm 5,0^c$
Dosis 3 (300 mg/kg BB)	$52 \pm 10,85^a$

Keterangan: Notasi a, b, dan c menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antara satu perlakuan dengan perlakuan lainnya.

Penurunan ekspresi ER- α pada kelompok perlakuan 1, perlakuan 2 dan perlakuan 3 terjadi karena pemberian terapi fitosterol dari ekstrak etanol tanaman pegagan. Fitosterol yang berasal dari tanaman pegagan mempunyai sifat estrogenik, sehingga menggantikan peran estrogen dan berikatan dengan estrogen reseptor, proses pengikatan fitosterol pada reseptor estrogen di membran sel, dan ikatan tersebut berikatan dalam bentuk dimer. Setelah hormon berikatan dengan

reseptornya, reseptor berpindah ke inti sel dan kemudian reseptor tersebut berikatan ERE (estrogen response element) dan kompleks tersebut akan berikatan dengan koaktivator sehingga faktor transkripsi menjadi aktif yang dapat mengubah ekspresi gen. Selanjutnya regulasi transkripsi gen akan menghasilkan suatu protein spesifik yang terlibat dalam fungsi biologis tertentu (Budi, 2016).

Reseptor estrogen memiliki 2 jalur faktor transkripsi yaitu AF-1 dan AF-2, AF-1 terletak pada *N-terminal region* dan AF-2 terletak pada *C-terminal ligand binding domain*, jalur transkripsi ER- α lebih dominan melalui jalur AF-1, sedangkan jalur transkripsi ER- β lebih dominan melalui jalur AF-2, terapi estrogenik yang diberikan (fitosterol) melalui jalur transkripsi AF-2 sehingga ER- β menunjukkan ekspresi yang lebih tinggi dibandingkan ER- α hal yang berbeda ketika diberikan terapi estrogenik dengan dosis tinggi atau tomoxifen yang akan menghambat jalur transkripsi melalui AF-2 sehingga ER- α mempunyai afinitas dan ekspresi yang lebih tinggi dibandingkan dengan ER- β (Watanabe dkk., 1997), dan menurut menurut Pilsakova dkk. (2010) bahwa fitosterol, merupakan suatu substansi yang berasal dari tumbuhan yang memiliki struktur mirip dengan 17 β -estradiol (estrogen) dan dapat berikatan dengan estrogen reseptor α atau β , namun fitosterol mempunyai afinitas yang lebih tinggi terhadap estrogen reseptor β daripada estrogen reseptor α dan memiliki potensi untuk mengaktifkan jalur sinyal estrogen, baik secara genomik maupun nongenomik, sehingga ER- α mengalami penurunan ekspresi pada kelompok perlakuan.

Perbedaan *ligan binding* antara ER- α dan ER- β terletak di afinitas terhadap molekul dan respon transkripsi yang diberikan oleh molekul tersebut,

seperti Tomoxifen yang merupakan agonis parsial untuk ER- α , namun antagonis untuk ER- β (Tremblay dkk., 1998), sehingga hal ini menyebabkan ER- α mengalami peningkatan dibandingkan dengan ER- β .

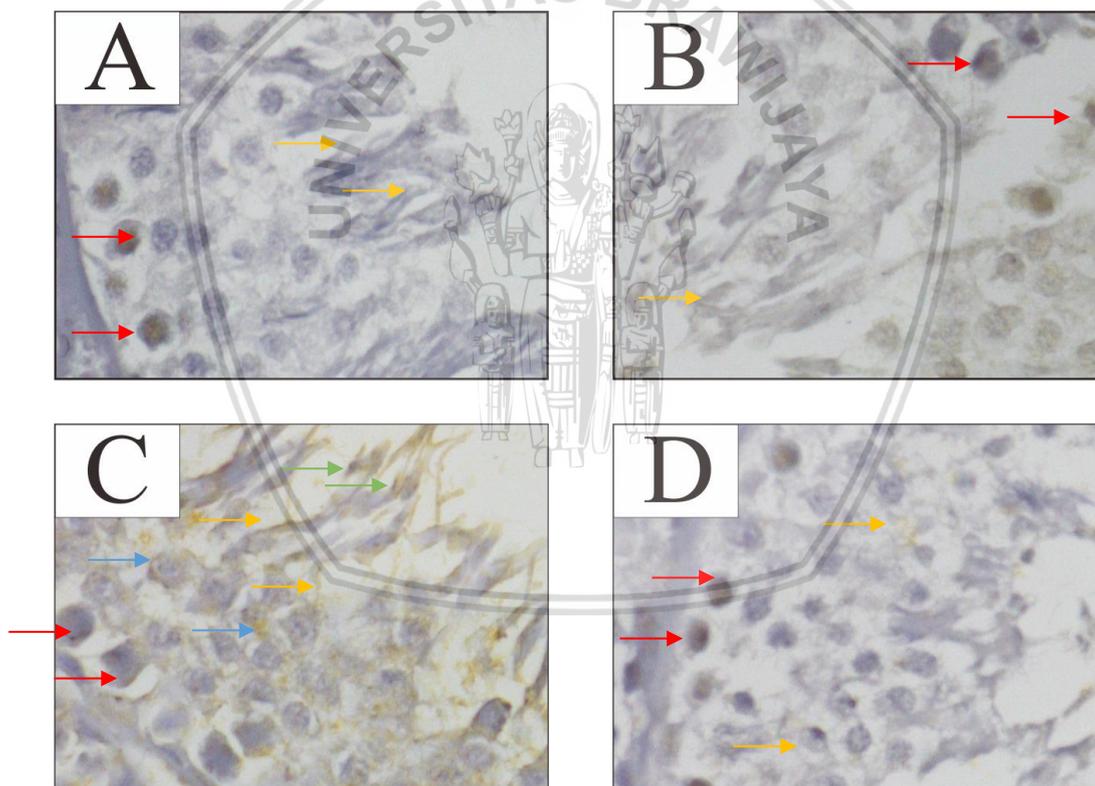
Pada kelompok perlakuan 3 terjadi peningkatan ekspresi namun masih dibawah kelompok kontrol positif, karena terapi estrogenik bergantung dosis yang diberikan, pada kelompok perlakuan 3 dengan dosis 300 mg/Kg BB merupakan dosis tinggi sehingga ekspresi dari ER- α mengalami peningkatan hal tersebut terjadi karena *co-expression* yang terjadi dan faktor transkripsi pada terapi estrogenik melalui jalur AF-1 dimana ER- α lebih dominan sehingga meningkatkan ekspresi ER- α dan menurunkan ekspresi ER- β (Patterson dkk., 2000)

5.2 Pengaruh Ekstrak *Centella Asiatica* terhadap Ekspresi Estrogen Reseptor β Pada Jaringan Testis Tikus Tua dengan Metode IHK

Pada jaringan testis tikus tua hewan coba kontrol positif masih terlihat ekspresi ER- β (**Gambar 5.1.A**), hal ini menunjukkan bahwa tikus jantan usia tua tetap mengekspresikan estrogen reseptor β . Ekspresi ER- β pada jaringan testis tikus tua hewan coba kontrol positif dalam jumlah yang rendah, terlihat dari area yang berwarna coklat (sel sertoli dan spermatisit) lebih sedikit dibandingkan dengan kelompok perlakuan (**Gambar 5.1.B**).

Pada kelompok perlakuan 1 dengan pemberian dosis 100 mg/Kg BB (**Gambar 5.2.B**) terjadi peningkatan ekspresi, terlihat dari sel sertoli, spermatisit, spermatid yang berwarna coklat lebih luas dibandingkan dengan kelompok kontrol positif, hal ini menunjukkan bahwa sudah terjadi peningkatan ekspresi dibandingkan dengan kelompok kontrol. Peningkatan tertinggi terjadi pada

perlakuan 2 dengan dosis pemberian 200 mg/Kg BB (**Gambar 5.2.C**) terlihat pada sel sertoli sampai sel spermatid yang berwarna coklat lebih luas dibandingkan dengan kelompok perlakuan 1 dan kelompok kontrol positif. Pada kelompok perlakuan 3 dengan dosis pemberian 300 mg/Kg BB (**Gambar 5.2.D**) terjadi penurunan dibandingkan dengan kelompok perlakuan, terlihat pada sel sertoli, spermatogonia, spermatosit yang berwarna coklat lebih sedikit dibandingkan dengan perlakuan 2 namun lebih banyak apabila dibandingkan dengan kelompok kontrol (**Gambar 5.2.B**).



Gambar 5.2. Gambaran Ekspresi ER- β dengan Metode Imunohistokimia Jaringan Testis dengan perbesaran 1000x

- A = Kontrol positif (tikus tua)
- B = Perlakuan 1 (pemberian ekstrak etanol pegagan 100mg/kgBB)
- C = Perlakuan 2 (pemberian ekstrak etanol pegagan 200mg/kgBB)
- D = Perlakuan 3 (pemberian ekstrak etanol pegagan 300mg/kgBB)
- = Sel Sertoli
- = Spermatosit
- = Spermatogonia
- = Spermatid

Ekspresi ER- β pada kelompok kontrol positif (K+) menunjukkan tikus usia tua masih terbentuk tetapi jika dibandingkan tiga kelompok kontrol perlakuan lain jumlahnya lebih sedikit (**Tabel 5.2**). Hal ini terjadi karena pada tikus usia tua akan mengalami penurunan jumlah estrogen sehingga menyebabkan turunnya ekspresi reseptor estrogen β (Kahina dkk., 2007).

Ekspresi ER- β pada kontrol positif mengalami kenaikan dibandingkan dengan 3 perlakuan yg lain yaitu dengan dosis pemberian 100 mg/Kg BB, 200 mg/Kg BB, 300 mg/Kg BB. Pada kelompok perlakuan 1, perlakuan 2 dan perlakuan 3 terjadi perbedaan dibandingkan dengan kontrol positif (**Tabel 5.2**), hasil yang signifikan terlihat pada kelompok perlakuan 2 dalam peningkatan ekspresi ER- β , hal tersebut menunjukkan bahwa ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) berpengaruh terhadap ekspresi ER- β pada tikus jantan usia tua dan dosis yang paling berpengaruh adalah dosis 2 yaitu 200 mg/Kg BB.

Seluruh kelompok perlakuan mengalami kenaikan ekspresi ER- β setelah diberikan ekstrak etanol tanaman pegagan jika dibandingkan dengan kelompok kontrol positif (K+) (**Tabel 5.2**). Kelompok perlakuan 1 dengan dosis ekstrak etanol tanaman pegagan sebesar 100 mg/kg BB mengalami kenaikan ekspresi ER- β sebesar 77,7% ($83,2 \pm 10,28$ sel) sedangkan pada kelompok perlakuan 2 mengalami kenaikan ekspresi ER- β 136,92% ($114,2 \pm 10,54$ sel) dan pada kelompok perlakuan 3 didapatkan ekspresi ER- β 24,3% ($58,2 \pm 6,76$ sel). Kenaikan yang signifikan terjadi pada kelompok perlakuan 2. Hal ini membuktikan bahwa ekstrak tanaman pegagan dapat meningkatkan ekspresi ER- β , dan dosis pemberian yang paling optimal adalah 200 mg/Kg BB.

Tabel 5.2 Hasil Uji Tukey Terhadap Ekspresi ER- β

Kelompok	Rata-rata Ekspresi ER- β (\pm SD) Sel
KP	46,8 \pm 8,52 ^a
Dosis 1 (100 mg/kg BB)	83,2 \pm 10,28 ^b
Dosis 2 (200 mg/kg BB)	114,2 \pm 10,54 ^c
Dosis 3 (300 mg/kg BB)	58,2 \pm 6,76 ^a

Keterangan: Notasi a, b, dan c menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antara satu perlakuan dengan perlakuan lainnya.

Peningkatan tersebut sesuai dengan penelitian yang dilakukan Kuiper dkk. (1998) bahwa aktivasi faktor transkripsi estrogen yang berasal dari tumbuhan (fitoestrogen) seperti fitosterol, genistein, caumestrol memiliki afinitas yang lebih tinggi (sampai 10 kali) terhadap reseptor estrogen β daripada reseptor estrogen α .

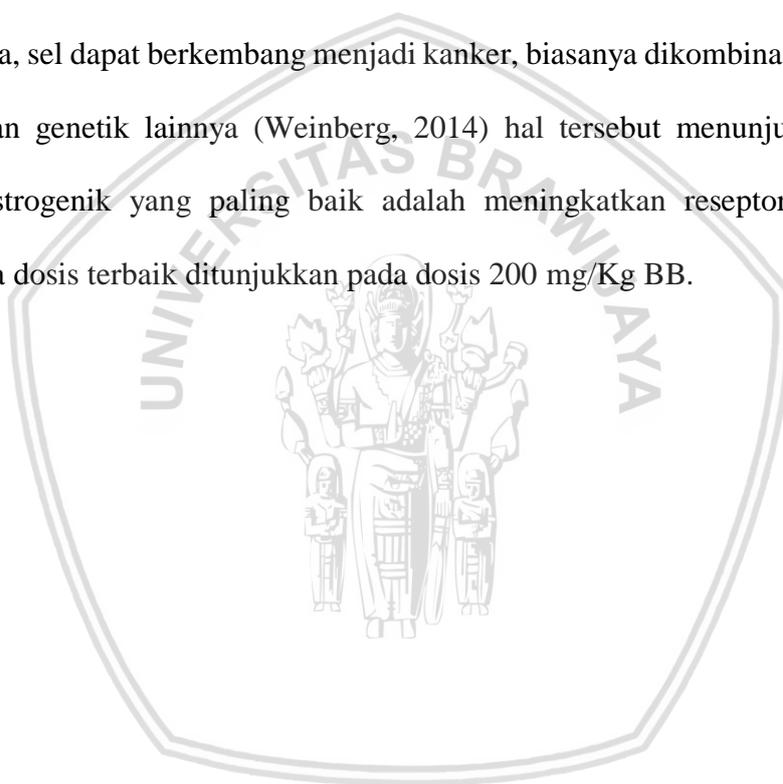
Estrogen Reseptor dibutuhkan dalam proses spermatozoa dalam motilitas dan maturasi sperma, karena penelitian yang dilakukan oleh Avanel dkk. (2010) menunjukkan bahwa tikus yang mengalami ERKO (*Estrogen Receptor knock out*) mengalami motilitas yang rendah dan kegagalan maturasi, hal tersebut karena estrogen reseptor juga ditemukan di duktus efferent yang berfungsi sebagai penyerapan cairan dan maturasi sperma, sehingga pada tikus ERKO ditemukan bahwa tikus tersebut mengalami motilitas yang rendah dan kegagalan maturase sehingga tikus tersebut infertil. Reseptor estrogen α dan β mempunyai kerja yang homolog satu sama lain, dimana ER- α dan ER- β mempunyai mempunyai protein yang memiliki afinitas yang tinggi terhadap 17 β -estradiol (estrogen) dan ER- β merupakan molekul alternatif untuk terapi estrogenik (Gail dkk., 1998)

Ekstrak etanol tanaman pegagan mengandung fitosterol yang mampu berikatan dengan reseptor estrogen α atau β , sehingga pemberian ekstrak pegagan pada tikus tua dapat menggantikan peran dan meningkatkan estrogen sehingga terjadi peningkatan ekspresi reseptor estrogen β , karena estrogen dapat bekerja setelah berikatan dengan reseptornya (Astuti, 2009). Potensi ekstrak etanol tanaman pegagan dapat meningkatkan ekspresi ER- β melalui afinitas dengan estrogen reseptor sehingga memperlihatkan sel yg terwarnai coklat pada metode Imunohistokimia. Pemberian ekstrak tanaman pegagan dengan dosis 200 mg/Kg BB dapat meningkatkan ekspresi ER- β sehingga menjadi dosis optimal.

Pada kelompok perlakuan 3 yaitu pada dosis 300 mg/Kg BB pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan terjadi peningkatan ekspresi ER- β jika dibandingkan dengan kelompok kontrol positif, namun pada dosis tersebut terjadi penurunan jika dibandingkan pada kelompok perlakuan 2, ekspresi pada dosis tersebut tidak berbeda signifikan jika dibandingkan dengan kelompok perlakuan 1 dengan dosis 100mg/Kg BB. Penurunan ekspresi tersebut terjadi karena dosis terapi yang diberikan, dosis 300 mg/Kg BB merupakan dosis tinggi sehingga terapi estrogenik yang diberikan akan berikatan dengan ER- α melalui faktor transkripsi jalur AF-1 dan meningkatkan ekspresi dari ER- α tersebut (Pettersson dkk., 2000).

Pemberian terapi estrogenik akan meningkatkan ekspresi pada reseptornya, reseptor estrogen α atau reseptor estrogen β , namun pada penyakit kanker payudara ditemukan bahwa ekspresi yang paling tinggi adalah estrogen reseptor α (Nathalie dkk., 2014) sehingga reseptor estrogen α disebut onkogenik (penyebab kanker) Onkogen adalah versi mutan dari gen normal yang dapat memicu pertumbuhan sel

gen pada sel normal yang dapat berubah menjadi onkogen aktif akibat mutasi, disebut proto onkogen, mutasi mampu mengubah proto onkogen menjadi onkogen aktif (Sofyan, 2000). sedangkan penelitian yang dilakukan oleh Carine dkk. (2012) menunjukkan reseptor estrogen β sebagai tumor supressor, tumor supresor atau antionkogenik adalah gen yang melindungi sel dari satu langkah di jalan menuju kanker, ketika gen ini bermutasi menyebabkan hilangnya atau penurunan fungsinya, sel dapat berkembang menjadi kanker, biasanya dikombinasikan dengan perubahan genetik lainnya (Weinberg, 2014) hal tersebut menunjukkan bahwa terapi estrogenik yang paling baik adalah meningkatkan reseptor estrogen β Sehingga dosis terbaik ditunjukkan pada dosis 200 mg/Kg BB.



BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan yang telah disampaikan dapat diambil kesimpulan bahwa :

1. Pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) menurunkan ekspresi ER- α pada jaringan testis tikus putih (*Rattus novergicus*) usia tua.
2. Pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) menaikkan ekspresi ER- β pada jaringan testis tikus putih (*Rattus novergicus*) usia tua dengan dosis pemberian paling efektif yaitu 200 mg/kg BB.

6.2 Saran

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

Perlu dilakukan penelitian lanjut mengenai dampak peningkatan estrogen reseptor terhadap sistem reproduksi jantan.

DAFTAR PUSTAKA

- Akbar, B. 2010. *Tumbuhan dengan Kandungan Senyawa Aktif yang Berpotensi Sebagai Anti Fertilitas*. Jakarta : Adabia Press. 4-5
- Alvionita, D. R. Siti, dan S. Nurcholidah. 2015. *Kualitas Semen Domba Lokal pada Berbagai Kelompok Umur*. *Jurnal Ilmiah Fakultas Peternakan Universitas Padjajaran*.
- Andreollo, Santos, Araujo, opes. 2012. *Rat's Age Versus Human's Age: What is the Relationship?*, *ABCD Arq Bras Cir Dig*, 25(1), 49-51.
- Astuti, S. 2009. *Pengaruh Pemberian Tepung Kedelai Kaya Isoflavon, Seng dan Vitamin E*.
- Avenel Joseph, Rex A. Hess, David J. Schaeffer, CheMyong Ko, Susan Hudgin-Spivey, Pierre Chambon, and Barry D. Shur. 2010. *Absence of Estrogen Receptor Alpha Leads to Physiological Alterations in the Mouse Epididymis and Consequent Defects in Sperm Function*. Atlanta : Journal Biology Of Reproduction
- Baskoro, A. Dan Konthen, P. G. 2008. *Basic Immunology of Aging Process*. Naskah lengkap pada *5th Bali Endocrine Update 2nd Bali Aging and Geriatric Update Symposium*. Bali 11-13 April, 2008.
- Brinkman, A.O. 2009. *Androgen Physiology: Receptor and Metabolic disorders*. Available at: <http://www.endotext.org/male/male3index.html>. accessed: 1 november 2010.
- Budi Mulyati. 2010. *Studi Komputasi Interaksi Isoflavon dengan Reseptor Estrogen β Menggunakan Metode Oniom*. Bandung : Educhemia
- Carine Bossard, Muriel Busson, David Vindrieux, Françoise Gaudin, Véronique Machelon, Madly Brigitte¹, Carine Jacquard¹, Arnaud Pillon, Patrick Balaguer, Karl Balabanian, Gwendal Lazenec. 2012. *Potential Role of Estrogen Receptor Beta as a Tumor Suppressor of Epithelial Ovarian Cancer*. Prancis : Plus One
- Carreau S, Bouraima-Lelong H and Delalande C. 2011. *Estrogens: new players in spermatogenesis*. *Reproductive biology*. 11: 174-93.
- Cui D. *Atlas of Histology with Functional and Clinical Correlations First Ed*. 2011. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.



- Delbes G, Levacher C, Duquenne C, Racine C, Pakarinen P and Habert R. 2005. *Endogenous estrogens inhibit mouse fetal Leydig cell development via estrogen receptor alpha*. *Endocrinology*.; 146: 2454-61
- Dilman, Vladimir. *Theories Of Aging*. <http://www.antiagingsystems.com/ARTICLE-613/theories-of-aging.htm>. Diakses pada tanggal 15 Oktober 2010
- D'Souza R, Gill-Sharma MK, Pathak S, Kedia N, Kumar R, Balasinor N. 2005. *Effect of high intratesticular estrogen on the seminiferous epithelium in adult male rats*. *Molecular Cell Endocrinol*. ;241:41-48. doi : 10.1016/j.mce.2005.04.011
- Faranita, O. V. 2009. *Kualitas Spermatozoa pada Tikus Wistar Jantan Diabetes Melitus [Skripsi]*. Semarang : Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.
- Finlayson, A., Sanders, S. 2007. *Crash Course: Endocrine and Reproductive Systems. 3rd Edition*. Philadelphia: Elsevier Limited. p. 109-118, 155-172.
- Fox, JG. 2002. *Laboratory Animal Medicine 2nd*. New York: Academic pr.
- Gail S. Prins, Michael Marmer, Carl Woodham, William Chang, George Kuiper, Jan-Åke Gustafsson, Lynn Birch. 1998. *Estrogen Receptor b Messenger Ribonucleic Acid Ontogeny in the Prostate of Normal and Neonatally Estrogenized Rats*. USA : Endocrinology Society
- Gohil, K.J. 2010. *Pharmalogical Review on Centella asiatica: A Potential Herbal Cure-all*. *Review Article* p546-556.
- Gruber, C., Tschugguel, W., Schneeberger, C., and Huber, J. 2002. *Production and Action of Estrogen*. *N Engl J Med*, **346** (5).340-352.
- Guyton AC, Hall JE. 2006. *Textbook of Medical Physiology. 11th ed*. Philadelphia: Elsevier.
- Hejmej A, Kotula-balak M, Bili B. 2009. *Antiandrogenic and Estrogenic Compounds : Effect on Development and Function of Male Reproductive System*.
- Hill CM, Anway MD, Zirkin BR, Brown TR. 2004. *Intratesticular androgen levels, androgen receptor localization, and androgen receptor expression inadult rat Sertoli cells*. *Biol Reprod*. 71:1348-1358.
- Irawan, R. H. W. 2012. *Pengaruh Pemberian Yogurt Susu Kambing Sebagai Pencegahan untuk Hiperkolesteroleia melalui Pengamatan*

- Malondialdedida (MDA) dan TNF- α pada Jantung Hewan Model Tikus (Rattus novergicus)*. Journal of Universitas Brawijaya Malang. 1-8.
- Junqueira L, Carneiro J. 2009. *Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas. 12th ed.* (Mescher AL, ed.). McGraw-Hill Medical.
- Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH,. 1998. *Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta*. Endocrinology 139:4252–63.
- Kumar R, Thompson EB . 1999. *The structure of the nuclear hormone receptors*. Steroids, 64, 310-9.
- Kusriningrum, 2008. *Perancangan Percobaan*. Airlangga University Press. Surabaya. 3-15.
- Kormin, S. 2005. *The effect of Heat Processing on Triterpene Glycosides and Antioxidant Activity of Herbal Pegagan (Centella asiatica) Drink [Thesis]*. Kuala Lumpur : Universiti Teknologi Malaysia.
- Lazari MFM, Lucas TFG, Yasuhara F, Gomes GRO, Siu ER, Royer C. 2009. *Estrogen receptors and function in the male reproductive system*. Arq Bras Endocrinol Metabol. 53:923-933.
- Liu, D., Honglin, J., Grange R.W. 2005. *Genistein Activates the 3,5,-Cyclic Adenosine Monophosphate Signaling Pathway in Vascular Endothelial Cell and Protects Endothelial Barrier Function*. The Endocrinology Society USA. 146 (3):1312-1320.
- Lusiana, F. Dhafir, dan Masrianih. 2013. *Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Pegagan (Centella asiatica) terhadap Motilitas Spermatozoa Mencit (Mus musculus) Galur DDY*. Journal E-Jipbiol. Vol. 2: 24-29, Desember 2013.
- McAninch JW, Lue TF. Smith & Tanagho's. 2013. *General Urology. 18th ed.* San Francisco : McGraw-Hill Medical.
- Mendelsohn, M. E., and Karas, R. H., 1999. *Mechanisms of Disease: The Protective Effects of Estrogen on The Cardiovascular System*. N Engl JMed 340:1801–11.
- Miller, Carol A.1999. *Nursing Care of Older Adults: Theory and Practice*. Philadepia : Lippincott.
- Myles, F. dan Cooper. 2009. *Myles Buku Ajar Bidan*. Jakarta : EGC.

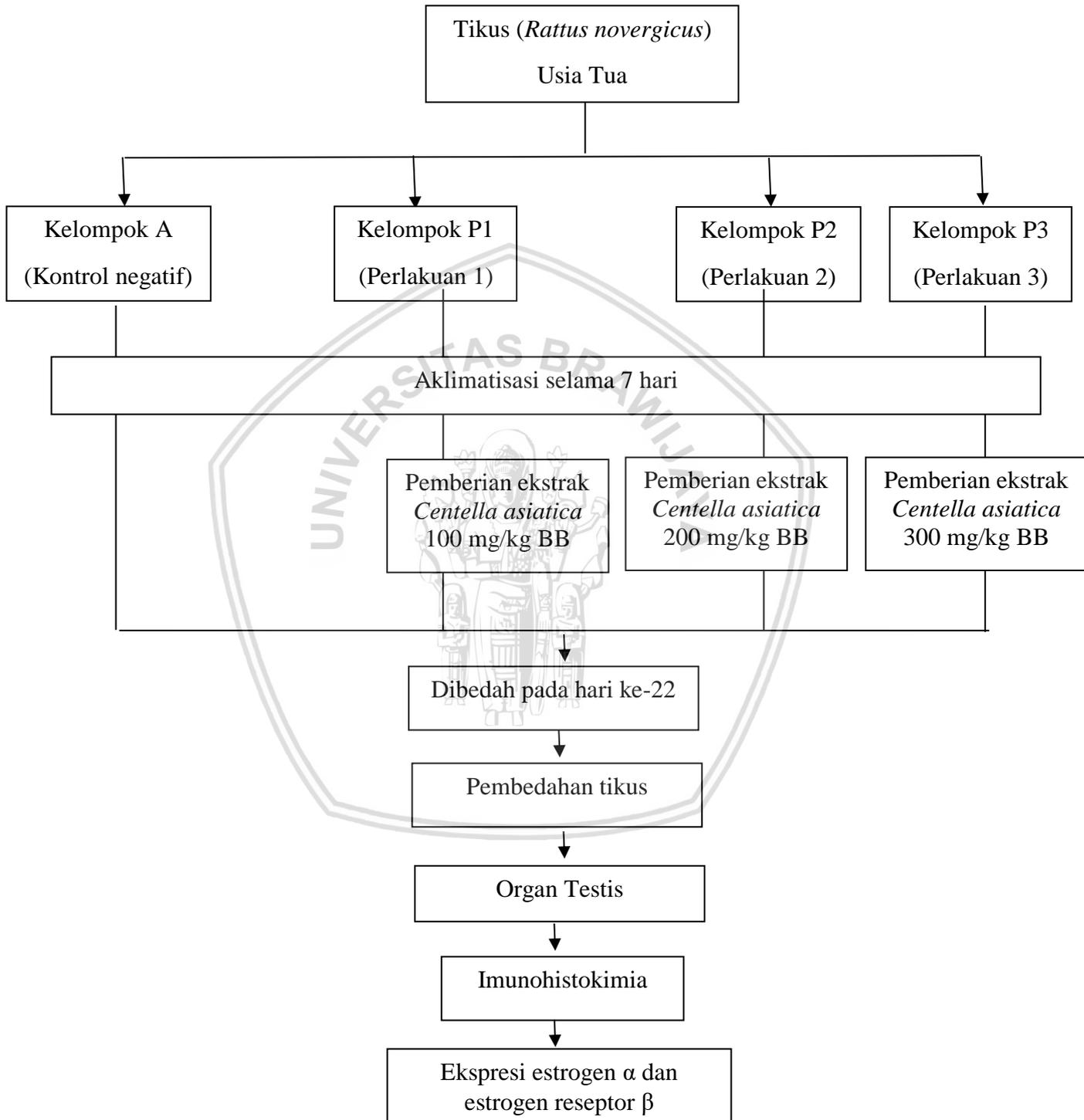
- Nathalie Zatula, Maria Wiese, Jens Bunzendahl, Walter Birchmeier, Christina Perske, Annalen Bleckmann, Felix H. Brembeck. 2014. *The BCL9-2 proto-oncogene governs estrogen receptor alpha expression in breast tumorigenesis*. Germany : Impactjournal.
- Newall, CA, Anderson LA, Phillipson JD. 1996. *Herbal Medicines A Guide for Health-care Professionals*. The Pharmaceutical Press.London.
- O'Donnell L, Robertson KM, Jones ME and Simpson ER. 2001. *Estrogen and spermatogenesis*. Endocrine reviews. 22: 289-318.
- Ogawa S, Inoue S, Watanabe T, Hiroi H, Orimo A,. 1998. *The complete primary structure of human estrogen receptor beta (hER beta) and its heterodimerization with ER alpha in vivo and in vitro*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 243:122–26
- Pangkahila, W. 2007. *Anti-aging Medicine : Memperlambat Penuaan Meningkatkan Kualitas Hidup*. hal. 24-28, 70-74
- Pangkahila, J.A. 2011. *Manfaat Pelatihan Fisik Untuk Fungsi Hormon. National Symposium and Workshop on Anti-Aging Medicine*, Denpasar.
- Pettersson K, Delaunay F, Gustafsson JA. 2000. *Estrogen receptor beta acts as a dominant regulator of estrogen signaling*. Oncogene ; 19:4970–4978. [PubMed: 11042684].
- Pilsakova, Rieèanský I, Jagla F. 2010. *The Physiological action of isoflavone phytoestrogens*. Physiological Research 59 : 651-64.
- Pratama, A. Y., Aullani'am., dan M. C. Padaga. 2013. *Gambaran Histopatologi dan Jumlah Mikroflora Jejenum Tikus Putih (Rattus novergicus) yang Terpapar Indometasin dan Mendapat Suplementasi Bakteri Asam Laktat [Skripsi]*. Malang : Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya Press.
- Rajah, T.T., Du, N., Drews, N., and Cohn, R. 2009. *Genistein in the Presence of 17β-Estradiol Inhibits Proliferation of Er β Breast Cancer Cells*. Pharmacology. 84 : 68-73.
- Samsiar, A. Ramadhan, dan D. Tureni. 2013. *Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Pegagan (Centella asiatica) terhadap Morfologi Spermatozoa Mencit (Mus musculus) Galur DDY*. Journal E-Jipbiol., Vol. 2: 20-23.

- Samson, E. Dan A. J. A, Unility.2014. *Ekspresi Immunoglobulin A (Ig A) pada Usus Halus Tikus Putih (Rattus novergicus)*. Seminar Nasional Basic Science VI FMIPA Universitas Padjajaran.
- Sherwood, L. 2007. *Human Physiology From Cells to System.6 thn Edition*. Thomson Brooks/cole. USA.
- Smith, B. J. B. dan S. Mangkoewidjojo. 1998. *Pemeliharaan Pembiakan dan Penggunaan Hewan Percobaan di Daerah Tropis*. Universitas Indonesia. Jakarta. Hlm. 228-233.
- Soejono, C. H. 2004. Pasien Geriatri dan Permasalahannya. *Artikel Medika*. no. 5 tahun XXX, Mei 2004.
- Sofyan, R., 2000. *Terapi Kanker pada Tingkat Molekuler*. Cermin Dunia Kedokteran. No. 127, 5-10.
- Solihati, N. 2013. *Antifertiitas Ekstrak Pegagan (Centella asiatica) dan Reversibilitas Fungsi Reproduksi pada Tikus (Rattus novergicus) Jantan [Disertasi]*. Bogor : Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.
- Speroff, L., dan Fritz, M.A. 2005. *Handbook for clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility Hormone Biosynthesis, Metabolism, and Mechanism of Action. Eight Edition*. Philadelphia : Lippincot Williams and Wilkins. Baltimore.p 1221-1240
- Stanley, Mickey, and Patricia Gauntlett Beare.2006. *Buku Ajar Keperawatan Gerontik, ed 2*.Jakarta:EGC
- Stoica, GE., TF. Franke, A. Wellstein, F.Czubayko, HJ. List, R. Reiter, E. Morgan,MB. Martin & A. Stoica. 2003. *Estradiolrapidly activates Akt via the ErbB2 signaling pathway*. Molecular Endocrinology. 17: 818-830
- Sugiyanto. 1995. *Petunjuk Farmakologi. Adisi IV. Laboratorium Farmakologi dan Toksikologi Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada*. Yogyakarta.
- Susilawati, T. 2011. *Spermatology*. Universitas Brawijaya Press. Malang
- Tamher dan Noorkasiani.2009.*Kesehatan Usia Lanjut dengan Pendekatan Asuhan Keperawatan*.Jakarta: Salemba Medika
- Toni Setiabudhi dan Hardiwinoto.1999. *Panduan Gerontologi Tinjauan dari Berbagai Aspek*. Jakarta:Gramedia Pustaka Utama.

- Tremblay GB, Tremblay A, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA,. 1997. *Cloning, chromosomal localization, and functional analysis of the murine estrogen receptor β* . *Mol. Endocrinol.* 11:353–65
- Waun Ki Hong, Robert C. Best, William N. Hait, Donald W. Kufe, Raphael E. Pollock, Ralph R. Weichselbaum, James F. Holland, Emil Frei III. 2010. *Cancer Medicine ed 8*. Shelton-Connecticut USA : AACR.
- Watanabe T, Inoue S, Ogawa S, Ishii Y, Hiroi H, et al. 1997. *Agonistic effect of tamoxifen is dependent on the cell type, ERE-promoter context, and estrogen receptor subtype: Functional difference between estrogen receptors α and β* . *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 236:140– 45.
- Weinberg, Robert A. 2014. *The Biology of Cancer*. Prancis: Garland Science
- Weinbauer GF, Luetjens CM, Simoni M, Nieschlag E. *Physiology of Testicular Function*. In: Nieschlag E, Behre HM, Nieschlag S, eds. *Andrology: Male Reproductive Health and Dysfunction*. 3rd Ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2010:629. doi:10.1007/978-3-54078355-8.
- Winarto, W. R. Dan Surbakti, M. 2003. *Khasiat dan Manfaat Pegagan*. Jakarta : Agromedia Pustaka.
- Woodhouse, D. 2003. *Testosterone-Physiology and Factor Affecting Serum Concentration*. Available from: <http://www.absolutebodybuilding.co>

LAMPIRAN

Lampiran 1. Skema Penelitian



Lampiran 2. Pembuatan Ekstrak Etanol Tanaman Pegagan (*Centella asiatica*)

Tanaman Pegagan
(*Centella asiatica*)

400 mg serbuk simplisia ditambahkan 500 mL etanol 70%
Dicampur dalam maserator dengan pengadukan pelan selama 30
menit pada awal perendaman
Disimpan campuran selama 24 jam dan dilakukan proses
remaserasi
Filtrat disaring dan diuapkan dengan *rotary evaporator* dengan
suhu 30°C
Diletakkan di *vacum drying* untuk menghilangkan kadar air
Dibuat bentuk phytosome dengan metode sonikasi
Dicampur letichin, etanol 70%, dan ekstrak *Centella asiatica*
Distirer ± 3 jam dengan *magnetic stirrer* 2000 rpm
Dilakukan penguapan pelarut dengan *rotary evaporator*
Dihidrasi dengan aqua bebas CO₂

Hasil

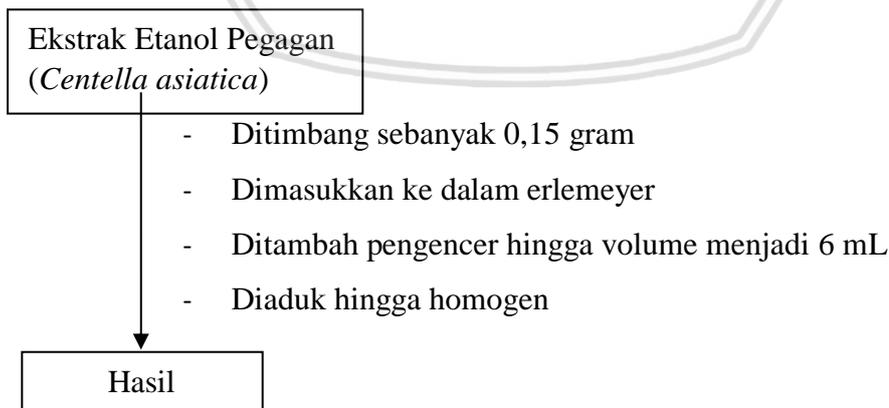
Lampiran 3. Perhitungan Dosis Terapi Ekstrak Etanol Tanaman Pegagan (*Centella asiatica*)

Perhitungan dosis terapi adalah diasumsikan bahwa berat seluruh tikus putih (*Rattus novergicus*) usia tua yaitu 300 gram. Setiap kelompok perlakuan terdapat 5 ekor tikus putih (*Rattus novergicus*) dan setiap tikus putih (*Rattus novergicus*) disonde dengan ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) sebanyak 1 mL. Pembuatan dosis ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) dilebihkan 1 ekor tikus putih (*Rattus novergicus*), sehingga menjadi 6 ekor tikus. Hal ini bertujuan untuk mengantisipasi ekstrak yang tertinggal di dalam *disposable syringe*, sehingga diharapkan dosis yang masuk tetap sesuai dengan perhitungan. Rincian perhitungan dosis ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) yang digunakan adalah sebagai berikut :

Dosis 1

Dosis ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) 100 mg/kg BB

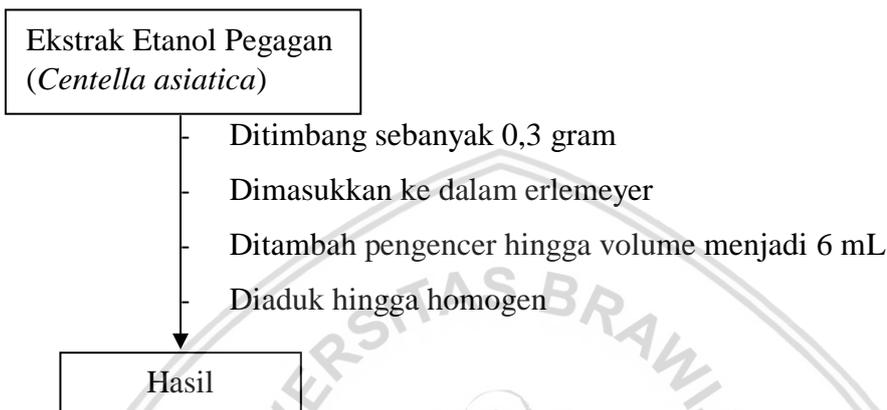
$$\begin{aligned} D1 &= \text{Berat badan} \times \text{dosis} \times \text{jumlah tikus putih (Rattus novergicus)} \\ &= 0,3 \text{ kg} \times 100 \text{ mg/kg BB} \times 5 \text{ ekor} \\ &= 150 \text{ mg} = 0,15 \text{ gram} \end{aligned}$$



Dosis 2

Dosis ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) 200 mg/kg BB

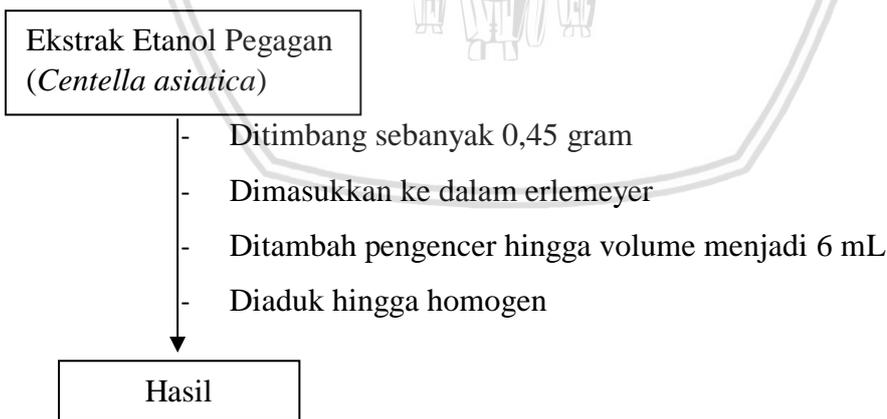
$$\begin{aligned}
 D2 &= \text{Berat badan} \times \text{dosis} \times \text{jumlah tikus putih (Rattus novergicus)} \\
 &= 0,3 \text{ kg} \times 200 \text{ mg/kg BB} \times 5 \text{ ekor} \\
 &= 300 \text{ mg} = 0,3 \text{ gram}
 \end{aligned}$$



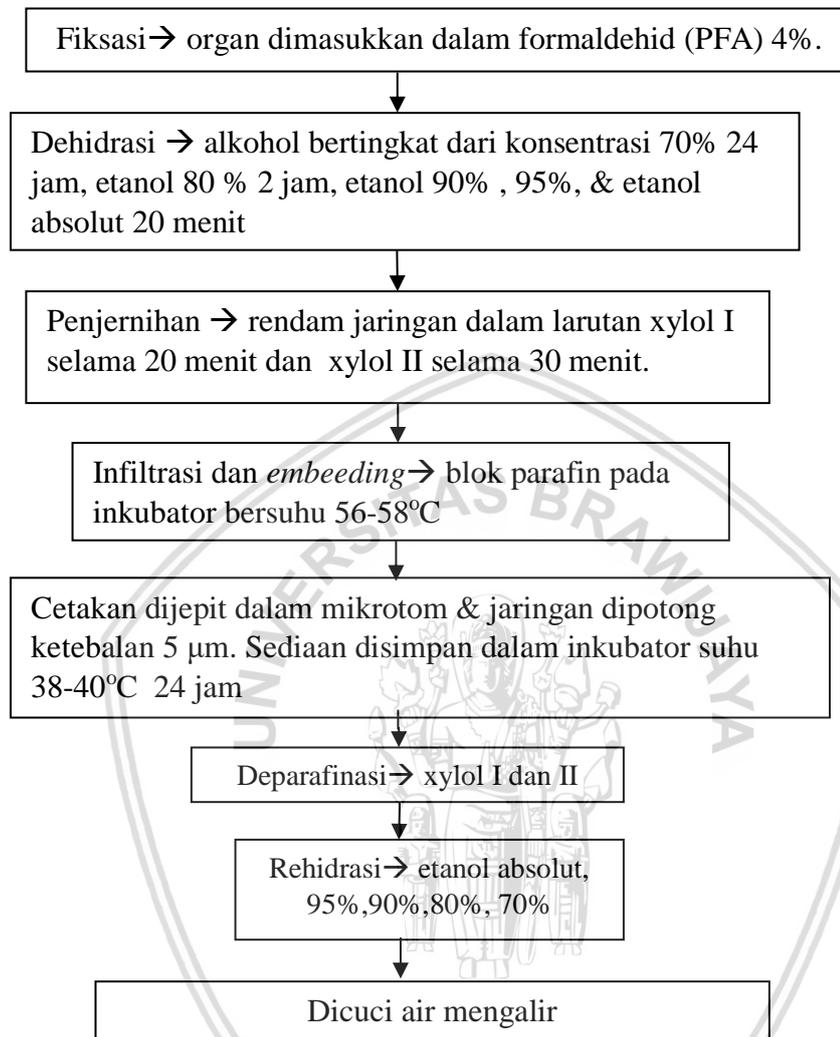
Dosis 3

Dosis ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) 300 mg/kg BB

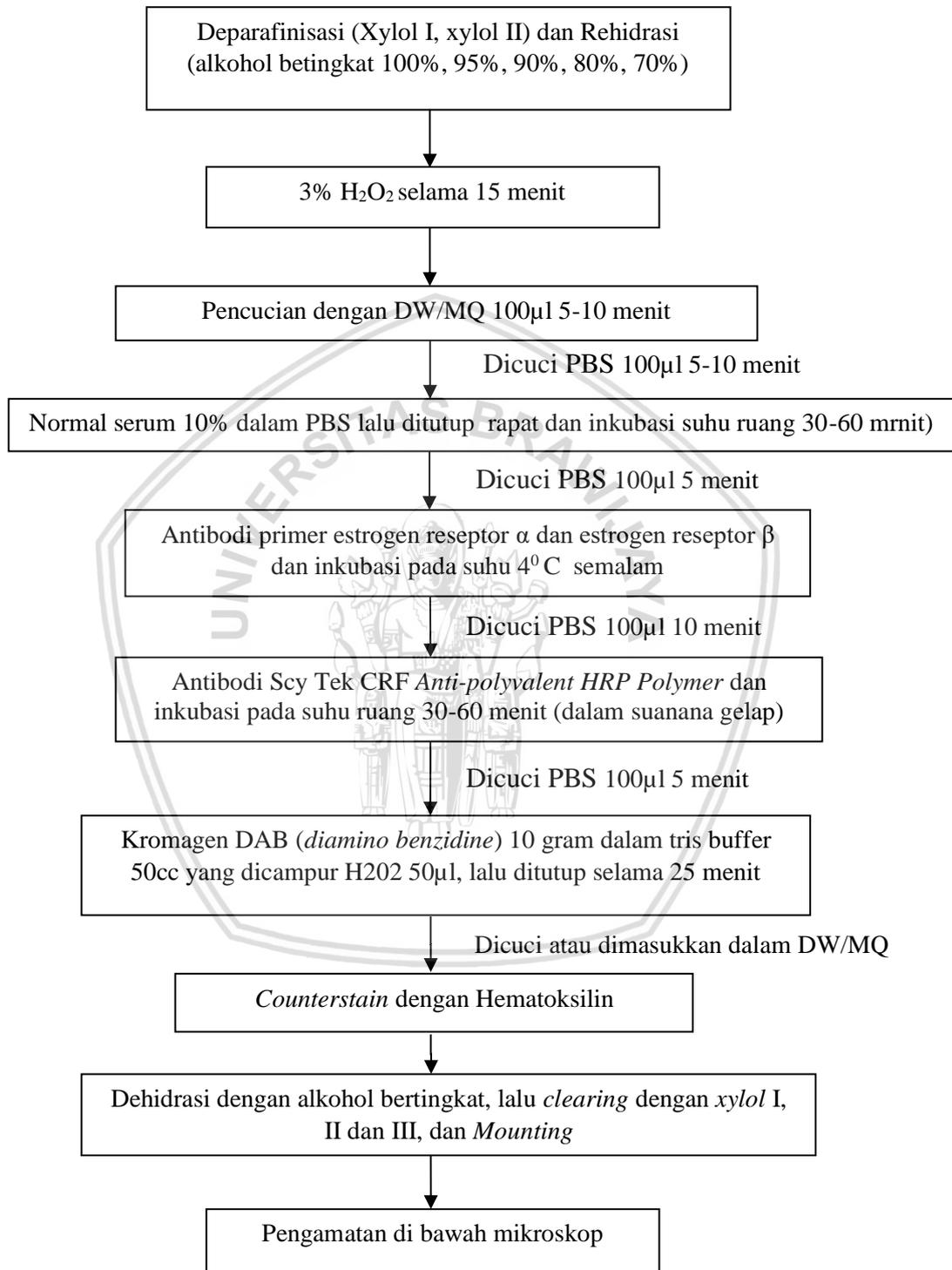
$$\begin{aligned}
 D3 &= \text{Berat badan} \times \text{dosis} \times \text{jumlah tikus putih (Rattus novergicus)} \\
 &= 0,3 \text{ kg} \times 300 \text{ mg/kg BB} \times 5 \text{ ekor} \\
 &= 450 \text{ mg} = 0,45 \text{ gram}
 \end{aligned}$$



Lampiran 4. Pembuatan Preparat Histopatologi Testis



Lampiran 5. Metode Imunohistokimia



LAMPIRAN 6. Determinasi Tanaman Pegagan



DINAS KESEHATAN
UPT MATERIA MEDICA BATU
Jalan Lahor No.87 Telp. (0341) 593396
KOTA BATU 65313

Nomor : 074/373/102.7/2017
Sifat : Biasa
Perihal : **Determinasi Tanaman Pegagan**

Memenuhi permohonan saudara :

Nama / NIM : GRAHADENATA HANA P. / 145130101111060
GHYARI SYAFRIZALDI NASUKHA/ 145130107111012
GANANG RILO PAMBUDI / 145130107111005
ESTI LUTFI OKTAVIANI / 145130101111018
BAY ABDUL WAHAB / 145130107111021
RISALIA ELITE DITYASARI / 145130101111067
Fakultas : FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN, JURUSAN PENDIDIKAN DOKTER HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA MALANG

1. Perihal determinasi tanaman pegagan

Kingdom : Plantae (Tumbuhan)
Subkingdom : Tracheobionta (Tumbuhan berpembuluh)
Super Divisi : Spermatophyta (Menghasilkan biji)
Divisi : Magnoliophyta (Tumbuhan berbunga)
Kelas : Dicotyledonae
Bangsa : Umbellales
Suku : Umbelliferae
Marga : Centella
Jenis : *Centella asiatica* (L.) Urban.
Sinonim : *Hydrocotyle asiatica* L. = *Pasequimus* Rumph.

Nama Daerah : Pegagan, gagan-gagan, rendeng, kerok batok (Jawa), daun kaki kuda (Indonesia), pegaga (Ujung Pandang), antanan gede, antanan rambat (Sunda), dan tungke (Bugis), kos tekosan (Madura), kori-kori (Halmahera).
Kunci Determinasi : 1b-2b-3b-4b-6b-7b-9b-10b-11b-12b-13b-14b-16a-239b-243b-244b-248b-249b-250b-266b-267a-268a-269a-2b-3.

2. Morfologi : Pegagan merupakan terna menahun tanpa batang, tetapi dengan rimpang pendek dan stolon-stolon yang merayap dengan panjang 10-80 cm. Akar keluar dari setiap bonggol, banyak bercabang yang membentuk tumbuhan baru. Helai daun tunggal, bertangkai panjang sekitar 5-15 cm berbentuk ginjal. Tepinya bergerigi atau beringgit, dengan penampang 1-7 cm tersusun dalam roset yang terdiri atas 2-10 helai daun, kadang-kadang agak berambut. Bunga berwarna putih atau merah muda, tersusun dalam karangan berupa payung, tunggal atau 3-5 bersama-sama keluar dari ketiak daun. Tangkai bunga 5-50 mm. Buah kecil bergantung yang berbentuk lonjong/pipih panjang 2-2.5 mm, baunya wangi dan rasanya pahit.

3. Nama Simplicia : Centellae Folium / Daun Pegagan.

4. Kandungan : Asiaticoside, thankuniside, isothankuniside, madecassoside, brahmoside, brahminoside, brahmic acid, madasiatic acid, meso-inositol, centellose, carotenoids, garam-garam mineral seperti garam kalium, natrium, magnesium, kalsium, besi, vellarine, dan zat samak. Senyawa glikosida triterpenoida yang disebut asiaticoside dan senyawaan sejenis, mempunyai kasiat anti lepra. Daun kaki kuda mengandung senyawa glikosida trigergpenoida, alkaloid hidrokotilin, steroid, tanin, minyak atsiri, gula pereduksi dan garam-garam mineral seperti garam kalium, natrium, magnesium, kalsium dan besi.

5. Penggunaan : Penelitian.

6. Daftar Pustaka

- Anonim. 1977. *Materia Medica Indonesia "Jilid I"*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Anonim. 2007. *Serial Tanaman Obat "PEGAGAN"*. Badan POM Republik Indonesia.
- Anonim. <http://www.iptek.net.id/pegagan>, diakses tanggal 29 oktober 2010.
- Syamsuhidayat, Sri Sugati dan Hutapea, Johny Ria. 1991. *Inventaris Tanaman Obat Indonesia 1*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia: Badan Penelitian Dan Pengembangan
- Van Steenis, CGGJ. 2008. *FLORA*. Pradnya Paramita, Jakarta.

Demikian surat keterangan determinasi ini kami buat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

Batu, 17 Oktober 2017
Kepala UPT Materia Medica Batu




LAMPIRAN 7. Sertifikat Laik Etik



**KOMISI ETIK PENELITIAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK
"ETHICAL CLEARANCE"**

No: 842-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 EKSTRAK ETANOL TANAMAN PEGAGAN (*Centella asiatica*) TERHADAP EKSPREI MDA SEL SPERMATOGENIK DAN SPERMATOGENESIS PADA JARINGAN TESTIS TIKUS PUTIH USIA TUA

PENELITI : RISALIA ELITE DITYASARI

UNIT/LEMBAGA/TEMPAT : UNIVERSITAS BRAWIJAYA

DINYATAKAN : LAIK ETIK

Malang, 10 Oktober 2017
Ketua Komisi Etik Penelitian
Universitas Brawijaya



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

LAMPIRAN 8. Uji ANOVA Estrogen Receptor α

ONEWAY

Perlakuan BY ER α
 /STATISTICS DESCRIPTIVES HOMOGENEITY
 /MISSING ANALYSIS
 /POSTHOC = TUKEY ALPHA(.05).

Oneway

[DataSet0]

Descriptives

PERLAKUAN	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
P0	5	58.0000	3.80789	1.70294	53.2719	62.7281	52.00	62.00
P1	5	45.2000	2.86356	1.28062	41.6444	48.7556	42.00	49.00
P2	5	31.0000	5.00000	2.23607	24.7917	37.2083	23.00	36.00
P3	5	52.0000	2.54951	1.14018	48.8344	55.1656	49.00	55.00
Total	20	46.5500	10.85539	2.42734	41.4695	51.6305	23.00	62.00

Test of Homogeneity of Variances

PERLAKUAN	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
	.597	3	16	.626

ANOVA

PERLAKUAN	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2022.150	3	674.050	49.745	.000
Within Groups	216.800	16	13.550		
Total	2238.950	19			



Post Hoc

Multiple Comparisons

PERLAKUAN
Tukey HSD

(I) ER ALFA	(J) ER ALFA	Mean Difference (I- J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
P0	P1	12.80000 [*]	2.32809	.000	6.1393	19.4607
	P2	27.00000 [*]	2.32809	.000	20.3393	33.6607
	P3	6.00000	2.32809	.085	-.6607	12.6607
P1	P0	-12.80000 [*]	2.32809	.000	-19.4607	-6.1393
	P2	14.20000 [*]	2.32809	.000	7.5393	20.8607
	P3	-6.80000 [*]	2.32809	.045	-13.4607	-.1393
P2	P0	-27.00000 [*]	2.32809	.000	-33.6607	-20.3393
	P1	-14.20000 [*]	2.32809	.000	-20.8607	-7.5393
	P3	-21.00000 [*]	2.32809	.000	-27.6607	-14.3393
P3	P0	-6.00000	2.32809	.085	-12.6607	.6607
	P1	6.80000 [*]	2.32809	.045	.1393	13.4607
	P2	21.00000 [*]	2.32809	.000	14.3393	27.6607

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Homogeneous

PERLAKUAN

Tukey HSD

ER ALFA	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
P2	5	31.0000		
P1	5		45.2000	
P3	5			52.0000
P0	5			58.0000
Sig.		1.000	1.000	.085

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.



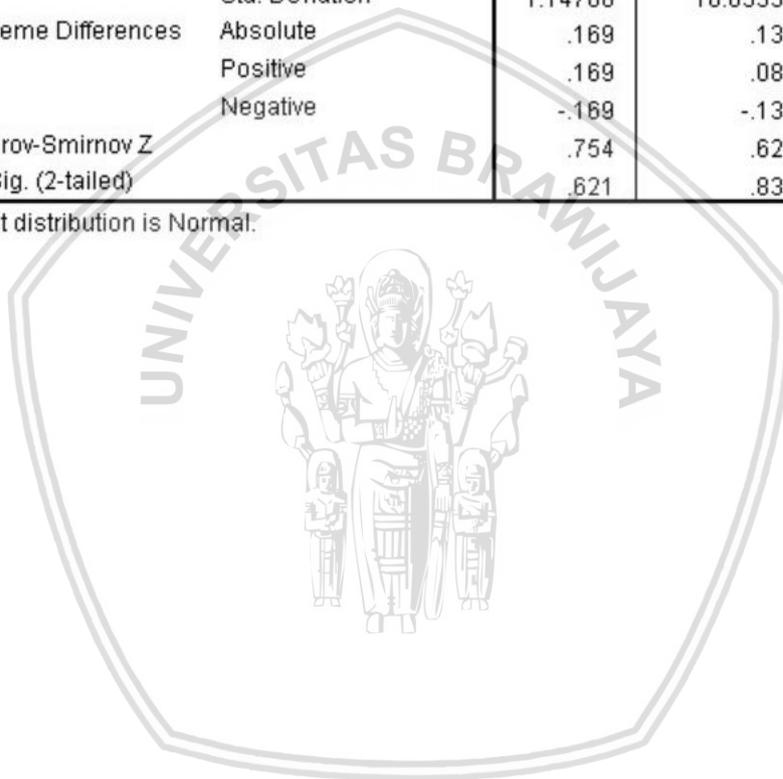
/K-S(NORMAL)= Perlakuan ERα
 /MISSING ANALYSIS.

[DataSet0]

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		ER ALFA	PERLAKUAN
N		20	20
Normal Parameters ^a	Mean	2.5000	46.5500
	Std. Deviation	1.14708	10.85539
Most Extreme Differences	Absolute	.169	.139
	Positive	.169	.084
	Negative	-.169	-.139
Kolmogorov-Smirnov Z		.754	.623
Asymp. Sig. (2-tailed)		.621	.833

a. Test distribution is Normal.



Lampiran 9. Uji ANOVA Estrogen Receptor β

ONEWAY

Perlakuan BY ER β
 /STATISTICS DESCRIPTIVES HOMOGENEITY
 /MISSING ANALYSIS
 /POSTHOC = TUKEY ALPHA(.05).

Oneway

[DataSet0]

Descriptives

PERLAKUAN	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
P0	5	46.8000	8.52643	3.81314	36.2130	57.3870	38.00	58.00
P1	5	83.2000	10.28105	4.59783	70.4344	95.9656	70.00	96.00
P2	5	1.1420E2	10.54514	4.71593	101.1065	127.2935	102.00	128.00
P3	5	58.2000	6.76018	3.02324	49.8061	66.5939	49.00	65.00
Total	20	75.6000	27.85375	6.22829	62.5640	88.6360	38.00	128.00

Test of Homogeneity of Variances

PERLAKUAN	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
	.575	3	16	.640

ANOVA

PERLAKUAN	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	13399.600	3	4466.533	53.284	.000
Within Groups	1341.200	16	83.825		
Total	14740.800	19			

Post Hoc

Multiple Comparisons

PERLAKUAN
Tukey HSD

(I) ER BETA	(J) ER BETA	Mean Difference (I- J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
P0	P1	-36.40000 ^a	5.79051	.000	-52.9668	-19.8332
	P2	-67.40000 ^a	5.79051	.000	-83.9668	-50.8332
	P3	-11.40000	5.79051	.240	-27.9668	5.1668
P1	P0	36.40000 ^a	5.79051	.000	19.8332	52.9668
	P2	-31.00000 ^a	5.79051	.000	-47.5668	-14.4332
	P3	25.00000 ^a	5.79051	.003	8.4332	41.5668
P2	P0	67.40000 ^a	5.79051	.000	50.8332	83.9668
	P1	31.00000 ^a	5.79051	.000	14.4332	47.5668
	P3	56.00000 ^a	5.79051	.000	39.4332	72.5668
P3	P0	11.40000	5.79051	.240	-5.1668	27.9668
	P1	-25.00000 ^a	5.79051	.003	-41.5668	-8.4332
	P2	-56.00000 ^a	5.79051	.000	-72.5668	-39.4332

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Homogeneous

PERLAKUAN

Tukey HSD

ER BETA	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
P0	5	46.8000		
P3	5	58.2000		
P1	5		83.2000	
P2	5			1.1420E2
Sig.		.240	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.



[DataSet0]

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		ER_BETA	PERLAKUAN
N		20	20
Normal Parameters ^a	Mean	2.5000	75.6000
	Std. Deviation	1.14708	27.85375
Most Extreme Differences	Absolute	.169	.148
	Positive	.169	.148
	Negative	-.169	-.089
Kolmogorov-Smirnov Z		.754	.663
Asymp. Sig. (2-tailed)		.621	.772

a. Test distribution is Normal.

