PERBEDAAN PEMBERIAN EKSTRAK TERONG CEPOKA (*Solanum torvum* S.) DAN BIJI KAPUK (*Ceiba pentandra* G.) TERHADAP EKSPRESI PROTEIN P53 DAN JUMLAH SEL LEYDIG PADA TIKUS (*Rattus norvegicus*)

SKRIPSI

Oleh:
LIZA SADDA CAKRAWATI
155130100111008

PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2019

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

PERBEDAAN PEMBERIAN EKSTRAK TERONG CEPOKA (*Solanum torvum S.*) DAN BIJI KAPUK (*Ceiba pentandra G.*) TERHADAP EKSPRESI PROTEIN P53 DAN JUMLAH SEL LEYDIG PADA TIKUS (*Rattus norvegicus*)

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh:
LIZA SADDA CAKRAWATI
155130100111008

PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2019

repository.ub.ac.id

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

PERBEDAAN PEMBERIAN EKSTRAK TERONG CEPOKA (*Solanum torvum* S.) DAN BIJI KAPUK (*Ceiba pentandra* G.) TERHADAP EKSPRESI PROTEIN P53 DAN JUMLAH SEL LEYDIG PADA TIKUS (*Rattus norvegicus*)

Oleh:
LIZA SADDA CAKRAWATI
155130100111008

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal 23 April 2019
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Dosen Pembimbing I	Dosen Pembimbing II
Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES	**drh. Viski Fitri Hendrawan, M.Vet**
NIP. 19600903 198802 2 001	NIP. 19880518 201504 1 003

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Brawijaya

Dr. Ir. Sudarminto Setyo Yuwono, M. App. Sc.
NIP. 19631216 198803 1 002

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

repository.ub.ac.id

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Liza Sadda Cakrawati
NIM : 155130100111008
Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan
Penulis Skripsi berjudul :

Perbedaan Pemberian Ekstrak Terong Cepoka (*Solanum torvum* S.) dan Biji Kapuk (*Ceiba pentandra* G.) Terhadap Ekspresi Protein p53 dan Jumlah Sel Leydig pada Tikus (*Rattus norvegicus*)

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, 23 April 2019
Yang menyatakan,

(Liza Sadda Cakrawati)
NIM. 155130100111008

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

Perbedaan Pemberian Ekstrak Terong Cepoka (*Solanum torvum* S.) dan Biji Kapuk (*Ceiba pentandra* G.) Terhadap Ekspresi Protein p53 dan Jumlah Sel Leydig pada Tikus (*Rattus norvegicus*)

ABSTRAK

Pertumbuhan penduduk dari tahun ke tahun mengalami peningkatan. Peningkatan pertumbuhan penduduk berpengaruh pada hewan kesayangan di sekitar lingkungan. Oleh sebab itu, perlu adanya pengendalian pertumbuhan penduduk melalui penggunaan kontrasepsi. Kontrasepsi berfungsi untuk mencegah bertemunya sel telur yang matang dengan sel mani, sehingga tidak akan terjadi pembuahan atau infertil. Terong cepoka (*Solanum torvum* S.) yang memiliki kandungan solasodin dan biji kapuk (*Ceiba pentandra* G.) yang mengandung senyawa gosipol berfungsi sebagai agen antifertilitas. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak terong cepoka (*Solanum torvum* S.) dan biji kapuk (*Ceiba pentandra* G.) sebagai kandidat kontrasepsi pria terhadap ekspresi protein p53 di tubulus seminiferus dan jumlah sel leydig pada tikus putih (*Rattus norvegicus*). Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap dengan 18 ekor tikus putih strain *Wistar* jantan umur 2,5-3 bulan dengan berat badan 190-320 g dibagi menjadi 3 kelompok dengan 6 ulangan, yaitu kelompok kontrol negatif (K-), kelompok perlakuan 1 (P1) yang diberikan ekstrak terong cepoka dengan dosis 1 g/kg berat badan tikus, perlakuan 2 (P2) yang diberikan ekstrak biji kapuk dengan dosis 0,1 g/kg berat badan tikus. Analisa data yang digunakan dalam penelitian ini menggunakan analisa data secara kuantitatif menggunakan uji statistik dengan *one-way* ANOVA, α=0,05 dan dilanjutkan dengan Uji Beda Nyata Jujur (α=5%). Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian ekstrak biji kapuk (*Ceiba pentandra* G.) dosis 0,1 g/BB secara signifikan ($P<0,05$) dapat meningkatkan ekspresi protein p53 serta dapat menurunkan jumlah sel leydig dibanding dengan pemberian ekstrak terong cepoka (*Solanum torvum* S.) dosis 1 g/kgBB. Kesimpulan penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak biji kapuk (*Ceiba pentandra* G.) dosis 0,1 g/kgBB meningkatkan ekspresi protein p53 dan menurunkan jumlah sel leydig. Disimpulkan bahwa ekstrak biji kapuk dapat dikembangkan sebagai kandidat kontrasepsi pria.

Kata Kunci : Terong Cepoka (*Solanum torvum* S.), Biji Kapuk (*Ceiba pentandra* G.), Kontrasepsi, Protein p53, Sel Leydig

Difference Between The Administration of Cepoka Eggplant Extract (*Solanum torvum* S.) and Kapok Seeds (*Ceiba pentandra* G.) Toward p53 Protein Expression and The Number of Leydig Cells on Rats (*Rattus norvegicus*)

ABSTRACT

Population growth from year to year has increased. Increased population growth affects the favorite animals around the environment. Therefore, it is necessary to control population growth through the use of contraception. Contraception functions to prevent the meeting of mature eggs with semen cells, so that fertilization or infertility will not occur. Cepoka eggplant (*Solanum torvum* S.) which contains solasodine and kapok seeds (*Ceiba pentandra* G.) which contain gosipol compounds function as antifertility agents. This study aims to determine the effect of eggplant cepoka extract (*Solanum torvum* S.) and kapok seeds (*Ceiba pentandra* G.) as male contraceptive candidates on the expression of p53 protein in the seminiferous tubules and the number of leydig cells in white rats (*Rattus norvegicus*). This study used a completely randomized design with 18 white male Wistar rats 2.5-3 months old with a weight of 190-320 g divided into 3 groups with 6 replications, namely the negative control group (K-), treatment group 1 (P1) given the eggplant cepoka extract at a dose of 1 g/kg body weight of the rat, treatment 2 (P2) was given kapok seed extract at a dose of 0.1 g/kg body weight of mice. Analysis of the data used in this study used quantitative data analysis using statistical tests with one-way ANOVA, $\alpha = 0.05$ and continued with an Honest Real Difference Test (α=5%). The results showed that the administration of kapok seed extract (*Ceiba pentandra* G.) dose of 0.1 g/BB significantly ($P<0.05$) could increase the expression of protein p53 and could reduce the number of leydig cells compared with the administration of eggplant cepoka extract (*Solanum torvum* S.) dose of 1 g/kgBB. In conclusion, kapok seed extract possibly is increased the expressions of p53 protein and reduced the number of leydig cells. It can be concluded that kapok seed extract have possibly develop as male contraceptive candidate.

Keywords : Cepoka Eggplant (*Solanum torvum* S.), Kapok Seed (*Ceiba pentandra* G.), Contraception, Protein p53, Leydig Cells

repository.ub.ac.id

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadirat Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini yang berjudul "Perbedaan Pemberian Ekstrak Terong Cepoka (*Solanum torvum* S.) dan Biji Kapuk (*Ceiba pentandra* G.) Terhadap Ekspresi Protein p53 dan Jumlah Sel Leydig pada Tikus (*Rattus norvegicus*)".

Penulis menyampaikan terima kasih sebesar-besarnya kepada seluruh pihak yang telah membantu membimbing dan menyelesaikan skripsi ini, secara khusus penulis menyampaikan terima kasih kepada :

1. Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES selaku dosen pembimbing I atas waktu, bimbingan, arahan, kesabaran, dan motivasi kepada penulis dalam penyusunan dan penyempurnaan skripsi ini.
2. drh. Viski Fitri Hendrawan, M. Vet selaku dosen pembimbing II atas waktu, bimbingan, arahan, kesabaran, dan motivasi kepada penulis dalam penyusunan dan penyempurnaan skripsi ini.
3. drh. Aulia Firmawati, M. Vet selaku dosen penguji I atas waktu, bimbingan, tanggapan, kritik, dan saran yang diberikan.
4. drh. Wawid Purwatiningsih, M. Vet selaku dosen penguji II atas waktu, bimbingan, tanggapan, kritik, dan saran yang diberikan.
5. Dr. Ir. Sudarminto Setyo Yuwono, M. App. Sc. selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan yang selalu memberikan dukungan dalam penyelesaian skripsi ini dan demi kemajuan FKH UB.
6. drh. Dyah Ayu Oktavianie A.P., M. Biotech selaku Wakin Dekan 1 Fakultas Kedokteran Hewan yang selalu memberikan dukungan dalam penyelesaian skripsi ini dan demi kemajuan FKH UB.
7. Drh. Desi Wulansari, M. Vet, drh. Viski Fitri Hendrawan, M. Vet, drh. Yudit Oktanella, M. Si, dan drh. Galuh Chandra Agustina, M. Si. atas waktu, bimbingan, arahan, kesabaran, dan motivasi selama penelitian serta semangat yang selalu diberikan.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

8. Ayahanda Capek Buanan dan ibunda Tumisah serta saudara saya tercinta Novita Rufianti dan Ziko Djefrianto untuk doa, kasih sayang, motivasi, dukungan serta pengorbanan baik moril maupun materi selama ini.
9. Tim skripsi saya yaitu Kama, Afwan, Hevin, Satria, Taufiq dan kak Nadia yang telah semangat bekerja bersama dalam menyelesaikan skripsi ini.
10. Teman-teman seperjuangan di bangku kuliah NakdekxNyinyir terkhusus Kamay, Annisa, Inggrit, Riris, Tyas, Dini, Leli yang selalu bersama baik suka maupun duka serta kak Firdausi, kak Ila, kak Nate, kak Iif yang selalu memberikan motivasi dan semangat untuk segera menyelesaikan skripsi.
11. Seluruh asisten praktikum laboratorium anatomi veteriner FKH UB.
12. Teman-teman seperjuangan keluarga besar angkatan 2015 FKH UB khususnya kelas A atas cinta, persahabatan, semangat, inspirasi, dan mimpi-mimpi yang luar biasa.
13. Serta kepada semua pihak yang telah membantu dalam pelaksanaan dan penyusunan laporan ini yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Penulis menyadari bahwa tidak ada manusia yang sempurna begitu juga dalam penulisan skripsi ini. Apabila nantinya terdapat kekurangan dan kesalahan dalam penulisan, penulis berharap kepada seluruh pihak agar dapat memberikan kritik dan saran yang membangun.

Akhir kata, penulis berharap semoga Allah SWT membalas segala kebaikan yang telah diberikan kepada penulis dan semoga skripsi ini dapat bermanfaat serta menambah pengetahuan bagi penulis maupun pembaca. Amin ya Rabbal'alamin.

Malang, 23 April 2019

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 xiii
BAB 1 PENDAHULUAN 1
1.1 Latar Belakang Penelitian 1
1.2 Rumusan Masalah 5
1.3 Batasan Masalah 6
1.4 Tujuan Penelitian 7
1.5 Manfaat Penelitian 7
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA 8
2.1 Kontrasepsi 8
2.2 Terong Cepoka (*Solanum torvum* S.) 10
2.3 Biji Kapuk (*Ceiba pentandra* G.) 12
2.4 Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) 15
2.5 Testis 17
2.6 Spermatogenesis 21
2.7 Protein p53 22
2.8 Sel Leydig 24
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN 26
3.1 Kerangka Konseptual 26
3.2 Hipotesis Penelitian 29
BAB 4 METODE PENELITIAN 30
4.1 Waktu dan Tempat Penelitian 30
4.2 Alat dan Bahan 31
4.2.1 Alat-alat yang Digunakan 31
4.2.2 Bahan-bahan yang Digunakan 31
4.3 Rancangan Penelitian 31
4.4 Pengulangan 32
4.5 Variabel Penelitian 33
4.6 Tahapan Penelitian 33
4.6.1 Persiapan Hewan Coba Tikus (*Rattus norvegicus*) 33
4.6.2 Pembuatan Ekstrak Terong Cepoka dan Biji Kapuk 33
4.6.3 Pemberian Ekstrak Terong Cepoka dan Biji Kapuk 34
4.6.4 Pembedahan Tikus Pasca Perlakuan 35
4.6.5 Pembuatan Preparat Histologi 35

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

4.6.6 Perhitungan Ekspresi Protein p53 dengan Metode Immunohistokimia 39
4.6.7 Perhitungan Jumlah Sel Leydig 41
4.7 Analisa Data 41
BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN 42
5.1 Pengaruh Pemberian Ekstrak Terong Cepoka (*Solanum torvum* S.) dan Biji Kapuk (*Ceiba pentandra* G.) Terhadap Ekspresi Protein p53 Tubulus Seminiferus Testis pada Tikus Putih Wistar (*Rattus norvegicus*) 42
5.2 Pengaruh Pemberian Ekstrak Terong Cepoka (*Solanum torvum* S.) dan Biji Kapuk (*Ceiba pentandra* G.) Terhadap Gambaran Histologi Jumlah Sel Leydig Tubulus Seminiferus Testis pada Tikus Putih Wistar (*Rattus norvegicus*) 49
BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN 56
6.1 Kesimpulan 56
6.2 Saran 56
DAFTAR PUSTAKA 57
LAMPIRAN 61

DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

%	: Persen
^{0}C	: derajat celcius
±	: kurang lebih
ABP	: *Androgen Binding Protein*
AIF	: *Apoptosis Inducing Factor*
APAF-1	: *Apototic Protease Activating Factor-1*
ATP	: *Adenosine Triphosphate*
ANOVA	: *Analysis of Variance*
Bax	: *Bcl-2 Assosiated X*
BB	: Berat Badan
Bcl-2	: *B-cell Lymphoma 2*
BNF	: *Buffer Neutral Formalin*
BNJ	: Beda Nyata Jujur
cm	: sentimeter
DAB	: *diaminobenziddine*
DNA	: *Deoxyribose-Nucleic Acid*
dpl	: diatas permukaan laut
FasL	: fas ligan
FSH	: *Folicle Stimulating Hormone*
g	: gram
g/kg	: gram per kilogram
GnRH	: *Gonadotropin Releasing Hormone*
HE	: *Hematoxilin Eosin*
IHK	: Imunohistokimia
KB	: Keluarga Berencana
kg	: kilogram
LH	: *Luteinizing Hormone*
m	: meter
mg/kg	: miligram per kilogram
mL	: mililiter
mm	: milimeter
mRNA	: *messenger Ribonucleic Acid*
mtDNA	: mitokondria *Deoxyribose-Nucleic Acid*
p53	: Protein 53
PBS	: *Phosphat Buffer Saline*
RAL	: Rancangan Acak Lengkap
ROS	: *Reactive Oxygen Specific*
TNF-α	: *Tumor Necrosis Factor α*
TRP53	: *Transformation-Related* Protein 53
UPT	: Unit Pelaksana Teknis

repository.ub.ac.id

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Penelitian

Pertumbuhan penduduk di Indonesia setiap tahun mengalami peningkatan yang sangat pesat dan fantastis. Tingginya pertumbuhan penduduk menjadi penyebab utama permasalahan kependudukan di Indonesia. Menurut Badan Pusat Statistik (2015), jumlah penduduk Indonesia di tahun 2014 sebesar 252,164 juta jiwa atau sekitar 3,5% dari keseluruhan jumlah penduduk dunia. Hal ini membuat Indonesia berada dalam peringkat keempat dengan jumlah penduduk terbanyak di dunia.

Upaya pemerintah dalam menangani permasalahan tersebut yaitu dengan program keluarga berencana (KB). Program keluarga berencana (KB) merupakan program pemerintah yang bertujuan untuk mengendalikan jumlah penduduk melalui penggunaan obat maupun alat kontrasepsi. Kontrasepsi secara umum diartikan sebagai suatu cara untuk mencegah kehamilan (Laili, 2017). Program keluarga berencana (KB) yang dilaksanakan oleh pemerintah masih belum dapat berjalan optimal akibat keikutsertaan pria dalam ber KB masih sangat rendah. Hal ini disebabkan belum tersedianya sarana KB yang benar-benar aman dan nyaman bagi pria. Upaya peningkatan keikutsertaan pria dalam ber KB perlu dilakukan melalui penelitian obat antifertilitas yang dapat digunakan oleh kaum pria (Aulanni'am dkk., 2007).

Ditinjau dari dunia kedokteran hewan, di lingkungan sekitar masih banyak dijumpai hewan kesayangan (*pet animal*) seperti anjing dan kucing yang hidup

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

liar dengan populasi yang banyak dan tidak terawat. Hewan-hewan tersebut akan terus berkembang biak tanpa adanya pengendalian oleh manusia dan dapat menyebabkan populasi berlebih sehingga hewan-hewan tersebut dapat mati sia-sia dan tidak terawat. Kesejahteraan hewan juga dipengaruhi oleh kesejahteraan manusia. Selain itu, dampak negatif bagi manusia terkait kesehatan hewan itu sendiri yaitu penularan penyakit zoonosis. Sejauh ini pengendalian reproduksi hewan jantan masih belum banyak dilakukan selain metode kastrasi.

Penelitian dan pengembangan berbagai obat kontrasepsi di Indonesia terus dikaji dan berkembang pesat (Rusmiati, 2010). Masyarakat Indonesia saat ini terlihat adanya kecenderungan untuk lebih menggunakan obat tradisional dibandingkan dengan obat sintetik. Berbagai senyawa bioaktif pada tumbuhan, khususnya kelompok senyawa-senyawa steroid, alkaloid, isoflafonoid, triterpenoid dan xanthon memiliki khasiat sebagai bahan pengatur fertilitas. Pengaruhnya dapat berupa pemicu kesuburan atau menghambat kesuburan (antifertilitas) (Hidayanti dan Nofianti, 2014). Salah satu senyawa yang dapat digunakan sebagai agen antifertilitas adalah solasodin yang terdapat dalam buah terong cepoka (*Solanum torvum* S.) dan gosipol yang terdapat dalam biji kapuk (*Ceiba pentandra* G.).

Terong cepoka (*Solanum torvum* S.) merupakan jenis tanaman yang banyak dimanfaatkan oleh masyarakat Indonesia. Terong cepoka merupakan salah satu tanaman yang mudah didapat karena tanaman ini tumbuh liar di daerah perdesaan. Terong cepoka mengandung senyawa sterol carpesterol, alkaloid, steroid dan tanin. Senyawa tersebut dapat dijadikan sebagai bahan untuk

kontrasepsi (antifertilitas). Salah satu senyawa alkaloid yang terdapat dalam terong cepoka adalah solasodin sebanyak 0,84% (Hidayanti dan Nofianti, 2014).

Solasodin adalah *aglicon* suatu alkaloid yang mempunyai inti steroid, dengan rumus bangun seperti diosgenin. Alkaloid steroid solanum dapat dipakai bahan dasar pembuatan beberapa hormon steroid yang digunakan untuk kontrasepsi. Alkaloid steroid mengganggu keseimbangan hormon gonadotropin untuk melakukan pelepasan *Folicle Stimulating Hormone* (FSH) dan *Luteinizing Hormone* (LH). Pelepasan FSH yang terganggu akan mengakibatkan keseimbangan hormonal pada sumbu hipotalamus-hipofisis-testis menjadi tidak stabil, dan pengikatan androgen (*Androgen Binding Protein*/ABP) dalam spermatogenesis terganggu pula. Hal tersebut akan mengakibatkan terjadinya penurunan fungsi dari sel sertoli sebagai penghasil ABP. Sedangkan pada pelepasan LH yang terganggu akan mengakibatkan terjadinya penurunan fungsi dari sel leydig untuk menghasilkan hormon testosteron. Hormon testosteron berperan dalam tingkah laku seksual hewan. Tanpa adanya hormon ini tingkah laku seksual atau keinginan untuk kawin tidak akan timbul. Menurut penelitian Hidayati dan Nofianti (2014), pemberian buah terong cepoka dengan dosis 0,0135 g/200 g BB tikus; 0,27 g/200 g BB tikus dan 0,54 g/200 g BB tikus mampu menurunkan berat testis, indeks testis dan konsentrasi spermatozoa tikus putih jantan galur Wistar namun belum signifikan.

Solasodin yang terdapat dalam terong cepoka juga dapat mengakibatkan terganggunya mekanisme apoptosis di dalam membran sel. Mekanisme tersebut diawali dengan mengikat ikatan gula, sehingga terjadi perubahan morfologi sel

dan DNA. Salah satu gen protein yang berperan pada proses apoptosis sel yaitu P53. Protein p53 mengandung domain pengikat DNA yang dapat mengaktivasi transkripsi protein. Hal ini akan menyebabkan ekspresi dari protein spesifik yang dibutuhkan untuk menghambat pertumbuhan sel (Suhaimi, 2012).

Pada penelitian ini juga digunakan ekstrak biji kapuk (*Ceiba pentandra* G.) sebagai antifertilitas (kontrasepsi). Kapuk randu merupakan jenis tanaman yang tumbuh di kawasan pinggir pantai serta lahan dengan ketinggian 700 meter di atas permukaan laut. Biji kapuk randu mengandung senyawa kimia seperti alkaloid, saponin, flavonoid, tanin, triterpenoid, dan gosipol (Wirastuti dkk., 2018). Gosipol yang terdapat dalam biji kapuk randu digunakan sebagai bahan antifertilitas. Gosipol merupakan salah satu senyawa fenolik aldehid berwarna kuning yang memberikan efek toksik (Xin He *et al*., 2017). Gosipol dapat menginduksi perubahan ekspresi gen dan dapat menginduksi kerusakan DNA. Gen yang terlibat dalam kerusakan DNA yaitu BRCA-1, FANCA, RFC1, dan p53. Penelitian Volate *et al*. (2010) menyebutkan bahwa gosipol dapat menginduksi kerusakan DNA yang menyebabkan aktivasi p53 dan apoptosis melalui jalur mitokondria. Mitokondria merupakan organel penting dalam induksi apoptosis dan mitokondria menjadi permeabel dalam melepaskan protein sitokrom c (*Cyt c*) atau *Apoptosis Inducing Factor* (AIF) dari intermembran mitokondria ke sitosol yang telah diidentifikasi dalam apoptosis. Beberapa penelitian mengindikasikan bahwa ROS (*Reactive Oxygen Species*) dapat menjadi media induksi apoptosis (Ching-Huai *et al*., 2007). Selain itu, gosipol mempengaruhi kerja dari sistem gonad pituitari (hipofisa anterior) untuk melepaskan hormon-

hormon reproduksi seperti FSH dan LH. Apabila terjadi gangguan pada pelepasan hormon FSH, maka fungsi FSH sebagai pengikat androgen (*Androgen Binding Protein*/ABP) dalam spermatogenesis terganggu pula. Begitu juga dengan hormon LH, apabila terjadi gangguan pelepasan hormon tersebut maka akan mengakibatkan terjadinya penurunan fungsi dari sel leydig untuk menghasilkan hormon testosteron. Berdasarkan penelitian Mughniati (2015) bahwa pemberian ekstrak biji kapuk randu menyebabkan penurunan konsentrasi, motilitas, viabilitas dan abnormalitas sperma pada kucing lokal akibat adanya penekanan sekresi hormon reproduksi seperti hormon testosteron.

Berdasarkan latar belakang tersebut, penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak terong cepoka (*Solanum torvum* S.) dan biji kapuk (*Ceiba pentandra* G.) sebagai kandidat kontrasepsi pria melalui peningkatan ekspresi protein p53 dan gambaran histologi tubulus seminiferus dalam menentukan jumlah sel leydig pada Tikus Wistar (*Rattus novegicus*).

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang penelitian, maka rumusan masalah yang dapat diambil adalah sebagai berikut :

a. Apakah ada perbedaan pemberian ekstrak buah terong cepoka (*Solanum torvum* S.) dan biji kapuk (*Ceiba pentandra* G.) dilihat berdasarkan peningkatan ekspresi protein p53 di tubulus seminiferus pada tikus jantan (*Rattus norvegicus*) galur *Wistar*?

b. Apakah ada perbedaan pemberian ekstrak buah terong cepoka (*Solanum torvum* S.) dan biji kapuk (*Ceiba pentandra* G.) dilihat berdasarkan penurunan jumlah sel leydig pada tikus jantan (*Rattus norvegicus*) galur *Wistar*?

1.3 Batasan Masalah

Berdasarkan latar belakang penelitian, maka batasan masalah yang dapat diambil adalah sebagai berikut :

a. Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus novergicus*) strain *Wistar* jantan umur 2,5-3 bulan dan berat badan 190-320 gram. Penggunaan hewan coba ini telah mendapatkan sertifikasi dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya dengan No. 967-KEP-UB **(Lampiran 2)**.
b. Hewan coba tikus dibuat menjadi hewan model infertilitas. Dosis terong cepoka (*Solanum torvum* S.) yang digunakan adalah 1 g/kg berat badan tikus. Sedangkan dosis biji kapuk (*Ceiba pentandra* G.) yang digunakan adalah 0,1 g/kg berat badan tikus.
c. Variabel yang diamati pada penelitian ini adalah ekspresi protein 53 (p53) di tubulus seminiferus dengan metode Immunohistokimia dan gambaran histologi tubulus seminiferus tikus putih berupa penurunan jumlah sel leydig dengan pewarnaan Hematoksilin Eosin (HE).

1.4 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah sebagai berikut :

a. Mengetahui perbedaan pemberian ekstrak buah terong cepoka (*Solanum torvum* S.) dan biji kapuk (*Ceiba pentandra* G.) terhadap ekspresi protein p53 di tubulus seminiferus pada tikus jantan (*Rattus norvegicus*) galur *Wistar*
b. Mengetahui perbedaan pemberian ekstrak buah terong cepoka (*Solanum torvum* S.) dan ekstrak biji kapuk (*Ceiba pentandra* G.) terhadap jumlah sel leydig pada tikus jantan (*Rattus norvegicus*) galur *Wistar*

1.5 Manfaat Penelitian

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

a. Penelitian ini dapat digunakan sebagai kajian ilmiah pengaruh pemberian ekstrak terong cepoka (*Solanum torvum* S.) dan biji kapuk (*Ceiba pentandra* G.) terhadap ekspresi protein p53 dan gambaran histologi tubulus seminiferus dalam menentukan jumlah sel leydig pada Tikus Wistar (*Rattus novegicus*).
b. Penelitian ini dapat digunakan sebagai literatur pemanfaatan pemberian ekstrak terong cepoka (*Solanum torvum* S.) dan biji kapuk (*Ceiba pentandra* G.) sebagai alternatif kontrasepsi pada pria.

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kontrasepsi

Kontrasepsi berasal dari dua kata kontra dan konsepsi. Kontra berarti menolak, konsepsi berarti pertemuan antara sel telur (ovum) yang sudah matang dengan sel mani (sperma) sehingga terjadi pembuahan. Dengan demikian kontrasepsi adalah mencegah bertemunya sel telur yang matang dengan sel mani pada waktu bersenggama, sehingga tidak akan terjadi pembuahan atau infertil (Mughniati, 2015).

Infertilitas pada pria didefinisikan sebagai hilangnya kemampuan untuk menghasilkan spermatozoa. Pria dengan infertilitas dapat menghasilkan sperma yang sangat sedikit atau tidak ada sama sekali akibat tidak cukupnya stimulasi hormonal pada testis atau kegagalan gonad (Heffner dan Schust, 2008).

Penelitian pada tingkat molekuler menyebutkan bahwa infertilitas pria dilaporkan berhubungan dengan gangguan pada DNA mitokondria (mtDNA) dan apoptosis. Mitokondria normal diperlukan untuk spermatogenesis mamalia, dan gangguan yang dihasilkan dari akumulasi mutan mtDNA menyebabkan infertilitas pria. Kerusakan DNA pada fase awal perkembangan sperma ternyata berkaitan dengan rendahnya kualitas sperma (Hadi, 2011).

Selama proses spermatogenesis telah dilaporkan terjadi proses apoptosis yang diatur oleh ekspresi gen p53, p21, kaspase, bcl-2 dan Fas. Infertilitas pria menunjukkan korelasi positif dengan jumlah sperma yang mengalami apoptosis.

Kemungkinan peningkatan jumlah apoptosis karena terikutnya sperma yang belum matang ketika ejakulasi (Hadi, 2011).

Spermatogenesis merupakan proses yang kompleks dimulai dari proliferasi sel germinal dan pematangan spermatogonia menjadi spermatozoa. Selama spermatogenesis, kematian sel secara terprogram (apoptosis) memainkan peran penting untuk menghilangkan sel-sel germinal yang cacat atau yang membawa mutasi DNA. Pada proses fisiologi ini dapat terjadi disregulasi sehingga apoptosis sel germinal dapat menyebabkan infertilitas pria. Apoptosis sel germinal terjadi melalui dua jalur utama, yang melibatkan baik jalur mitokondria (intrinsik) maupun jalur sel reseptor permukaan (ekstrinsik). Pada apoptosis jalur mitokondria melibatkan kelompok protein Bcl-2. Pada jalur kematian sel reseptor melibatkan anggota superfamili reseptor TNF. Apoptosis sel germinal juga bisa dihasilkan dari gangguan eksternal seperti perubahan hormonal, paparan bahan kimia beracun atau radiasi yang dapat menyebabkan penurunan jumlah sperma dan masalah kesuburan pria. Peningkatan jumlah sperma yang mengalami apoptosis berpotensi menyebabkan infertilitas. Selain itu, apoptosis dan kerusakan DNA dapat mencegah proses pemasakan sperma (Hadi, 2011).

Metode kontrasepsi kimia merupakan suatu pilihan untuk sterilisasi tanpa tindakan operasi antara lain *zinc arginine* dan *zinc gluconate solution*. Metode kontrasepsi permanen merupakan sterilisasi dengan tindakan operasi yaitu kastrasi dan vasektomi. Semua metode tersebut memiliki kelebihan dan kekurangan yang beragam. Pilihan metode terbaik tentu sangat bergantung dengan kebutuhan.

Namun tentunya metode yang terbaik ialah yang memiliki efek samping paling sedikit, murah, mudah, dan lebih efektif (Mughniati, 2015).

2.2 Terong Cepoka (*Solanum torvum* S.)

Terong cepoka termasuk dalam famili Solanaceae, dan beberapa daerah mengenal dengan sebutan terong pipit, terong rimbang (Melayu), takokak (Jawa Barat) dan terong cepoka (Jawa Tengah). Dalam pengobatan tradisional, tanaman terong cepoka cukup dikenal, namun belum semua masyarakat mengetahui tentang identitas dan kegunaan dari tanaman tersebut, terutama bagi masyarakat daerah perkotaan. Di pedesaan bahan tanaman obat ini dipanen dari alam dan belum dibudidayakan secara luas (Nursalam, 2009).

Taksonomi terong cepoka (*Solanum torvum*) menurut Lawrence (1964) adalah sebagai berikut:

Divisi : Embryophyta Siphonogama

Subdivisi : Angiospermae

Kelas : Dicotyledone

Bangsa : Solanales

Suku : Solanaceae

Marga : Solanum

Jenis : *Solanum torvum* Swartz

Terong cepoka berasal dari kepulauan Antilles, dan penyebaran tumbuhnya sampai ke negara-negara tropika dan di Indonesia tumbuh di daerah Sumatera, Jawa dan sampai di dataran rendah hingga 1 sampai 1.600 meter di atas

permukaan laut, di tempat yang tidak terlalu berair, agak ternaungi dengan sinar matahari sedang dan tumbuh secara tersebar. Tanaman ini termasuk tanaman perdu yang tumbuh tegak, tinggi tanaman sekitar 3 m. Batang bulat, berkayu, bercabang, berduri jarang dan percabangan simpodial warnanya putih kotor. Daunnya tunggal, berwarna hijau, tersebar, berbentuk bulat telur, bercangap, tepi rata, ujung meruncing dan panjang sekitar 27 sampai 30 cm dan lebar 20 sampai 24 cm, pertulangan menyirip dan ibu tulang berduri. Bunga majemuk, bentuk bintang, bertaju, waktu kuncup berbintik ungu, kelopak berbulu, bertajuk lima, runcing, panjangnya kira-kira 5 mm, warna hijau muda, benang sari lima, tangkai panjang kira-kira 1 mm dan kepala sari panjangnya kira-kira 6 mm berbentuk jarum, berwarna kuning, tangkai putik kira-kira 1 cm berwana putih, dan kepala putik kehijauan. Buah berbentuk bulat, apabila masih muda berwarna hijau setelah tua berwarna jingga (**Gambar 2.1**). Bijinya pipih, kecil, licin berwarna kuning pucat, berakar tunggang berwarna kuning pucat (Nursalam, 2009).

Gambar 2.1 Buah Terong Cepoka (*Solanum torvum* S.) (Nursalam, 2009)

Penggunaan herba asal terong cepoka telah dilakukan turun temurun, dengan berbagai cara penyiapan. Sedangkan farmakologi Cina menyebutkan, tanaman terong cepoka memiliki rasa pahit, pedas, sejuk dan agak beracun, tanaman ini juga mampu melancarkan sirkulasi darah, menghilangkan rasa sakit

(analgetik) dan menghilangkan batuk (antitusif). Tanaman terong cepoka memiliki aktivitas pembersih superoksida yang tinggi yakni di atas 70%. Kandungan kimia yang terdapat pada buah dan daun mengandung alkaloid steroid yaitu jenis solasodin 0,84%, sedangkan kandungan buah kuning mengandung solasonin 0,1%, buah mentah mengandung chlorogenin, sisologenenone, torvogenin, vitamin A dan mengandung neochlorogenine, panicolugenine dan akarnya mengandung jurubine. Kandungan kimia pada buah terong cepoka (*Solanum torvum* Swartz) terdapat pada buah, daun dan akar tanaman yaitu saponin dan flavonoid. Selain itu, terong cepoka memiliki senyawa sterol carpesterol dan juga sebagai alat kontrasepsi karena buah dan daunnya mengandung alkaloid, steroid dan tanin yaitu solasodin 0,84% yang merupakan bahan baku hormon seks untuk kontrasepsi. Kandungan kimia yang terdapat pada terong cepoka mampu bertindak sebagai antioksidan dan dapat melindungi jaringan tubuh dari efek negatif radikal bebas. Kandungan solasodin dalam biji dan lendir buah mencapai 5,5%. Senyawa tersebut telah diuji ternyata dapat mencegah kehamilan pada hewan percobaan seperti tikus (Nursalam, 2009).

2.3 Biji Kapuk (*Ceiba pentandra* G.)

Kapuk (*Ceiba pentandra* Gaertn) atau randu (Sunda/Jawa) dan kapo (Madura) umumnya tumbuh di kawasan pinggir pantai serta lahan dengan ketinggian 700 meter di atas permukaan laut (dpl). Jenis pohon ini mulai berbunga dan berbuah pada usia 5-6 tahun dengan masa panen dilakukan setelah biji-biji kapuk berwarna kuning kelabu hingga berwarna hitam (**Gambar 2.2**). Pada

bagian biji diketahui mengandung gosipol, asam siklopropenoat, *karotenoid*, *flavonoid*, *alkaloid*, tanin, asam lemak tidak jenuh, karotenoid, senyawa fenolik, karbohidrat, protein, dan enzim. Ekstrak air pada biji mengandung *alkaloid*, *glycosides carbohydrates*, *flavonoid*, tanin, sedangkan ekstrak petroleum eter pada biji mengandung *alkaloid*, *flavonoid*, tanin, serta ekstrak etanol pada biji mengandung gosipol, *alkaloid*, *glycosides carbohydrates*, *flavonoid*, tanin (Mughniati, 2015).

Taksonomi tanaman kapuk menurut Tjitrosoepomo (2000) adalah sebagai berikut:

Divisi : Spermatophyta

Subdivisi : Angiospermae

Kelas : Dicotyledonae

Ordo : Bombales

Famili : Bambaceae

Genus : Ceiba

Spesies : *Ceiba pentandra*

Gambar 2.2 Tanaman Kapuk Randu (kiri) dan Biji Kapuk (kanan) (Kusumawardani, 2015)

Salah satu senyawa yang terdapat dalam tanaman kapuk yang dapat digunakan sebagai agen antifertilitas yaitu gosipol. Gosipol termasuk ke dalam senyawa polifenolik bersifat sitotoksik yang berwarna kuning. Efek sitotoksik gosipol juga merusak mitokondria sehingga mengganggu metabolisme energi seluler. Gosipol menghambat metabolisme oksidatif dengan menekan aktivitas enzim yang terlibat pada transpor elektron dan fosforilasi oksidatif. Disfungsi mitokondria mengakibatkan penurunan produksi *adenosine triphosphate* (ATP) untuk proses metabolisme sel (Zayani dkk., 2016). Gosipol bersifat racun bagi hewan kecuali ruminansia dan berpengaruh negatif terhadap aktivitas sperma. Terdapat dua macam gosipol, yaitu gosipol yang terikat (*bounded gossypol*) dan gosipol bebas (*free gossypol*), dan yang membahayakan kesehatan adalah gosipol bebas. Kadar gosipol bebas biasanya berkisar antara 0,39-1,70%, sedangkan kadar keseluruhan dapat mencapai 6,64%. Selisih antara keduanya adalah gosipol terikat. Hasil penelitian Alexander *et al.* menyatakan bahwa kandungan gosipol bebas pada berbagai varietas tanaman kapas pada berbagai lokasi berkisar antara 4,7-7,0 mg/kg. Kadar gosipol bebas ditetapkan dengan metode kolorimetri dengan menggunakan standar gosipol sebagai pembanding (Diana, 2016). Beberapa penelitian menunjukkan bahwa gosipol bebas dapat menghambat spermatogenesis pada spesies hewan yang berbeda seperti tikus, mencit dan kambing (Xin He *et al*., 2017).

Gosipol adalah senyawa fenolik dengan rumus kimia 1,1’, 6,6’, 7,7’, - heksahidroksi - 5,5’, - diisopropil - 3,3’, - dimetil - (2,2’, - binaftalen) - 8,8’, -

dikarboksi aldehida. Berdasarkan struktur di atas, senyawa ini mempunyai rumus molekul $C_{30}H_{30}O_8$ dengan berat molekul 518,5 (Irwan, 2010).

Berdasarkan penelitian Mughniati (2015) bahwa pemberian ekstrak biji kapuk randu menyebabkan penurunan konsentrasi, motilitas, viabilitas dan abnormalitas sperma pada kucing lokal akibat adanya penekanan sekresi hormon reproduksi seperti hormon testosteron.

2.4 Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

Hewan coba merupakan hewan yang dipelihara untuk dimanfaatkan sebagai hewan model dengan tujuan untuk mempelajari dan mengembangkan pengetahuan melalui kegiatan penelitian. Selain itu, hewan coba dapat digunakan untuk mempelajari lebih lanjut tentang diagnosa penyakit dan pengobatan (terapi). Tikus putih (*Rattus novergicus*) merupakan salah satu hewan coba yang sering digunakan untuk kegitan penelitian karena memiliki kecocokan DNA dengan manusia hingga 99% (Alexandru, 2011).

Menurut Krinke (2000) klasifikasi tikus putih (*Rattus norvegicus*) adalah sebagai berikut:

Kerajaan : Animalia

Filum : Chordata

Subfilum : Vertebrata

Kelas : Mammalia

Ordo : Rodentia

Famili : Muridae

Genus : Rattus

Species : *Rattus norvegicus*

Tikus termasuk hewan mamalia, oleh sebab itu dampaknya terhadap suatu perlakuan mungkin tidak jauh berbeda dibanding dengan mamalia lainnya. Selain itu, penggunaan tikus sebagai hewan percobaan juga didasarkan atas pertimbangan ekonomis dan kemampuan hidup tikus hanya 2-3 tahun dengan lama reproduksi 1 tahun. Keunggulan tikus putih dibandingkan tikus liar antara lain lebih cepat dewasa, tidak memperlihatkan perkawinan musiman, dan umumnya lebih cepat berkembang biak. Kelebihan lainnya sebagai hewan laboratorium adalah sangat mudah ditangani serta dapat ditinggal sendirian dalam kandang, asal dapat mendengar suara tikus lain dan berukuran cukup besar sehingga memudahkan pengamatan. Secara umum, berat badan tikus laboratorium lebih ringan dibandingkan berat badan tikus liar. Biasanya pada umur empat minggu beratnya 35-40 g, dan berat dewasa rata-rata 200-250 g, tetapi bervariasi tergantung pada galur (Krinke, 2000).

Tikus Wistar adalah salah satu strain tikus yang paling populer digunakan untuk penelitian laboratorium. Tikus Wistar memiliki karakteristik diantaranya kepalanya yang lebar, telinga yang panjang, dan memiliki panjang ekor yang kurang dari panjang tubuhnya. Tikus Wistar adalah strain tikus albino yang berasal dari spesies *Rattus norvegicus*. Strain ini dikembangkan di *Wistar Institute* pada tahun 1906 untuk digunakan dalam penelitian biologi dan medis. Berat badan tikus betina dewasa adalah 250-300 g, sedangkan berat badan tikus jantan dewasa adalah 450-520 g dengan masa hidup berkisar antara 2,5-3,5 tahun

(Alexandru, 2011). Bentuk fisik tikus putih Wistar dapat dilihat pada **Gambar 2.3.**

Gambar 2.3 Tikus putih strain Wistar (*Rattus norvegicus*) (Alexandru, 2011)

2.5 Testis

Testis adalah suatu organ yang aktif dan menghasilkan sejumlah besar spermatozoa setiap harinya. Testis sebagai organ kelamin primer mempunyai dua fungsi yaitu menghasilkan spermatozoa atau sel kelamin jantan dan mensekresikan hormon kelamin jantan yaitu testosteron. Sekitar 90 persen testis terdiri dari beratus-ratus meter tubulus yang sangat kecil. Sepuluh persen sisanya dari seluruh isi testis terdiri dari jaringan ikat, pembuluh-pembuluh darah dan sel-sel penghasil hormon penting yaitu sel leydig. Hormon jantan atau androgen dihasilkan oleh sel leydig yang berfungsi mengontrol tingkah laku jantan atau fungsi kelamin pejantan. Meskipun diproduksi dalam jumlah yang sedikit sekali, sekresinya langsung dicurahkan ke dalam aliran darah sehingga hormon tersebut dapat secara langsung mempengaruhi semua bagian tubuh hewan. Androgen atau yang dikenal sebagai testosteron juga mempengaruhi timbulnya sifat kelamin

sekunder misalnya bentuk tubuh, penyebaran rambut di tempat-tempat tertentu dan sifat kelamin jantan lainnya. Fungsi testosteron juga mempengaruhi perkembangan proses fisiologis dan perkembangan hewan-hewan muda. Tanpa adanya hormon ini tingkah laku seksual hewan muda tidak akan timbul (Feradis, 2014).

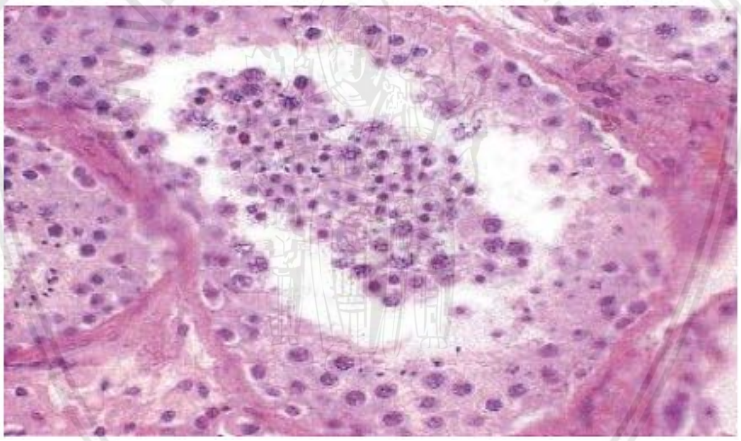
Testis normal berada di dalam skrotum yang berfungsi melindungi testis dan menjaga agar suhu testis di bawah suhu tubuh. Testis berbentuk oval dan berjumlah sepasang, terdapat di bagian tubuh sebelah kiri dan kanan. Testis kiri dan kanan dibatasi oleh suatu sekat yang terdiri dari serat jaringan ikat dan otot polos. Testis memiliki dua fungsi, yaitu untuk memproduksi hormon testosteron dan dihidrotestosteron, serta untuk memproduksi spermatozoa. Spermatozoa dibentuk dari sel germinal primitif di sepanjang dinding tubulus seminiferus dalam proses yang disebut spermatogenesis. Di antara tubulus seminiferus terdapat sel leydig yang memproduksi testosteron dan dihidrotestosteron yang kemudian akan disekresikan ke dalam aliran darah. Tubulus-tubulus seminiferus tersebut akan bergabung membentuk duktus yang lebih besar yang disebut tubulus rektus. Tubulus yang lebih besar ini membentuk rete testis yang akan berakhir pada duktus efferen. Dalam tubulus-tubulus tersebut mengalir cairan seminalis yang mengandung sperma dari testis ke epididimis. Dari sini spermatozoa memasuki vas deferens lalu duktus ejakulatorius untuk menuju ke urethra (Faranita, 2009).

Testis memproduksi sel gamet pada pria dan hormon seksual pada pria. Secara morfologi testis dibagi menjadi 2 kompartemen yaitu *Tubular*

Compartment (tubulus seminiferus) dan *Interstitial Compartment* (interstitium) yang terletak diantara *Tubular Compartment*. Walaupun secara anatomis kedua kompartemen ini terpisah, keduanya memiliki hubungan fungsional yang sangat erat dan tidak dapat dipisahkan satu sama lain. Untuk menghasilkan sel sperma yang baik secara kualitas dan kuantitas maka kedua kompartemen tersebut sangat dibutuhkan. Fungsi dari kedua kompartemen ini sangat dipengaruhi oleh struktur dari hipothalamus dan hipofisis (regulasi hormonal). Selain itu, kompartemen ini juga mempunyai peran penting untuk mengatur kerja hormonal testis secara lokal (parakrin dan autokrin) (Akbar, 2014).

Tubular compartment (tubulus seminiferus) mengisi 60-80% dari volume testis total (**Gambar 2.4**). Kompartemen ini terdiri dari sel germinativum (*cellula spermatogenica*) yang berproliferasi dan dua jenis sel somatik yaitu sel peritubular (epitel germinal) dan sel sertoli yang tidak berproliferasi. Sel peritubular (myofibroblasts) adalah sel yang mengisi dari dinding tubulus seminiferus. Sel germinativum adalah sel yang mengisi kompartemen tubuler dari testis yang berperan dalam proses spermatogenesis untuk menghasilkan sel sperma. Proses spermatogenesis mencakup pembelahan mitosis sel spermatogenik, yang menghasilkan sel induk pengganti dari sel spermatogenik lain yang akhirnya menghasilkan spermatosit primer (*spermatocytus primarius*) dan spermatosit sekunder (*spermatocytus secundarius*). Baik spermatosit primer maupun spermatosit sekunder mengalami pembelahan meiosis yang mengurangi jumlah kromosom dan DNA. Pembelahan spermatosit sekunder menghasilkan sel yaitu spermatid (spermatidium) yang mengandung 23 kromosom tunggal (22+X

atau 22+Y). Spermatid tidak mengalami pembelahan lanjut, tetapi berubah menjadi sperma melalui proses yang disebut spermiogenesis. Setelah berdiferensiasi, sel spermatogenik di epitel germinal disatukan oleh jembatan antarsel (*pons intercellularis*) selama proses diferensiasi dan perkembangan selanjutnya. *Pons intercellularis* terputus jika spermatid yang berkembang dilepaskan ke dalam tubuli seminiferi berupa sperma matang. Pada *Interstitial compartment* mengandung pembuluh darah, pembuluh limfe, makrofag, fibroblast dan sel leydig. Kompartemen ini mengisi 12-15 % volume testis total. Dimana, 10 -20 % dari kompartemen ini diisi oleh sel leydig (Akbar, 2014).



Gambar 2.4 Gambaran tubulus seminiferus testis tikus perbesaran 400x (Akbar, 2014)

Spermatozoa atau gamet jantan dihasilkan oleh sepasang testis dimana pada hampir sebagian besar golongan hewan domestik tergantung di luar tubuh. Testis terletak pada daerah prepubis, terbungkus dalam kantong skrotum dan digantung oleh funiculus spermaticus yang mengandung unsur-unsur yang terbawa oleh testis dalam perpindahannya dari cavum abdominalis melalui canalis inguinalis ke dalam skrotum (Feradis, 2014).

2.6 Spermatogenesis

Spermatozoa dibentuk di dalam testis melalui proses yang disebut spermatogenesis, tetapi mengalami pematangan lebih lanjut di dalam epididimis dimana sperma disimpan sampai ejakulasi. Sperma terbentuk di dalam tubuli seminiferi dari sel-sel induk spermatozoa yang diploid, disebut spermatogenia tipe A, yang terletak pada memran basalis. Spermatogenesis merupakan suatu proses kompleks yang meliputi pembelahan dan diferensiasi sel. Selama proses tersebut jumlah kromosom direduksi dari diploid (2n) menjadi haploid (n) pada setiap sel. Spermatogenesis meliputi spermatositogenesis dan spermiogenesis. Spermatositogenesis adalah pembentukan spermatosit primer dan spermatosit sekunder dari spermatogonia tipe A, sedangkan spermiogenesis adalah pembentukan spermatozoa dari spermatid. Spermatositogenesis dikendalikan oleh FSH dan spermiogenesis berada di bawah pengaruh LH dan testosteron (Feradis, 2014).

Proses spermatogenesis dibagi menjadi beberapa tahap, yaitu proliferasi mitotik, meiosis, dan spermiogenesis. Pada tahap awal spermatogenesis, spermatogonia primitif berkumpul di tepi membran basal epitel germinativum, disebut sebagai spermatogonia tipe A. Spermatogonia tersebut membelah menjadi sel yang sedikit lebih berdiferensiasi, yaitu spermatogonia tipe B. Pada tahap ini spermatogonia bermigrasi ke arah sentral di antara sel-sel sertoli. Dalam waktu kira-kira 24 hari setiap spermatogonium yang melewati lapisan pertahanan masuk ke dalam lapisan sel sertoli dimodifikasi secara berangsur-angsur dan membesar untuk membentuk spermatosit primer yang besar dengan 46 kromosom. Pada

akhir hari ke-24, setiap spermatosit primer terbagi dua menjadi spermatosit sekunder. Proses ini disebut sebagai meiosis pertama (Faranita, 2009).

Dalam 2 sampai 3 hari meiosis kedua menghasilkan spermatid yang memiliki 23 kromosom tunggal. Setiap spermatid mengalami modifikasi menjadi sebuah spermatozoa yang disebut sebagai fase spermiogenesis (Faranita, 2009). Spermiogenesis adalah suatu proses morfologik yang mengubah spermatid bulat menjadi sel sperma yang memanjang. Selama spermiogenesis, ukuran dan bentuk spermatid berubah, serta kromatin nukleus memadat (Akbar, 2014). Selama beberapa minggu berikutnya setelah meiosis, setiap spermatid secara perlahan-lahan berubah menjadi spermatozoa dengan cara menghilangkan beberapa sitoplasmanya, mengatur kembali bahan kromatin dari inti spermatid untuk membentuk satu kepala yang padat, serta mengumpulkan sisa sitoplasma dan membran sel pada salah satu ujung dari sel untuk membentuk ekor. Seluruh masa spermatogenesis ini membutuhkan waktu kira-kira 64 hari (Faranita, 2009).

2.7 Protein p53

Protein p53 merupakan suatu protein yang berperan pada proses apoptosis melalui jalur intrinsik (intraseluler) melalui pengaktifan protein bax yang memacu pelepasan sitokrom. Fungsi normal protein p53 adalah sebagai penjaga proteinom (*guardian of the proteinome*). Pada keadaan dimana jumlah protein p53 rendah maka p53 akan berperan sebagai penjaga sel, sedangkan dalam jumlah yang tinggi p53 akan mengaktifkan apoptosis (Suhaimi, 2012).

Apoptosis memiliki peranan penting selama spermatogenesis normal dalam mengendalikan jumlah sel germinativum dan menghilangkan sel germinativum yang rusak untuk menghasilkan spermatozoa fungsional. Apoptosis yang terjadi selama spermatogenesis adalah proses yang sangat kompleks yang melibatkan gen untuk berbagai faktor, seperti Bcl-2, Fas, Fas ligan, dan p53. Apoptosis sel germinativum juga dapat disebabkan oleh berbagai kondisi patologis seperti tekanan panas, paparan radiasi ion, substansi toksik, deplesi hormon, dan hilangnya sinyal *stem cell factor* (SCF) (Ohta *et al*., 2003).

Protein tumor *supressor* p53 sangat diekspresikan dalam testis dan diketahui terlibat dalam apoptosis. Adanya protein p53 mRNA pada spermatosit primer menunjukkan bahwa p53 memiliki peran di profase meiosis. Ekspresi p53 dalam testis tidak hanya ditingkatkan pada spermatosit tetapi juga pada spermatogonia. Hal ini menunjukkan bahwa p53 penting dalam pengaturan proses apoptosis pada spermatosit dan spermatogonia, serta p53 mungkin memiliki keterkaitan dengan infertilitas pria. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa apoptosis yang terjadi pada testis hewan coba tikus bergantung pada p53 (Ohta *et al*., 2003). Pada manusia p53 berada pada kromosom 17p131, sedangkan pada hewan berbeda-beda lokasinya pada setiap spesies. Nama lain atau simbol dari p53 adalah TRP53 (*Transformation-Related Protein*-53) (Suhaimi, 2012).

Protein 53 memiliki kemampuan dalam berbagi fungsi biologis yaitu dengan berperan sebagai faktor transkripsi sekuens spesifik dan memodulasi berbagai proses seluler termasuk apoptosis, *cell cycle arrest* dan perbaikan DNA. Protein p53 *wild type* (tipe liar) dikenal sebagai faktor regulator negatif terhadap

pertumbuhan sel. Protein p53 mengandung domain pengikat DNA yang dapat mengaktivasi transkripsi protein. Hal ini akan menyebabkan ekspresi dari protein spesifik yang diutuhkan untuk menghambat pertumbuhan sel. Mekanisme kerja p53 belum diketahui pasti, namun terdapat dugaan bahwa p53 bekerja untuk menghambat pertumbuhan sel. Ada beberapa hipotesis mekanisme kerja p53, yaitu :1) p53 menproteinali dan kemudian mengikatkan diri pada suatu spesifik *sequence* pada DNA yang diduga merupakan bagian tertentu yang berfungsi sebagai regulator dan 2) p53 menginduksi aktivitas RNA polimerase, sehingga bertindak sebagai faktor transkripsi (Suhaimi, 2012).

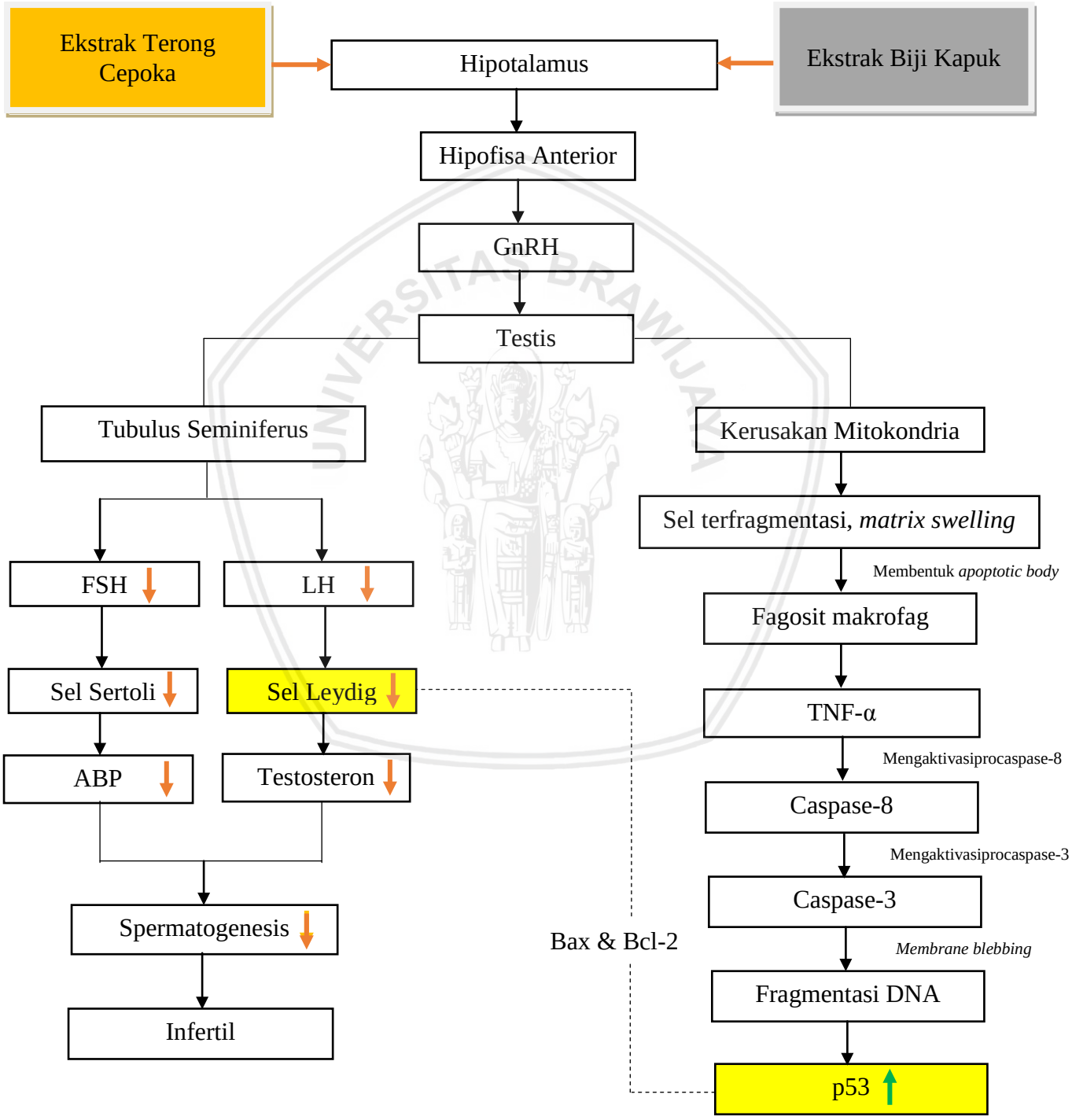
2.8 Sel Leydig

Sel leydig terdapat di jaringan interstisial di antara tubulus seminiferus. Fungsinya menghasilkan hormon testosteron. Pengaturan poros hipotalamus–hipofisis–testis, terdapat hubungan timbal balik sekresi LH dan FSH hipofisis anterior oleh testis. LH berfungsi mengatur produksi hormon testosteron oleh sel-sel interstitial leydig di dalam testis. Sel leydig ditempatkan di dekat tubulus seminiferus. Testosteron yang dihasilkan oleh testis mempunyai efek timbal balik dengan cara meningkatkan sekresi LH oleh hipofisis anterior apabila jumlah sel leydignya menurun. Penurunan sel leydig ini disebabkan karena pengaruh dari menurunnya hormon-hormon gonadotropin yang diproduksi oleh hipofisis anterior terutama LH yang berfungsi sebagai pemelihara sel leydig, baik dalam pertumbuhan maupun dalam fungsinya untuk mensekresi testosteron (Rahmawati, 2013).

Hormon jantan atau androgen dihasilkan oleh sel leydig yang berfungsi mengontrol tingkah laku jantan atau fungsi kelamin pejantan. Meskipun diproduksi dalam jumlah yang sedikit sekali, sekresinya langsung dicurahkan ke dalam aliran darah sehingga hormon tersebut dapat secara langsung mempengaruhi semua bagian tubuh hewan. Androgen atau yang dikenal sebagai testosteron juga mempengaruhi timbulnya sifat kelamin sekunder misalnya bentuk tubuh, penyebaran rambut di tempat-tempat tertentu dan sifat kelamin jantan lainnya. Fungsi testosteron juga mempengaruhi perkembangan proses fisiologis dan perkembangan hewan-hewan muda. Tanpa adanya hormon ini tingkah laku seksual hewan muda tidak akan timbul (Feradis, 2014). Menurut Dellmann dan Brown (1992), fungsi utama testosteron adalah (1) menampilkan naluri seksual secara normal (libido), (2) memacu pertumbuhan dan memelihara fungsi kelenjar aksesori, (3) bersama dengan FSH mengontrol kegiatan proses spermatogenesis, (4) memberikan umpan balik negatif pada hipofisa dan hipotalamus, dan (5) memberikan efek anabolik umum.

BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual



Gambar 3.1 Kerangka Konseptual

Keterangan :

: Pemberian Ekstrak Terong Cepoka dan Biji Kapuk

: Parameter yang diamati

: Pemicu

: Penurunan

: Peningkatan

: Pengaruh

Terong cepoka (*Solanum torvum* S.) memiliki kandungan sterol carpesterol, alkaloid, steroid dan tanin. Salah satu senyawa alkaloid yang terdapat dalam terong cepoka adalah solasodin. Alkaloid dapat mempengaruhi mekanisme kerja dari hipotalamus untuk melepaskan hormon GnRH (*Gonadotropin Relaxing Hormone*). Hormon tersebut berperan dalam pelepasan *Folicle Stimulating Hormon* (FSH) dan *Luteinizing Hormone* (LH). Pelepasan FSH yang terganggu akan mengakibatkan keseimbangan hormonal pada sumbu hipotalamus-hipofisis-testis menjadi tidak stabil, dan pengikatan androgen (*Androgen Binding Protein*/ABP) dalam spermatogenesis terganggu pula. Hal tersebut akan mengakibatkan terjadinya penurunan fungsi dari sel sertoli sebagai penghasil ABP. Sedangkan pada pelepasan LH yang terganggu akan mengakibatkan terjadinya penurunan fungsi dari sel leydig untuk menghasilkan hormon testosteron. Hormon testosteron berperan dalam tingkah laku seksual hewan. Tanpa adanya hormon ini tingkah laku seksual atau keinginan untuk kawin tidak akan timbul. Selain itu, hormon testosteron diperlukan dalam proses

spermatogenesis. Apabila hormon testosteron dihasilkan dalam jumlah sedikit, maka proses spermatogenesis terganggu dan dapat mengakibatkan infertilitas.

Biji kapuk mengandung senyawa kimia seperti alkaloid, saponin, flavonoid, tanin, triterpenoid, dan gosipol. Senyawa gosipol juga mempengaruhi kerja *pituitary gonadal system* dalam melepaskan hormon GnRH. Hormon tersebut berperan dalam pelepasan FSH dan LH. Apabila hormon GnRH terganggu, maka pelepasan FSH untuk menghasilkan ABP dan LH untuk menghasilkan testosteron juga terganggu. Hormon testosteron sendiri dihasilkan di dalam sel leydig. Apabila terjadi penurunan jumlah sel leydig, maka hormon testosteron yang dihasilkan juga menurun. Hormon testosteron diketahui berperan dalam proses spermatogenesis. Proses spermatogenesis yang terganggu dapat menyebabkan infertilitas.

Senyawa solasodin dan gosipol dapat menyebabkan kerusakan mitokondria pada sel germinal. Kerusakan mitokondria tersebut dapat mengakibatkan sel terfragmentasi. Sel yang terfragmentasi menjadi *apoptotic body* mengeluarkan signal yang dikenali oleh fagosit. Adanya sel-sel fagosit seperti sel makrofag akan mengekspresikan TNF-α. *Tumor Necrosis Factor*-α (TNF-α) bersama dengan FasL (Fas ligan) akan mengaktivasi procaspase-8 menjadi caspase-8. Caspase-8 secara langsung mengubah procaspase-3 menjadi caspase-3. Caspase-3 akan membelah substrat seluler dan mengakibatkan *membrane blebbing* yang pada akhirnya menyebabkan fragmentasi DNA. Fragmentasi DNA memacu ekspresi protein yang dikenal sebagai p53 untuk mengaktivasi Bax dan Bcl-2. Peningkatan Bcl-2 dan Bax pada apoptosis

mengakibatkan penurunan hormon testosteron. Hal tersebut menyebabkan sel leydig yang memproduksi hormon testosteron juga menurun. Selain itu, protein p53 menyebabkan penghambatan pembelahan sel germinal dan dalam jumlah yang tinggi akan mengaktifkan apoptosis. Apabila terjadi aktivitas apoptosis yang berlebihan, maka mengakibatkan banyak kematian sel yang seharusnya belum terjadi apoptosis. Benyaknya kematian sel tersebut mengakibatkan proses fisiologis seperti proses spermatogenesis menjadi terganggu. Spermatogenesis yang terganggu mengakibatkan infertilitas.

3.2 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan kerangka konseptual yang telah diuraikan didapatkan hipotesis penelitian sebagai berikut :

1. Pemberian ekstrak terong cepoka (*Solanum torvum* S.) dan biji kapuk (*Ceiba pentandra* G.) memiliki perbedaan dilihat berdasarkan peningkatan ekspresi protein p53 di tubulus seminiferus pada tikus putih (*Rattus novergicus*) sebagai kandidat kontrasepsi.
2. Pemberian ekstrak terong cepoka (*Solanum torvum* S.) dan biji kapuk (*Ceiba pentandra* G.) memiliki perbedaan dilihat berdasarkan penurunan jumlah sel leydig di testis pada tikus putih (*Rattus novergicus*) sebagai kandidat kontrasepsi.

BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Juli 2018 hingga bulan Agustus 2018. Dengan uraian tempat pelaksanaan penelitian sebagai berikut :

a. Pembuatan ekstrak etanol terong cepoka (*Solanum torvum* S.) dan biji kapuk (*Ceiba pentandra* G.) dilakukan di UPT Materia Medika Kota Batu.
b. Pemeliharaan hewan coba dilakukan di Laboratorium Embriologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.
c. Proses pengamatan ekspresi protein p53 dan pembacaan hasil pewarnaan histologi testis jumlah sel leydig dilakukan di Laboratorium Riset Bersama (ADD LAB) Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya Malang.
d. Pengoleksian sampel testis dilakukan di Laboratorium Embriologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.
e. Pembuatan preparat histologi testis dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.
f. Pewarnaan imunohistokimia dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.

4.2 Alat dan Bahan

4.2.1 Alat-alat yang Digunakan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian adalah spuit 3 cc sebanyak 2 buah, cawan petri (Pyrex), alat bedah/*Dissecting set* (OneMed), timbangan digital, mikroskop Olympus BX51, kandang pemeliharaan tikus, tempat minum, objek glass, *cover glass*, gelas ukur 50 mL (Iwaki Pyrex) sebanyak 2 buah, cawan petri, kamera handphone, alat sonde oral, pinset, pot sampel (5 mL), nampan (sebagai alas bedah), lemari pendingin.

4.2.2 Bahan-bahan yang Digunakan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian adalah terong cepoka berwarna hijau yang didapatkan dari pasar Belimbing sebanyak 5 kg, biji kapuk yang didapatkan dari Goa Ngerong Tuban sebanyak 3 kg, serbuk gergaji kayu (alas kandang tikus), pellet, air minum, tikus putih jantan galur Wistar sebanyak 20 ekor, glove, masker, kapas, alkohol 70%, pewarna HE (*Hematoxylin Eosin*), kertas label, kertas hvs A4, formalin buffer 70%, akuades, alkohol bertingkat (70%, 80%, 90%, 95%, 100%), parafin, xylol, antibodi p53, klorofom.

4.3 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL). Hewan coba dibagi menjadi tiga kelompok seperti yang dapat dilihat pada **Tabel 4.1**. Untuk skema penelitian dapat dilihat pada **Lampiran 1**.

Tabel 4.1 Tabel Rancangan Penelitian

Kelompok	Keterangan
K1 (Kontrol Negatif)	Tikus hanya diberi pakan berupa pellet dan air minum secara *ad libitum*.
P1	Tikus diberikan ekstrak etanol terong cepoka dengan dosis 1 g/kg BB menggunakan sonde lambung selama 10 hari.
P2	Tikus diberikan ekstrak etanol biji kapuk dengan dosis 0,1 g/kg BB menggunakan sonde lambung selama 10 hari.

4.4 Pengulangan

Berdasarkan rancangan penelitian yang menggunakan tiga kelompok perlakuan, maka jumlah ulangan untuk masing-masing kelompok perlakuan adalah sebagai berikut, berdasarkan rumus menurut Kusriningrum (2008) :

P (n-1) ≥ 15

3(n-1) ≥ 15

3n – 3 ≥ 15

3n ≥ 18

n ≥ 6

Keterangan :

p : jumlah kelompok hewan coba

n : jumlah ulangan yang diperlukan

Berdasarkan perhitungan di atas, maka untuk tiga kelompok hewan coba diperlukan jumlah ulangan paling sedikit enam kali dalam setiap kelompok, sehingga dibutuhkan 18 ekor hewan coba

4.5 Variabel Penelitian

Adapun variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah :

Variabel bebas : dosis ekstrak terong cepoka dan ekstrak biji kapuk

Variabel terikat : ekspresi protein 53 (p53) dan gambaran histologi testis berupa penurunan jumlah sel leydig

Variabel kontrol : tikus putih (*Rattus norvegicus*) dengan jenis kelamin jantan, umur 2,5-3 bulan, strain *Wistar*, berat badan 190-320 g, pakan berupa pellet

4.6 Tahapan Penelitian

4.6.1 Persiapan Hewan Coba Tikus (*Rattus norvegicus*)

Persiapan hewan coba dilakukan dengan melakukan proses adaptasi terhadap lingkungan selama 1 minggu dengan pemberian pakan *pellet* dan minum *ad libitum* pada semua tikus. Dilakukan pengkodean, penimbangan dan randomisasi pada tikus. Tikus dibagi menjadi 3 kelompok perlakuan, yaitu kelompok kontrol negatif (KN) sebagai pembanding, perlakuan 1 (P1), perlakuan 2 (P2). Tikus dipelihara di laboratorium Embriologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.

4.6.2 Pembuatan Ekstrak Terong Cepoka dan Biji Kapuk

Terong cepoka yang digunakan dalam penelitian ini ialah bagian buah yang masih segar sebanyak 5 kg. Sesuai dengan metode Agung

(2017), metode ekstraksi dilakukan dengan cara maserasi. Pelarut yang digunakan adalah etanol 70%. Jumlah pelarut sebanyak 10.000 mL, dengan waktu evaporasi 3 jam. Volume ekstraksi yang didapatkan sebanyak 2000 mL.

Biji kapuk yang digunakan dalam penelitian ini ialah bagian biji sebanyak 3 kg. Sesuai dengan metode Agung (2017), metode ekstraksi dilakukan dengan cara maserasi. Pelarut yang digunakan adalah etanol 70%. Jumlah pelarut sebanyak 8.000 mL, dengan waktu evaporasi 2 jam. Volume ekstraksi yang didapatkan sebanyak 700 mL. Pembuatan ekstrak terong cepoka dan biji kapuk secara rinci dapat dilihat pada **Lampiran 6**. Surat keterangan ekstraksi terong cepoka dan biji kapuk dapat dilihat pada **Lampiran 3**.

4.6.3 Pemberian Ekstrak Terong Cepoka dan Biji Kapuk

Pemberian ekstrak terong cepoka dan ekstrak biji kapuk dilakukan secara kontinyu. Pemberian kontinyu dilakukan dengan memberikan ekstrak secara terus menerus setiap hari selama pemeliharaan tikus putih selama 10 hari. Dosis pemberian ekstrak terong cepoka yang digunakan adalah 1 g/kgBB dan ekstrak biji kapuk 0,1 g/kgBB diberikan secara per oral dengan menggunakan sonde lambung. Perhitungan dosis ekstrak terong cepoka dan biji kapuk dapat dilihat pada **Lampiran 7**. Ekstrak terong cepoka diberikan ke tikus dengan label kandang pemeliharaan P1. Sedangkan biji kapuk diberikan

ke tikus dengan label kandang pemeliharaan P2. Pemberian ekstrak diberikan setiap pagi sebelum diberi makan. Sebelum diberikan, ekstrak diencerkan terlebih dahulu dengan akuades. Volume ekstrak yang diberikan kepada setiap tikus tergantung dari berat badan tikus.

4.6.4 Pembedahan Tikus Pasca Perlakuan

Tikus dilakukan pembedahan pada hari ke-18. Tikus dieuthanasi/dimatikan menggunakan kloroform. Tikus diletakkan pada posisi *dorsal recumbency* di atas nampan yang sudah dialasi kertas HVS putih A4. Tikus dibedah dengan cara membuat *incisi* pada bagian abdomen. Setelah itu, organ testis dipotong dan diisolasi. Sebelum dimasukkan pot sampel berisi buffer formalin 10%, sampel organ terlebih dahulu dicuci dengan menggunakan akuades dalam cawan petri.

4.6.5 Pembuatan Preparat Histologi

Setelah semua sampel organ testis terkumpul di pot sampel yang berisi buffer formalin 10%, sampel dibawa ke laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga untuk dibuat preparat histologi. Pembuatan preparat histologi secara rinci dapat dilihat pada **Lampiran 8**. Untuk *prosessing* jaringan memakai alat *tissue prosessor automatic* yang bekerja ± 18,5 jam (bisa diubah sesuai kebutuhan). Tahapan *prosessing* jaringan yaitu fiksasi, dehidrasi,

clearing, dan infiltasi parafin. Langkah-langkah tahapan tersebut adalah sebagai berikut :

1. Fiksasi

   Fiksasi bertujuan untuk mempertahankan susunan jaringan agar mendekati kondisi seperti sewaktu hidup serta untuk mengeraskan jaringan terutama jaringan lunak agar memudahkan pembuatan irisan tipis (Jusuf, 2009). Fiksasi dilakukan dengan cara memasukkan organ ke dalam larutan buffer formalin 10%. Buffer formalin 10% berisi formaldehide 40% H.CHO sebanyak 100 mL, sodium phospat monobasic $NaH_2PO_4H_2O$ sebanyak 4 gram, sodium phospat dibasic Na_2HPO_4 sebanyak 6,5 gram dan akuades sebanyak 900 mL.

2. Dehidrasi

   Dehidrasi merupakan langkah kedua dalam pemrosesan jaringan. Proses ini bertujuan untuk mengeluarkan seluruh cairan yang terdapat dalam jaringan yang telah difiksasi sehingga jaringan nantinya dapat diisi dengan parafin atau zat lainnya yang dipakai untuk membuat blok preparat. Hal ini perlu dilakukan karena air tidak dapat bercampur dengan cairan parafin atau zat lainnya yang dipakai untuk membuat blok preparat (Jusuf, 2009). Dehidrasi dilakukan dengan menggunakan larutan alkohol bertingkat dimulai dari alkohol 70%, 80%, 95%, larutan alkohol absolut I, II, dan III selama 1,5 jam.

3. *Clearing* (Penjernihan)

   Untuk melakukan penjernihan, jaringan dipindahkan dari alkohol absolut III ke larutan penjernihan, yaitu xylol I selama 1 jam, xylol II dan xylol III selama 1,5 jam.

4. *Embedding* (Pembenaman) dan Infiltasi Parafin

   Embedding (pembenaman) adalah proses untuk mengeluarkan cairan penjernih (*clearing agent*) dari jaringan dan diganti dengan parafin. Pada tahap ini jaringan harus benar-benar bebas dari cairan penjernih karena sisa cairan penjernih dapat mengkristal dan sewaktu dipotong dengan mikrotom akan menyebabkan jaringan menjadi mudah robek (Jusuf, 2009).

5. *Blocking* (Pengecoran)

   Pengecoran (*Blocking*) adalah proses pembuatan blok preparat agar dapat dipotong dengan mikrotom. Pembuatan blok preparat ini dengan menggunakan cetakan dari plastik (*histoplate*) dan piringan logam. *Histoplate* dari plastik diletakkan di atas piringan logam (seperti cetakan membuat es batu). Tuangkan sedikit cairan parafin ke dalam cetakan tersebut. Secepatnya masukkan jaringan dengan menggunakan pinset yang telah dipanaskan (agar parafin tak beku) dan diatur posisinya di dalam cetakan. Parafin cair kemudian dituangkan kembali hingga menutupi seluruh cetakan tersebut. Selama tindakan ini cetakan

(*histoplate* dari plastik) dan piringan logam harus diletakkan diatas *hot plate* (Jusuf, 2009).

6. *Mounting* (Pemotongan)

Pemotongan (*mounting*) adalah proses pemotongan blok preparat dengan menggunakan mikrotom. Blok preparat dipotong dengan ketebalan berkisar antara 5-7 mikrometer. Setelah itu, potongan blok preparat yang membentuk pita parafin dipindahkan secara hati-hati menggunakan pinset ke dalam waterbath yang temperaturnya diatur 37-40^{0}C dan dibiarkan beberapa saat hingga pita parafin tersebut mengembang. Setelah pita parafin terkembang dengan baik, tempelkan pita parafin pada *object glass* yang telah di-*coated* dengan cara memasukkan *object glass* kedalam *waterbath* dan menggerakkannya ke arah pita parafin. Setelah pita parafin telah melekat dengan kuat pada *object glass*, simpan *object glass* berisi potongan parafin dan jaringan sampai saatnya untuk diwarnai (Jusuf, 2009).

7. *Staining* (Pewarnaan HE/Hematoksilin-Eosin)

Pewarnaan adalah proses pemberian warna pada jaringan yang telah dipotong sehingga unsur jaringan menjadi kontras dan dapat dikenali/diamati dengan mikroskop. Pewarnaan yang digunakan yaitu pewarnaan HE (Hematoksilin-Eosin). Pada pewarnaan HE, hematoksilin yang berfungsi untuk memulas inti sel dan memberikan warna biru (basofilik) serta eosin yang

merupakan *counterstaining* hematoksilin, digunakan untuk memulas sitoplasma sel dan jaringan penyambung, sehingga memberikan warna merah muda (Jusuf, 2009).

4.6.6 Perhitungan Ekspresi Protein p53 dengan Metode Imunohistokimia

Analisa ekspresi protein p53 menggunakan metode imunohistokimia (IHK). Blok parafin yang telah berisi jaringan tubulus seminiferus dipotong setebal 3-4 µm dan diletakkan di atas objek glass yang telah dilapisi dengan ploy-L-Lysin, kemudian dikeringkan di hotplate ±30 menit. *Slide* ploy-L-Lysin tersebut kemudian diinkubasi semalam di inkubator pada suhu 45^0C. Selanjutnya dilakukan deparafinisasi dengan xilol I, xylol II, dan xylol III serta redehidrasi menggunakan alkohol absolut, 96%, 90%, 80%, 70%. Preparat kemudian direndam dalam 3% hidrogen peroksida (H_2O_2 Blok) selama 5-10 menit, lalu dicuci dengan akuades dilanjutkan pencucian dengan PBS sebanyak 2 kali masing-masing selama 5 menit. Selanjutnya dilakukan Trypsin 0,025% dalam *incubator* dengan temperatur 37^0C selama 15 menit. Kemudian dilanjutkan dengan pencucian PBS sebanyak 2 kali masing-masing selama 5 menit. Preparat dilakukan Ultra V.Blok selama 5 menit. Selanjutnya dibilas dengan PBS langsung antibodi, preparat ditetesi dengan antibodi primer antibodi monoklonal anti p53 (5% diencerkan dengan *diluent*) selama 1 jam atau semalam dalam lemari es (8^0C). Dicuci dalam PBS sebanyak 2 kali masing-

masing selama 5 menit. Preparat diinkubasikan dengan antibodi sekunder terbiotinilasi (*Biotinylated link* (*yellow*) *drops*) selama 30 menit, lalu dicuci dengan PBS sebanyak 2 kali masing-masing selama 5 menit. Kemudian ditetesi dengan *streptavidin-peroksidase* (Streptavidin (*red*) *drops*) selama 30 menit, lalu dicuci dengan PBS sebanyak 2 kali masing-masing selama 5 menit. Preparat ditetesi DAB (diaminobenziddine) chromogen diencer 2% dengan DAB Plus substrate selama 6-10 menit, lalu dicuci dengan PBS sebanyak 2 kali masing-masing selama 5 menit. Preparat di*dipping* dengan akuades selama 5 menit, selanjutnya dilakukan *counterstain* dengan hematoxylin/Mayer 5-10 menit. Preparat dicuci dengan air mengalir selama 5 menit, amoniak air 3 menit dan *dipping* aquades 5 menit. Terakhir dilakukan *mounting* menggunakan entelan/canada balsem sebelum ditutup dengan *deck glass* dan pengamatan di bawah mikroskop. Pembuatan preparat imunohistokimia dapat dilihat pada **Lampiran 9**. Pengecatan imunohistokimia dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga Surabaya.

Selanjutnya dilakukan pengamatan ekspresi p53 pada sel leydig (testis) pada semua kelompok hewan uji. Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400 kali. Sel yang mengekspresikan protein p53 akan tampak berwarna coklat pada sitoplasma sel, sedangkan sel yang tidak mengekspresikan memberikan

warna ungu pada membran sel. Pemeriksaan dilakukan di bawah mikroskop binokuler (Olympus® BX51 *microscope digital camera system)* di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga Surabaya.

4.6.7 Perhitungan Jumlah Sel Leydig

Analisa jumlah sel leydig dilakukan dengan mengamati preparat histologi yang sudah diwarnai di bawah mikroskop dimulai perbesaran terkecil yaitu perbesaran objektif 4x hingga perbesaran objektif 40x. Dilakukan perhitungan dengan menggunakan gratikulae terhadap sel leydig.

4.7 Analisa Data

Data penelitian ini berupa data kuantitatif. Ekspresi protein p53 dan jumlah sel leydig dianalisa secara kuantitatif. Hasil ekspresi protein p53 berupa data kuantitatif yang diinterpretasikan dalam bentuk data SPSS dari *Software Immunoratio*. Data kuantitatif akan dianalisis dengan uji *one-way* ANOVA (α=0,05), dan dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Jujur (BNJ) jika terdapat perbedaan nyata dengan α=5% (Kusriningrum, 2008).

BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Pengaruh Pemberian Ekstrak Terong Cepoka (*Solanum torvum* S.) dan Biji Kapuk (*Ceiba pentandra* G.) terhadap Ekspresi Protein p53 Tubulus Seminiferus Testis pada Tikus Putih Wistar (*Rattus norvegicus*)

Metode imunohistokimia dapat digunakan untuk mengamati potensi pemberian ekstrak terong cepoka (*Solanum torvum* S.) dan biji kapuk (*Ceiba pentandra* G.) terhadap ekspresi protein p53 di tubulus seminiferus testis pada tikus jantan Wistar (*Rattus norvegicus*). Metode imunohistokimia menunjukkan ekspresi protein p53 pada tubulus seminiferus testis dengan warna kecoklatan di jaringan. Warna kecoklatan ini disebabkan karena terjadi ikatan antara antibodi primer p53 dengan DAB (*Diaminobenziddine*) *chromogen* yang diencer 2% dengan *DAB Plus substrate*. Pengamatan ekspresi protein p53 dilakukan pada semua kelompok perlakuan, yaitu kelompok kontrol negatif (K1), kelompok perlakuan 1 ekstrak terong cepoka dengan dosis 1 g/kg BB (P1), dan kelompok perlakuan 2 ekstrak biji kapuk dengan dosis 0,1 g/kg BB (P2).

Hasil dari pengamatan imunohistokimia ini adalah terekspresinya protein p53 pada jaringan tubulus seminiferus testis. Pada kelompok kontrol negatif (K1) yang ditunjukkan pada **Gambar 5.1A** terdapat adanya ekspresi protein p53 dengan intensitas warna coklat yang paling rendah setelah dianalisis berdasarkan rata-rata persentase area dengan *software ImmunoRatio*. Ekspresi protein p53 secara normal memicu kerja fagositosis sel yang mengalami apoptosis dalam jaringan. Apoptosis adalah suatu proses

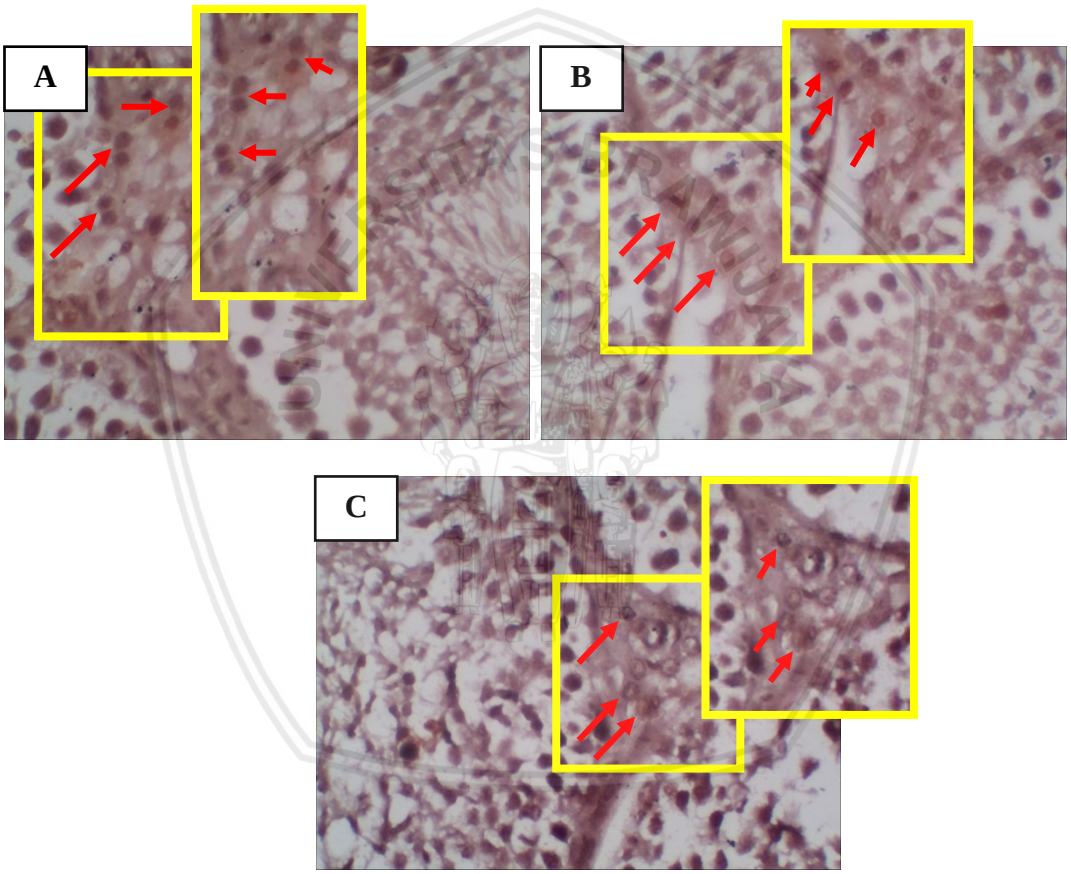
kematian sel yang terjadi pada sel tunggal secara terencana yang ditandai dengan gambaran morfologi dan biokimiawi khas sebagai akibat dari inisiasi oleh stimuli fisiologis maupun patologis tanpa menimbulkan reaksi radang (Hadi, 2011). Hasil pengamatan ekspresi protein p53 pada kelompok kontrol negatif (K1) memiliki intensitas warna coklat yang paling rendah dari kelompok perlakuan ekstrak terong cepoka dosis 1 g/kg BB (P1) dan kelompok perlakuan ekstrak biji kapuk dosis 0,1 g/kg BB (P2).

Hasil pengamatan dari ekspresi protein p53 pada kelompok perlakuan ekstrak terong cepoka dosis 1 g/kg BB (P1) seperti pada **Gambar 5.1B**, dan kelompok perlakuan ekstrak biji kapuk dosis 0,1 g/kg BB (P2) seperti pada **Gambar 5.1C** memiliki intensitas warna coklat yang lebih tinggi dibandingkan ekspresi protein p53 pada kelompok kontrol negatif yang hanya diberikan pakan dan minum secara *ad libitum*. Peningkatan ekspresi protein p53 pada tubulus seminiferus testis yang diberikan ekstrak terong cepoka (*Solanum torvum* S.) dengan biji kapuk (*Ceiba pentandra* G.) membuktikan bahwa solasodin dalam ekstrak terong cepoka (*Solanum torvum* S.) dan gosipol dalam ekstrak biji kapuk (*Ceiba pentandra* G.) dapat mempengaruhi mekanisme kerja dari hormon GnRH untuk melepaskan FSH dan LH pada spermatogenesis. Spermatogenesis merupakan proses yang kompleks dimulai dari proliferasi sel germinal dan pematangan spermatogonia menjadi spermatozoa. Kandungan solasodin dan gosipol dapat mempengaruhi mekanisme kerja dari hipotalamus hipofisa anterior untuk melepaskan hormon GnRH (*Gonadotropin Releasing Hormone*). Hormon tersebut

berperan dalam pelepasan FSH (*Folicle Stimulating Hormone*) dan LH (*Luteinizing Hormone*). Pada pelepasan FSH yang terganggu akan mengakibatkan penurunan dari fungsi sel sertoli untuk menghasilkan ABP (*Androgen Binding Protein*). Sedangkan pelepasan LH yang terganggu dapat mengakibatkan penurunan dari fungsi sel leydig untuk menghasilkan testosteron. *Androgen Binding Protein* (ABP) mengikat testosteron agar tetap berada di sekitar sel-sel spermatogenik untuk memelihara aktivitas spermatogenesis agar berjalan normal.

Penurunan fungsi hormon FSH dan LH juga dapat mengakibatkan sel mengecil dan hipofungsi. Hipofungsi disebabkan karena kekurangan atau terhambatnya sekresi hormon reproduksi. Terhambatnya sekresi hormon tersebut dikarenakan senyawa solasodin yang mempengaruhi mekanisme kerja GnRH untuk melepaskan FSH dan LH. Menurut Hidayati dan Nofianti (2014), senyawa flavanoid yang terdapat dalam ekstrak terong cepoka mampu menghambat enzim aromatase. Enzim aromatase merupakan enzim yang berfungsi mengkatalis konversi androgen menjadi estrogen, sehingga jumlah androgen (testosteron) meningkat. Tingginya konsentrasi testosteron berefek umpan balik negatif ke hipofisa sehingga tidak melepaskan FSH dan LH. Hal tersebut mengakibatkan hipofungsi sel sertoli untuk tidak menghasilkan ABP serta hipofungsi sel leydig untuk tidak menghasilkan testosteron. Pada kelompok perlakuan pemberian ekstrak biji kapuk dengan dosis 0,1 g/kgBB (P2) memiliki intensitas warna coklat lebih tinggi dibanding dengan kelompok perlakuan pemberian ekstrak terong cepoka dengan dosis 1 g/kgBB

(P1). Ekstrak terong cepoka memiliki mekanisme kerja dengan menghambat hormonal dari sistem reproduksi. Sedangkan ekstrak biji kapuk dapat mengakibatkan sitotoksik yang menyebabkan pelebaran pori-pori pada membran sel. Ekstrak biji kapuk juga dapat menyebabkan kerusakan mitokondria yang nantinya dapat mengaktivasi protein p53.



Gambar 5.1 Ekspresi protein p53 di tubulus seminiferus testis tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) dengan metode imunohistokimia perbesaran total 400x

Keterangan : (A) Tikus kontrol negatif (K1); (B) Tikus dengan ekstrak terong cepoka dosis 1 g/kgBB; (C) Tikus dengan ekstrak biji kapuk 0,1 g/kgBB. Ekspresi protein p53 merupakan warna kecoklatan pada jaringan interstitial tubulus seminiferus yang ditunjukkan anak panah (↑)

Perhitungan rata-rata persentase area ekspresi protein p53 di tubulus seminiferus testis tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) dilakukan dengan menggunakan *software ImmunoRatio* (**Lampiran 13**), kemudian data yang dihasilkan dianalisa statistik menggunakan ragam ANOVA pada *software* SPSS, kemudian dilanjutkan dengan uji BNJ (*Tukey test*) dengan α=5%. Hasil pengukuran terhadap persentase area ekspresi protein p53 pada setiap kelompok perlakuan tikus dapat dilihat pada **Tabel 5.1**.

Tabel 5.1 Pengaruh perbedaan perlakuan antara ekstrak terong cepoka dengan ekstrak biji kapuk terhadap ekspresi protein p53 pada jaringan interstitial tubulus seminiferus

Kelompok Perlakuan	Rata-Rata Ekspresi Protein p53 (%) ± SD	Peningkatan Ekspresi Protein p53 Terhadap Kontrol Negatif (%)
K1 (Kontrol Negatif)	72,9±5,1[a]	-
P1 (Perlakuan 1)	79,0±10,0[a]	8%
P2 (Perlakuan 2)	96,9±2,9[b]	32%

Keterangan : Perbedaan huruf *superscript* (a,b) menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antar perlakuan terhadap ekspresi protein p53 (α<0,05)

Hasil analisa secara statistik *One Way Analysis of Variant* (ANOVA) dengan menggunakan *software SPSS 22* menunjukkan bahwa pemberian ekstrak terong cepoka (*Solanum torvum* S.) dengan dosis 1 g/kgBB (P1) dan ekstrak biji kapuk (*Ceiba pentandra* G.) dengan dosis 0,1 g/kgBB (P2) secara signifikan (p<0,05) meningkatkan persentase area ekspresi protein p53 pada tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) seperti pada **Tabel 5.1**. Hasil lanjutan menggunakan uji Beda Nyata Jujur (BNJ) atau *Tukey test* (dapat dilihat pada **Lampiran 11**) menunjukkan bahwa terjadi peningkatan ekspresi protein p53

yang signifikan (p<0,05) pada kelompok perlakuan 2 (P2) dengan pemberian ekstrak biji kapuk (*Ceiba pentandra* G.) dosis 0,1 g/kgBB. Sedangkan pada kelompok perlakuan 1 (P1) ekstrak terong cepoka (*Solanum torvum* G.) dosis 1 g/kgBB tidak menunjukkan hasil yang signifikan (p>0,05). Berdasarkan hasil analisa statistik menunjukkan bahwa pemberian ekstrak terong cepoka (*Solanum torvum* S.) dengan biji kapuk (*Ceiba pentandra* G.) dapat meningkatkan rata-rata ekspresi protein p53. Namun peningkatan rata-rata ekspresi protein p53 yang lebih tinggi terjadi pada pemberian ekstrak biji kapuk dosis 0,1 g/kgBB. Sehingga pemberian ekstrak biji kapuk dosis 0,1 g/kgBB lebih berpotensi untuk dijadikan sebagai kandidat kontrasepsi.

Persentase peningkatan ekspresi protein p53 pada kelompok perlakuan pemberian ekstrak terong cepoka dosis 1 g/kgBB (P1) mengalami peningkatan sebesar 8% terhadap kelompok kontrol negatif (K1). Sedangkan pada kelompok perlakuan pemberian ekstrak biji kapuk dosis 0,1 g/kgBB (P2) mengalami peningkatan sebesar 32% terhadap kelompok kontrol negatif (K1). Kondisi ini menunjukkan bahwa adanya kandungan solasodin pada terong cepoka dan gosipol pada biji kapuk dapat meningkatkan ekspresi protein p53 di tubulus seminiferus. Hasil uji adanya kandungan solasodin dan gosipol dapat dilihat pada **Lampiran 4** dan **Lampiran 5**.

Pada kelompok perlakuan pemberian ekstrak terong cepoka dosis 1 g/kgBB (P1) yang mengandung solasodin dapat mengakibatkan penghambatan aktivitas spermatogenesis. Solasodin bersifat kompetitif terhadap reseptor *Folicle Stimulating Hormone* (FSH), sehingga pelepasan

FSH dari hipotalamus terganggu. Di samping itu, FSH juga mempengaruhi sel sertoli untuk menghasilkan protein pengikat androgen (*Androgen Binding Protein*). Protein pengikat androgen berfungsi untuk mengikat testosteron agar tetap berada di sekitar sel-sel spermatogenik untuk memelihara aktivitas spermatogenesis agar berjalan normal. Terhambatnya pembelahan sel-sel spermatogenik oleh solasodin dapat menyebabkan hambatan aktivitas spermatogenesis (Kaspul, 2016). Solasodin juga dapat merusak mitokondria di dalam sel sehingga proses respirasi akan terganggu akibatnya energi untuk mempertahankan hidup dan untuk bergerak akan menurun (Wahyuni, 2001).

Pada kelompok perlakuan pemberian ekstrak biji kapuk dosis 0,1 g/kgBB (P2) yang mengandung gosipol dapat mengakibatkan kerusakan pada mitokondria. Gosipol akan mengaktifkan fosfolipase dan enzim proteolitik yang akan merusak mitokondria. Gosipol pada konsentrasi yang tinggi dapat merusak enzim pada membran mitokondria sperma sehingga terjadi penghambatan proses pelepasan dan pemanfaatan ATP oleh sperma (Wirastuti dkk., 2018). Gosipol juga dapat mengikat reseptor *connexin43* pada sel sertoli. Fungsi reseptor *connexin43* yaitu untuk melakukan komunikasi antar sel. Gosipol memblok *gap junction* komunikasi antar sel sertoli dengan sel-sel yang berdekatan dan karena itu mempengaruhi fungsi reseptor *connexin43*. *Gap junction* ini berkaitan dengan pengaturan ion spermatogenesis dan menghilangkan *connexin43* dari sel sertoli menyebabkan keterlambatan dalam pematangan sel sertoli (Gorji *et al*., 2015). Peran penting *gap junction* adalah pengaturan pertumbuhan dan diferensiasi sel

dengan mengendalikan lewatnya molekul-molekul kecil di antara sel-sel yang berdekatan (El-Sharaky *et al*., 2010).

Berdasarkan hasil penelitian ini, diketahui bahwa perbedaan pemberian ekstrak terong cepoka (*Solanum torvum* S.) dan biji kapuk (*Ceiba pentandra* G.) dapat meningkatkan ekspresi protein p53 yang merupakan suatu protein yang dapat memicu terjadinya apoptosis. Namun, dilihat dari signifikansi analisa statistik pemberian biji kapuk (*Ceiba pentandra* G.) dosis 0,1 g/kgBB lebih berpotensi untuk dijadikan sebagai kandidat kontrasepsi.

5.2 Pengaruh Pemberian Ekstrak Terong Cepoka (*Solanum torvum* S.) dan Biji Kapuk (*Ceiba pentandra* G.) terhadap Gambaran Histologi Jumlah Sel Leydig Tubulus Seminiferus Testis pada Tikus Putih Wistar (*Rattus norvegicus*)

Spermatogenesis merupakan proses yang kompleks dimulai dari proliferasi sel germinal dan pematangan spermatogonia menjadi spermatozoa. Hormon yang berpengaruh dalam spermatogenesis yaitu testosteron. Testosteron sendiri dihasilkan di dalam sel leydig. Sel leydig merupakan sel yang terdapat di jaringan interstisial di antara tubulus seminiferus. Sel-sel leydig sesungguhnya berkembang dari sel yang mempengaruhi fibroblast di jaringan interstitial dan dirangsang oleh LH. *Luteinizing Hormone* (LH) juga merangsang sintesis dan sekresi testosteron (Foa, 2005).

Pemberian ekstrak buah terong cepoka (*Solanum torvum* S.) dan biji kapuk (*Ceiba pentandra* G.) pada tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) diharapkan dapat menurunkan jumlah sel leydig pada gambaran histologi tubulus seminiferus di testis dengan pewarnaan Hematoksilin Eosin (HE).

Pewarnaan Hematoksilin Eosin (HE) pada preparat histologi testis digunakan untuk mengetahui jumlah sel leydig pada jaringan interstitial tubulus seminiferus. Hematoksilin merupakan zat pewarna yang memberi warna biru keungunan pada inti sel, sedangkan eosin merupakan zat warna yang memberi warna merah atau merah muda pada sitoplasma. Hal ini dikarenakan prinsip dari pewarnaan HE yaitu inti yang bersifat asam akan menarik zat yang bersifat basa sehingga akan berwarna biru keunguan, sedangkan sitoplasma bersifat basa akan menarik zat bersifat asam sehingga berwarna merah. Pengamatan preparat histologi testis dilakukan dengan menggunakan mikroskop Olympus BX51 dengan perbesaran total 400x.

Pengamatan histologi testis dilakukan dengan mengamati dan menghitung jumlah sel leydig yang berada di jaringan interstitial di antara tubulus seminiferus yang diwarnai dengan pewarnaan Hematoksilin Eosin (HE). Pada gambaran histologi testis, sel leydig tersusun berkelompok memadat. Sel leydig memiliki ciri-ciri yaitu sel besar, sitoplasma sering tampak bervakuola, inti mengandung butir kromatin kasar dan anak inti terlihat jelas. Sitoplasma kaya akan benda inklusi seperti titik lipid. Retikulum endoplasma agranuler terletak di interstitial sel (Rahmawati, 2013).

Setelah 10 hari perlakuan didapatkan bahwa terjadi penurunan jumlah sel leydig pada pemberian ekstrak terong cepoka (*Solanum torvum* S.) dosis 1 g/kgBB serta pada pemberian ekstrak biji kapuk dosis 0,1 g/kgBB. Hasil pengamatan dan perhitungan jumlah sel leydig dengan mikroskop pada

perbesaran 400x dengan 5 lapang pandang kemudian dianalisa secara statistik menggunakan uji *one way* ANOVA dan dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Jujur (BNJ) atau uji Tukey dengan taraf kepercayaan α=0,05 untuk menentukan perbedaan antar perlakuan. Hasil perhitungan jumlah sel leydig dapat dilihat pada **Tabel 5.2** dan **Lampiran 12**.

Tabel 5.2 Rata-rata hasil jumlah sel leydig pada tikus semua perlakuan

Kelompok Perlakuan	Rata-Rata Jumlah Sel Leydig ± SD	Penurunan Jumlah Sel Leydig Terhadap Kontrol Negatif (%)
K1 (Kontrol Negatif)	29,7±2,7[a]	-
P1 (Perlakuan 1)	24,8±1,9[b]	16%
P2 (Perlakuan 2)	23,5±1,8[b]	20%

Keterangan : Perbedaan huruf *superscript* (a,b) menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antar perlakuan terhadap jumlah sel leydig (α<0,05)

Tabel 5.2 menunjukkan bahwa rata-rata jumlah sel leydig pada pemberian ekstrak terong cepoka dosis 1 g/kgBB (P1) sebesar 24,8 dan pemberian ekstrak biji kapuk dosis 0,1 g/kgBB (P2) sebesar 23,5. Hal ini berarti pada perlakuan 1 dan perlakuan 2 mengalami penurunan rata-rata jumlah sel leydig dibanding dengan kontrol negatif yang tidak diberikan perlakuan hanya diberi pakan dan minum secara *ad libitum*. Kedua perlakuan tersebut secara signifikan berbeda nyata dengan kontrol negatif (K1), namun penurunan rata-rata jumlah sel leydig lebih tinggi pada perlakuan 2 yaitu pemberian ekstrak biji kapuk (*Ceiba pentandra* G.) dosis 0,1 g/kgBB. Sehingga dapat disimpulkan bahwa pada pemberian ekstrak biji kapuk (*Ceiba pentandra* G.) dosis 0,1 g/kgBB (P2) lebih berpotensi untuk dijadikan sebagai

kandidat kontrasepsi pada pria dibanding dengan pemberian ekstrak terong cepoka (*Solanum torvum* S.) dosis 1 g/kgBB (P1).

Jumlah sel leydig merupakan salah satu variabel yang dinilai sehubungan dengan fungsinya sebagai kelenjar endokrin yang mensekresi hormon testosteron. Dimana hormon ini berperan dalam aktivitas spermatogenesis. Apabila terjadi penurunan testosteron, maka akan terjadi penurunan produksi sel spermatogenik, termasuk di dalamnya spermatogonium dan sel spermatosit primer (Foa, 2005).

Penurunan sel leydig ini diasumsikan dapat disebabkan karena kandungan steroid alkaloid yaitu solasodin yang mempengaruhi mekanisme kerja dari hipotalamus hipofisa anterior untuk melepaskan hormon GnRH (*Gonadotropin Releasing Hormone*). Pelepasan hormon GnRH yang terganggu akan mempengaruhi pelepasan FSH dan LH yang berfungsi sebagai pemelihara sel leydig baik dalam pertumbuhan maupun dalam fungsinya untuk mensekresi testosteron.

Selain itu, kandungan steroid yang terdapat dalam buah terong cepoka (*Solanum torvum* S.) dapat berperan sebagai penghambat spermatogenesis dan bersifat *reversible*. Hal ini disebabkan adanya steroid mengakibatkan konsentrasi testosteron yang terus meningkat dalam darah sehingga memunculkan efek umpan balik (*feedback*) negatif terhadap kelenjar hipofisis, sehingga akan berdampak terhambatnya sekresi *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) dan *Luteinizing Hormone* (LH) (Hidayati dan Nofianti,

2014). Terhambatnya sekresi LH akan mengganggu *signaling* LH di dalam sel leydig untuk mensekresikan testosteron.

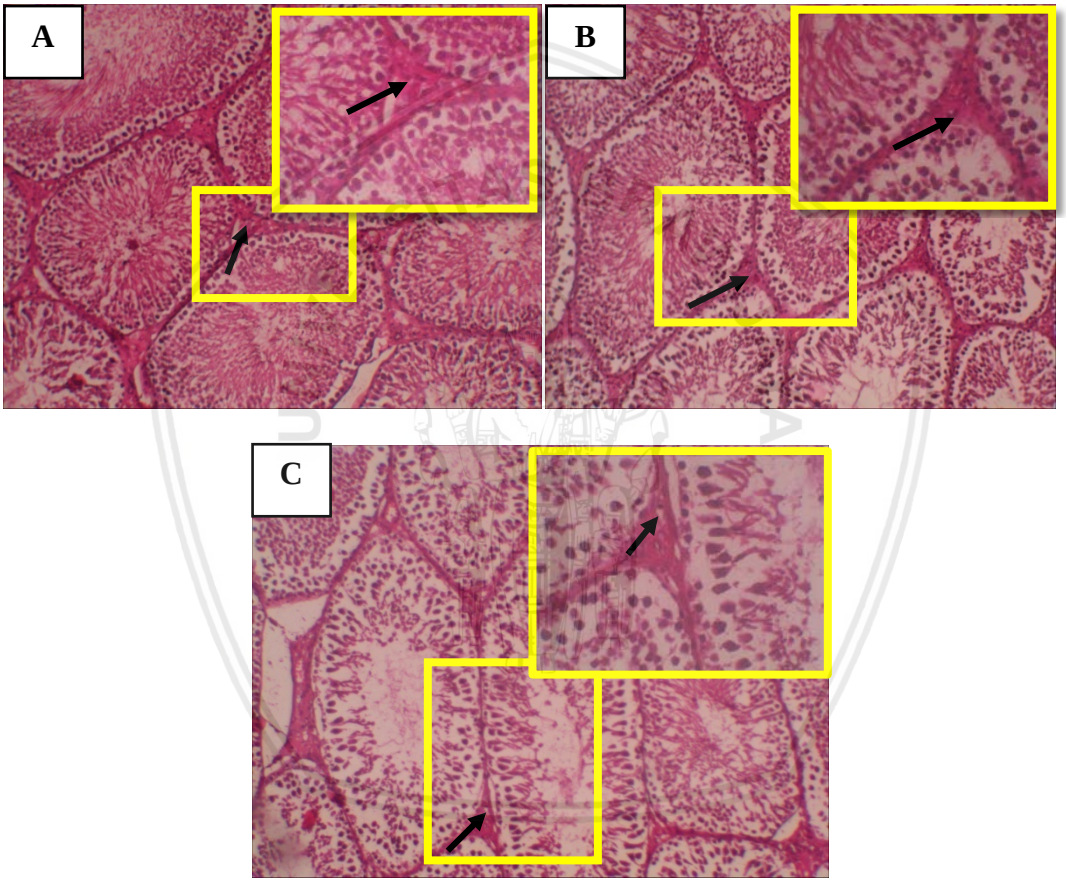
Sedangkan senyawa gosipol pada biji kapuk (*Ceiba pentandra* G.) yang ditemukan di dalam darah juga menimbulkan kerusakan jaringan pada testis. Beberapa penelitian lainnya menyebutkan bahwa senyawa gosipol menyebabkan terganggunya proses spermatogenesis yang mengakibatkan penurunan motilitas dan jumlah spermatozoa sebagai akibat dari degenerasi jaringan testis. Terganggunya proses spermatogenesis akan mengakibatkan presentase sperma yang abnormal mengalami peningkatan. Peningkatan sperma yang abnormal dan degenerasi jaringan testis oleh senyawa gosipol disebabkan karena rusaknya mitokondria pada ekor sperma dan rusaknya epitel germinal pada tubulus seminiferus (Wirastuti dkk., 2018). Fungsi mitokondria dalam sel adalah menghasilkan energi dalam bentuk ATP (*Adenosine Triphosphate*). Energi yang dihasilkan ini digunakan sel untuk homeostasis, regulasi, pembelahan serta motilitas (Susmiarsih, 2010).

Toksisitas gosipol pada reproduksi jantan menghambat spermatogenesis dengan menurunkan jumlah sperma, motilitas serta viabilitas spermatozoa. Gosipol menyebabkan infertilitas dengan menghambat motilitas sperma, menurunkan konsentrasi sperma, menginduksi kerusakan mitokondria pada ekor sperma dan merusak epitelium germinal (Gadelha *et al*., 2014).

Berdasarkan hasil penelitian ini didapatkan bahwa pemberian ekstrak terong cepoka dosis 1 g/kgBB (P1) dan pemberian ekstrak biji kapuk dosis 0,1 g/kgBB (P2) berpengaruh terhadap penurunan jumlah sel leydig. Namun

apabila dilihat dari penurunan rata-rata jumlah sel leydig, pemberian ekstrak biji kapuk (*Ceiba pentandra* G.) dosis 0,1 g/kgBB (P2) lebih berpotensi untuk dijadikan sebagai kandidat kontrasepsi pada pria.

Penurunan jumlah sel leydig pada tikus perlakuan dapat diamati dari gambaran histologi berikut ini :



Gambar 5.2 Histologi sel leydig tikus pewarnaan HE perbesaran total 400x

Keterangan : (A) Tikus kontrol negatif (K1); (B) Tikus dengan ekstrak terong cepoka dosis 1 g/kgBB; (C) Tikus dengan ekstrak biji kapuk 0,1 g/kgBB. Sel leydig normal ditunjukkan dengan panah warna hitam (↑).

Sel-sel interstitial (sel leydig) menempati sebagian besar ruang diantara tubuli seminiferus. Sel leydig berbentuk bulat atau poligonal, memiliki inti di pusat dan sitoplasma eosinofilik dengan banyak tetes lipid halus. Sel leydig

memiliki ciri sel pensekresi steroid. Sel ini merupakan sel endokrin yang dikhususkan untuk membuat dan mengeluarkan steroid dengan aktivitas hormonal (Junqueira *and* Carneiro, 2007).

Sel leydig yang berkurang akan mengakibatkan penurunan fungsi dari sel tersebut untuk menghasilkan hormon testosteron. Hormon testosteron sangat diperlukan dalam proses spermatogenesis. Proses spermatogenesis diawali dengan perkembangan sel spermatogenik menjadi spermatozoa yang siap dilepas ke lumen tubulus seminiferus. Pada spermatozoa, testosteron diperlukan untuk mempertahankan daya hidupnya di dalam epididimis. Di samping itu, testosteron juga berperan dalam proses pengambilan glukosa yang selanjutnya akan dimetabolisme di mitokondria untuk menghasilkan ATP yang merupakan sumber energi utama bagi spermatozoa untuk bergerak dan untuk mempertahankan aktivitasnya dalam mempertahankan hidup. Testosteron juga diperlukan untuk memulai proses meiosis pertama yaitu pembentukan sel spermatosit primer menjadi spermatosit sekunder. Selain itu, hormon testosteron akan menjaga semua tahapan perkembangan spermatid. Penurunan hormon testosteron mengakibatkan terlepasnya spermatid dari sel sertoli ke dalam lumen tubulus seminiferus. Hal tersebut yang menyebabkan gagalnya tahapan spermiogenesis (Prasetyorini dkk., 2018).

Maka dari itu, dengan berkurangnya sel leydig dapat mengakibatkan menurunnya testosteron yang dapat menyebabkan proses spermatogenesis terganggu. Pada akhirnya proses spermatogenesis yang terganggu dapat mengakibatkan infertilitas.

BAB 6

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil dan pembahasan di atas, maka dapat disimpulkan :

1. Ekstrak biji kapuk (*Ceiba pentandra* G.) dosis 0,1 g/kgBB meningkatkan ekspresi protein p53 di tubulus seminiferus testis pada tikus jantan Wistar (*Rattus norvegicus*).
2. Ekstrak biji kapuk (*Ceiba pentandra* G.) dosis 0,1 g/kgBB menurunkan jumlah sel leydig di testis pada tikus jantan Wistar (*Rattus norvegicus*), sehingga berdasarkan peningkatan ekspresi protein p53 dan penurunan jumlah sel leydig lebih berpotensi digunakan sebagai kandidat kontrasepsi pria dibanding dengan ekstrak terong cepoka dosis 1 g/kgBB.

6.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan parameter lain yang berbeda dengan fungsi ekstrak biji kapuk sebagai kandidat kontrasepsi serta diharapkan pada penelitian selanjutnya terdapat pembanding kontrasepsi yang bersifat permanen seperti vasektomi.

repository.ub.ac.id

DAFTAR PUSTAKA

Agung, N. 2017. *Buku Ajar Teknologi Bahan Alam*. Banjarmasin: Lambung Mangkurat University Press.

Akbar, M.A. 2014. Pengaruh Paparan Insektisida Bakar Bentuk Lingkar dan Insektisida Cair Terhadap Spermatogenesis Tikus Sprague Dawley Dilihat Secara Histopatologis. *Karya Tulis Ilmiah*. Fakultas Kedokteran. Universitas Diponegoro. Semarang.

Alexandru, Iliuta. 2011. Experimental Use of Animal in Research Spa. *Bulneo-Research Journal* 2(1): 65-66.

Aulanni'am, Akmal, M., dan Rosmaidar. 2007. Efek Antifertilitas Fraksi Air Biji Pinang (*Areca catechu*) sebagai Agen Apoptosis pada Sel-sel Jaringan Testis *Rattus norvegicus*. *Jurnal Media Kedokteran Hewan,* 23(3): 179-182.

Boekelheide, Kim. 2005. Damage to Fertility By Cancer and Its Treatments. *Journal of The National Cancer Institute Monographs* No. 34: 6-8.

Ching-Huai, K., Shing-Chuan, S., Liang-Yo, Y., Cheng-Wei, L., and Yen-Chou, C. 2007. Gossypol Reduction of Tumor Growth ROS-Dependent Mitocondria Pathway in Human Colorectal Carcinoma Cells. *Int. J. Cancer* 121:1670-1679.

Dellmann, H.D. dan Brown, E.M. 1992. *Buku Teks Histologi Veteriner II Edisi Ketiga*. Jakarta: UI-Press.

Diana, N.E. 2016. Pengaruh Waktu Perebusan Terhadap Kandungan Proksimat, Mineral dan Kadar Gosipol Tepung Biji Kapas. *Jurnal Penelitian Pascapanen Pertanian* 13(1): 100-107.

El-Sharaky, A.S., A.A. Newairy, N.M. Elguindy, A.A. Elwafa. 2010. Spermatotoxicity, Biochemical Changes and Histological Alteration Induced By Gossypol in Testicular and Hepatic Tissues of Male Rats. *Food and Chemical Toxicology* 48: 3354-3361.

Faranita, O.V. 2009. Kualitas Spermatozoa pada Tikus Wistar Jantan Diabetes Melitus. *Karya Tulis Ilmiah*. Fakultas Kedokteran. Universitas Diponegoro. Semarang.

Feradis. 2014. *Reproduksi Ternak*. Bandung: Penerbit Alfabeta.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

Foa, AOIICN. 2005. Pengaruh Pemberian Etanol Peroral Terhadap Gambaran Histologik Sel-Sel Spermatogenik dan Sel Leydig pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus Strain Wistar*) [Tesis]. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya.

Gadelha, I.C.N., N.B.S. Fonseca, S.C.S. Oloris, M.M. Melo, B.S. Blanco. 2014. Gossypol Toxicity from Cottonseed Products. *Hindawi Publishing Corporation The Scientific World Journal* 1-11.

Gorji, N.M., S.G.A. Jorsaraei, V. Hojati, E. Zabihi, A. Khalilpour, Z. Abedian, E. Tahmasbpour. 2015. A Comparison Between the Cytotoxicity Induced by Gossypol in Two Testicular Cell Lines. Iranian Journal of Toxicology 8(27): 1188-1195.

Hadi, R.S. 2011. Apoptosis pada Sperma Sebagai Petanda Adanya Gangguan Kesuburan Pria. *Majalah Kesehatan PharmaMedika* 3(2): 282-285.

Heffner, L.J. dan Schust, D.J. 2008. *At a Glance: Sistem Reproduksi Edisi Kedua*. Jakarta: Penerbit Erlangga.

Hidayati, N.L.D. dan Nofianti, T. 2014. Pengaruh Infusa Buah Terong Cepoka Terhadap Konsentrasi Spermatozoa Tikus Putih Jantan. *Jurnal Kesehatan Bakti Tunas Husada* 12(1): 202-210.

Irwan, S.A. 2010. Tanaman Kapas dan Kaitannya dengan Gosipol. *Bogor: Balai Penelitian Ternak.*

Junqueira, L.C. and Carneiro, Jose. 2007. *Histologi Dasar Teks & Atlas Edisi 10*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.

Jusuf, A.A. 2009. Histoteknik Dasar. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.

Kaspul. 2016. Pengaruh Buah Terong Pipit (Solanum torvum Sw) Terhadap Spermatogenesis Tikus Putih (Rattus norvegicus L). *Jurnal Sains dan Terapan Kimia* 10(1): 26-32.

Krinke, G. J. 2000. *The Laboratory Rat*. San Diego, CA: Academic Press. 150-152.

Kusriningrum, R.S. 2008. *Perancangan Percobaan*. Airlangga University Press. Surabaya. 3-15.

Kusumawardani, N.I. 2015. Pengaruh Temperatur, Kecepatan Putar Ulir dan Waktu Pemanasan Awal Terhadap Perolehan Minyak Biji Kapuk dari Biji Kapuk dengan Metode Penekanan Mekanis (*Screw Press*) [Skripsi]. Fakultas Teknik. Universitas Diponegoro. Semarang.

Laili, N.D.H. 2017. Penurunan Pergerakan Spermatozoa Tikus Putih Jantan (Rattus norvegicus) yang Diinduksi Ekstrak Etanol Daun Pepaya (Carica papaya L.).*Jurnal Kesehatan Bakti Tunas Husada* 17(2): 390-396.

Lawrence, G.H.M. 1964. *Taxonomy of Vascular Plant*. The Macmillan Company: New York.

Mughniati, S. 2015. Pengaruh Ekstrak Biji Kapuk (*Ceiba pentandra* Gaertn) Sebagai Obat Kontrasepsi pada Kucing Lokal (*Felis domestica*) Ditinjau dari Kualitas Sperma dan Organ Reproduksi Jantan [Skripsi]. Fakultas Kedokteran. Universitas Hasanuddin. Makassar.

Nursalam, S.B. 2009. Terong Cepoka (*Solanum torvum*) Herba yang Berkhasiat Sebagai Obat. *Warta Penelitian dan Pengembangan Tanaman Industri* 15(3): 10-12.

Ohta, H., S. Aizawa and Y. Nishimune. 2003. Functional Analysis of The p53 Gene in Apoptosis Induced by Heat Stress or Loss of Stem Cell Factor Signaling in Mouse Male Germ Cells. *Biology of Reproduction* 68 : 2249-2254.

Prasetyorini, M. Effendi, D.D. Cahyani. 2018. Uji Kualitas Spermatozoa Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Galur Sprague-Dawley dengan Pemberian Sari Buah Leunca (*Solanum nigrum* L.). *Jurnal Online Mahasiswa Bidang Biologi* 2(2): 709-720.

Rahmawati, Iis. 2013. Pengaruh Nikotin Terhadap Jumlah Sel Leydig pada Mencit (*Mus musculus*). *Stomatognatic (J. K. G. Unej)* 10(2): 82-85.

Suhaimi, D. 2012. Protein p53 Sebagai Faktor Risiko Terjadinya Ketuban Pecah Dini. *IJAS* 2(2): 83-85.

Susmiarsih, T. 2010. Peran Genetik DNA Mitokondria (mtDNA) pada Motilitas Spermatozoa. *Majalah Kesehatan PharmaMedika* 2(2): 178-180.

Tjitrosoepomo, G. 2000. *Taksonomi Tumbuhan (Spermatophyta).* Yogyakarta: UGM Press.

Volate, S.R., B.T. Kawasaki, E.M. Hurt, J.A. Milner, Y.S. Kim, J. White, and W.L. Farrar. 2010. Gossypol Induces Apoptosis by Activating p53 in Prostate Cancer Cells and Prostate Tumor-Initiating Cells. *Research Article, Molecular Cancer Therapeutic*.

Wahyuni, Alfaina. 2001. Motilitas dan Viabilitas Spermatozoa Mencit (*Mus musculus*) Setelah Pemberian Solasodin yang Diisolasi dari Terong Kuning (*Solanum khasianum*). *Mutiara Medika* 1(2): 26-35.

Wirastuti, D.S., Ngurah, I.W., Sang Ketut, S. 2018. Uji Aktivitas Ekstrak Biji Kapuk Randu (*Ceiba pentandra* G.) Terhadap Perilaku Kawin Tikus (*Rattus norvegicus*) Jantan. *Jurnal Metamorfosa* 5(1): 8-15.

Xin He, Chongyang Wu, Yanhua Cui, Haijing Zhu, Zhiming Gao, Bo li, Jinlian Hua, and Baoyu Zhao. 2017. The Aldehyde Group of Gossypol Induces Mitochondrial Apoptosis Via ROS-SIRT-p53-PUMA Pathway in Male Germline Stem Cell. *Oncotarget* 8(59): 100128-100140.

Zayani, N., I. Supriatna, dan M.A. Setiadi. 2016. Efektivitas Ekstrak Biji Kapas (Gossypium hirsutum L.) Terhadap Jumlah dan Viabilitas Embrio Mencit (Mus musculus L.). *Jurnal Sain Veteriner* 34(2): 233-242.