

Efek Terapi Ekstrak Buah Merah (*Pandanus conoideus* inn) pada Mencit (*Mus musculus*) Betina Model Infertilitas terhadap Gambaran Diameter Folikel Pre Antral dan Antral

Therapy Effect of (*Pandanus conoideus* inn) on Female Mice (*Mus musculus*) Infertility Model Toward The Folicle Diameter Size of Pre Antral and Antral Histopathological Features

Saiful Rizal¹, Widjiati², Retno Sri Wahjuni²

¹PPDH Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga

²Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga

Kampus C Unair, Jalan Mulyorejo, Surabaya-60115

Telp. 031-5992785, Fax. 031-5993015

Email : Saiful.Rizal11@yahoo.com

Abstract

The aim of this study reveals to know the follicle diameter size of pre antral and antral toward infertility female mice which was treated by red fruit extract (*Pandanusconoideus* Lam). Twenty four female mice were separated into four groups. P0 was a negative control group, P1 includes mice which was injected by testosterone propionate hormone without adding red fruit extract, P2 was a group of mice which was injected by testosterone propionate hormones and then treated by red fruit extract dosage 0,05 ml and P3 was a group of mice which was injected by testosterone propionate hormones then treated by red fruit extract dosage 0.1 ml. The study was done by doing injection of testosterone propionate hormones during 14 days in sub-cutan method and giving red fruit in 14 days in per oral manner. After that, the composing of histopathology ovarium preparation wasanalyzed by ANOVA and was continued by Duncan test. The result of this study showed the adding of red fruit extract dosage 0.1 ml was given an effect to increase the follicle diameter size of pre antral and antral of infertility female mice.

Keywords : infertility, red fruit extract, pre antral follicles, antral follicles

Pendahuluan

Gangguan reproduksi dapat mengakibatkan terjadinya kemajiran pada ternak. Gangguan reproduksi tersebut menentukan derajat kemajiran. Semakin banyak faktor gangguan reproduksi maka semakin berat pula derajat

kemajiran pada ternak. Derajat kemajiran terbagi menjadi derajat ringan disebut infertilitas yaitu kemajiran yang sifatnya sementara atau temporer dan masih bisa diobati serta derajat berat bersifat tetap atau permanen yaitu berhentinya proses

reproduksi secara penuh (Hariadi dkk., 2011).

Gangguan reproduksi yang disebabkan karena faktor hormonal salah satunya adalah hipofungsi ovarium. Hipofungsi ovarium merupakan ovarium yang permukaannya licin karena tidak terjadinya pertumbuhan folikel maupun korpus luteum walaupun ukurannya normal, gejala klinis yang terlihat adalah anestrus. (Hariadi dkk., 2011). Selain disebabkan oleh faktor hormonal gangguan reproduksi juga dapat disebabkan karena stres oksidatif.. Menurut Lazar, (2012) stres oksidatif dapat menyebabkan gangguan folikulogenesis dalam ovarium.

Infertilitas dapat dicegah dengan cara banyak mengkonsumsi vitamin E. Vitamin E merupakan senyawa organik yang diperlukan sebagai antioksidan, pelarut lemak dan memelihara fertilitas. Kekurangan vitamin E dapat mengakibatkan hemolisis sel darah merah dan anemia, penuaan dini, kulit keriput dan infertilitas. Senyawa turunan vitamin E sangat beraneka ragam namun yang memiliki aktivitas antioksidan tinggi adalah alfa tokoferol (Milczarek, 2005).

Menurut Budi dan Paimin (2005), ekstrak buah merah mengandung senyawa antioksidan (alfa tokoferol dan beta karoten) yang tinggi, masing – masing 500 ppm dan 700 ppm. Beta karoten (vitamin A) dan alfa tokoferol (vitamin E) merupakan senyawa esensial yang dibutuhkan pada fungsi reproduksi (Lintig and Vogt, 2004). Antioksidan berperan aktif menangkap radikal peroksil dengan memberikan atom hidrogennya sehingga menjadi radikal baru yang bersifat lebih stabil karena terjadi delokalisasi elektron yang tidak berpasangan (Maslachah *et al.*, 2004).

Senyawa antioksidan yang dapat menangkal radikal bebas diantaranya adalah alfa tokoferol dan betakaroten (Maslachah *et al.*, 2004; Budi dan Paimin, 2005).

Materi dan Metode Penelitian

Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kandang hewan coba sebanyak 4 kandang, timbangan untuk mengukur berat badan mencit, botol air minum mencit, spuit yang sudah dimodifikasi dengan sonde untuk pemberian ekstrak buah merah secara peroral, spuit tuberkulin untuk injeksi testosteron propionate, *object glass* untuk melihat gambaran siklus birahi dengan cara swab vagina, alat bedah, mikroskop.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit (*Mus musculus*) dari LPPT (Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu) Universitas Gadjah Mada. Bahan lain yang digunakan adalah hormon testosteron propionate, ekstrak buah merah (*Pandanus conoideus* Lam), akuades, pellet (pakan mencit), serbuk kayu, alkohol, *Cotton bud*, pewarna giemsa, *cotton bud*, , air minum *ad libitum*, sarung tangan (*gloves*), formalin 10%, alkohol, xylol, parafin, pewarna *Hematoxylin Eosin* (HE).

Metode Penelitian

Tahap Persiapan Hewan Coba

Sebelum penelitian dilakukan mencit diadaptasikan selama 1 minggu pada kandang hewan coba yang terbuat dari bak plastik dan diberi tutup dari kawat. Mencit diberi pakan pellet dan air minum secara *ad libitum*. Setelah itu mencit ditimbang , diberi penomoran dan dilakukan pengambilan secara acak kemudian dibagi menjadi empat

kelompok perlakuan (P1, P2, P3 dan P0) masing – masing menggunakan 6 ulangan.

Tahap Perlakuan

Mencit dibagi menjadi 4 kelompok perlakuan (P1, P2, P3 dan P0) masing – masing terdiri dari 6 ulangan. Kelompok kontrol (P0) hanya diberikan aquades tanpa mendapatkan perlakuan. Kelompok P1 diberi injeksi hormon testosteron propionate 1 mg/kgBB secara subcutan (sc) selama 14 hari untuk menimbulkan efek infertilitas. Kelompok perlakuan P2 dan P3 mendapatkan injeksi hormon testosteron propionate 1 mg/kgBB secara subcutan (sc) selama 14 hari untuk menimbulkan efek hipofungsi ovarium dan diberi terapi ekstrak buah merah dosis 0,05 ml dan 0,1 ml selama 14 hari secara peroral.

Testosteron propionate yang diinjeksikan sebanyak 0,02 ml dilakukan secara subcutan selama 14 hari. Pada pemberian Testosterone Propionate selama 14 hari akan didapatkan suatu keadaan yang menyerupai SOPK (Sindroma Ovarium Polikistik) dengan ciri-ciri tidak didaptkannya corpus luteum, adanya ovarium polikistik, hipertekosis pada stroma serta penipisan/atresi sel granulosa (Belooseky *et al.*, 2004). Sindroma Ovarium Polikistik (SOPK) merupakan gangguan ovulasi pada masa reproduksi, sehingga menyebabkan gangguan mentruasi dan infertilitas. (Santoso dan Irawan, 2007). Pembedahan pada Mencit Setelah semua mencit mendapatkan perlakuan selama 28 hari, pembedahan dilakukan pada hari ke 29. Tahapan pembedahan yaitu dengan melakukan euthanasia dengan menggunakan dietil eter dan kemudian dilakukan pembedahan untuk diambil ovariumnya. Ovarium yang telah diambil dimasukkan ke

dalam buffer formalin dan dikelompokkan sesuai kelompok perlakuan kemudian dilakukan pembuatan preparat histologis dengan pewarnaan Hematoxylin Eosin (HE).

Pembuatan Preparat Histologis Ovarium Pembuatan preparat ovarium dilakukan menggunakan metode parafin dan pewarnaan hematoxylin-eosin. Langkah pertama adalah dilakukan fiksasi ovarium dengan larutan formalin 10%, dilanjutkan proses dehidrasi menggunakan alkohol bertingkat dan clearing menggunakan xylol. Setelah clearing dilakukan infiltrasi parafin. Setelah terbentuk blok parafin maka blok tersebut ditempel pada holder, dilakukan trimming, dan pengirisan menggunakan rotary microtom. Pita-pita preparat yang terbentuk ditempel pada objek glass (affiksing).

Proses yang terakhir adalah pewarnaan (staining) dengan pewarna hematoxylin-eosin. Langkah terakhir adalah penutupan (covering) (Handari 1983).Pemeriksaan

Preparat Histopatologi

Pengamatan dilakukan secara mikroskopis menggunakan mikroskop dengan perbesaran 100X. Pengamatan preparat histopatologi dimaksudkan untuk menghitung rata – rata diameter folikel antral dan pre antral. Data yang didapat merupakan data kuantitatif yang diperoleh dengan cara menghitung diameter folikel antral dan pre antral.

Analisis Data

Analisis data menggunakan ANOVA (*Analysis Of Variance*). Data diproses menggunakan program SPSS (*Statistical Programs For Social Scientific*). Apabila terdapat perbedaan signifikan antar kelompok perlakuan dilanjutkan dengan uji

jarak berganda *Duncan* (Kusriningrum, 2012)

Hasil dan Pembahasan

Diameter Folikel Preantral

Folikel pre antral terdiri dari folikel primordial, folikel primer dan folikel sekunder. Berikut adalah data ukuran

diameter folikel primordial yang telah dihitung menggunakan mikroskop dengan pembesaran 100X

Tabel 1. Rerata dan simpangan baku ukuran diameter folikel primordial, folikel primer dan folikel sekunder setelah pemberian ekstrak buah merah

No	Perlakuan	Ukuran Diameter Folikel Primordial	Ukuran Diameter Folikel Primer	Ukuran Diameter Folikel Sekunder
1	P0 (Kontrol Negatif)	2,59 ^b ± 0,33	4,66 ^{ab} ± 0,86	10,95 ^b ± 2,21
2	P1 (Kontrol Positif)	1,90 ^a ± 0,12	3,83 ^a ± 1,15	8,45 ^a ± 1,45
3	P2	2,83 ^b ± 0,25	4,73 ^{ab} ± 0,79	9,73 ^{ab} ± 0,98
4	P3	2,63 ^b ± 0,32	5,71 ^b ± 1,02	10,80 ^b ± 2,11

Berdasarkan hasil ANOVA yang dilanjutkan dengan uji Duncan pada tabel 1 menunjukkan ada perbedaan nyata bahwa ukuran diameter folikel primordial dari P2, P3 dan P0 menunjukkan beda nyata ($P < 0,05$) terhadap kelompok P1. Untuk Folikel primer hasil pengamatan ukuran diameter folikel primer menunjukkan beda nyata antara P1 terhadap P3, sedangkan antara P0, P1 dan P2 tidak menunjukkan adanya perbedaan yang nyata. Sedangkan untuk folikel sekunder hasil pengamatan ukuran diameter folikel sekunder menunjukkan P3 dan P0 menunjukkan perbedaan yang nyata terhadap P1 dan P2.

Diameter Folikel Antral

Tabel 2. Rerata dan simpangan baku ukuran diameter folikel primordial, folikel

primer dan folikel sekunder setelah pemberian ekstrak buah merah

Perlakuan	Ukuran diameter folikel tersier (dalam μm) (Rata – rata ± SD)
P0	27,05 ^{ab} ± 3,25
P1	25,20 ^a ± 2,04
P2	27,61 ^{ab} ± 2,71
P3	29,01 ^b ± 3,15

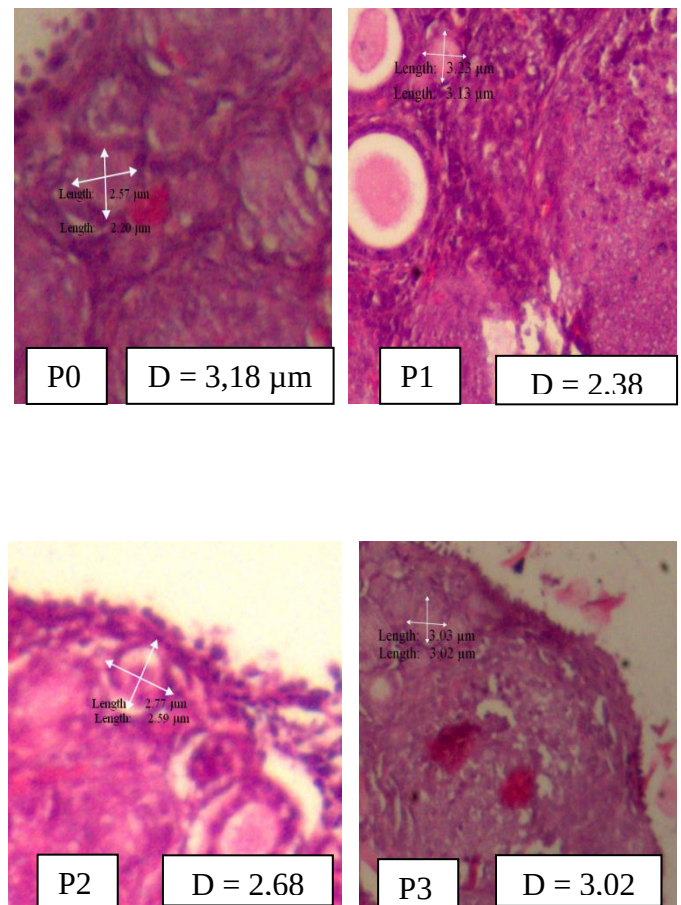
Dari hasil analisis tersebut menunjukkan terdapat beda nyata antara kelompok P1 dengan P3 sedangkan P2 tidak menunjukkan beda nyata terhadap P1 maupun P3.

Hewan model yang digunakan dalam penelitian ini dibuat dengan melakukan penyuntikan hormon testosteron propionate selama 14 hari pada mencit betina. Pada pembuatan model mencit pada penelitian ini

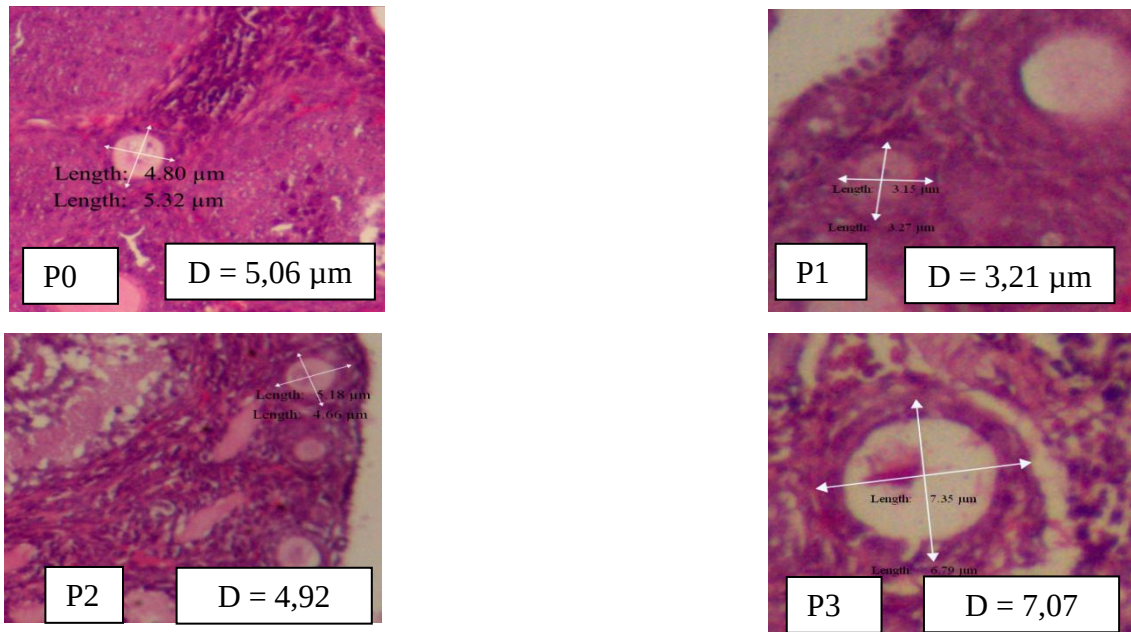
akan menyebabkan terjadi gangguan umpan balik dengan kadar estrogen yang selalu tinggi sehingga tidak pernah terjadi kenaikan kadar *Folicle Stimulating Hormon* (FSH) yang cukup adekuat. Kenaikan *Luteinizing Hormon* (LH) merangsang sintesa androgen sedangkan peningkatan kadar androstenedion diperifer diubah menjadi estron, kenaikan kadar tetosteron akan menekan sekresi *seks hormone binding globulin* (SHBG) oleh liver sehingga kadar testosterone dan estradiol bebas meningkat. Kenaikan kadar estron dan estradiol akan memberi umpan balik positif terhadap LH sehingga kadar LH lebih meningkat lagi. Sedangkan FSH tetap rendah tetapi masih terjadi pertumbuhan folikel sampai stadium antral dengan penampang kurang lebih 8 mm. terjadilah penumpukan folikel kecil berjajar di tepi ovarium tetapi tidak membesar apalagi ovulasi. (Speroffl and Frizt MA, 2005). Dengan demikian pada perlakuan P1 menunjukkan ukuran diameter folikel preantral dan antral paling kecil (Tabel 1 dan Tabel 2) dibandingkan P0, P2 dan P3.

Vitamin E dikenal sebagai *Anti Sterility Vitamine* yang berpengaruh terhadap kesuburan. Vitamin E yang diberikan pada ternak dapat memperbaiki birahi dan ovulasi serta angka kebuntingan. (Hariadi dkk., 2011). Vitamin E berperan dalam mekanisme penghambatan produksi nitric oxide saat proses produksi estrogen dari sel granulosa sehingga aktivitas folikulogenesis dan ovulasi dapat berlangsung (Dunnam *et al.*, 1999). El Shahat dan Monem (2011) mengemukakan

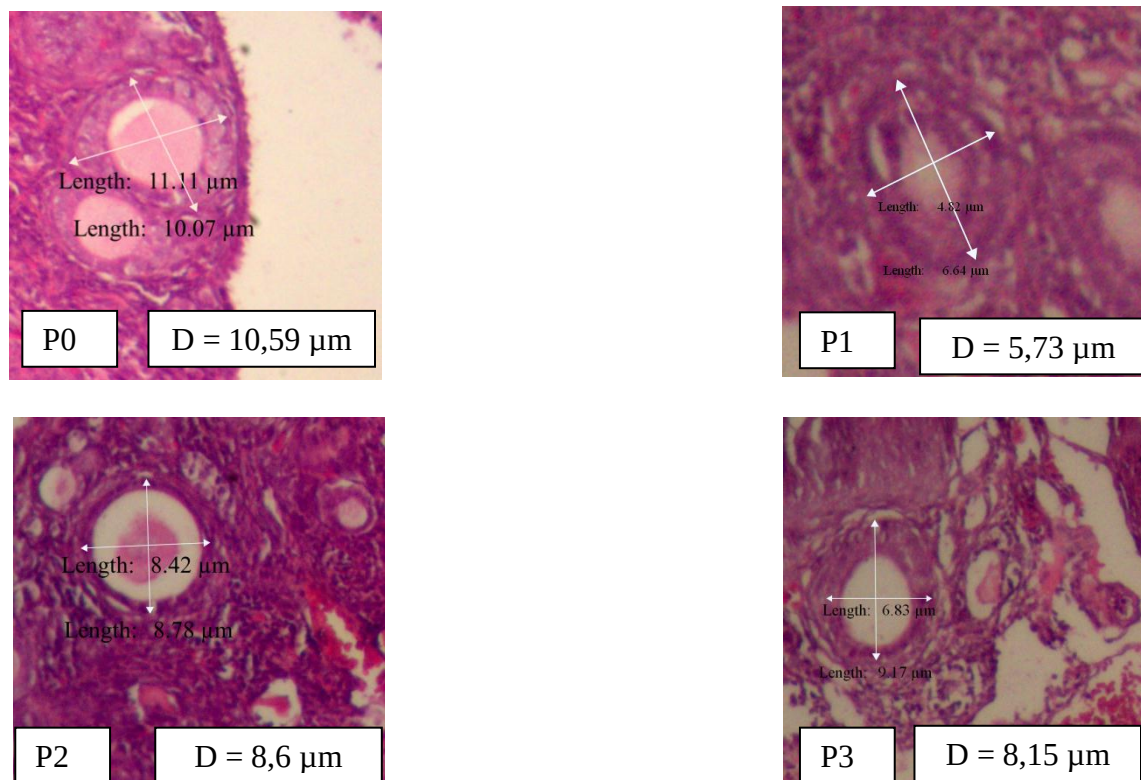
bahwa vitamin E mempengaruhi kecepatan waktu timbulnya estrus dan meningkatkan kejadian konsepsi, karena vitamin E merupakan antioksidan yang menstimulasi proses steroidogenesis dan merangsang kelenjar pituitari anterior untuk mensekresikan hormon steroid serta menginisiasi kejadian folikulogenesis pada ovarium.



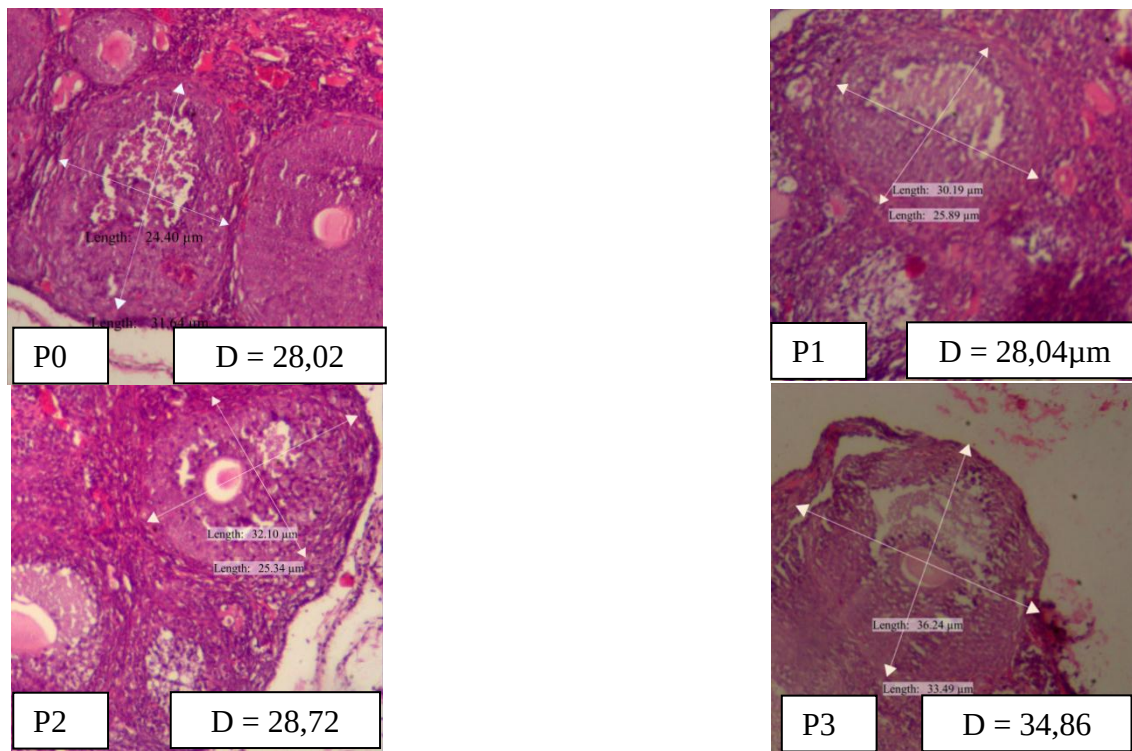
Gambar 1. Gambaran Histopatologi Folikel Primordial Ovarium (Pewarnaan H.E: perbesaran 100x : Mikroskop Olympus CX-4



Gambar 2. Gambaran Histopatologi Folikel Primer Ovarium (Pewarnaan H.E: perbesaran 100x : Mikroskop Olympus CX-41)



Gambar 3. Gambaran Histopatologi Folikel Sekunder Ovarium (Pewarnaan H.E: perbesaran 100x : Mikroskop Olympus CX-41)



Gambar 4. Gambaran Histopatologi Folikel tersier Ovarium (Pewarnaan H.E: perbesaran 100x : Mikroskop Olympus CX-41)

Kesimpulan

Berdasarkan penelitian dan pembahasan hasil yang telah dilakukan didapatkan kesimpulan bahwa pemberian ekstrak buah merah (*Pandanus conoideus* Lam) dengan dosis 0,1 ml dapat meningkatkan ukuran diameter folikel pre antral dan antral mencit (*Mus musculus*) model infertilitas.

Daftar Pustaka

- R. Belooseky, R. Gold, B. Almog, A.L Bracha, and I. Eldor. 2004. Induction of polycystic ovary by testosterone in immature female rats modulation of apoptosis and attenuation of glucose/insulin ratio. *International J. Mol. Med.* 14 : 207–15.
- I. M. Budi dan R.P. Paimin. 2005. Buah Merah. Jakarta : Penebar Swadaya.
- R. C. Dunnam, M. J. Hill, D. M. Lawson, and J. C. Dunbar. 1999. Ovarian Hormone Secretory Response to Gonadotropin and Nitric Oxide Following Chronic Nitric Oxide Deficiency in Rat. *Biology of Reproduction.* 60 : 959-963.
- K. El-Shahat and U.M.A. Monem. 2011. Effect of Dietary Supplementation with Vitamin E and/or Selenium on Metabolic and Reproductive Performance of Egyptian Baladi Ewes Under Subtropical Conditions. *World Applied Sciences Journal.* 12(9) : 1492- 1499.
- M. Hariadi, S. Hardjopranyoto, Wurlina, A. H. Herry, B. Utomo, Rimayanti, I. T. Norma dan H. Ratnani. 2011. Ilmu Kemajiran Pada Ternak. Surabaya : Airlangga University Press.
- R. S. Kusningrum. 2012. Perancangan Percobaan. Surabaya : Pusat

- Penerbitan dan Percetakan Unair (AUP). 15.
- L. Lazar. 2012. The Role of Oxidative Stress in Female Reproduction and Pregnancy. Intech, [cited 2013 Des.15]. Available at: <http://ccf.org/reproductiveresearchcenter/docs/agradoc217.pdf>
- J. Lintig and K. Vogt. 2004. Vitamin A formation in animals Molecular identification and fuctional characterization of carotene cleaving enymes. J. Nutr. 134 : 251S-256S.
- L. Maslachah, M. Sukmanadi dan R. Sugiharti. 2004. Pengaruh pemberian antisterilitas alpha tocopherol terhadap spermatogenesis tikus yang menerima stresor. J. Pen. Med. Eks. 5: 258-269
- A. Milczarek . 2005. Vitamin E Disease Mechanism IV. Free Radical Damage an Antioxidant Drug.
- B. Santoso dan Irawan. 2007. Prevalensi Sindoma Ovarium Polikistik Wanita Usia Reproduksi di Surabaya (Laporan akhir Risbin Iptekdok 2007/dibacakan pada PIT XVIII – Balikpapan 2008)
- L. Speroff and M.A. Frizt. 2005. Anovulation and polycystic ovary In: Clinical Gynecologic Endocrinology And Infertility. Ed 7th. Lippincott Wiliam and Wilkins Philadelphia. 465-498.