

**KINERJA PASAK BUMI (*Eurycoma longifolia* Jack)
DALAM PENINGKATAN KUALITAS REPRODUKSI
TIKUS (*Rattus norvegicus*) JANTAN**

HURIP PRATOMO

UNIVERSITAS TERBUKA



**SEKOLAH PASCASARJANA
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2012**

PERNYATAAN MENGENAI DISERTASI DAN SUMBER INFORMASI

Dengan ini saya menyatakan bahwa disertasi Kinerja Pasak Bumi (*Eurycoma longifolia* Jack) dalam Peningkatan Kualitas Reproduksi Tikus (*Rattus norvegicus*) Jantan adalah karya saya dengan arahan komisi pembimbing dan belum diajukan dalam bentuk apa pun kepada perguruan tinggi mana pun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka di bagian akhir disertasi ini.

Bogor, November 2011

Hurip Pratomo
NRP B061050011

UNIVERSITAS TERBUKA

ABSTRACT

HURIP PRATOMO. Mechanism of Pasak Bumi (*Eurycoma longifolia* Jack) in Improving the Quality of Male Rat (*Rattus norvegicus*) Reproduction Under the Direction of **IMANSUPRIATNA, ADI WINARTO, and WASMEN MANALU.**

Pasak bumi is popular in the traditional medical herb that is believed can increase the secondary reproduction characters such as: 1. libido and 2. the duration of erection. Here a reported the research that focus on: 1. sexual behavior of the male white rat treated by pasak bumi. and the better dose of pasak bumi that indicated highest libido. 2. mechanism of pasak bumi in the hypophysis cells that produce reproduction hormones including: acidophile and basophile cells distribution, the response of luteinizing hormone (LH) cells and the response of follicle stimulating hormone (FSH) cells. 3. The works of pasak bumi in the production of testosterone 4. The works of pasak bumi in the development stage of spermatogenesis in the seminiferous tubule. 5. The works of pasak bumi in the quality of semen in cauda epididymis including profile of cauda epididymis ductus diameter, some parameters of macroscopical and microscopical semen quality. Research carried out in five experiments; experiment 1 using the designed cage to observe the male white rat behavior seduced by female oestrus in separating wire net. Then, the male white rat administered orally by various doses of pasak bumi to find out the best dose. Experiment 2, using HE staining method to study micromorphological distribution of the acidophile and basophile cells in hypophysis, and using immunohistochemical staining method to study the response of LH cells of the male rat hypophysis treated by pasak bumi, also using immunohistochemical staining method to study the response of FSH cells. Experiment 3. using the RIA method to measure testosterone level in blood serum. Experiment 4. using HE staining method to study micromorphological of the profile of spermatogenesis stage in the seminiferous tubule. Experiment 5. using HE staining method to study micromorphological of the diameter of cauda epididymis, also doing macroscopical and microscopical semen quality in the cauda epididymis. Result of the research showed that: 1. Sexual behavior that reflected the male white rat libido were: a. face to face meeting, b. moving close to wire net partition, c. scratching the wire net partition. 2. The optimal dose of pasak bumi resulted highest libido was 18 mg/200 g bw (body weight) compared with 100 mg/200 g bw, 200 mg/200 g bw, and the control (1 ml aquadest). 3. Basophyle cells increased significantly in the third day of pasak bumi administration; LH cells strongly significantly response to produce LH hormone within cells in the third day; FSH cells weakly response (non significantly) to produce FSH hormone within cells in the third day. 4. The level of testosterone in plasma increased significantly in the third day of pasak bumi administration. 5. The last spermatid actively increased in the third day. 6. The quality of semen in the cauda of epididymis increased significantly in the third day of pasak bumi administration.

Keywords: pasak bumi, libido, LH cells, FSH cells, testosterone, semen quality.

RINGKASAN

HURIP PRATOMO. Kinerja Pasak Bumi (*Eurycoma longifolia* Jack) dalam Peningkatan Kualitas Reproduksi Tikus (*Rattus norvegicus*) Jantan Dibimbing oleh IMAN SUPRIATNA, ADI WINARTO, dan WASMEN MANALU.

Pasak bumi sudah lama dikenal masyarakat sebagai obat tradisional untuk afrodisiaka. Seduhan serbuk akar pasak bumi dengan air jika diminum beberapa kali dipercaya dapat meningkatkan libido, ketahanan ereksi pria, dan memulihkan kesegaran tubuh. Serbuk akar pasak bumi seberat 1 g dengan air seduhan 100 ml diminum pria dewasa sekali setiap hari selama tiga hari dipercaya oleh masyarakat tradisional dapat meningkatkan libido dan nafsu makan. Diketahui dari penelitian bahwa pasak bumi membangkitkan libido tikus jantan tua berumur 24 bulan yang lemah daya seksual dengan pemberian minum fraksi air pasak bumi dua kali sehari selama 10 hari dengan dosis 100 mg/200 g bobot badan (bb). Walaupun demikian informasi/data dari kerja pasak bumi yang berkaitan dengan fungsinya sebagai afrodisiaka masih sangat sedikit. Dengan demikian, perlu dilakukan penelitian untuk mengungkap kinerja pasak bumi (*Eurycoma longifolia* Jack) pada beberapa aspek terkait fungsinya dalam fisiologi reproduksi jantan yang dapat menjadi model dalam memahami alur kerja pasak bumi pada manusia.

Tujuan penelitian adalah menentukan kerja pasak bumi pada: 1. Tingkah laku libido tikus putih jantan pada kandang pengamatan yang meliputi: 1). indikator tingkah laku libido, dan 2) dosis terbaik diantara dosis yang telah ada; 2. Aktivitas sel hipofisis yang meliputi: 1). sebaran sel-sel asidofil dan basofil pada hipofisis, 2). perubahan aktivitas sel-sel penghasil hormon *follicle stimulating hormone* (FSH), dan 3) perubahan aktivitas sel-sel penghasil *luteinizing hormone* (LH); 3. Konsentrasi hormon testosteron dalam darah; 4. Perkembangan tahapan spermatogenesis di dalam tubuli seminiferi; 5. Perubahan diameter kauda epididimis dan kualitas semen di dalam kauda epididimis yang meliputi: 1). perubahan diameter kauda epididimis, 2) kualitas semen secara makroskopis (evaluasi makroskopis), dan 3). kualitas semen secara mikroskopis (evaluasi mikroskopis).

Metode penelitian untuk menentukan kerja pasak bumi dilakukan dalam lima tahap sebagai berikut: 1. Penentuan tingkah laku libidodan dosis terbaik melalui pengamatan individual tikus jantan yang digoda tikus betina estrus di dalam kandang bersekat jaring kawat selama 10 menit. Hewan coba menggunakan tikus putih jantan dewasa *Rattus norvegicus* strain Sprague Dawley berumur 3 ½ bulan dan tikus betina untuk penggoda berumur 3 ½ bulan. Metode untuk menentukan dosis terpilih dilakukan dengan membandingkan frekuensi tertinggi yang mencerminkan tingkah laku libido diantara empat kelompok perlakuan dosis. Kelompok 1 dosis seduhan serbuk pasak bumi 18 mg/200g bb tikus, kelompok 2 dosis seduhan 100 mg/200 g bb dalam 1 ml aquades, kelompok 3 dosis seduhan 200 mg/200 g bb dalam 1 ml aquades, sebagai kontrol kelompok 4 dengan pemberian 1 ml aquades. Perlakuan pemberian per oral pasak bumi pada hari ke-1, 2, dan 3. Dosis optimal terbaik digunakan untuk penelitian tahap

lanjutan. 2. Metode untuk menentukan kerja pasak bumi pada aktivitas sel hipofisis dilakukan dengan pendekatan histologi dan imunohistokimia menggunakan teknik pewarnaan hematoksilin eosin (HE), pewarnaan imunohistokimia anti-antibodi hormon FSH, pewarnaan imunohistokimia anti-antibodi hormon LH; 3. Penentuan taraf konsentrasi testosteron di dalam darah menggunakan metode *radioimmunoassay* (RIA); 4. Pengukuran kerja pasak bumi pada perkembangan tahap spermatogenesis di dalam tubuli seminiferi dilakukan dengan pendekatan teknik pewarnaan HE pada beberapa tingkat perkembangan sel-sel spermatozoa; 5. Pengukuran diameter saluran-saluran dalam kauda epididimis dilakukan dengan pendekatan histologi menggunakan pewarnaan HE, evaluasi kualitas semen kauda epididimis dilakukan secara makroskopis (evaluasi makroskopis) dan mikroskopis (evaluasi mikroskopis).

Temuan hasil penelitian sebagai berikut: 1. Terdapat 15 tingkah laku libidotikus selama 10 menit dalam kandang pengamatan kelompok kontrol tanpa perlakuan pasak bumi dan dengan betina estrus. Tingkah laku tersebut adalah: mendekati sekat/betina, berdiri bertumpu dengan kaki belakang, berputar, mengendus sekeliling, mengusap muka dengan kaki depan, mengais/ menggigit sekat betina, bertemu muka/hadapan muka, mengendus-endus atas, mengais/mendorong sekam, menggaruk muka dengan kaki belakang, diam di pojok, menjilat kaki depan, menjilat kaki belakang, menjilat pangkal ekor, dan makan sekam. Tiga tingkah laku utama yang mencerminkan libido yaitu: mendekat betina, mengais/ menggigit sekat betina, dan bertemu muka/ hadapan muka. Analisis membandingkan perlakuan dosis kelompok 1, 2, 3, dan 4 menemukan bahwa dosis yang meningkatkan libido secara nyata ditimbulkan oleh pemberian minum akar pasak bumi dosis seduhan 1 sebesar 18 mg/200g bb (=90 mg/kg bb) pada hari ke-1 sampai dengan hari ke-3; 2. Hasil penentuan kerja pasak bumi pada aktivitas sel hipofisis menemukan yaitu: 1) sel-sel basofil meningkat aktivitasnya secara nyata pada hari ke-3 pemberian pasak bumi dibanding kontrol hari ke-1 dan 3 serta pemberian pasak bumi hari ke-1, 2) pemberian pasak bumi menjadi trigger sel hormonal LH yang meningkat aktivitasnya secara nyata pada hari ke-3 dibanding kontrol hari ke-1 dan 3 serta pemberian pasak bumi hari ke-1, 3) aktivitas sel-sel hormonal FSH dengan pemberian pasak bumi sampai hari ke-3 tidak berbeda nyata dengan kontrol hari ke-3; 3. Pengukuran kerja pasak bumi pada produksi testosteron serum darah memperoleh temuan bahwa kadar testosteron diproduksi lebih tinggi secara nyata setelah pemberian pasak bumi hari ke-3 (9,73 ng/ml) dibanding hari ke 1 (4,00 ng/ml) dan kontrol hari ke-1 (0,5 ng/ml) dan hari ke-3 (2,46 ng/ml); 4. Penentuan kerja pasak bumi pada tahapan spermatogenesis dalam tubuli seminiferi menemukan bahwa proses pembentukan spermatid akhir meningkat secara nyata pada hari ke-3 dibanding tahap sel sperma lainnya pada hari ke-1 dan kontrol hari ke-1 dan 3; 5. Pengukuran diameter kauda epididimis dan kualitas semen memperoleh temuan bahwa: 1) diameter saluran-saluran kauda epididimis tidak berbeda nyata secara statistik pada hari ke-3 pemberian pasak bumi dibanding hari ke-1 dan kontrol, 2) evaluasi makroskopis menunjukkan pH semen tidak berbeda nyata sampai hari ke-3 perlakuan pasak bumi. Warna semen putih susu sampai hari ke-3 perlakuan pasak bumi dibanding hari ke-1 dan kontrol, konsistensi semen kental tidak berbeda nyata sampai hari ke-3 bumi dibanding hari ke-1 dan kontrol. 3) evaluasi mikroskopik memperoleh: persentase motilitas spermatozoa

tidak berbeda nyata setelah pemberian pasak bumi hari ke-3 dibanding hari ke-1 dan kontrol, konsentrasi spermatozoa (juta/ml) meningkat secara nyata setelah pemberian pasak bumi hari ke-3 dibanding kontrol hari ke-1 dan 3, persentase hidup spermatozoa meningkat nyata setelah pemberian pasak bumi hari ke-3 dibanding kontrol, persentase abnormalitas spermatozoa menurun jumlahnya secara nyata setelah pemberian pasak bumi hari ke-3 dan hari ke-1 dibanding kontrol. Secara keseluruhan dari semua tahapan penelitian yang telah dilakukan menjelaskan bahwa kerja pasak bumi dengan dosis seduhan 18 mg/200g bb meningkatkan kualitas libido dan organ-organ yang berfungsi dalam reproduksi jantan secara nyata pada hari ke-3 dibanding kontrol hari ke-1 dan 3.

Kata kunci: pasak bumi, libido, sel-sel LH, sel-sel FSH, testosteron, kualitas semen.

UNIVERSITAS TERBUKA

© Hak Cipta Milik Institut Pertanian Bogor, tahun 2012
Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan atau menyebutkan sumbernya. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik, atau tinjauan suatu masalah; dan pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis dalam bentuk apa pun tanpa izin IPB

**KINERJA PASAK BUMI (*Eurycoma longifolia* Jack) DALAM
PENINGKATAN KUALITAS REPRODUKSI
TIKUS (*Rattus norvegicus*) JANTAN**

HURIP PRATOMO

Disertasi
sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Doktor pada
Program Studi/Mayor Biologi Reproduksi

**SEKOLAH PASCASARJANA
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2012**

UNIVERSITAS TERBUKA

Penguji Luar pada Ujian Tertutup : 1. Dr. dra. R. Iis Arifiantini, M.Si.
2. Dr. dra. Ietje Wientarsih, Apt. M.Sc.

Penguji Luar pada Ujian Terbuka : 1. drh. Yulvian Sani, Ph.D.
2. Dr. drh. H. Bambang Purwantara, M.Sc.

Judul Disertasi : Kinerja Pasak Bumi (*Eurycoma longifolia* Jack) dalam Peningkatan Kualitas Reproduksi Tikus (*Rattus norvegicus*) Jantan
Nama : Hurip Pratomo
NRP : B061050011
Program studi : Biologi Reproduksi (BRP)

Disetujui

Komisi Pembimbing

Prof. Dr. drh. Iman Supriatna

Ketua

drh. Adi Winarto Ph.D

Anggota

Prof. Dr. Ir. Wasmen Manalu

Anggota

Diketahui

Ketua Program Studi/Mayor
Biologi Reproduksi

Dekan Sekolah Pascasarjana
IPB

Dr. drh. M. Agus Setiadi

Dr. Ir. Dahrul Syah, M.Sc. Agr.

Tanggal Ujian : 5 Januari 2012

Tanggal Lulus :

PRAKATA

Alhamdulillah, segala puji dan syukur tak terhingga penulis haturkan kehadirat Allah SWT yang maha pengasih dan penyayang sehingga penelitian dapat diselesaikan. Apalah artinya manusia yang tak mempunyai daya upaya kecuali daya upaya dari Allah yang maha kuasa. Tema yang dipilih dalam penelitian ini adalah peningkatan kualitas reproduksi jantan, dengan judul Kinerja Pasak Bumi (*Eurycoma longifolia* Jack) dalam Peningkatan Kualitas Reproduksi Tikus (*Rattus norvegicus*) Jantan.

Terima kasih yang besar penulis ucapkan kepada Prof. Dr. drh. Iman Supriatna, drh. Adi Winarto Ph.D., Prof. Dr. Ir. Wasmen Manalu atas segala saran, masukan, dan bantuan kemudahan fasilitas laboratorium di lingkungan FKH IPB sehingga penelitian dan penulisan disertasi ini dapat terlaksana dengan baik. Terima kasih juga penulis haturkan kepada para teknisi/laboran di lingkungan FKH IPB saudara Iwan, Maman, Soleh, Bondan, mahasiswa tingkat akhir 2010 FKH IPB Alimansyah, Ridi Arif dan Tamy, kakak dan adik tingkat di Program Studi BRP Pascasarjana IPB, serta teman sejawat di Program Studi S-1 Biologi dan FMIPA UT.

Terima kasih sebesar-besarnya kepada Ibunda dan Ayahanda tercinta: almarhumah Hj. Werdiyati dan almarhum H. Hendro Prayitno (Purn TNI dan Veteran RI) yang selama hidupnya tidak terhitung jasanya kepada penulis. Terima kasih juga kepada istri: Evy Sylvia dan anak-anak: Fauzan, Hibban, Hasnan, dan adik-adik penulis: Hugeng, Heni, Ira, Ida, Handayani, dan paman: H. Sudibjo Soepardi yang telah mendukung penuh keikhlasan untuk kelangsungan studi dan penyelesaiannya.

Terima kasih kepada pihak berwenang di Kementrian Pendidikan Nasional yang telah membantu dana melalui Hibah Bersaing tahun 2009 dan beasiswa BPPS Dikti (tahun 2005-2008). Serta terima kasih kepada Dekan FKH IPB dan wakilnya, para penguji luar komisi pada sidang tertutup dan sidang terbuka, dan semua pihak yang tidak bisa disebutkan satu persatu yang telah membantu studi S-3 penulis, penelitian, dan penulisan disertasi hingga selesai.

Semoga Allah SWT yang maha luas kasih sayangNya membalas semua kebaikan itu dengan keberkahan, keselamatan, dan kebaikan-kebaikan yang berlipat ganda. Serta hasil penelitian ini bisa berguna bagi yang memerlukannya, Amin.

Bogor, 4 Januari 2012

Hurip Pratomo

RIWAYAT HIDUP

Penulis adalah anak pertama dari enam bersaudara dari pasangan H. Hendro Prayitno (Alm.Purn.TNI, Veteran Pejuang RI) dan Hj. Werdiyati (Almh). Penulis dilahirkan di Jakarta pada tanggal 26 Juli 1961. Pendidikan sarjana muda biologi ditempuh pada Fakultas Biologi, Universitas Nasional (UNAS, disamakan) Jakarta tamat tahun 1985, dilanjutkan dengan sarjana biologi pada Fakultas Biologi, UNAS (disamakan) tamat tahun 1987. Program Pascasarjana IPB pada Program Studi Biologi jenjang S-2 ditamatkan penulis pada tahun 1997 dengan bantuan beasiswa TMPD Dikti 1995. Selanjutnya penulis meneruskan studi pada jenjang S-3 di Program Studi Biologi Reproduksi (BRP) IPB pada bulan September tahun 2005 dengan bantuan beasiswa BPPS Dikti Kemendiknas.

Penulis diterima sebagai dosen pada Jurusan Biologi, FMIPA, UT sejak tahun 1988, dan menjadi PNS tahun 1989. Sebelum itu penulis aktif dalam *Biological Science Club* (BScC) UNAS tahun 1984-1986, Ketua INSECTA di bawah organisasi BScC tahun 1985-1986. Asisten dosen Praktikum pada Fakultas Biologi, UNAS tahun 1985-1987. Guru Biologi SMA Sampaghita tahun 1986-1988 di Jl. Abdul Rahman Saleh Jakarta. Penulis pernah menjadi Ketua Program Studi S-1 Biologi FMIPA UT, tahun 2000 sampai dengan tahun 2004. Penulis pernah menjadi dosen tidak tetap pada FIKES UHAMKA di Jl. Limau V Radio Dalam - Jakarta, dengan ketua tim Prof.Dr. Nana Suhana (Alm., Gurubesar FKUI), tahun 2000 sampai 2003. Juga pernah menjadi dosen tidak tetap pada STIKES Kesosi Jakarta dan Akbid Primahusada Bogor tahun 2006-2007.

Selama menempuh program pendidikan jenjang S-3 (dokter), penulis telah menyajikan karya ilmiah yang berjudul: Kemungkinan Mekanisme Pasak Bumi Pada Tubuh, pada Seminar Nasional FMIPA UT Tahun 2009. Menulis artikel ilmiah yang akan dimuat pada Jurnal Matematik Sains dan Teknologi volume 12 nomor 2, 2012 berjudul: Perubahan Sebaran Sel-Sel Asidofil dan Basofil Hipofisis Pengaruh Pemberian Pasak Bumi (*Eurycoma longifolia* Jack). Penulis juga menulis artikel ilmiah yang akan dimuat pada Jurnal Kefarmasian Indonesia volume 2 nomor 2 Tahun 2012 berjudul: Tingkat Aktivitas Sel

Endoktrin Penghasil *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) Terkait Pemberian Pasak Bumi (*Eurycoma longifolia* Jack). Di samping itu, penulis pernah menulis bahan ajar: Praktikum Taksonomi Avetebrata untuk mahasiswa program studi S-1 Biologi UT tahun 2004, dan Taksonomi Vertebrata pada tahun 2010.

UNIVERSITAS TERBUKA

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR GAMBAR	xvii
DAFTAR LAMPIRAN	xviii
PENDAHULUAN	1
Latar Belakang	1
Tujuan Penelitian.....	3
Kerangka Pemikiran	3
Manfaat Penelitian.....	4
TINJAUAN PUSTAKA.....	5
Feromon pada Hewan.....	5
Afrodisiaka untuk Manusia dan Efek Kerjanya	5
Tumbuhan Pasak Bumi	8
Khasiat Pasak Bumi pada Reproduksi Hewan Coba.....	9
Kandungan Kimia Pasak Bumi	12
Tikus Putih <i>Rattus norvegicus</i> Strain Sprague Dawley	13
Morfologi Hipofisis Anterior dan Hormon yang Dihasilkan.....	15
Pengendalian Hormon Reproduksi Terhadap Spermatogenesis	17
Testosteron	20
Struktur Morfologi Testis	22
Semen	25
Tingkah Laku Libido (<i>Sexual behaviour</i>) Tikus Jantan	28
PENINGKATAN LIBIDO DAN DOSIS EFEKTIF PEMBERIAN PASAK BUMI SEBAGAI AFRODISIAKA PADA TIKUS PUTIH JANTAN	30
Abstrak	30
Pendahuluan.....	31
Bahan dan Metode	32
Hasil dan Pembahasan.....	38
Kesimpulan	44
Daftar Pustaka.....	44
TINGKAT AKTIVITAS SEL HIPOFISIS PRODUSEN HORMON- HORMON REPRODUKSI SETELAH PEMBERIAN PASAK BUMI.....	47
Abstrak.....	47
Pendahuluan.....	48
Bahan dan Metode.....	49
Hasil dan Pembahasan	56
Kesimpulan	65
Daftar Pustaka.....	66

PENINGKATAN KADAR TESTOSTERON SERUM SETELAH PEMBERIAN SEDUHAN PASAK BUMI	68
Abstrak	68
Pendahuluan	69
Bahan dan Metode	70
Hasil dan Pembahasan	72
Kesimpulan	77
Daftar Pustaka.....	78
KERJA PASAK BUMI PADA SPERMATOGENESIS DALAM TUBULI SEMINIFERI	80
Abstrak	80
Pendahuluan	81
Bahan dan Metode	82
Hasil dan Pembahasan	85
Kesimpulan	88
Daftar Pustaka.....	89
KINERJA PASAK BUMI PADA DIAMETER DAN KUALITAS SEMEN DALAM KAUDA EPIDIDIMIS	90
Abstrak	90
Pendahuluan	91
Bahan dan Metode	92
Hasil dan Pembahasan	97
Kesimpulan	109
Daftar Pustaka.....	110
PEMBAHASAN UMUM	112
KESIMPULAN UMUM.....	117
SARAN	118
DAFTAR PUSTAKA.....	119
LAMPIRAN.....	126

DAFTAR TABEL

	Halaman
1. Kadar FSH, LH, dan testosteron dalam serum darah menurut umur tikus jantan Sprague Dawley	20
2. Pengaruh dosis seduhan pasak bumi pada tingkah laku tikus jantan yang menonjol pada hari ke-1, 2, dan 3	40
3. Rancangan ketika pengambilan sampel jaringan.....	50
4. Rancangan ketika pengambilan sampel sel FSH hipofisis	52
5. Rancangan ketika pengambilan sampel sel LH hipofisis	54
6. Distribusi sel-sel asidofil dan basofil pada hipofisis setelah perlakuan pasak bumi dan kontrol aquades pada hari ke-1 sampai ke-3	56
7. Jumlah sel penghasil LH pada hipofisis setelah perlakuan kontrol aquades dan pasak bumi pada hari ke-1 sampai hari ke-3	59
8. Jumlah sel penghasil FSH pada hipofisis setelah perlakuan kontrol aquades dan pasak bumi pada hari ke-1 sampai hari ke-3	63
9. Rancangan kegiatan untuk analisis kadar testosteron.....	70
10. Kadar hormon testosteron serum setelah perlakuan kontrol/ aquades dan pasak bumi pada hari ke-1 sampai hari ke-3	73
11. Rancangan kegiatan untuk analisis tahap spermatogenesis	82
12. Jumlah sel-sel tahapan spermatogenesis setelah perlakuan kontrol/ aquades dan pasak bumi pada hari ke-1 sampai hari ke-3	85
13. Lama waktu proses spermatogenesis pada beberapa spesies	87
14. Rancangan kegiatan untuk analisis kinerja pasak bumi pada kauda epididimis	94
15. Diameter kauda epididimis setelah perlakuan pasak bumi	98
16. Kualitas semen pada kauda epididimis setelah perlakuan kontrol /aquades dan pasak bumi	100
17. Kualitas spermatozoa pada kauda epididimis secara mikroskopik setelah perlakuan kontrol dan pasak bumi pada hari ke-1 sampai hari ke-3	102

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
1. Tanaman muda pasak bumi	9
2. Akar tanaman pasak bumi	9
3. Tikus strain Sprague Dawley	13
4. Skema hubungan hipotalamus dan hipofisis	16
5. Skema jalur kerja hormon reproduksi jantan pada proses spermatogenesis	17
6. Ilustrasi tahapan proses spermatogenesis pada tubuli seminiferi	19
7. Testosteron	21
8. Ilustrasi potongan membujur testis	23
9. Skema kerja hormonal reproduksi pria/jantan	25
10. Spermatozoa tikus	27
11. Akar kering pasak bumi.	33
12. Gambaran mikroskopik serbuk pasak bumi	34
13. Tampilan sitologi fase estrus	36
14. Bertemu/hadapan muka	41
15. Struktur kimia euriokomanon beserta derivatnya	61
16. Potongan melintang saluran-saluran di dalam kauda epididimis	99

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
1. Grafik rerata frekuensi jantan bertemu muka dan mendekati sekat betina pada hari ke-1, 2, 3	128
2. Sebaran sel asidofil dan basofil hipofisis	129
3. Grafik distribusi jumlah sel asidofil dan basofil pada hipofisis setelah perlakuan kontrol dan pasak bumi pada hari ke-1 dan ke-3	129
4. Grafik rerata jumlah sel penghasil LH pada hipofisis anterior setelah perlakuan kontrol dan pasak bumi pada hari ke-1 dan ke-3	130
5. Sebaran sel penghasil hormon LH pada hipofisis anterior A. kontrol hari ke-3 dan B. perlakuan pasak bumi pada hari ke 3	130
6. Grafik rerata jumlah sel penghasil FSH pada hipofisis anterior setelah perlakuan kontrol dan pasak bumi pada hari ke-1 dan ke-3	131
7. Sebaran sel penghasil hormon FSH pada hipofisis anterior A. kontrol hari ke-3 dan B. perlakuan pasak bumi sampai hari ke-3	131
8. Perkembangan tahapan spermatogenesis dalam tubuli seminiferi testis pada kontrol hari ke-3	132
9. Perkembangan tahapan spermatogenesis dalam tubuli seminiferi testis pada kontrol hari ke-3	132

PENDAHULUAN

Latar Belakang

Perdagangan sediaan bahan tanaman obat atau disebut simplisia obat herbal di dunia semakin penting. Sebagai contoh di Amerika Serikat telah diformulasikan obat herbal sejumlah 45 macam. Dari sejumlah 45 macam obat herbal yang diperdagangkan tersebut, 14 spesies berasal dari Indonesia (Sampoerno 2003). Perdagangan obat herbal di Asia membutuhkan simplisia tanaman obat dalam jumlah banyak, mengingat jumlah penduduk Asia yang lebih dari tiga milyar orang. Peluang perdagangan obat herbal yang besar sudah dimanfaatkan oleh Cina yang merupakan pusat produksi obat herbal terbesar di Asia dan mampu menghasilkan devisa untuk Asia sebesar enam milyar dolar AS pada tahun 1998 (Depkes 2003). Walaupun demikian untuk nilai ekspor tanaman obat dan olahannya pada tahun 2003 Indonesia meraih 35 juta dolar AS. Nilai perolehan itu masih sedikit dibandingkan nilai ekspor yang diperoleh Cina pada tahun 2002, yaitu sekitar 250 juta dolar AS (Menteri Pertanian RI 2004).

Penderita gangguan ereksi pada tahun 2001 tercatat sekitar 1000 – 2000 pria yang datang ke RSCM untuk berobat. Jumlah tersebut mungkin lebih banyak lagi karena sebagian pria malu untuk berkonsultasi ke dokter (Sampoerno 2003). Sementara itu afrodisiaka yang berasal dari Indonesia dan cukup lama dikenal masyarakat antara lain, yaitu pasak bumi (*Eurycoma longifolia* Jack).

Kata afrodisiaka berasal dari kata *Aphrodite*, yaitu nama dewi cinta seks dalam masyarakat Yunani kuno. Afrodisiaka adalah: suatu makanan, minuman, bagian tumbuhan, bagian hewan, obat, bau-bauan, atau bahan lain yang dapat menimbulkan atau meningkatkan secara nyata keinginan seksual (libido). Afrodisiaka juga meningkatkan potensi seks *coendi* yang antara lain meliputi kemampuan ereksi dan ejakulasi (Nordenberg 2000; Ningsih 2005).

Pasak bumi atau dengan nama lain tongkat Ali adalah tumbuhan famili Simaroubaceae, merupakan tumbuhan asli Indonesia dan Malaysia. Pohon pasak bumi ramping dapat mencapai tinggi 15 m, dengan daun tipe pinatus berderet menyirip teratur. Bunga pasak bumi adalah *dioecious*, bunga jantan dan betina berada pada pohon berbeda. Buah masak berwarna hijau gelap kemerahan (Kardono *et al.* 2003; Lemmens 2003).

Ekstrak pasak bumi dengan pelarut air didapati kandungan antara lain komponen fenol, tanin, polisakarida, glikoprotein, dan mukopolisakarida, juga di dalamnya termasuk eurikomanon dan longilakton (Ang & Lee 2002). Di samping itu, tiga jenis kuasinoid, yaitu eurikolakton A, B, dan C berhasil diisolasi dari akar pasak bumi (Ang *et al.* 2000), sedangkan dari batang dan kayu pasak bumi diperoleh kandungan yang sitotoksik terhadap sel karsinoma dalam percobaan, yaitu 11 dehidroklainenon, eurikomalakton, dan 5,6 dehidroeurikomalakton (Itokawa *et al.* 1992).

Wijayakusuma (1994) dan Kardono *et al.* (2003) menyatakan bahwa seduhan serbuk akar pasak bumi dengan air jika diminum beberapa kali dapat meningkatkan libido dan ketahanan ereksi pria. Kandungan kimia akar pasak bumi secara keseluruhan digunakan untuk memulihkan kemampuan ereksi dan kesegaran tubuh (Adimoelja 2000). Serbuk akar pasak bumi seberat 1 g dengan air seduhan 100 ml diminum pria dewasa sekali setiap hari selama tiga hari dapat meningkatkan libido dan nafsu makan. (Soedibyo 1998; Kardono *et al.* 2003; Biotech 2007).

Peranan pasak bumi dalam membangkitkan libido tikus jantan tua yang lemah daya seksual berumur 24 bulan dikaji oleh Ang *et al.* (2004). Pemberian minum dengan dosis 50 mg/100 g bobot badan (bb) fraksi air pasak bumi yang diberikan dua kali sehari selama 10 hari dilanjutkan pengamatan melalui tingkah laku menguap atau *yawning* dan meregangkan tubuh atau *stretching*. Gerakan *stretching* dan *yawning* dianggap suatu gerakan yang mencerminkan adanya timbul nafsu libido tikus tua. Diperoleh hasil bahwa pasak bumi berperan sebagai afrodisiaka pada tikus putih tua (Ang *et al.* 2004).

Walaupun demikian informasi/data dari kerja pasak bumi yang berkaitan dengan fungsinya sebagai afrodisiaka masih sangat sedikit. Dengan demikian perlu dilakukan penelitian untuk menjelaskan mekanisme kerja pasak bumi (*Eurycoma longifolia* Jack) pada beberapa aspek terkait fungsinya dalam fisiologi reproduksi jantan yang dapat menjadi model dalam memahami alur kerja pasak bumi pada manusia.

Tujuan Penelitian

Tujuan umum penelitian adalah untuk menentukan mekanisme kerja pasak bumi pada tingkah laku libido (libido=keinginan untuk melakukan kawin) dan kaitannya dengan aktivitas sel hipofisis anterior penghasil hormon reproduksi, serta proses lanjutannya pada jaringan terkait organ reproduksi primer, produksi hormon testosteron, dan kualitas semen kauda epididimis.

Tujuan khusus penelitian adalah untuk menjelaskan: 1. Kerja pasak bumi pada tingkah laku kelamin tikus putih jantan setelah pemberian pasak bumi pada kandang pengamatan yang meliputi: 1). indikator tingkah laku libido, dan 2) dosis terbaik di antara dosis yang telah ada. 2. Kinerja pasak bumi pada sel penghasil hormon-hormon reproduksi pada hipofisis yang meliputi: 1). sebaran sel-sel asidofil dan basofil pada hipofisis, 2). perubahan aktivitas sel-sel penghasil hormon FSH, 3) perubahan aktivitas sel-sel penghasil hormon LH. 3. Efek pasak bumi pada peningkatan produksi hormon testosteron. 4. Kerja pasak bumi pada perkembangan tahapan spermatogenesis di dalam tubuli seminiferi. 5. Efek pasak bumi pada perubahan diameter kauda epididimis dan kualitas semen yang meliputi: 1). perubahan diameter kauda epididimis, 2). kualitas semen secara makroskopis, dan 3). kualitas semen secara mikroskopis.

Kerangka Pemikiran

Pasak bumi selama ini dikenal atau diceriterakan masyarakat sebagai afrodisiaka dapat meningkatkan libido dan ketahanan ereksi. Beberapa penelitian memperoleh perbedaan waktu yang menimbulkan efek nyata karena pengaruh pasak bumi. Sementara itu, kerja pasak bumi yang terjadi pada peningkatan libido, respons sel hormonal hipofisis, dan kerjanya pada organ reproduksi primer belum jelas. Penelitian dilakukan untuk menjelaskan kerja dan efek pasak bumi pada beberapa permasalahan tersebut. Penelitian untuk mempelajari peningkatan libido dapat dilakukan dengan pengamatan tingkah laku libido tikus jantan pada kandang pengamatan. Peningkatan libido mempunyai keterkaitan dengan proses hormonal yang dikendalikan oleh hipofisis anterior. Dengan demikian, setelah menemukan tingkah laku libido dan kepastian fungsi afrodisiaka dari dosis pilihan di antara

dosisi yang telah dipublikasi, penelitian dilanjutkan ke bagian hipofisis di dasar otak. Pendekatan dilakukan dengan pewarnaan histologi kelenjar hipofisis. Pada bagian ini penelitian menganalisis sebaran dan identifikasi sel-sel asidofil dan basofil. Sel-sel basofil diketahui sebagai sel-sel produsen hormon LH dan FSH, sedangkan sel-sel asidofil menghasilkan hormon lain misalnya prolaktin. Sekiranya pada penelitian terdapat temuan sebaran sel-sel basofil yang signifikan maka akan didalami lebih lanjut dengan menganalisis sel-sel basofil penghasil hormon LH dan FSH yang diaktifkan oleh kerja pasak bumi. Dengan demikian, akan diperoleh kerja pasak bumi sebagai *trigger* hormon-hormon reproduksi pada hipofisis yang didekati dengan metode imunohistokimia. Selanjutnya diteliti jalur kerja pasak bumi pada tubuh, yaitu pada jalur hormonal sehingga dianalisis produksi hormon testosteron oleh sel-sel Leydig dalam testis yang disekresikan masuk peredaran darah, yang berlanjut pada pengamatan perkembangan tahapan spermatogenesis di dalam tubuli seminiferi serta pengkajian kauda epididimis dan kualitas semen/spermatozoa di dalamnya.

Hipotesis

Pasak bumi (*Eurycoma longifolia* Jack) sebagai afrodisiaka dapat meningkatkan: libido, kinerja sel-sel kelenjar hipofisis yang memproduksi hormon LH dan FSH, peningkatan hormon testosteron, kinerja testis, dan perubahan diameter kauda epididimis serta kualitas spermatozoa pada kauda epididimis.

Manfaat Penelitian

Hasil temuan akan menjadi salah satu konsep dasar dalam pengembangan ilmu pengetahuan dan teknologi biologi reproduksi, dan sebagai landasan penerapan dalam penelitian herbal lainnya. Di samping itu, pemahaman kerja pasak bumi pada tubuh akan meningkatkan kepercayaan pengguna tanaman obat herbal khususnya jamu afrodisiaka Indonesia. Dengan demikian, dalam aplikasinya nanti diharapkan dapat menjadi obat herbal alternatif untuk memperbaiki kualitas organ reproduksi primer dan sekunder.

TINJAUAN PUSTAKA

Feromon pada Hewan

Feromon alami dalam dunia hewan dapat berasal dari kelenjar sekresi bagian tubuh tertentu, misalnya vagina. Pada hewan tertentu, feromon diproduksi untuk memberitahukan atau memberi sinyal untuk menarik lawan jenis agar mendekat mengawininya. Kebanyakan feromon diproduksi oleh hewan betina, hanya beberapa yang diproduksi oleh hewan jantan. Sekresi feromon biasanya bersifat mudah menguap/volatil dan berdaya jangkau cukup luas sehingga mudah dikenali oleh indra penciuman hewan-hewan pasangannya (Singer *et al.* 1976; O. Connell *et al.* 1981).

Senyawa sekresi vaginal seperti *p-hidroksibenzoat* adalah salah satu komponen yang penting dari sejumlah sekresi vagina anjing dan berefek kuat untuk anjing jantan mengawini segera setelah membaui senyawa tersebut, demikian pula *vaginal fluids* pada tikus dan hamster yang sedang estrus. Tetapi ketika *p-hidroksibenzoat* tersebut diletakkan di lapangan terbuka dan tidak menempel pada genital anjing betina, maka tidak ada respons dari anjing jantan. Senyawa lain, yaitu *dimetil disulfida* yang disekresikan hamster betina, mempunyai daya tarik untuk hamster jantan mendekati tetapi tidak kuat untuk mendorong mengawini hamster betina. Diduga efek feromon bekerja dipengaruhi bukan oleh satu senyawa saja tetapi oleh gabungan senyawa sekresi genital betina (Singer *et al.* 1976; O. Connell *et al.* 1981; Johnson & Barry 1998).

Afrodisiaka untuk Manusia dan Efek Kerjanya

Bahan afrodisiaka alami untuk konsumsi manusia (terutama para suami) pada umumnya berasal dari bagian tumbuhan, dan beberapa dari bagian tubuh hewan. Beberapa afrodisiaka alami dan efek kerjanya, yaitu: rangga rusa, som jawa, ginseng, buah lyci, kuku Bima, arginin, yohimbin, dan pasak bumi.

Serbuk Rangga Rusa

Serbuk rangga rusa berperan bukan sebagai afrodisiaka yang berefek cepat, tetapi lebih berfungsi sebagai “tonikum” karena mempertahankan

kekencangan otot dan menguatkan untuk tidak mudah lelah. Ditemukan bahwa rangka rusa banyak mengandung insulin *growth factor-1* (IGF-1). Mempertahankan keberadaan IGF-1 dalam tubuh manusia dapat berfungsi mempertahankan sebagai “antipenuaan”, daya tahan aktivitas fisik, fungsi otot, kadar testosteron, dan *dehidroepiandrosterone* (DHEA). Rangka rusa juga mengandung aneka asam amino, seperti valin, *leucin*, dan *isoleucin*, yang juga berfungsi dalam regenerasi sel-sel tubuh (Allen *et al.* 2002; Gerard 1989).

Som Jawa

Peran som jawa (*Talinum paniculatum* Gaertn) secara legenda di masyarakat adalah sebagai afrodisiaka pada pria (Wijayakusuma *et al.* 1996, Kardono *et al.* 2003). Peranan som jawa sebagai afrodisiaka antara lain ditunjukkan dengan peningkatan libido pada tikus putih jantan yang diberikan secara oral serbuk akar som jawa dalam aquades dengan dosis 100 mg /200 g bobot badan (bb). Sebagai stimulan, som jawa dengan dosis 70 mg/200 g bb mempengaruhi susunan saraf pusat sehingga dapat memperpanjang waktu tidur (Kartawinata 1996). Konsentrasi spermatozoa tikus kontrol berumur empat setengah bulan menggunakan aquades ialah $38,50 \pm 6,98 \times 10^6$ per ml, meningkat dengan pemberian som jawa 50 mg/200 g bb, yaitu menjadi $62,12 \pm 6,24 \times 10^6$ per ml. Diperoleh juga dosis LD 50 ekstrak som jawa, yaitu 644,5 mg/200 g bb (Nugroho *et al.* 2000).

Ginseng

Tumbuhan Ginseng bernama ilmiah *Panax ginseng*. Nama ginseng merujuk pada beberapa nama tumbuhan, dua yang umum adalah *Panax ginseng* sebagai ginseng Korea dan China, *Panax quinquefasciatus* sebagai ginseng Amerika. Beberapa penelitian yang dimuat dalam *The Journal of Urology* menyebutkan bahwa ginseng secara nyata meningkatkan kemampuan ereksi penis dibanding perlakuan *placebo*, tetapi lambat reaksinya dalam meningkatkan kadar testosteron. Lebih lanjut nitrogen monoksida mungkin dilibatkan dalam mekanisme aksi ginsenoside pada sistem saraf pusat dan pada kelenjar gonad, dan menyebabkan memacu libido dan kemampuan kawin pada hewan percobaan.

Dosis biasa konsumsi ginseng untuk pria dewasa adalah 500-1000 mg per hari (Allen *et al.* 2002; Murphy & Lee 2002).

Buah Lyci

Buah Lyci bernama ilmiah *Lycium barbarum*, dikenal juga dengan sebutan *wolfberry*. Buah lyci yang kecil dikeringkan dan dihaluskan disajikan seperti minuman teh. Hasil suatu studi menyebutkan lyci menghasilkan polisakarida yang dapat melindungi organ kelamin pria dan wanita dari kerusakan sel akibat oksidan atau radikal bebas. Kompleks protein-polisakarida *Lycium barbarum* (LBP(3p)) terbukti meningkatkan ekspresi interleukin-2, sejenis protein sitokinin yang disekresikan sebagian besar oleh makrofag dan limfosit B untuk stimulan pembentukan sel limfosit T. Kompleks protein-polisakarida *Lycium barbarum* juga mencegah kelelahan serta meningkatkan daya adaptasi terhadap beban latihan fisik. Tetapi, harus dihindari konsumsi oleh wanita hamil dan menyusui, karena kandungan betain dapat menyebabkan keguguran (Kamhi 2004; Allen *et al.* 2002; Yim *et al.* 2003).

Tribulus terrestris

Tribulus terrestris terkandung dalam suatu jamu afrodisiaka yang bebas dijual di pasar yang diproduksi oleh Sidomuncul. Satu sachet jamu tersebut pada kemasan disebutkan terdiri atas 2 kapsul @ 650 mg dengan kandungan sebagai berikut: Ekstraks *Tribulus terrestris* 300 mg, serbuk *Hippocampus* 8 mg, ekstraks *Panax ginseng* 40 mg, *Eurycomae radix* 25 mg, *Kaempferiae rhizoma* 10 mg, *Zingiberis rhizoma* 20 mg, *Phyllanti herba* 9 mg, *Zingiberis aromaticae rhizoma* 20 mg, dan bahan lainnya hingga 650 mg.

Menurut informasi pada kemasan disebutkan bahwa kandungan jamu seperti *Tribulus terrestris* dalam uji preklinis terbukti dapat meningkatkan kadar hormon testoteron dan konsentrasi sperma pada tikus percobaan. Ningsih (2005) menyebutkan bahwa setelah 2 minggu meminum jamu tadi dan menjaga kesehatan tubuh serta dalam keadaan tenang tidak *stress*, maka efek meningkatkan libido dan daya seksual muncul. Penggunaan kapsul jamu tersebut sebagai afrodisiaka untuk mengatasi disfungsi ereksi menurut aturan pakai pada kemasan

adalah : minum 2 kapsul setiap malam selama 2 atau 3 minggu selanjutnya 2 kapsul setiap 2 atau 3 hari.

Arginin

Arginin adalah senyawa asam amino non esensial yang diproduksi oleh hati. Arginin dapat terkandung di dalam buah cokelat, daging, kacang-kacangan, telur, santan kelapa, dan keju. Arginin di tubuh manusia mempunyai banyak fungsi. Arginin di dalam sel tubuh mengalami perubahan menjadi *nitric oxide* (atau Nitrogen Monoksida =NO) yang dapat meningkatkan jumlah aliran darah ke dalam alat genital. Arginin juga disebutkan sebagai faktor antipenuaan karena kemampuannya memadatkan dan mengencangkan otot. Di samping itu, arginin juga diketahui dapat meningkatkan motilitas sperma dan kesuburan wanita. Setelah melalui beberapa penelitian, arginin dipatenkan sebagai *L-Arginine* untuk digunakan manusia (Allen *et al.* 2002; Meston & Worcel 2002).

Yohimbin

Tumbuhan yohimbin bernama ilmiah *Pausynistalia yohimbe*, banyak di Afrika Barat. Yohimbin berbatang bergaris-garis dan tumbuh tinggi rimbun menghijau. Senyawa kandungan primer yang berkhasiat adalah yohimbin. Yohimbin dengan resep dokter digunakan untuk mengobati pria dan para suami yang mengalami disfungsi ereksi. Yohimbin hidroklorida bekerja memblok reseptor adrenergik α_2 dan meningkatkan dilatasi pembuluh darah. Proses-proses ini meningkatkan dan mempertahankan ereksi. Setelah melalui beberapa penelitian, yohimbin dipatenkan sebagai *yohimbine* untuk digunakan manusia. Dosis yang aman adalah 15-20 mg per hari (Meston & Worcel 2002; Ajavi *et al.* 2003; McKay 2004).

Tumbuhan Pasak Bumi

Eurycoma longifolia dikenal masyarakat sebagai pasak bumi atau dengan nama lain tongkat Ali adalah suatu tumbuhan berbunga yang termasuk ke dalam famili Simaroubaceae, merupakan tumbuhan asli Indonesia dan Malaysia. Tanaman pasak bumi merupakan suatu pohon dengan habitus yang ramping dapat

mencapai tinggi 15 m, dengan daun-daun berderet menyirip teratur , berdaun tipe pinatus dengan panjang dari pangkal tangkai 20-40 cm, setiap deret terdiri atas 13-41 lembar daun atau anak daun (Gambar 1), berakar tunggang dengan warna kuning (Gambar 2). Bunga pasak bumi adalah *diocious* atau berumah dua, dengan bunga jantan dan bunga betina berada pada pohon yang berbeda. Bunga dihasilkan oleh suatu kelopak besar, masing-masing bunga terdiri atas 5-6 daun bunga sangat kecil. Buah yang masak berwarna hijau gelap kemerahan, panjang 1-2 cm dan lebarnya 0,5-1 cm (Kardono *et al.* 2003; Lemmens 2003)



Gambar 1 Tanaman muda pasak bumi (Bhat & Karim 2010).



Gambar 2 Akar tanaman pasak bumi

Khasiat Pasak Bumi pada Reproduksi Hewan Coba

Wijayakusuma (1994) dan Kardono *et al.* (2003) menyatakan bahwa seduhan atau campuran serbuk akar pasak bumi dengan air matang agak panas jika diminum beberapa kali dapat meningkatkan libido dan ketahanan ereksi pria. Serbuk akar pasak bumi yang dikonsumsi secara oral digunakan untuk memulihkan kemampuan ereksi, kandungan kimianya secara keseluruhan mempertahankan kesegaran tubuh (Adimoelja 2000). Serbuk akar pasak bumi seberat 1 g dengan air seduhan 100 ml atau dibuat infus dengan air 110 ml, untuk

diminum pria dewasa sekali setiap hari selama tiga hari dapat meningkatkan nafsu makan dan libido. Dosis tersebut setara dengan 1 g/ 70 kg bobot badan rata-rata pria dewasa, jika dikonversi dengan indeks konversi dosis dari manusia ke tikus putih, yaitu 0,018 (Donatus *et al.* 1998) maka dosisnya menjadi 18 mg/200 g bobot badan tikus putih (Soedibyo 1998; Kardono *et al.* 2003; Biotech 2007).

Peranan pasak bumi atau *Eurycoma longifolia* pada kualitas seksual dipelajari pada perilaku hewan coba, yaitu tikus putih jantan dewasa dengan pemberian dosis 500 mg/kg bobot badan dengan berbagai fraksi pasak bumi. Sementara grup kontrol menerima NaCl fisiologis 3 ml/kg bobot badan setiap hari selama 12 minggu. Hasil menunjukkan bahwa pasak bumi meningkatkan kualitas seksual dengan penurunan “waktu keraguan-raguan” untuk mengawini tikus betina dibanding kontrol, hasil grup perlakuan, yaitu dengan kisaran waktu segera kawin setelah rata-rata 600 detik pemberian pasak bumi. Berbeda nyata dengan grup kontrol yang lebih lama “waktu keraguan-raguan” untuk kawin rata-rata 900 detik melalui pengamatan periode waktu (Ang & Lee 2002).

Peranan pasak bumi untuk meningkatkan libido dikaji juga dengan pemberian dosis 800 mg/kg bb tikus putih dan beberapa dosis lebih tinggi, pemberian dilakukan dua kali sehari selama 10 hari. Hasil menunjukkan bahwa libido tikus jantan meningkat seiring dengan peningkatan dosis serbuk pasak bumi yang diberikan. Jumlah frekuensi jantan menaiki tikus betina meningkat seiring dengan peningkatan dosis. Di samping itu, tikus jantan perlakuan lebih bernafsu dengan lebih sering menjilat dan menciumi organ genital betina reseptif atau betina siap kawin. Para tikus jantan perlakuan juga sering kali mengusap dan menjilati alat kelaminnya dengan waktu yang lebih lama dibanding hewan kontrol yang sering menjelajah di dalam kandang. Tingkah laku seperti itu menunjukkan libido mereka aktif dengan menikmati sensasi melalui sentuhan dan jilatan pada organ genital jantan mereka sendiri (Ang & Lee 2002).

Pasak bumi menurut beberapa kajian oleh University Science Malaysia mempunyai peranan meningkatkan beberapa karakter seksual, kekuatan dan ukuran otot pada hewan coba dibanding kontrol. Di beberapa negara Asia Tenggara pasak bumi digunakan untuk antimalaria, antipemam, antiperadangan dan sedang diteliti kemungkinan sebagai suplemen antikanker. Selain itu, suatu

penelitian oleh Forest Research Institute of Malaysia (FRIM) mendapatkan bahwa pasak bumi mengandung senyawa enzim antioksidan, yaitu suatu enzim superoksida dismutase. Ekstrak air dan metanol dari pasak bumi mempunyai efek menghambat reaksi berantai dari radikal bebas yang dapat membahayakan sistem tubuh (Lemmens 2003).

Peranan pasak bumi sebagai ant demam dan malaria diterangkan oleh Kardono *et al.* (2003) bahwa pada tahun 1995 diketahui senyawa kuasinoid yang diekstrak dari pasak bumi mempunyai khasiat ant demam (antipiretik, analgetik), dari penelitian ini diperoleh bahwa kuasinoid berkhasiat dua kali lebih efektif daripada aspirin. Pada tahun 1980 suatu kajian menunjukkan bahwa senyawa kimia tanaman pasak bumi yang disebut alkaloid kuasinoid mempunyai kemampuan untuk membunuh parasit malaria (Kardono *et al.* 2003).

Peranan pasak bumi dalam menimbulkan atau membangkitkan daya seksual yang lemah bagi tikus putih tua dikaji oleh Ang *et al.* (2004). Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi daya seksual pada tikus jantan tua yang lemah secara seksual, berumur 24 bulan dan sudah tidak dipakai untuk pejantan. Perlakuan secara oral dengan dosis 20, 50, 80 mg/100 g bb (konversi dari 200, 500, 800 mg/1 kg bb) seduhan serbuk akar pasak bumi yang diberikan dua kali sehari selama 10 hari. Tikus kontrol menerima 0,3 ml/100 g bb larutan garam normal (NaCl fisiologis). Peran afrodisiaka diamati melalui tingkah laku menguap dan meregangkan tubuh atau *stretching* karena menguap, juga gerakan yang berkaitan dengan *stretching*. Gerakan *stretching* dianggap suatu gerakan yang mencerminkan adanya timbul nafsu libido yang secara turun temurun diwariskan dari nenek moyang generasi tikus. Hasil percobaan menunjukkan bahwa 50 mg/100 g bb pasak bumi meningkatkan *yawning* atau menguap sampai 50 % dan tingkah laku *stretching* sampai 16 % pada tikus jantan tua yang lemah seksual. Pada tikus jantan yang aktif untuk pejantan, *yawning* dan *stretching* mencapai 676-719 % dan 31-336 % secara berurutan dibanding perlakuan kontrol. Berdasarkan fenomena tadi disimpulkan bahwa pasak bumi mempunyai peran sebagai afrodisiaka pada tikus putih tua lemah seksual dan tikus jantan aktif (Ang *et al.* 2004).

Walaupun pasak bumi adalah suatu tanaman afrodisiaka yang berpotensi unggul, tetapi juga mempunyai efek samping dalam jangka panjang (Lemmens 2003; Ang *et al.* 2004). Satu dari beberapa efek samping dosis tinggi pasak bumi adalah insomnia. Di samping itu ketika mengkonsumsi pasak bumi berulang kali dalam waktu lama dapat menurunkan libido atau nafsu seksual. Dengan demikian, konsumsi yang baik adalah penggunaan dosis rendah selama 2 sampai 7 hari daripada suatu dosis tinggi hanya pada satu hari. Dosis lebih aman menurut Kardono *et al.* (2003) ialah 500 mg serbuk akar pasak bumi per hari untuk pria dewasa. Berdasarkan uji empirik pada beberapa orang yang mengkonsumsi pasak bumi diperoleh temuan bahwa dosis tinggi dapat menyebabkan kenaikan suhu tubuh yang tidak baik. Sebagian di antara pengguna dosis tinggi merasa gelisah dan tidak sabar, akan menjadi mudah marah. Dengan demikian, akan lebih baik mengkonsumsi pasak bumi dalam dosis rendah pada periode waktu 2 sampai 7 hari (Wiart 2006).

Kandungan Kimia Pasak Bumi

Akar tanaman pasak bumi mengandung berbagai senyawa yang diyakini dapat meningkatkan libido. Komponen fitokimia yang diekstrak dari akar pasak bumi dalam berbagai pelarut seperti metanol, diklorometan atau kloroform dan air mengandung: terpenoid, stigmasterol, sitosterol, sterol, saponin, kuassinoid, campesterol, benzokoinon, alkaloid, skopoletin, piskidinol, nilositin, metoksisantin-mono-oksida, metoksisantin, melian, longilen, longilakton A dan B, hidroksieurikomalakton, hidroksisantin-mono-oksida, hidroksidehidroeurikomalakton, hispidon, eurilene, durilakton, erikomanol-oD-glikopiranosid, eurikomanol, dihidroeurikomalakton (Kardono *et al.* 2003; Lemmens 2003). Ekstrak dengan pelarut air didapati kandungan terutama komponen fenol, tanin, polisakarida dengan bobot molekul tinggi, glikoprotein dan mukopolisakarida (Ang & Lee 2002). Di samping itu, tiga jenis kuasinoid, yaitu eurikolakton A, B dan C berhasil diisolasi dari akar pasak bumi (Ang *et al.* 2000), sedangkan dari batang dan kayu pasak bumi diperoleh kandungan tiga kuasinoid yang sitotoksik pada sel karsinoma dalam percobaan, yaitu 11 dehidroklainenon, eurikomalakton dan 5,6 dehidroeurikomalakton (Itokawa *et al.* 1992).

Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Strain Sprague Dawley

Tikus putih percobaan yang digunakan untuk berbagai penelitian laboratorium adalah antara lain Dark Agouti, Sprague Dawley dan Wistar. Dari tiga strain tersebut strain Sprague Dawley lebih sesuai untuk hewan percobaan pada penelitian bidang toksikologi dan biologi reproduksi. Tikus strain Sprague Dawley (Gambar 3) mempunyai multifungsi sebagai model pilihan untuk kajian dan penelitian bidang kesehatan manusia dan penyakit. Tikus strain Sprague Dawley digunakan dalam berbagai keperluan sebagai model hewan coba dalam bidang toksikologi, biologi reproduksi, farmakologi, dan penelitian tingkah laku (Donatus *et al.* 1998; Wilkinson *et al.* 2000).



Gambar 3 Tikus strain Sprague Dawley.

Biologi tikus strain Sprague Dawley (Donatus *et al.* 1998; Wilkinson *et al.* 2000;) antara lain:

1. Bobot badan dewasa maksimal: 250 – 300 g (betina), 450 – 520 g (jantan)
2. Jangka/lama hidup: 2,5 - 3,5 tahun
3. Laju pernapasan: 70 – 115 menghisap napas/menit
4. Detak jantung: 250 – 450 detak/menit

Aspek bioreproduksi tikus strain Sprague Dawley sebagai berikut: Pembiakan tikus strain Sprague Dawley yang berkualitas baik untuk jantan dan betina adalah pada umur 65 – 105 hari, walaupun mungkin tikus betina tikus strain Sprague Dawley sudah mengalami estrus pertama pada umur 35 hari. Sedangkan tikus jantan mulai pubertas pada umur 8 minggu atau 50 – 60 hari. Tikus mempunyai tipe poliestrus, berbiak sepanjang tahun, dan ovulasinya spontan. Periode siklus estrus berjalan selama rata-rata 5 hari dan fase estrus (siap dikawini) sendiri berlangsung dalam 12-24 jam bahkan sampai 48 jam dalam kandang percobaan, yang kadang-kadang awal estrus muncul pada siang hari dan

sore hari. Tindakan pemeriksaan untuk menentukan status fase estrus dengan *vaginal smear* sangat diperlukan. Perkawinan biasanya dilakukan malam hari, walaupun kadang-kadang pada pagi atau siang hari pada suasana kandang yang agak gelap atau remang-remang. Terjadinya perkawinan dapat dikonfirmasi dengan adanya *vaginal plug* setelah 12 – 14 jam kopulasi, walaupun indikator ini tidak sebaik yang muncul pada mencit. Keberadaan spermatozoa ketika dilakukan *vaginal smear* merupakan indikator terbaik telah terjadi perkawinan (Donatus 1998; Wilkinson *et al.* 2000).

Rata-rata periode kebuntingan strain Sprague Dawley adalah 22 hari, *postpartum estrus* setelah melahirkan pada seekor betina subur terjadi dalam 48 jam. Penyusuan yang simultan dan kebuntingan mengakibatkan implantasi berikut tertunda 3 – 5 hari. Jumlah anak yang dihasilkan setiap induk sekitar 6 – 12 ekor, anak tikus disebut *pup* dan bobotnya 5 – 6 g ketika lahir. Anak tikus disapih setelah 3 minggu penyusuan dengan bobot menjadi 40 – 50 g. Jika *postpartum estrus* tidak berfungsi, tikus betina induk akan kembali mengalami fase-fase siklus estrus kembali setelah 2 – 4 hari penyapihan (Uchino *et al.* 1990; Donatus *et al.* 1998; Wilkinson *et al.* 2000,)

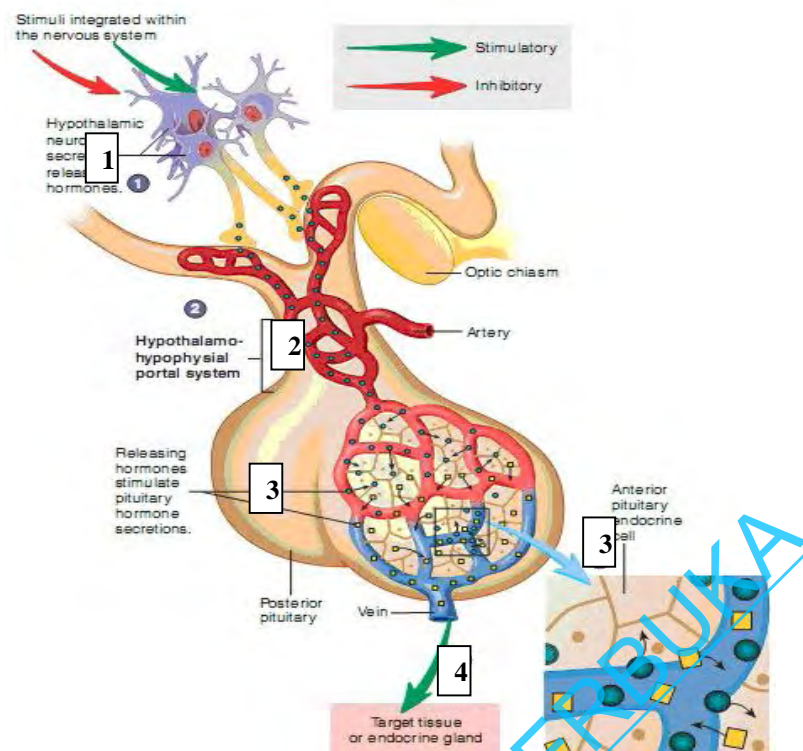
Siklus kelamin pada tikus betina dan mamalia betina secara alami terjadi atas empat fase yang kronologisnya berurutan, yaitu dari 1). Proestrus, 2). Estrus, 3). Metestrus, sampai 4). Diestrus. Di antara empat fase tersebut, fase estrus adalah fase berahi untuk ketertarikan pejantan untuk melakukan perkawinan. Hewan betina pada fase estrus bertingkah laku ingin kawin dan penerimaan yang besar terhadap hewan jantan. Pada fase estrus, folikel de Graaf menjadi besar dan matang. Estradiol dari folikel de Graaf menyebabkan terjadinya perubahan-perubahan pada saluran reproduksi tubuler yang maksimal. Estradiol merangsang sistem saraf pusat sehingga hewan betina memperlihatkan pola tingkah laku yang khas bagi hewan yang berahi (estrus). Pada fase ini terjadi ovulasi, ovulasi merupakan proses melepasnya sel telur atau oosit ke dalam tuba falopi akibat meluruhnya folikel de Graaf. Ovulasi pada tikus betina terjadi secara spontan terjadi mengikuti perkembangan proses estrus (Mc Donald 1989).

Organ dan Objek yang Diteliti

Beberapa organ dan objek yang diteliti kerja atau efeknya sebagai respons/tanggapan terhadap pemberian bahan pasak bumi antara lain adalah: hipofisis anterior, testosteron, testis, semen dan spermatozoa. Berikut ini uraian mengenai organ dan objek tersebut.

Morfologi Hipofisis Anterior dan Hormon yang Dihasilkan

Hipofisis tampak secara relatif berwarna kelabu kemerah-merahan, berukuran kecil sekitar 10 mm pada manusia dan relatif lebih kecil lagi pada tikus putih. Hipofisis berhubungan dengan hipotalamus, hipofisis terletak pada otak tepat di belakang kiasma optikum dan merupakan bagian penonjolan dari dasar hipotalamus. Hipofisis anterior adalah lobus anterior dari hipofisis yang merupakan bagian paling besar dan penting dari organ hipofisis (Gambar 4). Pada mamalia dan manusia, lobus ini kira-kira hampir 70 % dari bobot total kelenjar. Hipofisis anterior secara histologi terdiri atas sel-sel epitel kelenjar dari berbagai ukuran dan bentuk tersusun dalam jalur-jalur yang relatif luas dan sirkuler serta dipisahkan oleh sinusoid-sinusoid yang mengandung darah. Dengan pewarnaan umum dibedakan atas tiga jenis sel, yaitu: 1. sel kromofob (neutrofil) sukar diwarnai, 2. sel kromatin mengambil warna asam (eosinofil), seperti sel penghasil prolaktin adalah asidofilik sehingga berkaitan dengan itu disebut sel asidofil dan 3. sel kromatin mengambil warna basa (basofil), sel penghasil LH dan FSH adalah basofilik sehingga berkaitan dengan itu disebut sel basofil. Sel-sel kromatin terletak di luar jalur dan oleh karena itu berdekatan dengan sinusoid-sinusoid darah dan relatif mudah diwarnai (Harper *et al.* 1979; Norman & Litwack 1987).



Gambar 4 Skema hubungan hipotalamus dan hipofisis (Lucky 2010).

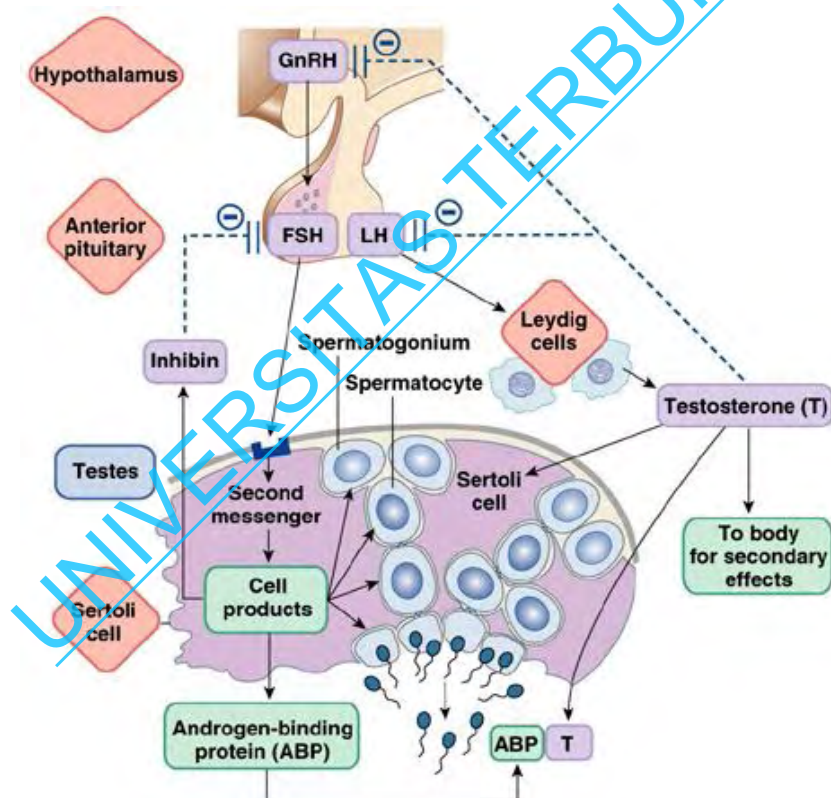
Keterangan : 1. Stimuli dari sistem saraf, *releasing hormones* disekresi dari neuron hipotalamus. 2. *Releasing hormones* melalui sistem portal hipotalamohipofisial ke hipofisis anterior. 3. *Releasing hormones* menstimulasi sel hipofisis anterior untuk melepaskan hormon tertentu. 4. Hormon dibawa oleh darah ke jaringan target.

Suatu hormon pengendali bekerja aktif pada hipofisis anterior, yaitu: *thyrotropin releasing hormone* (TRH), *gonadotropin releasing hormone* (GnRH) dan *corticotropin releasing hormone* (CRH). Hormon-hormon tersebut secara berurutan aktif bekerja untuk pelepasan *thyroid stimulating hormone* dari sel-sel tirotropik pada hipofisis anterior atau *anterior pituitary* sebagai reaksi stimulasi oleh TRH. Hormon prolaktin dari sel-sel laktotropik pada hipofisis anterior sebagai reaksi stimulasi oleh TRH. Hormon LH dari sel-sel luteotropik pada hipofisis anterior sebagai reaksi stimulasi oleh GnRH-LH. Hormon FSH dari sel-sel folikulotroik pada hipofisis anterior sebagai reaksi stimulasi oleh GnRH-FSH. Adrenokortikotropin dari sel-sel kortikotropik pada hipofisis anterior sebagai reaksi stimulasi oleh CRH. Berdasarkan beberapa bukti menunjukkan bahwa LH dan FSH dapat dikeluarkan dari sel yang sama, sehingga mungkin sel-sel luteotropik dan sel-sel folikulotropik adalah satu dan sel yang sama, tetapi juga

dapat muncul dengan kedua jenis sel (Norman & Litwack 1987; Bearden *et al.* 2004).

Pengendalian Hormon Reproduksi Terhadap Spermatogenesis

Pengendalian hormon reproduksi terhadap spermatogenesis di dalam tubuli seminiferi dimulai dari pelepasan *gonadotropin releasing hormone* (GnRH) dari hipotalamus dan lebih lanjut merangsang pelepasan hormon-hormon reproduksi gonadotropin LH dan atau FSH dari kelenjar hipofisis/*pituitary* anterior (Vandenberg 1983; Johnson & Barry 1998). Urutan skema kerja hormon reproduksi terhadap spermatogenesis (Terrichan 2010) tampak pada Gambar 5 berikut:

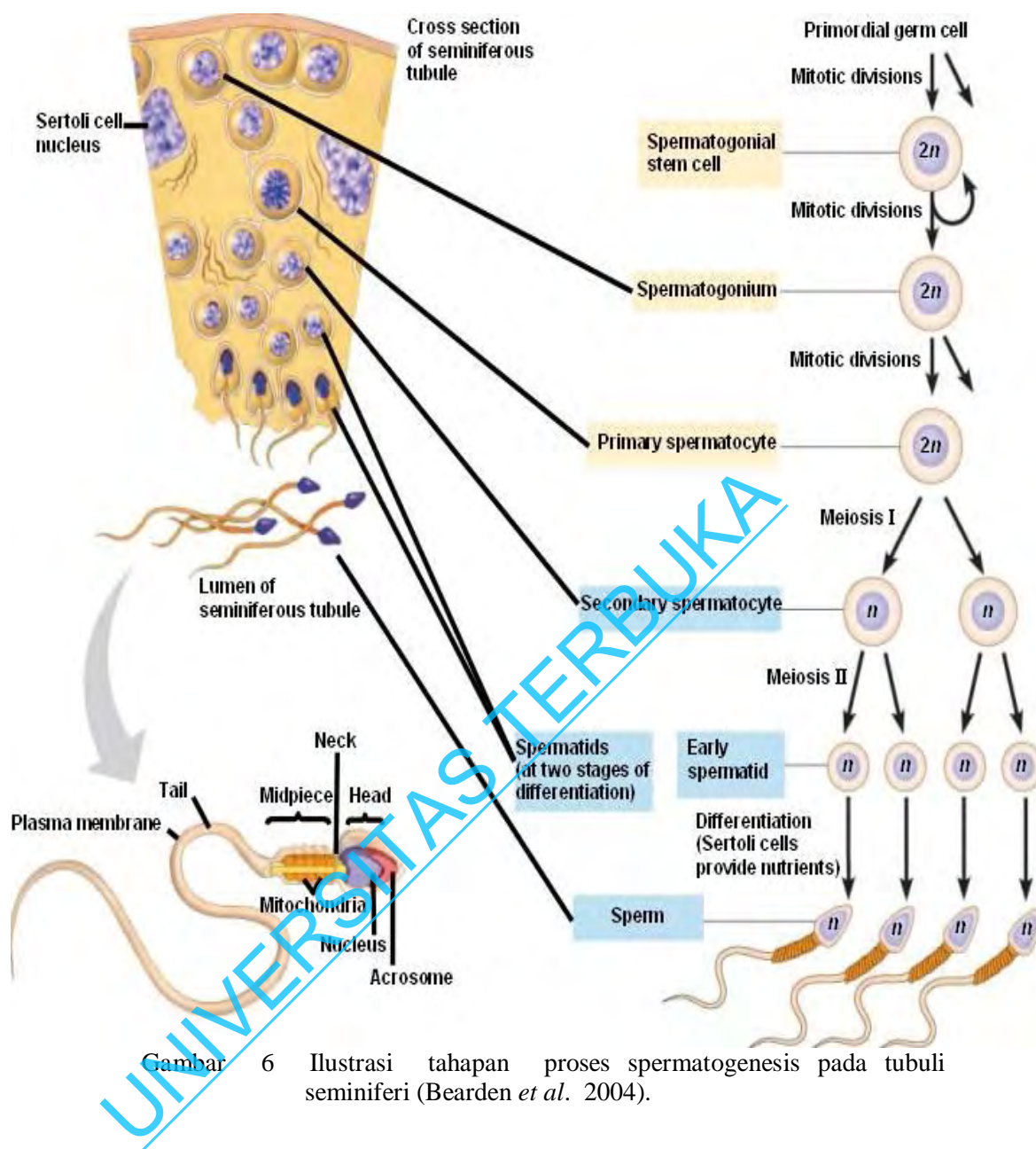


Gambar 5 Skema jalur kerja hormon reproduksi jantan pada proses spermatogenesis (Terrichan 2010)

Hormon LH disekresikan oleh sel-sel produsennya pada hipofisis anterior yang selanjutnya melalui transportasi aliran darah akan diterima oleh reseptornya pada permukaan sel-sel Leydig yang mempunyai afinitas tinggi terhadap LH. Selanjutnya, terjadi peningkatan kadar cAMP intrasel dalam waktu 60 detik, dan

diteruskan dengan sintesis testosteron yang meningkat dalam waktu 20-30 menit. Peran LH dalam meningkatkan proses sintesis testosteron tidak berjalan sendiri, walaupun LH sebagai faktor utama tetapi diduga juga dibantu oleh peran aktivitas hormon prolaktin dari hipofisis anterior dan inhibin yang membantu pengikatan ke reseptor sel Leydig dalam perangsangan sintesis testosteron. Hormon testosteron lalu menembus tubuli seminiferi dan mengikat ke reseptor-reseptor androgen di dalam sel-sel Sertoli yang berfungsi mendukung proses spermatogenesis. Sebagian testosteron diikat oleh *androgen binding protein* (ABP), sebagian lagi akan menuju sel/jaringan target untuk perkembangan karakter seksual sekunder (Vandenberg 1983; Norman & Litwack 1987; Johnson & Barry 1998).

Pada sisi lain, setelah GnRH-FSH disekresikan oleh hipotalamus sampai ke hipofisis, maka hipofisis anterior selanjutnya mensintesis FSH. Hormon FSH terikat ke reseptor-reseptor yang berada pada bagian basal membran sel Sertoli. Lalu, merangsang kegiatan enzim adenil siklase; sintesis RNA dan protein; memobilisasi sumber-sumber energi; pembuatan cairan testis; dan *output* sintesis protein-protein sel Sertoli seperti ABP dan inhibin. Secara nyata, produksi protein reseptor pengikat androgen intrasel juga dirangsang oleh FSH, yang menguatkan tanggapan sel Sertoli kepada aksi dari hormon androgen. Hormon androgen pada gilirannya merangsang kemunculan reseptor FSH. Dengan demikian, Testosteron dan FSH beraksi bersama bersinergi di dalam sel Sertoli untuk mendukung penuh proses spermatogenesis di dalam tubuli seminiferi berjalan secara lengkap. Tahapan pembentukan sel spermatozoa di dalam proses spermatogenesis yang terjadi di dalam tubuli seminiferi tikus jantan terdiri atas lima bentuk sel secara berurutan, yaitu: spermatogonia, spermatosit primer, spermatosit sekunder, spermatid awal, spermatid akhir (*elongated*). (Norman & Litwack 1987; Johnson & Barry 1998). Skema spermatogenesis seperti berikut:



Cambar 6 Ilustrasi tahapan proses spermatogenesis pada tubuli seminiferi (Bearden *et al.* 2004).

Matthiesson *et al.* (2006) menemukan bahwa FSH dan LH mengendalikan proses spermatogenesis secara terpisah. *Follicle stimulating hormone* menunjukkan pengaruh nyata pada peningkatan jumlah spermatisit sekunder dibanding LH. Sementara peningkatan nyata perubahan menjadi spermatid sekunder dipengaruhi oleh LH. Matthiesson *et al.* (2006) juga menemukan bahwa pematangan spermatogonia dipengaruhi oleh FSH, sedangkan proses spermiogenesis tampak jelas dipengaruhi oleh LH dan testosteron testis. Kadar FSH, LH, dan testosteron dalam serum darah bervariasi menurut umur tikus jantan Sprague Dawley seperti pada Tabel 1 berikut (Lee *et al.* 1975):

Tabel 1 Kadar FSH, LH, dan testosteron dalam serum darah menurut umur tikus jantan Sprague Dawley

No	Umur (hari)	FSH (ng/ml)	LH (ng/ml)	Testosteron (ng/ml)
1	11-15	282 ± 22	3,86 ± 0,6	0,63 ± 0,17
2	21-25	262 ± 53	3,51 ± 0,3	0,37 ± 0,07
3	31-40	288 ± 32	1,92 ± 0,3	0,78 ± 0,21
4	51-60	193 ± 20	3,24 ± 0,6	1,10 ± 0,28
5	71-80	230 ± 37	3,86 ± 0,3	2,15 ± 0,32

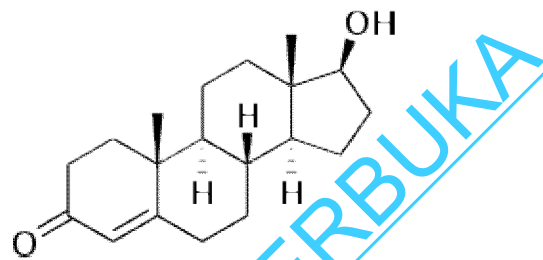
Sumber: (Lee *et al.* 1975)

Berhubungan dengan fungsi FSH dikaitkan dengan perkembangan tahap spermatogenesis berdasarkan umur tikus jantan, Lee *et al.* (1975) menemukan bahwa tikus Sprague Dawley jantan umur 0-5 hari memiliki kadar FSH yang tinggi/meningkat (660 ng/ml) yang berperan meningkatkan pembentukan spermatogonia dari sel calon spermatogonia. Kadar FSH menurun ketika tikus jantan berumur 11-15 hari (282 ng/ml), pada saat itu penampilan histologi spermatogenesis pada tubuli seminiferi tidak mengalami perubahan dibanding kontrol. Kadar FSH kembali tinggi/meningkat (421 ng/ml) pada tikus umur 26-30 hari dan berperan merangsang pembentukan spermatosit primer. Tahapan pembentukan spermatid akhir dipengaruhi oleh LH (Matthiesson *et al.* 2006). Selanjutnya pada tikus umur 51-60 hari menunjukkan kadar FSH menurun (193 ng/ml) dan ini berkaitan dengan penurunan jumlah spermatozoa karena sebagian besar telah dilepas dari tubuli seminiferi (Lee *et al.* 1975).

Testosteron

Testosteron merupakan hormon steroid dari kelompok androgen yang dominan pada jantan. Testosteron dijumpai pada hewan jantan mamalia antara lain: sapi, kuda, kambing, kerbau, kelinci, tikus. Testosteron ditemukan juga pada reptil, burung, dan beberapa vertebrata lain, serta pada pria. Testosteron pada mamalia terutama disekresikan oleh testis jantan dan sejumlah kecil oleh ovarium betina. Sejumlah kecil testosteron disekresikan juga oleh kelenjar adrenal. Sifat utama hormon ini adalah sebagai hormon kelamin jantan dan steroid anabolik (Cox & John 2005; Reed *et al.* 2006).

Testosteron mempunyai bobot molekul 288,41 Dalton. Proses sintesis testosteron berlangsung di sel Leydig. Sel Leydig adalah suatu sel interstisial pada testis yang memberikan tanggapan pada *interstitial cell stimulating hormone* (ICSH) atau dikenal dengan *luteinizing hormone* (LH). Pada jantan sebagian dihidrotestosteron dibentuk di jaringan perifer. Rumus kimia testosteron adalah $C_{19}H_{28}O_2$ dengan waktu paruh yang dimiliki adalah 2-4 jam. Testosteron yang tak terpakai akan diekskresikan ke luar tubuh melalui urin (90 %) dan feses (6 %) (Greenspan & Strewler 1997; Morgentaler & Schulman 2009). Rumus bangun testosteron pada Gambar 7.



Gambar 7 Testosteron (Greenspan & Strewler 1997; Morgentaler & Schulman 2009).

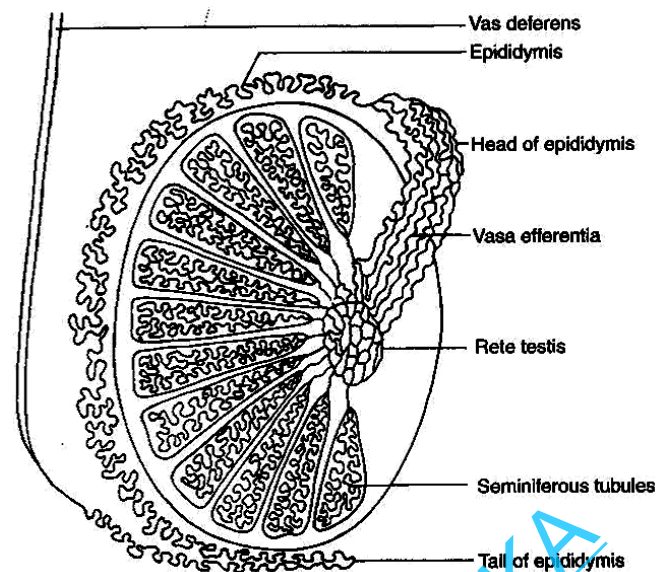
Pengubahan testosteron terjadi pada kira-kira sejumlah 7 % testosteron yang beredar direduksi menjadi 5 α -dihidrotestosteron (DHT) oleh kerja enzim 5 α -reductase sitokrom P₄₅₀. Enzim 5 α -reductase sitokrom P₄₅₀ adalah enzim yang banyak diekspresikan pada organ-organ asesori kelamin jantan dan folikel rambut. Sementara itu, sekitar 0,3 % testosteron diubah menjadi estradiol oleh enzim aromatase (CYP19A1) suatu enzim yang diekspresikan pada otak, hati, dan jaringan adiposa. Senyawa DHT adalah bentuk yang lebih poten dibanding testosteron, sedangkan estradiol sangat berbeda aktivitasnya yang berfungsi utama pada reproduksi hewan betina dibandingkan dengan testosteron yang berfungsi utama pada reproduksi hewan jantan. Hormon testosteron dan DHT dapat dinetralkan fungsinya oleh enzim hidrosilase yang bekerja pada posisi 6, 7, 15 atau 16 (Mooradian *et al.* 1987; Randall 1994; Meinhardt & Mullis 2002).

Testosteron dihasilkan dari biosintesis kolesterol. Biosintesis testosteron dipicu oleh LH yang dilepaskan oleh hipofisis dan akan terikat pada reseptornya di sel-sel interstisial testis. Setelah terjadi ikatan antara LH dan reseptornya maka akan terbentuk *mesenger* kedua yang berupa cAMP. Terbentuknya cAMP mengaktifkan protein kinase yang akan mempengaruhi inti sel agar gen-gen yang

mengatur biosintesis testosteron menjadi aktif dan mulailah terjadi sintesis testosteron. Tahap pertama dalam biosintesis melibatkan pembelahan oksidasi dari satu sisi rantai kolesterol oleh CYP11A suatu enzim oksidase sitokrom P₄₅₀ pada mitokondria dengan hilangnya enam atom karbon untuk menjadi pregnenolon. Tahap berikutnya dua atom karbon dipindah oleh enzim CYP17A di dalam retikulum endoplasma untuk menghasilkan variasi dari steroid C19. Di samping itu, grup 3-hidroksil dioksidasi oleh 3- β -HSD untuk menghasilkan androstenedion. Pada tahap akhir, atom C-17 grup keto androstenedion direduksi oleh enzim 17- β hidroksisteroid dehidrogenase untuk menjadi testosteron (Zuber *et al.* 1986; Waterman & Keeney 1992; Squires 2003).

Struktur Morfologi Testis

Testis pada semua mamalia dan manusia dibungkus oleh selubung tunika vaginalis suatu jaringan serosa yang merupakan perluasan dari peritonium. Jaringan serosa ini menyelubungi testis sampai turun ke skrotum dan menyentuh sepanjang epididimis. Lapisan luar testis adalah tunika albugenia suatu membran putih tipis dan merupakan jaringan pengisi yang elastis. Pembuluh kapiler darah banyak tampak persis di bawah tunika albugenia. Lapisan di bawah tunika albugenia adalah lapisan parenkim, suatu lapisan fungsional testis. Parenkim berwarna kekuningan dan dibagi atas segmen-segmen dengan sekat-sekat jaringan pengisi (*connective tissue*). Bertempat di dalam segmen-segmen jaringan parenkim terdapat tubulus seminiferus. Tubulus seminiferus yang berliku-liku (Gambar 8) merupakan pembuluh kelamin primer, mengandung sel-sel germinal (spermatogonia) dan sel-sel perawat (sel Sertoli). Sel-sel Sertoli berukuran lebih besar dan jumlahnya kurang sedikit dibandingkan dengan spermatogonia. Sel-sel tersebut terhubung erat dengan membran dasar atau membran basalis yang membentuk *blood testis barrier*. Dengan stimulasi oleh FSH, sel-sel Sertoli memproduksi *androgen binding protein* (ABP) dan inhibin. Tubulus seminiferus merupakan tempat produksi spermatozoa (Bearden *et al.* 2004).



Gambar 8 Ilustrasi potongan membujur testis. Segmen-segmen jaringan terdiri atas: kauda epididimis, tubulus seminiferus, rete testis, vasa eferentia, caput epididimis, dan saluran skrotum vas deferen (Bearden *et al.* 2004).

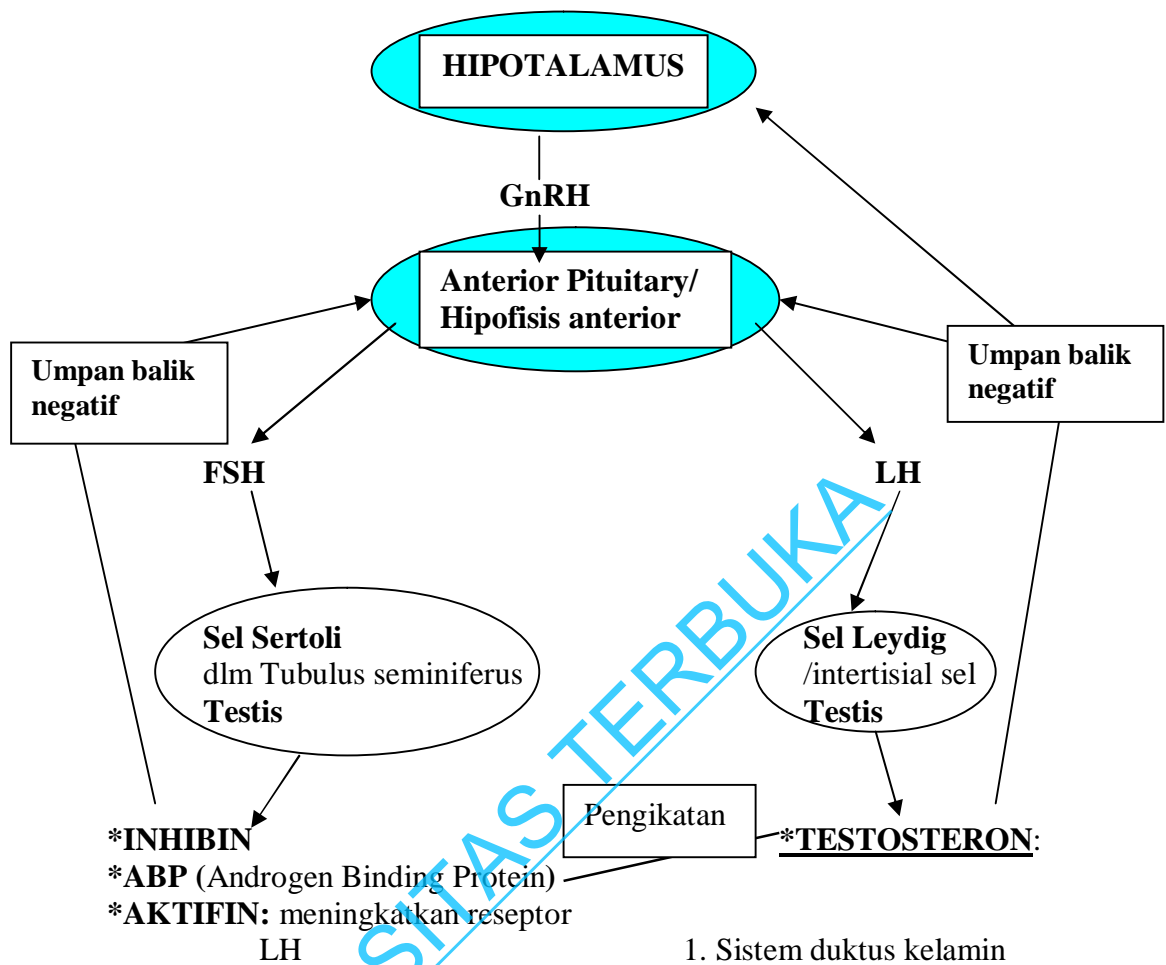
Sel-sel Leydig (*interstitial cells*) terdapat di dalam jaringan parenkim di antara saluran-saluran tubulus seminiferus. Ketika distimulasi oleh LH, sel-sel Leydig memproduksi testosteron dan sedikit androgen lainnya. Testosteron diperlukan dalam produksi spermatozoa, mengembangkan karakter seks sekunder dan tingkah laku kawin normal. Di samping itu, testosteron dibutuhkan untuk fungsi kelenjar asesori, dan mempertahankan sistem duktus jantan/pria. Melalui pengaruhnya pada jantan/pria maka hormon testosteron membantu mempertahankan kondisi optimum dalam proses spermatogenesis, transpor spermatozoa dan peletakan spermatozoa ke dalam saluran betina/wanita (Norman 1987 & Litwack; Bearden *et al.* 2004).

Hormon testosteron mengembangkan proses spermatogenesis di dalam testis, meningkatkan libido, menormalkan pertumbuhan dan fungsi epididimis, duktus deferen, kelenjar prostat, vesikula seminalis, dan penis. Juga diferensiasi embrio pada sistem alat kelamin luar. Di samping itu, membantu pertumbuhan otot dan rangka sewaktu pubertas, juga pertumbuhan kumis, janggut, penebalan pita suara, tulang hyoid jakun dan bulu kemaluan sebagai ciri kelamin sekunder pada manusia (Harper *et al.* 1979).

Sementara itu, FSH akan diterima oleh reseptor sel Sertoli yang terletak di dalam tubulus seminiferus testis. Sel Sertoli di bawah pengaruh FSH akan memicu sel-sel germinal melakukan proses awal spermatogenesis dan bekerja merawat dan mensuplai nutrisi kebutuhan pertumbuhan dan perkembangan spermatogonia. Di samping itu, sel Sertoli memproduksi inhibin, ABP dan aktifin. Mengenai proses ereksi terjadi pada jaringan organ penis yang melibatkan antara lain: sistem pembuluh darah, persarafan dan otot polos korpus kavernosum (Harper *et al.* 1979; Norman & Litwack 1987).

Berkaitan dengan testosteron, Squires (2003) dan Bearden *et al.* (2004) menjelaskan bahwa testosteron disintesis di dalam testis, yaitu oleh sel-sel Leydig di bawah kontrol LH dari kelenjar hipofisis. Setelah masuk ke dalam sel-sel target pada hipotalamus, kelenjar hipofisis, dan testis, testosteron langsung diikat oleh reseptor androgen (AR). Selanjutnya kompleks testosteron dan AR mengikat gen pada rantai urutan DNA tertentu dan mengatur kejadian transkripsi gen. Proses tersebut dapat memicu dan mengatur proses spermatogenesis, merangsang libido. Pada tahapan embrional berpengaruh pada proses diferensiasi dan perkembangan dari duktus wolffian menjadi epididimis dan vas deferens. Di samping itu, menyebabkan suatu mekanisme umpan balik negatif (Gambar 9) dari sintesis dan sekresi gonadotropin setelah mencapai kadar tertentu, sehingga terjadi keseimbangan proses faal.

Testosteron setelah masuk ke dalam sel-sel target pada bagian organ sinus urogenital, tuberkulus urogenital, dan beberapa jaringan target androgen tambahan, dimetabolisme menjadi 5α dihidrotestosteron (DHT) oleh enzim 5α reduktase tipe 2 (Squires 2003). Dihidrotestosteron setelah itu mengikat reseptor androgen (AR), dan kompleks DHT-AR mengikat gen urutan tertentu rantai DNA. Selanjutnya terjadi proses yang mengatur transkripsi gen, yang dapat menyebabkan proses diferensiasi dan perkembangan prostat, alat genital eksternal dan pematangan karakter sekunder kelamin pria atau jantan (Squires 2003; Bearden *et al.* 2004).



Gambar 9 Skema kerja hormonal reproduksi pria/jantan (Squires 2003).

Semen

Semen adalah cairan interseluler semigelatin yang terdiri atas plasma semen dan sel germinatif spermatozoa. Sebagian besar cairan semen berasal dari kelenjar asesori jantan, dan sebagian kecil dari epididimis. Semen yang mengandung cairan yang melindungi dan membawa spermatozoa yang akan bergerak sampai ke tempat tujuan di dalam saluran kelamin betina. Semen mengandung nutrisi yang lengkap antara lain: fruktosa, sorbitol, asam askorbat, kalsium, chlorin, kolesterol, asam sitrat, kreatin, asam deoksiribonukleat (*DNA*), glutathion, hyaluronidase, inositol, asam laktat, magnesium, nitrogen, fosfor,

potasium, purin, pirimidin, asam piruvat, natrium, sorbitol, spermidin, spermin, urea, asam urat, vitamin B12, zinc (Johnson & Barry 1998; Krisfalosi *et al.* 2006).

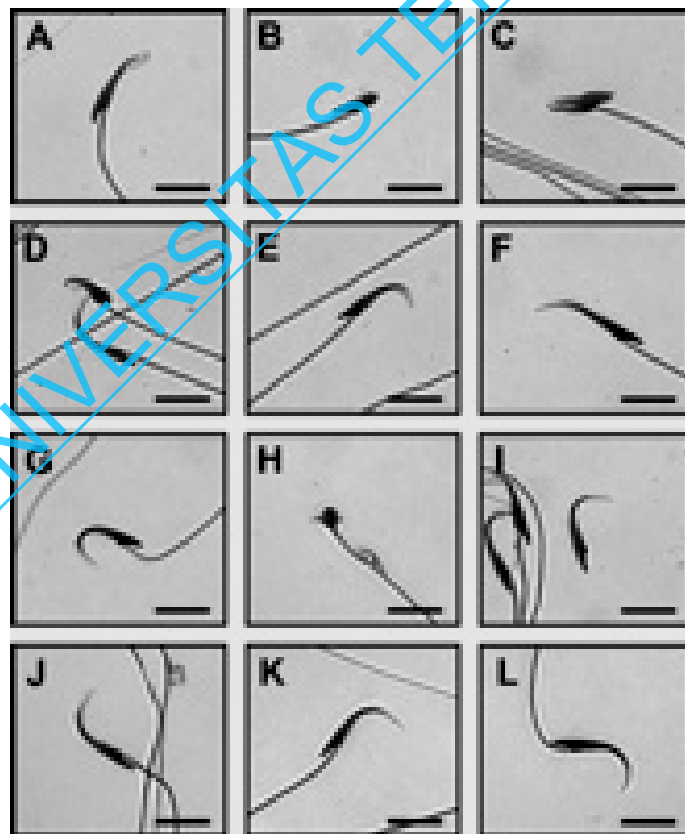
Safarinejad *et al.* (2010) menemukan bahwa semen tikus putih jantan yang tidak subur (infertil) memiliki konsentrasi asam lemak omega 3 lebih rendah daripada semen tikus putih jantan yang subur (fertil). Hal demikian ternyata juga terjadi pada semen pria tidak subur (infertil) memiliki konsentrasi asam lemak omega 3 yang lebih rendah dibanding semen pria subur. Asam lemak omega 3 yang dimaksud adalah: *α linolenic acid* (ALA), *eicosapentaenoic acid* (EPA), dan *docosahexaenoic acid* (DHA).

Spermatozoa merupakan materi penting yang terdapat di dalam cairan semen. Spermatozoa dapat bergerak menggunakan satu ekor (flagel). Enzim-enzim glikolitik terikat pada pembungkus ekor spermatozoa. Krisfalosi *et al.* (2006) menemukan bahwa pada pembungkus ekor spermatozoa terdapat enzim *glyceraldehydes 3 phosphate dehydrogenase spermatogenic* (GAPDHS), enzim ini khusus berfungsi sebagai enzim glikolitik yang dibutuhkan untuk pergerakan spermatozoa. Enzim GAPDHS diketahui terikat pada pembungkus elastik ekor spermatozoa mamalia seperti kelinci, hamster, tikus, mencit, dan oposum. Enzim GAPDHS juga terdapat pada ekor spermatozoa manusia. Selanjutnya diketahui terdapat empat enzim glikolitik yang dijumpai pada pembungkus ekor spermatozoa, yaitu: *aldolase 1 isoform A* (ALDOA), GAPDHS, laktat dehidrogenase A (LDHA), dan piruvat kinase (Krisfalosi *et al.* 2006).

Morfologi spermatozoa kadang-kadang mengalami kelainan atau cacat. Spermatozoa tikus putih jantan pada keadaan biasa atau normal dapat mengalami kelainan atau abnormal di dalam kauda epididimis mencapai rerata 20,7 % (Fauzi 2008). Pada temuan yang lain diperoleh bahwa pada spermatozoa tikus jantan strain Sprague Dawley berumur 3 ½ bulan mengalami bentuk abnormal mencapai rerata 8 % dan meningkat menjadi 10,5 % setelah memperoleh perlakuan pemberian panadol sekali setiap hari selama 90 hari (Ekaluo *et al.* 2009). Lebih lanjut pada analisis menggunakan *computer assisted rat sperm analysis* (CASA) diperoleh bahwa pada spermatozoa tikus putih strain Sprague Dawley berumur 3 ½ bulan yang tidak terkena *stress* memiliki rerata jumlah

persen motilitas 80 %, rerata integritas membran 58 %, dan integritas akrosom 99 % (Varisli *et al.* 2009).

Kelainan morfologi spermatozoa pada kerbau, sapi dan anoa yang berbentuk cacat atau abnormal biasanya terdapat pada bagian kepala dan atau pada ekor. Kelainan pada kepala antara lain: *pearshaped* atau *pyriform* (kepala berbentuk buah peer), *narrow at the base* atau *tapered* (kepala mengecil di bagian bawah), *macrocephalus* (kepala besar), *microcephalus* (kepala kecil), *double heads* (kepala ganda) dan kepala tanpa ekor. Kelainan pada ekor antara lain: *abaxial* (penempelan ekor tidak pada titik tengah dasar kepala), *around the head* (ekor melingkari kepala), *abnormal piece* (kelainan pada *mid piece*), dan ekor tanpa kepala (Barth & Oko 1989; Kuster *et al.* 2004; Yudi *et al.* 2010). Morfologi spermatozoa tikus yang abnormal dan normal menurut Saether *et al.* (2007) tampak pada Gambar 10.



Gambar 10 Spermatozoa tikus, skala bar 10 μm (Saether *et al.* 2007)
 Bentuk abnormal pada: A-C: Kepala
 D-E: Leher
 F-G: Kurvatur spermatozoa
 H: Pin heads
 I: Kepala tanpa leher
 J-L: Tiga spermatozoa bentuk normal

Tingkah Laku Libido (*Sexual Behaviour*) Tikus Jantan

Urutan tingkah laku libido (*sexual behaviour*) yang lengkap dari seekor tikus jantan baik strain Sprague Dawley maupun Wistar terdiri atas: 1) tingkah laku prakawin, 2) kopulasi, dan akhirnya 3) ejakulasi. 1) tingkah laku prakawin terdiri atas: membaui senyawa feromon dan melihat betina estrus dari relatif dekat, mendekati betina, kontak fisik dengan betina antara lain bertemu muka/moncong, mengendus area genital betina, menjilat area genital betina. Lalu menjilati penisnya sendiri, mengikuti betina dan sekali-sekali mencoba menaiki betina tanpa intromisi, pada tingkah laku ini hampir semua tikus betina estrus menerima dinaiki tikus jantan. Walaupun begitu ada sedikit betina estrus yang pada awalnya menolak halus ketika dinaiki. Setelah percobaan menaiki (*mounting*) beberapa kali, dilanjutkan dengan 2) kopulasi yang berlangsung sebentar saja dan diakhiri dengan 3) ejakulasi. Berdasarkan pengamatan diperoleh bahwa tikus-tikus jantan yang pernah kawin dengan kata lain berpengalaman kawin akan lebih berhasil melakukan *mounting*, kopulasi dan ejakulasi dibandingkan tikus jantan yang belum pernah kawin (Dissanayake *et al.* 2009; Sul'ain *et al.* 2011).

Sementara itu, pengamatan tingkah laku libido pada tikus jantan tua Sprague Dawley dilakukan oleh Ang *et al.* (2004). Temuannya bahwa waktu 10 menit adalah rerata waktu yang dibutuhkan oleh tikus jantan tua berumur 24 bulan untuk melakukan *mounting* awal atau menaiki setelah digabung dengan tikus betina estrus. Dengan dasar itu, waktu 10 menit menjadi waktu yang memadai untuk mengkaji tingkah laku tikus jantan dewasa yang sedang digoda libidonya oleh kehadiran tikus betina estrus. Di samping itu, Dissanayake *et al.* (2009) menemukan bahwa tikus jantan strain Wistar dewasa dalam suatu pengamatan selama 15 menit ketika digabung dengan betina estrus menunjukkan tingkah laku libido yang aktif. Tikus jantan melakukan ejakulasi samar paling awal pada rerata detik $489,50 \pm 67,66$. Selanjutnya, ketika pengamatan diteruskan 20-30 menit maka tikus jantan dapat melakukan percobaan intromisi ataupun kopulasi dengan frekuensi lebih banyak.

Peranan pasak bumi dalam membangkitkan libido tikus jantan tua yang lemah daya seksual berumur 24 bulan dikaji oleh Ang *et al.* (2004). Pemberian

minum dengan dosis 50 mg/100 g bobot badan (bb) fraksi air pasak bumi yang diberikan dua kali sehari selama 10 hari dilanjutkan pengamatan melalui tingkah laku menguap atau *yawning* dan meregangkan tubuh atau *stretching*. Gerakan *stretching* dan *yawning* dianggap suatu gerakan yang mencerminkan adanya peningkatan libido tikus tua. Diperoleh hasil bahwa pasak bumi berperan sebagai afrodisiaka pada tikus putih tua (Ang *et al.* 2004). Sebelum itu, ditemukan bahwa pemberian fraksi air pasak bumi dengan dosis 400 mg/kg bb pada jantan dewasa Sprague Dawley dapat menampilkan frekuensi tingkah laku *mounting* sejumlah $4,8 \pm 0,7$ dalam pengamatan 20 menit bersama betina estrus (Ang & Sim 1997).

UNIVERSITAS TERBUKA

**PENINGKATAN LIBIDO DAN DOSIS EFEKTIF PEMBERIAN
PASAK BUMI SEBAGAI AFRODISIACA PADA TIKUS PUTIH JANTAN**

**Libido Enhancement and Effective Dose of Pasak Bumi as Aphrodisiac
on Male White Rat**

Abstrak

Pasak bumi dikenal sebagai afrodisiaca di dalam pengobatan herbal tradisional Indonesia. Berkaitan dengan itu, penelitian telah dikerjakan untuk mengamati tingkah laku libido atau libido tikus jantan tanpa perkawinan setelah perlakuan pemberian seduhan pasak bumi. Pengamatan dilakukan menggunakan kandang yang dirancang dengan seekor tikus betina estrus di dalamnya yang dipisahkan dengan jaring kawat. Terdapat tiga perlakuan dosis seduhan pasak bumi yang diberikan kepada tikus putih jantan dewasa. Dosis 1 adalah 18 mg/200 g bobot badan (bb), dosis 2 adalah 100 mg/200 g bb, dosis 3 adalah 200 mg/200 g bb, dan kontrol diberikan akuades 1 ml. Tingkah laku kelamin yang mencerminkan libido diperoleh adalah: 1). mendekati sekat betina, 2). bertemu muka dengan muka 3). mengais atau menggigit sekat. Disimpulkan bahwa libido meningkat dipicu oleh pemberian seduhan pasak bumi. Efek libido yang meningkat signifikan terbaik dalam penelitian ini adalah pemberian seduhan pasak bumi dosis 1=18 mg/200 g bb. Sementara efek dosis 2=100 mg/200 g bb dan dosis 3=200 g bb lebih baik daripada kontrol tetapi lebih rendah dibandingkan efek dosis 1=18 mg/200 g bb.

Kata kunci: Pasak bumi, *Eurycoma longifolia*, libido, dosis

Abstract

*Pasak bumi was known as an aphrodisiac in Indonesian in using traditional herbal medicine. A research of sexual behaviour or libido on male rats after receiving Pasak bumi (*Eurycoma longifolia* Jack) was conducted to evaluate its effect. Observation was done by using a wire partitioned designed cage which allow Pasak bumi treated male rat to express their interested to an estrus female without mounting section. The doses of Pasak bumi evaluated were 18 mg/200 g bw, 100 mg/200 g bw, 200 mg/200 g bw, and a control which received orally 1 ml distilled water. The result indicated that there were 3 mayor activities were strongly noted; 1) get closed to female, 2) meeting face to face, 3). scratching/nipping partition. The data analysis showed that Pasak bumi stimulated the libido of experimental animals. Concern to the administrated dose effect on libido dose of 18 mg/200 g bw is the first choice then followed by 100 mg/200 g bw and 200 mg.*

Keywords: Pasak bumi, *Eurycoma longifolia*, libido, dose

PENDAHULUAN

Khasiat pasak bumi pada beberapa buku tanaman obat tradisional antara lain dinyatakan oleh Wijayakusuma (1994) dan Kardono *et al.* (2003) bahwa serbuk akar pasak bumi dengan air seduhan jika diminum beberapa kali dapat meningkatkan libido dan ketahanan ereksi pria. Kandungan kimia akar pasak bumi secara keseluruhan digunakan untuk memulihkan kemampuan ereksi dan kesegaran tubuh (Adimoelja 2000). Serbuk akar pasak bumi seberat 1 g dengan air seduhan 100 ml diminum pria dewasa sekali setiap hari selama tiga hari dapat meningkatkan nafsu makan dan libido. (Soedibyo 1998; Kardono *et al.* 2003; Biotech 2007).

Peranan pasak bumi dalam membangkitkan libido tikus jantan tua yang lemah daya seksual berumur 24 bulan dikaji oleh Ang *et al.* (2004). Pemberian minum dengan dosis 40 mg/200 g bb (bobot badan) fraksi air pasak bumi yang diberikan dua kali sehari selama 10 hari dilanjutkan pengamatan melalui tingkah laku menguap atau *yawning* dan meregangkan tubuh atau *stretching*. Gerakan *stretching* dan *yawning* dianggap suatu gerakan yang mencerminkan adanya timbul nafsu libido tikus tua. Diperoleh hasil bahwa pasak bumi mempunyai peran sebagai afrodisiaka pada tikus putih tua.

Tanaman pasak bumi merupakan pohon dengan habitus ramping dapat mencapai tinggi 15 m, dengan daun-daun berderet menyirip teratur, berdaun tipe pinatus dengan panjang dari pangkal tangkai 20-40 cm, setiap deret terdiri atas 13-41 lembar daun atau anak daun. Bunga pasak bumi adalah *dioecious* atau berumah dua, dengan bunga jantan dan bunga betina berada pada pohon yang berbeda. Bunga dihasilkan oleh suatu kelopak besar, masing-masing bunga terdiri atas 5-6 daun bunga sangat kecil. Buah yang masak berwarna hijau gelap kemerahan, panjang 1-2 cm dan lebarnya 0.5-1 cm (Lemmens 2003; Bhat & Karim 2010).

Berdasarkan informasi ilmiah dari kerja pasak bumi berkaitan dengan peningkatan libido masih sangat sedikit, maka perlu konfirmasi lebih jelas dengan melakukan penelitian untuk mengungkap kerja pasak bumi (*Eurycoma longifolia* Jack) pada tingkah laku libido hewan coba (tikus putih jantan) yang dapat menjadi model dalam memahami kerja pasak bumi pada manusia. Penggunaan

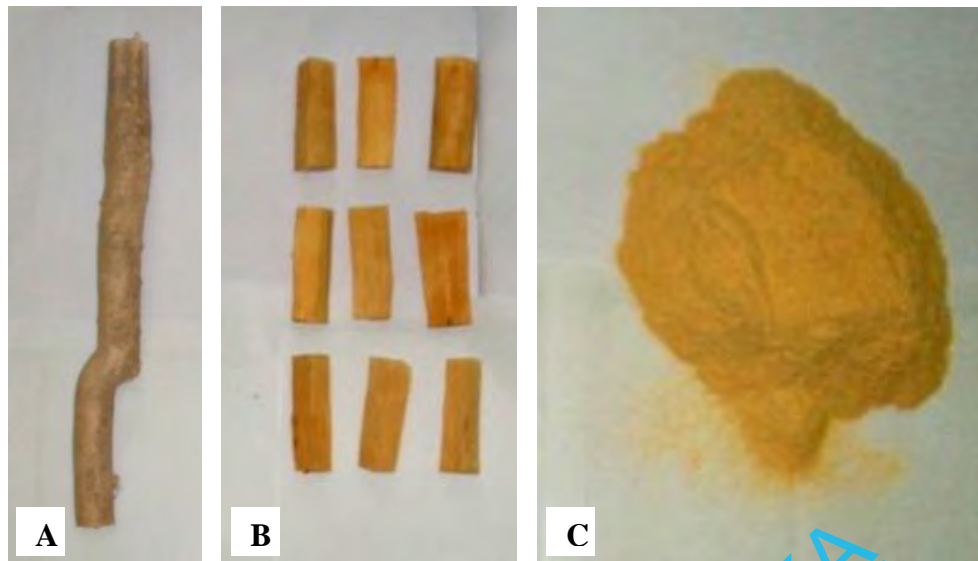
hewan coba sebagai model dapat menghindari biasanya data yang muncul dari faktor sugesti dan subjektivitas. Dua faktor tersebut kadang-kadang dianggap dapat membiaskan data (menjadi data bias) ketika yang diberi perlakuan untuk kajian tingkah laku libido adalah manusia.

Tujuan penelitian adalah 1) menjelaskan kerja pasak bumi sebagai afrodisiaka, khususnya berhubungan dengan parameter tingkah laku libido. 2). menetapkan dosis terbaik seduhan pasak bumi yang menimbulkan libido, untuk tahapan penelitian selanjutnya.

Manfaat pemahaman kerja pasak bumi pada tubuh akan meningkatkan kepercayaan pengguna tanaman obat herbal Indonesia (Menteri Pertanian RI 2004) dan mendukung pembuatan jamu afrodisiaka dalam skala industri yang bermanfaat ganda, yaitu: 1). melestarikan sumber plasma nutfah dan 2). mendatangkan devisa yang bernilai ekonomi.

BAHAN DAN METODE

Pembuatan serbuk akar pasak bumi (Gambar 11) dilakukan di laboratorium Hewan Coba dan Toksikologi Puslitbang Biomedis dan Farmasi Depkes Jakarta. Sumber akar tanaman pasak bumi diperoleh dari pasar jamu di Banjarmasin yang berasal langsung dari hutan-hutan di provinsi Kalimantan Selatan sehingga terjamin keasliannya. Tempat pemeliharaan tikus putih dan perlakuan pasak bumi dilakukan di kandang Laboratorium Patologi FKH IPB Bogor. Pengamatan tingkah laku dan pembuatan preparat sitologi *cheking* estrus tikus betina dengan cara *vaginal smears* dilakukan di Laboratorium Histologi FKH IPB Bogor.



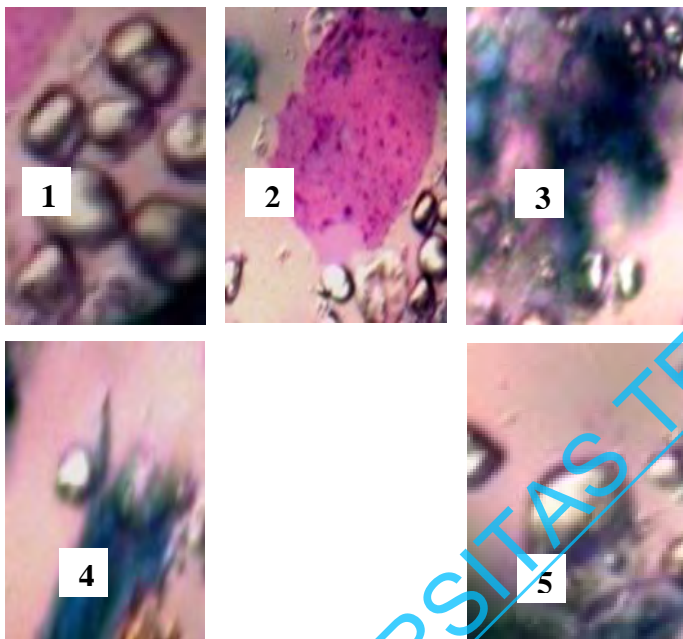
Gambar 11 Akar kering pasak bumi.
 A. Akar tanpa kulit
 B. Potongan akar untuk digiling
 C. Serbuk pasak bumi

Bahan Penelitian

Hewan coba berupa tikus putih jantan dewasa *Rattus norvegicus* strain Sprague Dawley berumur 3 ½ bulan dengan bobot 121-194 g. Sebelum diberi perlakuan pasak bumi, tikus putih diadaptasikan di kandang percobaan selama 2 minggu. Selama penelitian tikus putih diberi pakan dan minum *ad libitum*. Sejumlah 20 ekor tikus jantan dibagi dalam empat kelompok, yaitu: kelompok 1 (dosis seduhan 18 mg/200 g bobot badan (bb)), kelompok 2 (dosis seduhan 100 mg/200 g bb), kelompok 3 (dosis seduhan 200 mg/200 g bb), dan kelompok 4 (kontrol, 1 ml aquades/200 g bb). Setiap kelompok terdiri atas 5 ekor tikus sebagai ulangan. Hewan penggoda libido digunakan satu ekor tikus betina yang sedang estrus dipilih dari sejumlah 6 ekor tikus betina dengan umur dan strain yang sama. Tikus diperoleh dari laboratorium hewan coba Badan Pengawasan Obat dan Makanan (POM) di Jakarta.

Akar tanaman pasak bumi (*Eurycomae longifolia* Jack) diproses mengikuti cara Pratomo (1987) dan Depkes (2003) yang dimodifikasi sebagai berikut: dikuliti, bagian kayu dicuci bersih lalu ditiriskan dan dipotong-potong dengan ukuran panjang 7 cm, lebar 2 cm dan tebal 2 cm. Potongan dikeringkan

dalam oven pada suhu 50° C selama lima hari, selanjutnya dipotong kecil-kecil menggunakan pisau *stainless* tajam. Potongan akar kayu tersebut lalu digiling sampai halus menggunakan alat giling khusus untuk membuat tepung merk Wiley mill USA, lalu diayak dengan pengayak Mesh 50. Simplisia selanjutnya dimasukkan ke dalam kemasan kaca kedap udara disimpan di lemari kering. Determinasi mikroskopik serbuk akar pasak bumi juga dilakukan menggunakan pewarna Giemsa 10 % tampak pada Gambar 12.



Gambar 12 Gambaran mikroskopik serbuk pasak bumi : 1. Granula tepung, 2. Trachea, 3. Parenchyma, 4. Serat, 5. Sel batu.

Disain Kandang Pengamatan Tingkah Laku

Kandang pengamatan berupa kandang plastik berukuran panjang 44 cm, lebar 34 cm, tinggi 17 cm yang berlubang-lubang di keempat sisi dan atapnya. Kandang pengamatan disekat di bagian dalam dengan kawat jaring. Tikus betina penggoda diletakkan di dalam bagian ruang kecil (14 cm x 34 cm x 17 cm) sedangkan tikus putih jantan dimasukkan di bagian yang lebih luas (30 cm x 34 cm x 17 cm). Rancangan kandang seperti itu dapat mengakomodasi: 1). keleluasaan gerak tingkah laku tikus, 2). keleluasaan indra penglihatan dan penciuman tikus dengan lingkungan di sekitar dalam dan luar kandang. 3). Tingkah laku libido/seksual tikus ♂ keinginan kawin yang meningkat ketika terangsang betina estrus, tetapi tidak dapat melakukan kawin karena disekat jaring

kawat. 4). tidak terjadi ejakulasi karena dibutuhkan untuk pengukuran lanjutan kualitas semen/spermatozoa, dan 5). penghematan penggunaan kelompok tikus betina, karena tidak sampai terjadi perkawinan sehingga tidak terjadi fertilisasi dan kebuntingan, tetapi tetap mendapatkan tingkah laku khusus yang mencerminkan libido tikus jantan.

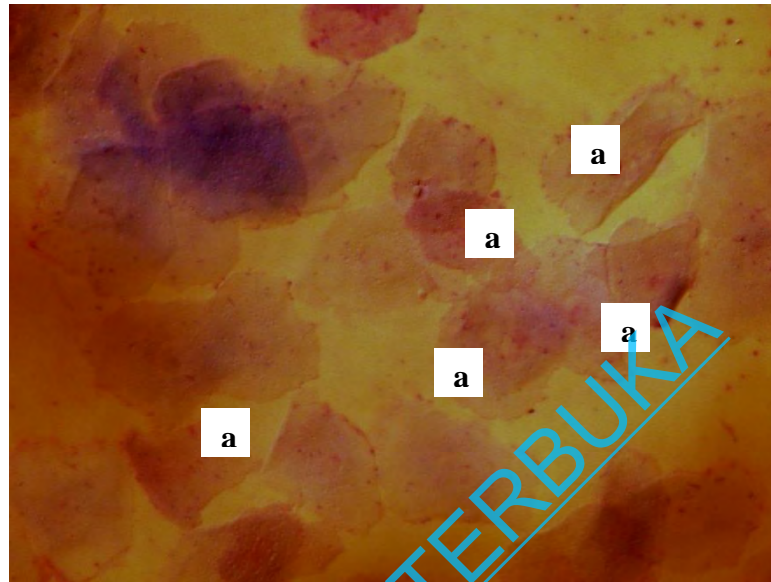
Pengamatan Tingkah Laku Libido Tikus Putih Jantan

Kajian tingkah laku libido tikus putih jantan dilakukan dengan pengamatan visual di siang hari, keadaan ruangan dibuat agak remang tanpa sinar lampu tetapi tingkah laku tikus jantan dapat diamati secara visual. Hal ini dilakukan untuk menghindari biasanya data karena tikus adalah hewan nokturnal; yang tanpa pemberian apapun akan aktif pada malam hari. Setelah diberi seduhan pasak bumi peroral pada pukul 9.00. WIB, setelah selang waktu 5 jam kemudian tingkah laku diamati per individu pada pukul 14.00 WIB selama 10 menit. Selama pengamatan berlangsung tidak disediakan pakan dan minum di dalam kandang. Data tingkah laku setiap tikus yang diberi perlakuan dicatat dalam lembar pengamatan frekuensi tingkah laku. Pengamatan tingkah laku libido tikus jantan dilakukan pada hari ke-1, 2, dan 3. Ulangan perlakuan setiap variasi dosis dilakukan sebanyak 5 kali. Sebagai kontrol digunakan aquades dengan volume sama per oral. Sebagai pemicu tingkah laku libido digunakan tikus betina estrus penggoda yang ditetapkan dari enam tikus betina yang telah dipersiapkan.

Pemeriksaan Status Reproduksi Tikus Betina

Observasi fase estrus selalu dilakukan untuk mendapatkan tikus betina estrus dari enam tikus betina yang digunakan untuk penggoda (*teaser*) tanggapan libido tikus jantan. Metode pemeriksaan status estrus mengikuti cara standar *vaginal smears* di laboratorium. Status estrus tikus betina dilakukan dengan memperhatikan ciri-ciri yang tampak di bawah mikroskop, yaitu fase sebagai berikut 1. Proestrus: didominasi oleh sel epitel berinti dan tidak berkornifikasi/lapisan tanduk, terdapat leukosit/monosit dengan frekuensi sedikit 2. Estrus: semua sel yang tampak adalah sel-sel epitel mengalami kornifikasi/lapisan tanduk. 3. Met-estrus: tampak sel-sel epitel berkornifikasi,

dikombinasikan dengan leukosit yang relatif banyak/ di antara sel-sel epitel tersebut. 4. Diestrus: didominasi oleh leukosit/monosit, tampak sedikit sel epitel berinti tidak berkornifikasi. Tampilan sitologi fase estrus terdapat pada Gambar 13.



Gambar 13 Tampilan sitologi fase estrus (pembesaran: 100 X). Sel-sel epitel vagina mengalami kornifikasi (a), pada fase ini tikus betina siap untuk kawin dan mengeluarkan senyawa vaginal feromon.

Penyiapan Seduhan Pasak Bumi

Frakasi air seduhan pasak bumi berupa: aquades setelah dipanaskan 80°C didiamkan 1 menit lalu ditambahkan ke serbuk pasak bumi dengan dosis tertentu (18 mg/200 g bb, 100 mg/200 g bb, 200 mg /200 g bb per 1 ml aquades). Setiap dosis disiapkan secara terpisah, lalu diaduk merata dan didiamkan sampai dingin. Selanjutnya supernatan dipisahkan untuk digunakan dalam penelitian.

Pemberian Pasak Bumi Dosis Seduhan 1, 2, 3

Pemberian pasak bumi dilakukan menggunakan sonde satu kali sehari peroral selama tiga hari dengan variasi dosis seduhan (18 mg/200 g bb, 100 mg/200 g bb, 200 mg /200 g bb) dan kontrol (aquades) sesuai kelompok dosis pada pagi hari pukul 9.00 WIB. Terdapat empat kelompok perlakuan (setiap kelompok terdiri atas 5 ekor tikus sebagai ulangan) sebagai berikut: kelompok 1 (dosis seduhan 18 mg/200 g bb), kelompok 2 (dosis seduhan 100 mg/200 g bb),

kelompok 3 (dosis seduhan 200 mg/200 g bb), dan kelompok 4 (kelompok kontrol=1 ml aquades/200 g bb).

Dosis seduhan 1 serbuk pasak bumi 18 mg/200g bb (=90 mg/kg bb tikus) yang digunakan adalah konversi dosis yang dipakai masyarakat dalam buku tanaman obat tradisional, yaitu untuk pria dewasa: satu gram pasak bumi ditambah air seduhan sejumlah 100 ml sehari sekali selama tiga hari (Soedibyo 1998, Kardono *et al.* 2003, Biotech 2007). Dosis seduhan 2, yaitu 100 mg/200 g bb di dalam 1 ml aquades adalah dosis yang menimbulkan efek peningkatan libido tikus jantan tua (Ang *et al.* 2004). Dosis seduhan 3, yaitu 200 mg/200 g bb adalah 2 kali dosis seduhan 2 sebagai dosis yang maksimal kekentalannya setelah ditambah dengan aquades sampai 1 ml. Sebagai kontrol, diadakan perlakuan dengan pemberian 1 ml aquades per oral.

Analisis Data

Dosis terbaik dari perlakuan yang diberikan akan diperoleh dengan membandingkan *mean* (rerata) dari frekuensi tingkah laku libido/libido berdasarkan perlakuan dosis seduhan 1=18 mg/200 g bb, 2=100 mg/200 g bb, 3=200 mg/200 g bb, dan kontrol=aquades 1 ml pada hari ke-1, 2, dan 3. *Mean* frekuensi tingkah laku libido yang tertinggi dari semua pengamatan pada hari ke-1, 2, 3 menunjukkan respons/tanggapan tingkah laku libido yang tertinggi berkaitan dengan pemberian dosis tersebut.

Perlakuan variasi dosis seduhan 1, 2, 3 pasak bumi dan periode hari ke-1, 2, 3 terhadap tingkah laku libido akan diuji dengan RAL faktorial dan bila ada pengaruh nyata pasak bumi akan diuji lanjut dengan uji Duncan sehingga menemukan dosis terbaik untuk libido dari variasi dosis yang diberikan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kajian Tingkah Laku

Tingkah laku tikus putih jantan di dalam kandang pengamatan ketika perlakuan kontrol dengan aquades adalah 15 variabel tingkah laku: 1). mendekati sekat/betina, 2). berdiri bertumpu dengan kaki belakang, 3). berputar, 4). mengendus sekeliling, 5). mengusap muka dengan kaki depan, 6). mengais/menggigit sekat betina, 7). bertemu muka / hadapan muka, 8). mengendus-endus atas, 9). mengais/mendorong sekam, 10). menggaruk muka dengan kaki belakang, 11). diam di pojok, 12). menjilat kaki depan, 13). menjilat kaki belakang, 14). menjilat pangkal ekor, dan 15). makan sekam

Dari lima belas gerakan tingkah laku itu, berdasarkan pengamatan tingkah laku (dalam 20 kali pengamatan pada jam 14.00 WIB, selama 10 menit) yang menunjukkan perhatian tikus kepada lingkungan luar kandang adalah: 1). mengendus atau membaui sekeliling dengan moncong ditempelkan ke lubang-lubang sekeliling kandang, dan 2). mengendus-endus atas dengan menempelkan moncong ke lubang-lubang atap kandang. Tingkah laku yang menunjukkan nafsu makan adalah: 1). mengais/mendorong sekam, 2). makan sekam. Sekam diberikan sebagai alas kandang yang terdiri atas hancuran kulit gabah kering.

Tingkah laku memperhatikan lingkungan luar dan nafsu makan dikontrol oleh suatu bagian di otak yang disebut sistem limbik (Guyton 1983). Sistem limbik terdiri atas: Bulbus olfaktori, hipotalamus, nukleus amigdala (basal ganglia), fornix, *cingulate gyrus* cerebrum, dan talamus. Sistem limbik mengendalikan beberapa fungsi antara lain: analisis terhadap lingkungan luar dan nafsu makan. Multifungsi sistem limbik, yaitu untuk mengontrol: 1). pengaturan tekanan emosi dari jalan pikiran, 2). menyaring kejadian-kejadian di luar dirinya ke dalam pernyataan atau ketetapan di dalam/internal diri, 3). menentukan suatu kejadian sebagai hal penting untuk dirinya, 4). menyimpan kisah-pengalaman yang bernilai emosi tinggi, 5). membangkitkan motivasi, 6). mengontrol nafsu makan dan waktu tidur, 7). meningkatkan keterikatan, 8). memproses secara

langsung indra penciuman, 9). mengendalikan libido (Guyton 1983; Ang & Sim 1997; Ang *et al.* 2004).

Berkaitan dengan tingkah laku libido, pada tikus jantan tua berumur 24 bulan tingkah laku libido yang menonjol ketika dihadirkan dengan tikus betina estrus menurut Ang & Lee (2002) dan Ang *et al.* (2004) adalah: 1. menjilati organ genitalnya sendiri, 2. *stretching* (peregangan), 3. *yawning* (menguap), dan 4. mengusap muka dengan kaki depan yang telah dijilat (seakan-akan bersolek). Tetapi berbeda dari hasil pengamatan dalam penelitian ini, tikus jantan dewasa berumur 3 ½ bulan yang terpicu libidonya karena kehadiran betina estrus yang disekat di dalam kandang, empat tingkah laku atau gerakan tersebut sangat jarang muncul. Hal demikian mungkin disebabkan bahwa jantan muda dewasa: 1) adanya sekat yang mencegah terjadinya jantan mencium area genital betina sehingga tidak menimbulkan tingkah laku urutan berikutnya seperti menjilati organ genitalnya sendiri. 2) oleh karena koordinasi persarafan motorik tikus jantan dewasa lebih kuat dibanding tikus jantan tua, sehingga libido pada tikus jantan dewasa muncul dalam bentuk aksi gerakan-gerakan kegiatan langsung mendekati betina walaupun telah disekat pemisah. Pada tikus jantan tua karena lebih lemah koordinasi persarafan motorik maka libido muncul dalam bentuk tidak langsung tetapi lebih mengarah pada sensasi seksual individual diri sendiri.

Tingkah Laku Libido Berdasarkan Perlakuan Dosis 1, 2, 3, dan Kontrol

Tingkah laku tikus putih jantan yang menonjol dengan kehadiran tikus betina estrus yang disekat ketika diberi perlakuan variasi dosis pasak bumi, yaitu: 1). mendekati sekat/betina, 2). mengendus sekeliling, 3). mengais/menggigit sekat betina, 4). bertemu muka/berhadapan muka, 5). mengendus-endus atas, 6). mengais/mendorong sekam, 7). makan sekam. Tingkah laku yang dilakukan di dalam kandang pengamatan selama 10 menit ditampilkan pada Tabel 2.

Tabel 2 Pengaruh dosis seduhan pasak bumi pada tingkah laku tikus jantan yang menonjol pada hari ke-1, 2, dan 3

Perlakuan dosis seduhan	Rerata frekuensi tingkah laku (kali)						
	1	2	3	4	5	6	7
1=18 mg/200 g bb	15,1±1,7 ^a	8,3±1,1 ^a	4,6±2,9 ^a	4,2±1,3 ^a	6,0±0,8 ^a	3,3±0,1 ^a	4,1±0,7 ^a
2=100 mg/200 g bb	13,4±2,6 ^b	8,5±0,7 ^a	4,0±2,8 ^a	3,6±2,4 ^{ab}	6,5±0,9 ^a	4,6±0,9 ^{a,b}	10,5±1,0 ^c
3=200 mg/200 g bb	10,7±2,8 ^c	5,6±1,2 ^b	4,8±2,8 ^a	2,7±1,8 ^b	8,1±1,2 ^a	5,6±0,7 ^b	6,3±0,5 ^b
Kontrol=Aquades 1 ml	9,1±1,9 ^d	4,1±0,3 ^b	3,1±2,1 ^a	1,4±1,1 ^c	6,6±0,4 ^a	4,9±0,4 ^{a,b}	6,2±0,4 ^b

Keterangan : Notasi huruf kecil superskript berbeda di dalam setiap kolom yang sama menyatakan perbedaan nyata ($\alpha = 5\%$, uji Duncan). 1, 3, 4 di arsir = menunjukkan tingkah laku keinginan kawin atau libido. 1= Mendekati sekat/betina, 2= Mengendus sekeliling, 3= Mengais/ menggigit sekat betina, 4= Bertemu muka / hadapan muka, 5= Mengendus-endus atas, 6= Mengais/mendorong sekam, 7= Makan sekam. bb= bobot badan tikus putih ♂

Berdasarkan frekuensi tingkah laku yang menunjukkan perhatian terhadap lingkungan dalam dan luar kandang, maka dosis seduhan 100 mg/200 g bb dan 200 mg/200 g bb tampak cenderung mempengaruhi peningkatan perhatian tikus jantan terhadap lingkungan luar dengan rerata (mean) frekuensi mengendus sekeliling tertinggi, yaitu 8,5 kali dan mengendus-endus atas, yaitu 8,1 kali (Tabel 2). Meskipun untuk frekuensi mengendus atas tidak berbeda nyata dengan perlakuan kontrol. Mengendus sekeliling mungkin indikator secara tidak langsung adanya libido.

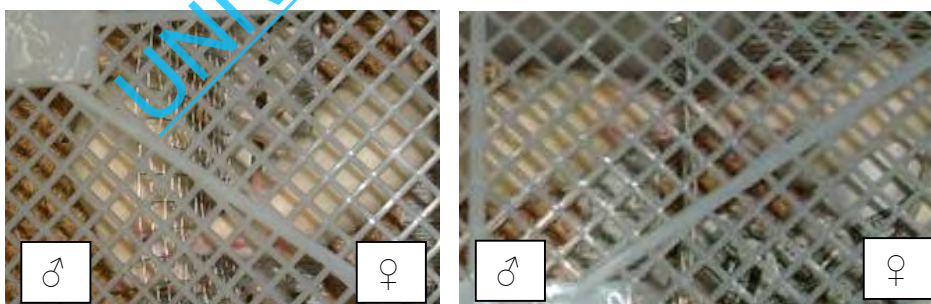
Dosis seduhan 2=100 mg/200 g bb dan 3=200 mg/200 g bb juga meningkatkan perhatian tikus jantan pada lingkungan dalam dan nafsu makan dengan rerata frekuensi makan sekam, yaitu 10,5 kali dan mengais/medorong sekam, yaitu 5,6 kali. Meskipun untuk frekuensi mengais/mendorong sekam tidak berbeda nyata dari kontrol. Dosis seduhan 18 mg/200 g bb mempunyai pengaruh pada tingkah laku yang menunjukkan keinginan kawin atau libido lebih tinggi dibanding pemberian pasak bumi dosis seduhan 100 mg/200 g bb, 200 mg/200 g bb, dan kontrol (Tabel 2). Tingkah laku yang menunjukkan keinginan kawin yang besar atau tingkah laku libido berdasarkan dari data Tabel 1 adalah bagian yang diarsir, yaitu: mendekati sekat/betina, mengais/menggigit sekat pemisah, dan berhadapan muka antara jantan dan betina. Namun perlakuan pasak bumi terhadap tingkah laku mengais/menggigit sekat pemisah memberikan hasil

yang tidak signifikan antara perlakuan dosis seduhan 18 mg/200 g bb, 100 mg/200 g bb dan 200 mg/200 g bb dengan kontrol.

Dosis Terbaik

Pemberian seduhan pasak bumi peroral pada jam 9.00 pagi dilanjutkan dengan pengamatan tingkah laku libido tikus putih jantan pada jam 14.00 siang selama 10 menit. Waktu 10 menit adalah rerata waktu yang dibutuhkan oleh tikus jantan tua berumur 24 bulan untuk melakukan percobaan *mounting* setelah digabung dengan tikus betina estrus (Ang *et al.* 2004). Dengan demikian, waktu 10 menit menjadi waktu yang memadai untuk mengkaji tingkah laku tikus jantan yang sedang digoda libidonya oleh kehadiran tikus betina estrus. Di samping itu juga karena penelitian ini menggunakan tikus jantan dewasa lebih muda (berumur 3 ½ bulan), tentu akan lebih singkat lagi selang waktu yang dibutuhkan untuk melakukan *mounting* atau mengawini tikus betina estrus jika kandang tidak disekat pemisah.

Berdasarkan data yang disajikan pada Tabel 2, tingkah laku libido yang muncul dengan pemberian pasak bumi peroral dosis seduhan 18 mg/200 g bb, 100 mg/200 g bb dan 200 mg/200 g bb mempunyai nilai mean frekuensi lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol/aquades. Tingkah laku libido yang berbeda secara nyata dengan pemberian pasak bumi dibanding kontrol adalah: mendekati sekat/betina dan bertemu/berhadapan muka (Gambar 14).



Gambar 14 Bertemu/hadapan muka. Salah salah satu tingkah laku libido yang utama (tampak dari atas kandang pengamatan).

Seduhan pasak bumi memberikan rerata frekuensi untuk kedua tingkah laku libido tersebut secara nyata. Pemberian dosis seduhan 1 menghasilkan frekuensi mendekati sekat/betina dan bertemu/berhadapan muka masing-masing sebesar 15,1 kali dan 4,2 kali, lebih tinggi daripada pemberian dosis seduhan 2

dan 3 (13,4; dan 3,6 kali) dan (10,7; dan 2,7 kali). Dengan demikian dosis seduhan 1 = 18 mg/200 g bb ditambah 1 ml aquades adalah dosis efektif untuk menimbulkan libido di dalam penelitian ini.

Jalur Mekanisme Pasak Bumi yang Diduga Meningkatkan Libido

Komponen fitokimia yang diekstrak dari akar pasak bumi dalam berbagai pelarut seperti air, metanol, diklorometan atau kloroform adalah: terpenoid, stigmasterol, sitosterol, sterol, saponin, quassinoid, campesterol, benzOkoinpon, alkaloid, skopoletin, piskidinol, nilositin, metoksisantin-mono-oksida, metoksisantin, melian, longilen, longilakton A dan B, hidroksieurikomalakton, hidroksisantin - mono-oksida, hidroksi dehidro eurikomalakton, hispidon, eurilene, durilakton, erikomanol-oD-glikopiranosid, eurikomanol, dihidroeurikomalakton (Kardono *et al.* 2003; Lemmens 2003). Ekstrak dengan pelarut air pasak bumi didapati kandungan utama: komponen fenol, tanin, polisakarida dengan bobot molekul tinggi, glikoprotein dan mukopolisakarida (Ang & Lee 2002). Di samping itu, tiga jenis kuasinoid, yaitu eurikolakton A, B dan C berhasil diisolasi dari akar pasak bumi (Ang *et al.* 2000), sedangkan dari batang dan kayu pasak bumi diperoleh kandungan tiga kuasinoid yang sitotoksik terhadap sel karsinoma dalam percobaan, yaitu 11 dehidroklainenon, eurikomalakton dan 5,6 dehidroeurikomalakton (Itokawa *et al.* 1992).

Pada penelitian kajian tingkah laku dan libido ini diduga kuat pasak bumi (dengan berbagai senyawa kandungannya secara sendiri-sendiri atau gabungan yang bersinergi) bekerja meningkatkan libido melalui mekanisme pengaktifan reseptor feromon, yaitu kemoreseptor spesifik pada mukosa olfaktori tikus putih jantan sebagai model hewan coba dalam penelitian. Berkaitan dengan fenomena pengaruh feromon pada hewan vertebrata dari segi fisiologis maupun tingkah laku telah diungkapkan oleh para peneliti. Pada beberapa spesies hewan di antaranya anjing, feromon betina dapat dideteksi oleh organ vomeronasal yang memancarkan informasi ke sistem limbik melalui bulbus olfaktori aksesori jantan. Beberapa peneliti telah mengidentifikasi keberadaan reseptor feromon yang diekspresikan pada mukosa olfaktori. Perangkat jaringan mukosa olfaktori telah diketahui sebagai kemoreseptor spesifik yang ikut terlibat dalam proses pelepasan

hormon, kontrol, serta koordinasi aktivitas seksual misalnya pada gerak-tingkah laku libido (Harper *et al.* 1979; Vandenberg 1983; Bergman 2000).

Tingkah laku libido atau libido dikelola oleh area tertentu di otak sebagai pusat sistem saraf. Dua area yang saling bertumpang tindih, yaitu *medial preoptik area* (MPO) dan inti dasar atau bed nukleus dari stria terminalis (BST) berfungsi sebagai pengendali libido. Menurut kajian anatomi menunjukkan bahwa area-area ini dan *medial amigdala* (MEA) yang sama seperti area MPO dan BST berfungsi juga mengendalikan tingkah laku libido atau libido. Ketiga area di otak tersebut mempunyai hubungan jaringan satu sama lain. Neuron-neuron/sel-sel saraf pada setiap area tadi mengandung reseptor androgen (RA) sendiri atau reseptor estrogen (RE) sendiri, atau mengandung dua tipe reseptor RA dan RE dalam neuron yang sama. Tingkah laku libido atau libido jantan atau pria dirubah atau dikurangi ketika senyawa antagonis hormon steroid androgen (antagonis RA) atau antagonis RE diberikan kepada MPO atau MEA dan juga BST. Tingkah laku libido/libido juga dikurangi dengan menonaktifkan enzim aromatase yang mengubah testosteron menjadi estradiol (E2). Region area yang saling berhubungan antara MEA, MPO dan BST merupakan jaringan yang sensitif terhadap hormon steroid (androgen dan estrogen). Tiga area tadi bekerja mengharmonikan dan mengkoordinasi tanggapan/respons tingkah laku libido/libido dengan tanggapan-tanggapan fisiologis dari kelenjar prostat, penis, dan organ-organ reproduksi lainnya yang bekerja dalam proses kopulasi dan inseminasi (Greco *et al.* 2003; Coolen *et al.* 1998; Johnson & Barry 1998; Nadelhaft *et al.* 2002; Paisley *et al.* 2005; Rosseli *et al.* 2003).

KESIMPULAN

Pemberian pasak bumi dosis seduhan 18 mg/200 g bb dalam 1 ml aquades meningkatkan libido yang tertinggi dibanding dosis seduhan 100 mg/200 g bb, dosis seduhan 200 mg/200 g bb, dan kontrol aquades 1 ml. Tingkah laku libido tikus putih jantan yang menonjol di dalam kandang pengamatan adalah: 1). mendekati sekat/betina, 2). bertemu muka/hadapan muka, 3). mengais/menggigit sekat betina.

Pasak bumi dosis seduhan 100 mg/200 g bb dan 200 mg/200 g bb mempengaruhi tingkah laku untuk perhatian terhadap lingkungan luar, lingkungan dalam kandang dan nafsu makan lebih tinggi dari pada dosis seduhan 18 mg/200 g bb dan kontrol. Tingkah laku tersebut adalah: mengendus sekeliling, mengendus-endus atas, mengais/mendorong sekam dan makan sekam.

DAFTAR PUSTAKA

- Adimoelja A. 2000. Phytochemical and the breakthrough of traditional herbs in the management of sexual dysfunction. *Int J Androl* 23 (2): 82-84
- Ang HH, Hitotsuyanagi Y, Takeya K. 2000. Eurycolactones A-C, novel quassinoids from *Eurycoma longifolia*. *Tetrahedron Pythochem* 41(35): 6849-6853
- Ang HH, Lee KL. 2002. Effect of *Eurycoma longifolia* Jack on orientation activities in middle-aged male rats. [Abstract] *Fund & Clin Pharmacol* 16 (6): 479
- Ang HH, Lee KL, Kiyoshi M. 2004. Sexual arousal in sexually sluggish old male rats after oral administration of *Eurycoma longifolia* Jack - tongkat Ali [Abstract]. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 15(3-4):303-9.
- Ang HH, Sim MK. 1997. *Eurycoma longifolia* Jack enhances libido in sexually experienced male rats. *Exp Anim* 6(4):287-90.
- Bergman A. 2000. *Molecular Biology of the Cell* 4th ed. Texas, New York: Garland Science.
- Biotech 2007. *Talinum paniculatum* Gaertn <http://biotech.tipo.gov.tw/plantjpg/1/Talinum> [3/01/2007]

- Coolen LM, Peters HJP, Veening JG. 1998. Anatomical interrelationships of the medial preoptic area and other brain regions activated following male sexual behavior: a combined fos and tract-tracing study. *J Comp Neurol* 397: 421–435.
- Depkes 2003. Standarisasi Sediaan Obat Herba. Makalah *Seminar Dan Pameran Nasional*. Kelompok Kerja Nasional Tumbuhan Obat Indonesia. Jakarta 25-26 Maret 2003.
- Gréco, B, Blasberg ME, Kosinski EC, Blaustein JD. 2003. Response of ER α -IR and ER β -IR cells in the forebrain of female rats to mating stimuli. *Horm Behav* 43: 444–453.
- Guyton AC. 1983. *Buku ajar fisiologi kedokteran*. Edisi 5, Alih bahasa Adji Dharma dan P Lukmanto. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Harper HA, Rodwell VW, Mayes PA. 1979. *Review of Physiological Chemistry 17th Ed.* Drawer L, Los Altos, California: Lange Medical Publications.
- Itokawa H, Kishi E, Morita H, Takeya K. 1992. Cytotoxic quassinoids and tirucallane type triterpenes from the woods of *Eurycoma longifolia*. *Chem Pharm Bull* 40(4): 1053-1055.
- Johnson MH, Barry JE. 1998. *Essential reproduction*. London: Blackwell Science Ltd.
- Kardono LBS, Artanti N, Dewiyanti ID, Basuki T. 2003. *Selected Indonesian medicinal plants: monographs and descriptions* vol 1. Jakarta: PT Gramedia Widiasarana Indonesia.
- Lemmens RHMJ. 2003. *Eurycoma* Jack. Di dalam: Lemmens RHMJ dan N Bunyapraphatsara, Editor. *Medicinal and poisonous plants 3. Plants Resources of South East Asia. No.12 (3)*. Leiden, Backhuys Publishers.
- Nadelhaft I, Miranda, Sousa AJ, Vera PL. 2002. Separate urinary bladder and prostate neurons in the central nervous system of the rat: simultaneous labeling with two immunohistochemically distinguishable pseudorabies viruses. *BMC Neurosci* 3: 1–11.
- Paisley JC, Huddleston GG, Denman HN, Carruth LL, Grober MS, Petrusis A, Clancy AN. 2005. Inhibition of estrogen receptor synthesis in the medial preoptic area, but not the medial amygdala, reduces male rat mating behavior. *Horm Behav* 48: 94-101
- Pratomo H. 1987. *Efek rimpang kunyit (*Curcuma domestica* Val) sebagai anti piretik pada tikus putih jantan yang didemamkan* [skripsi]. Jakarta: Fakultas Biologi UNAS.

- Roselli CF, Cross E, Poonyagariyagorn HK, Stadelman HL. 2003. Role of aromatization in anticipatory and consummatory aspects of sexual behavior in male rats. *Horm Behav* 44: 14-16
- Soedibyo BRAM. 1998. *Alam sumber kesehatan, manfaat dan kegunaan*. Jakarta: Balai pustaka.
- Vandenberg JG. 1983. *Pheromones and reproduction in mammals*. Orlando: Academic press Inc.
- Wijayakusuma Hembing. 1994. *Tanaman berkhasiat obat di Indonesia*. Jilid 3. Jakarta: Pustaka Kartini.

UNIVERSITAS TERBUKA

**TINGKAT AKTIVITAS SEL HIPOFISIS PRODUSEN HORMON-
HORMON REPRODUKSI SETELAH PEMBERIAN PASAK BUMI**

**The Activity of Reproductive Hormone Producing Cells of Hypophysis after
Pasak Bumi administration**

Abstrak

Penelitian dilanjutkan dengan menggunakan dosis efektif temuan, yaitu 18 mg/200 g (=90 mg/kg) bb untuk menentukan sel-sel hormon reproduksi tertentu apa saja yang tingkat aktivitasnya dipengaruhi oleh pemberian pasak bumi. Metode penelitian dilakukan dengan pendekatan teknik pewarnaan histologi hematoxilin eosin (HE) dan imunohistokimia menggunakan antibodi anti-LH dan antibodi anti-FSH. Pemberian pasak bumi sampai hari ke-3 meningkatkan proporsi jumlah sel basofil pada hipofisis daripada sel asidofil pada hipofisis. Sel basofil yang meningkat jumlahnya tersebut setelah dideteksi dengan pewarnaan imunohistokimia ternyata adalah sel yang mensintesis hormon LH intrasel setelah pemberian pasak bumi dosis seduhan 90 mg/kg bb sampai hari ke-3. Sementara itu, tingkat aktivitas sel yang memproduksi FSH intrasel dipertahankan dan tidak meningkat secara signifikan.

Kata kunci: pasak bumi, sel hipofisis, asidofil, basofil, LH intrasel, FSH intrasel

Abstract

Further study on the effect of pasak bumi at the dose of 18 mg/200 g (=90 mg/kg) body weight (bw) in 1 ml distilled water was done in order to understand its effect on reproductive hormone producing cells of Hypophysis. The approached was using histological method and stained by Haematoxilin and Eosin (HE) to identify basophile and acidophile cells population. In detail immunostaining using anti-LH antibody and anti-FSH antibody was aimed to evaluate LH and FSH cells distribution. The result showed that administration of Pasak Bumi at dosage of 90 mg/kg bw increased hipophysis basophile cells higher than acidophile cells in numbers. Moreover, the basophile cells producing LH increased significantly as compared to those in control. Meanwhile, the basophile cells producing FSH was affected by the pasak bumi administration

Keywords: pasak bumi, hypophysis cells, acidophile, basophile, intracellular LH, intracellular FSH.

PENDAHULUAN

Wijayakusuma (1994) dan Kardono *et al.* (2003) menyatakan bahwa seduhan serbuk akar pasak bumi dengan air jika diminum beberapa kali dapat meningkatkan libido dan ketahanan ereksi pria. Kandungan kimia akar pasak bumi secara keseluruhan digunakan untuk memulihkan kemampuan ereksi dan kesegaran tubuh (Adimoelja 2000; Bhat & Karim 2010). Serbuk akar pasak bumi seberat 1 g dengan air seduhan 100 ml diminum pria dewasa sekali setiap hari selama 3 hari dapat meningkatkan libido dan nafsu makan (Soediby 1998; Kardono *et al.* 2003; Biotech 2007).

Hasil penelitian pada tahapan sebelumnya menjelaskan bahwa pemberian pasak bumi dosis seduhan 18 mg/200 g bb dalam 1 ml aquades meningkatkan libido yang tertinggi dibanding dosis seduhan 100 mg/200 g bb, dosis seduhan 200 mg/200 g bb, dan kontrol (aquades 1 ml). Tingkah laku libido tikus putih jantan yang menonjol dengan kehadiran betina estrus yang dipisah/disekat jaring kawat di dalam kandang pengamatan adalah: 1). mendekati sekat/betina, 2). bertemu muka/hadapan muka, 3). mengais/menggigit sekat betina.

Peningkatan libido tikus jantan yang dikontrol di otak pada region area yang saling berhubungan, yaitu MEA, MPO dan BST akan mempengaruhi proses fisiologi lanjutan pada hipotalamus. Sel-sel neuron hipotalamus akan mengeluarkan *releasing hormone* (RH) untuk hormon reproduksi tertentu (Lucky 2010). Senyawa RH yang diekskresikan akan sampai pada hipofisis dan ditanggapi oleh sel-sel targetnya di hipofisis. Oleh karena itu perlu untuk diteliti tingkat aktivitas sel-sel yang memproduksi hormon di hipofisis setelah pemberian seduhan pasak bumi, sehingga akan dapat diketahui sel-sel hormon reproduksi tertentu apa saja yang aktivitasnya dipengaruhi oleh pemberian pasak bumi.

Penelitian bertujuan untuk menjelaskan kerja pasak bumi pada sel hormon-hormon reproduksi pada hipofisis yang meliputi: 1). sebaran sel-sel asidofil dan basofil pada hipofisis, 2). perubahan tingkat aktivitas sel-sel penghasil hormon FSH, 3) perubahan tingkat aktivitas sel-sel penghasil hormon LH.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Histologi Departemen Anatomi, Fisiologi, dan Farmakologi, Fakultas Kedokteran Hewan IPB.

Bahan Penelitian

Hewan percobaan menggunakan tikus putih jantan dewasa *Rattus norvegicus* strain Sprague Dawley berumur 3 ½ bulan dengan bobot 121-194 g. Tikus tersebut diperoleh dari Laboratorium Hewan Coba, Badan POM sejumlah 18 ekor jantan dan 6 betina, dengan rincian sebagai berikut: 9 ekor jantan dengan perlakuan pasak bumi yang akan dikorbankan 6 ekor menggunakan anestesi masing-masing 3 ekor (n=ulangan=3) pada hari ke-1 dan 3 ekor pada hari ke-3. Selebihnya 9 ekor jantan digunakan sebagai kontrol dengan pemberian aquades yang juga dikorbankan 6 ekor masing-masing 3 ekor pada hari ke-1 dan 3 ekor pada hari ke-3. Sejumlah 6 ekor tikus betina dipilih seekor yang sedang estrus untuk digunakan sebagai penggoda. Sebelum diberi perlakuan pasak bumi, tikus putih diadaptasikan di kandang hewan percobaan di laboratorium anatomi dan histologi FKH. Waktu adaptasi masing-masing selama 2 minggu. Selama penelitian tikus diberi pakan dan minum *ad libitum*.

Simplisia akar tanaman pasak bumi (*Eurycomae longifolia* Jack) dikuliti seperti pada pembuatan serbuk jamu lainnya (Depkes 2003; Pratomo 1987). bagian kayu dari akar pasak bumi yang relatif keras dicuci bersih lalu ditiriskan dan dipotong potong dengan ukuran panjang 7 cm, lebar 2 cm dan tebal 2 cm. Potongan dikeringkan dalam oven pada suhu 50°C selama 5 hari, selanjutnya dipotong kecil-kecil menggunakan pisau *stainless* tajam. Potongan akar kayu tersebut lalu digiling sampai halus menggunakan alat giling khusus untuk membuat tepung lalu disaring dengan pengayak Mesh 50 (ukuran pori = 300 µm). Simplisia selanjutnya disimpan dalam toples-toples di lemari kering.

Sebelum diambil jaringan hipofisis untuk analisis: 1) sebaran sel asidofil basofil, 2) tingkat aktivitas sel penghasil hormon FSH dan 3) tingkat aktivitas sel penghasil hormon LH, terlebih dahulu dilakukan perlakuan pemberian seduhan pasak bumi dan kontrol pada pukul 9.00 WIB. Selanjutnya pada pukul (pk1) 14.00 WIB diamati tingkah laku libido dengan digoda tikus betina estrus. Setelah itu

diambil sampel jaringan hipofisis dengan disain percobaan seperti penjelasan di berikut ini.

Disain Percobaan Pengambilan Sampel Jaringan

Pengambilan sampel jaringan pada hari ke-1 dan hari ke-3 dilakukan (Tabel 3) seperti berikut:

Tabel 3 Rancangan ketika pengambilan sampel jaringan

Waktu	Pkl 9.00 WIB	Selang 5 jam	Pkl. 14.00 WIB	Pkl 14.12 WIB
Hari ke-1, 2, 3	Pemberian pasak bumi	Tikus ♂ istirahat	Pengamatan tingkah laku libido 10 menit	Anastesi, sampling jaringan

Sebelum sampling jaringan, tikus putih dianastesi intraperitoneal dengan Ketamil yang berisi Ketamine 100 mg/ml dengan dosis 0,2 cc untuk 100-200 g bb. Penggunaan tikus dikorbankan untuk sampling jaringan sebagai berikut:

Hari ke-1 → 9 ekor tikus diberikan pasak bumi, 3 ekor dikorbankan untuk sampling jaringan.

Hari ke 2 → 6 ekor tikus diberikan pasak bumi.

Hari ke-3 → 3 ekor tikus diberikan pasak bumi, 3 ekor dikorbankan untuk sampling jaringan.

Sebagai kontrol dilakukan pemberian aquades 1 ml per oral per ekor tikus putih dengan ulangan sejumlah 3 ekor tikus setiap hari pada hari ke-1 sampai hari ke-3. Pengambilan sampel jaringan tikus kontrol dilakukan seperti kegiatan pada perlakuan pasak bumi, yaitu pada hari ke-1 dan ke-3. Semua sampel jaringan yang diperoleh difiksasi dalam larutan formaldehid 4 % dalam NaCl fisiologis 0,9 % disimpan selama 1 minggu dan selanjutnya dilakukan tahapan untuk evaluasi secara histologis (analisis mikromorfologi)

Analisis Mikromorfologi

Setelah jaringan sampel difiksasi selama 1 minggu, dilakukan dehidrasi dengan alkohol bertingkat selama 4 hari, kemudian *diclearing* dengan *xylol* dan dibloking dengan parafin histo, lalu disimpan dalam lemari pendingin beberapa

hari, dan selanjutnya diiris dengan alat mikrotom secara hati-hati berukuran tipis 4-5 μm . Analisis mikromorfologi dilakukan terhadap: aktivitas sel-sel hipofisis anterior berupa sel-sel asidofil dan basofil yang selanjutnya dilanjutkan dengan mengkaji sel-sel yang berperan dalam memproduksi hormon-hormon reproduksi LH dan FSH setelah pemberian pasak bumi. Sebaran sel-sel asidofil dan basofil dikaji dengan pewarnaan histokimia HE sedangkan penentuan aktivitas sel-sel hipofisis yang memproduksi hormon LH dan FSH melalui pewarnaan imunohistokimia.

Langkah Pewarnaan HE

Langkah-langkah pewarnaan HE (Kiernan 1990) adalah sebagai berikut:

1. Deparafinasi – rehidrasi (1-2 menit) , direndam di air kran selama 10 menit
2. Destilated water (DW)/Aquadest 3 - 5 menit
3. Pewarnaan dengan hematoksilin 1-2 menit
4. Perendaman di air kran 10 menit, lalu di aquades atau DW 5 menit
5. Pewarnaan dengan eosin, 2 menit.
6. Pemucatan warna eosin sekaligus proses dehidrasi dengan alkohol dan clearing dengan xylol secara bertingkat (alkohol 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 100 %/absolut 1, 2, 3 lalu xylol 1, 2, 3 masing-masing 3 kocokan kesamping/3 detik) lalu dikontrol di bawah mikroskop
8. *Slide* preparat yang sudah jadi terakhir di *mounting* dengan Entelan (Merck).

1) Pengukuran Distribusi Sel Sel Asidofil dan Basofil pada Hipofisis

Slide preparat hipofisis yang diwarnai dengan pewarnaan HE diamati di bawah mikroskop pembesaran 400 kali (10 x pada lensa Okuler, 40 x pada lensa objektif). Respons sel-sel pada hipofisis diamati setelah pemberian seduhan pasak bumi dosis terbaik hasil yang sudah diperoleh, yaitu 18 mg/200 g bb dalam 1 ml aquades. Kajian mikromorfologi sel-sel hipofisis tikus putih jantan yang diamati adalah pada perlakuan hari ke-1 sampai hari ke-3. Analisis distribusi jumlah sel-sel asidofil dan basofil dihitung dari setiap kelompok/populasi 50 sel

hipofisis. Penghitungan jumlah kepadatan/distribusi sel asidofil dan basofil dilakukan pada sepuluh area lapang pandang dari sejumlah *slide* ulangan (tiga ulangan) yang dipilih. Penghitungan dimulai dari titik paling atas lingkaran populasi 50 sel dilanjutkan ke kanan memutar sesuai arah jarum jam terus melingkar ke arah dalam. Data untuk setiap perlakuan kemudian dihitung reratanya.

2) Menentukan Kerja Pasak Bumi Terhadap Tingkat Aktivitas Sel Penghasil Hormon FSH pada Hipofisis

Sebelum dibedah untuk disampling jaringan hipofisis, tikus putih diperlakukan seperti pada Tabel 4 berikut:

Tabel 4 Rancangan kegiatan untuk pengambilan sampel sel FSH hipofisis

Waktu	Pkl 9.00 WIB	Selang 5 jam	Pkl. 14.00 WIB	Pkl 14.12 WIB
Hari ke-1, 2, 3	Pemberian pasak bumi	Tikus ♂ istirahat	Pengamatan tingkah laku libido 10 menit	Anastesi, sampling Jaringan

Sampling hipofisis dilakukan pada kelompok kontrol dan perlakuan pasak bumi pada hari ke-1 dan hari ke-3. Perlakuan yang dilakukan untuk analisis respons sel penghasil FSH hipofisis, yaitu: 1) pemberian aquades 1 ml pada kelompok kontrol pada hari ke-1 sampai hari ke-3. 2) pemberian dosis seduhan pasak bumi terpilih, yaitu 18 mg/200 g bb pada kelompok perlakuan pada hari ke-1 sampai hari ke-3.

Pengambilan hipofisis dilakukan dengan menggunakan pinset ujung runcing dengan bantuan penglihatan di bawah mikroskop Olympus binokuler dengan tambahan lampu cahaya yang cukup kuat. Sebelum itu, tengkorak kepala tikus dibuka dengan menggunakan gunting bedah secara hati-hati, organ hipofisis yang berukuran lebih kecil dari ujung pentol korek api terletak di dasar di bawah cerebelum. Hipofisis yang telah diambil lalu difiksasi di dalam alkohol 70 % dalam tabung ependorf. Selanjutnya *ditrimming* di basket histo di dalam Paraformaldehid 4 % dalam NaCl fisiologis 0,9 %.

Prosedur pendeteksian sel-sel penghasil hormon FSH dengan metode imunohistokimia mengikuti cara Kiernan (1990) yang dimodifikasi, yaitu:

1). slide preparat hipofisis hasil pemotongan dengan mikrotom (telah melewati tahapan dehidrasi, *clearing*, parafinasi, *embedding*, dan *blocking*) yang telah disimpan di inkubator 40°C dikeluarkan lalu diletakkan dalam jajaran kotak rak logam perendaman dengan posisi tidur di dalam inkubator 65°C selama 3 menit untuk pencairan parafin, 2). rehidrasi/deparafinasi, dengan langkah-langkah, yaitu: perendaman masing-masing *slide* selama 3 menit dipindahkan dari satu botol ke botol berikutnya secara berurutan *xylol* 3, *xylol* 2, *xylol* 1, lalu alkohol absolut 3, alkohol absolut 2, alkohol absolut 1, diteruskan ke dalam botol alkohol 95 %, 90 %, 80 %, 70 %, dan aquades (perendaman di dalam aquades lebih lama \pm 20 menit), 3). bagian bawah slide dikeringkan dengan kertas saring, lalu ditandai lingkaran pada bawah *slide* hipofisis dengan marker, (marker yang digunakan adalah immEdge vector laboratories Inc Burlingame CA 94010), direndam lagi di dalam aquades 30 menit, 4). diangkat lalu *slide* dijajarkan dengan bagian yang ditandai marker di bawahnya, dan ditetesi larutan *phosphate buffered saline* (PBS) 0,1 N didiamkan selama 5 menit, hal ini dilakukan tiga kali (dengan cara ditetesi PBS 0,1 N didiamkan 5 menit, PBS dibuang, lalu penetesan PBS ke dua dan didiamkan 5 menit, PBS dibuang, lalu penetesan PBS ke tiga dan didiamkan 5 menit), selanjutnya 5). Diberi/ditetesi *normal goat serum* (NGS) sejumlah 5-10 % dalam PBS dan didiamkan 30 menit dalam perendaman tetesan NGS, lalu kotak tempat jajaran slide ditutup untuk mencegah kontaminasi eksternal 6). pencucian dengan PBS dilakukan lagi tiga kali seperti no 4), 7). ditetesi antibodi primer hormon *follicle stimulating hormone* (FSH) yang telah diencerkan 500 kali, dan didiamkan pada kotak tertutup tanpa cahaya selama satu malam/*overnight* dengan suhu ruang 27°C, 8) setelah melewati satu malam inkubasi, dilakukan pencucian dengan PBS lagi sebanyak dua kali, 9). dilakukan kembali pencucian dengan PBS sebanyak tiga kali, pada kali yang ke-3 perendaman PBS sekitar 20-30 menit, 10). PBS dibuang lalu ditetesi *secondary antibody* dan direndam, didiamkan selama 45 menit dengan kotak tertutup, 11). pencucian kembali dengan PBS tiga kali 5 menit, 12). PBS dibuang lalu ditetesi pewarna kromogen deamin benzedin (DAB), didiamkan 1 detik lalu pewarna DAB dibuang, 13). slide dengan raknya direndam di aquades selama 15-20 menit, 14). dilakukan dehidrasi dengan cara bergiliran 3 slide – 3 slide direndam

dipindah dalam satu botol ke botol berikutnya, yaitu botol alkohol 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, dengan dikocok perlahan tiga kali lalu didiamkan 1 menit, 15). lalu ke botol alkohol absolut dengan dikocok tiga kali dan didiamkan 2 menit berurutan alkohol absolut 1, 2, dan 3, 16). lalu ke botol xylol dengan dikocok tiga kali dan didiamkan 2 menit berurutan *xylol* 1, 2, dan 3, 17). Langkah terakhir ialah *mounting* dengan ditetesi entelan dan penutupan menggunakan *cover glass* secara hati-hati.

Analisis kerja pasak bumi pada sel-sel penghasil hormon FSH dilakukan pada setiap perlakuan yang dianalisis dari sepuluh area lapang pandang pada sejumlah slide ulangan (tiga ulangan) yang dipilih. Penghitungan sel dimulai dari titik paling atas lingkaran dilanjutkan ke kanan memutar sesuai arah jarum jam terus melingkar ke arah dalam. Data kemudian dihitung reratanya untuk setiap perlakuan. Pengamatan dan analisis mikromorfologi sel-sel penghasil hormon FSH pada hipofisis menggunakan mikroskop cahaya binokuler dengan pembesaran 400 kali. Setelah tahap penentuan aktivitas sel-sel penghasil hormon FSH dilakukan, selanjutnya dilakukan tahapan berikutnya, yaitu menentukan kerja pasak bumi pada tingkat aktivitas sel penghasil hormon LH pada hipofisis.

3). Menentukan Kerja Pasak Bumi pada Tingkat Aktivitas Sel Penghasil LH pada Hipofisis

Sebelum dilakukan sampling jaringan hipofisis, tikus putih diperlakukan seperti pada Tabel 5 berikut:

Tabel 5 Rancangan kegiatan untuk pengambilan sampel sel LH hipofisis

Waktu	Pkl 9.00 WIB	Selang 5 jam	Pkl. 14.00 WIB	Pkl 14.12 WIB
Hari ke-1, 2, 3	Pemberian pasak bumi	Tikus ♂ istirahat	Pengamatan tingkah laku libido 10 menit	Anastesi, sampling Jaringan

Perlakuan yang dilakukan untuk analisis respons sel penghasil *luteinizing hormone* (LH) hipofisis, yaitu: 1) pemberian aquades 1 ml/200 g bb pada kelompok kontrol pada hari ke-1 sampai hari ke-3. 2) pemberian dosis seduhan pasak bumi terpilih, yaitu 18 mg/200 g bb pada kelompok perlakuan pada hari ke-

1 sampai hari ke-3. Sampling hipofisis dilakukan pada kelompok kontrol dan perlakuan pasak bumi pada hari ke-1 dan hari ke-3.

Sebelum pendeteksian dilakukan pengambilan atau sampling hipofisis dengan menggunakan pinset ujung runcing dengan bantuan penglihatan di bawah mikroskop Olympus binokuler dengan tambahan lampu cahaya yang cukup kuat. Sebelum itu, tengkorak kepala tikus dibuka dengan menggunakan gunting bedah secara hati-hati, organ hipofisis yang berukuran lebih kecil dari ujung pentol korek api terletak di dasar di bawah cerebellum. Hipofisis yang telah diambil untuk sementara disimpan difiksasi di dalam alkohol 70 % dalam tabung ependorf. Selanjutnya di *trimming* di basket histo di dalam Paraformaldehid 4 % dalam NaCl fisiologis 0,9 %.

Prosedur pendeteksian sel-sel penghasil hormon LH dengan metode imunohistokimia mengikuti cara Kiernan (1990) yang dimodifikasi. Pendeteksian analisis respons sel penghasil *luteinizing hormone* (LH) hipofisis dilakukan dengan langkah-langkah hampir sama seperti yang dilakukan pada metode pendeteksian sel-sel penghasil hormon FSH. Tetapi berbeda pada langkah no 7) dan no 10) dengan menggunakan antibodi antihormon LH. Evaluasi sebaran sel LH dideteksi dengan menggunakan *immunostaining* memakai antibodi anti-LH dengan pengenceran 1000 kali. Antibodi diinkubasikan selama satu malam selanjutnya direaksikan dengan immunostaining kit dan divisualisasikan dengan diamine benzedine (DAB).

Analisis kerja pasak bumi pada sel-sel penghasil hormon LH dilakukan pada setiap perlakuan didata dari sepuluh area lapang pandang pada sejumlah slide ulangan (tiga ulangan) yang dipilih. Penghitungan sel dimulai dari titik paling atas lingkaran dilanjutkan ke kanan memutar sesuai arah jarum jam terus melingkar ke arah dalam. Data kemudian dihitung reratanya untuk setiap perlakuan. Pengamatan dan analisis mikromorfologi sel-sel penghasil hormon LH pada hipofisis menggunakan mikroskop cahaya binokuler dengan pembesaran 400 kali.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian tingkat aktivitas sel hipofisis produsen hormon-hormon reproduksi setelah pemberian pasak bumi terdiri atas tiga subpenelitian, yaitu: 1). distribusi/sebaran sel asidofil-basofil hipofisis, 2). tingkat aktivitas sel-sel penghasil hormon LH pada hipofisis, dan 3). tingkat aktivitas sel-sel penghasil hormon FSH pada hipofisis.

1). Distribusi Sel Asidofil dan Basofil Hipofisis

Respons sel-sel pada hipofisis diamati setelah pemberian seduhan pasak bumi dosis terbaik hasil dari kajian bagian pertama, yaitu dosis seduhan pasak bumi = 18 mg/200 g bb dalam 1 ml aquades. Kajian mikromorfologi sel-sel hipofisis tikus putih jantan yang diamati adalah pada perlakuan: 1). Pemberian aquades 1 ml pada hari ke-1, 2). Pemberian aquades 1 ml sampai hari ke-3. 3). Pemberian dosis seduhan terbaik pasak bumi (18 mg/200 g bb) hari 1, 4). Pemberian dosis seduhan terbaik pasak bumi 18 mg/200 g bb sampai hari ke-3. Hasil analisis distribusi sel-sel asidofil dan basofil dari setiap kelompok 50 sel hipofisis ditampilkan reratanya pada Tabel 6.

Tabel 6 Distribusi jumlah sel-sel asidofil dan basofil pada hipofisis setelah perlakuan pasak bumi dan kontrol/aquades.

No	Perlakuan	Asidofil (rerata±SD)	Basofil (rerata±SD)
1	Aquades hari ke-1	21,2±1,3 ^a	28,8±1,3 ^a
2	Aquades hari ke-3	21,9±0,5 ^a	28,1±0,5 ^a
3	Pasak bumi hari ke-1	22,1±0,7 ^a	27,9±0,7 ^a
4	Pasak bumi hari ke-3	14,8±0,9 ^b	35,2±0,8 ^b

Keterangan: Notasi huruf kecil superskrip berbeda pada kolom yang sama menyatakan perbedaan nyata pada taraf 5 %, Uji Duncan $\alpha = 0,05$.
SD=Standar deviasi

Sebaran sel hipofisis diidentifikasi dengan pewarnaan HE dapat mengenali sel-sel asidofil dan basofil. Sel-sel asidofil merupakan sel-sel yang menyerap warna asam dari HE sehingga akan tampak sitoplasmanya berwarna pink atau merah muda cerah, secara keseluruhan sitoplasma sel-sel asidofil

bersifat basa sehingga mengikat pewarna asam. Sel-sel basofil merupakan sel-sel yang menyerap warna basa dari HE sehingga akan tampak sitoplasmanya berwarna keunguan atau kebiruan, secara keseluruhan sitoplasma sel-sel basofil bersifat asam sehingga mengikat pewarna basa.

Sebaran sel asidofil pada hipofisis dengan perlakuan aquades pada hari ke-1 sampai hari ke-3 terjadi sedikit peningkatan, yaitu dari rerata 21,2 sel menjadi 21,9 sel, tetapi tidak signifikan secara statistik (uji Duncan, $\alpha = 0,05$). Sedangkan sebaran sel asidofil pada hipofisis dengan perlakuan pasak bumi dosis seduhan 1 pada hari ke-1 sampai hari ke-3 terjadi penurunan, yaitu dari rerata 22,1 sel menjadi 14,8 sel yang secara statistik dengan uji Duncan berbeda nyata (Tabel 5, uji Duncan, $\alpha = 0,05$).

Sebaliknya, sebaran sel basofil pada hipofisis dengan perlakuan aquades pada hari ke-1 sampai hari ke-3 terjadi sedikit penurunan, yaitu dari rerata 28,8 sel menjadi 28,1 sel, tetapi tidak signifikan secara statistik (uji Duncan taraf nyata 5 % , $\alpha = 0,05$). Sebaran sel basofil pada hipofisis dengan perlakuan pasak bumi dosis seduhan 1 pada hari ke-1 sampai hari ke-3 terjadi peningkatan signifikan, yaitu dari rerata 27,9 sel menjadi 35,2 sel (uji Duncan, $\alpha = 0,05$).

Hipofisis anterior adalah lobus anterior dari hipofisis yang merupakan bagian paling besar dan penting dari organ hipofisis. Pada mamalia dan manusia lobus ini kira-kira hampir 70 % dari bobot total kelenjar. Hipofisis anterior secara histologi terdiri atas sel-sel epitel kelenjar dari berbagai ukuran dan bentuk yang tersusun dalam jalur-jalur yang relatif luas dan sirkuler serta dipisahkan oleh saluran-saluran yang mengandung darah. Hipofisis dengan pewarnaan HE dibedakan atas tiga jenis sel, yaitu: sel kromofob (neutrofil) sukar diwarnai, sel kromatin mengambil warna asam (eosinofil) seperti sel penghasil prolaktin adalah asidofilik, dan sel kromatin mengambil warna basa (basofil). Sel penghasil LH dan FSH pada hipofisis adalah basofilik (Harper *et al.* 1979; Norman & Litwack 1987; Bergman 2000).

Mekanisme pasak bumi yang berfungsi sebagai *trigger* hormonal tertentu sehingga meningkatkan sebaran sel-sel basofil penghasil hormon LH dan FSH pada hari ke-3 sebagai kinerja pasak bumi yang mekanismenya diduga melalui pengaktifan sumbu hipotalamus-hipofisis/hipofisis anterior dan adrenal (HPA)

tikus jantan. Secara khusus, feromon tikus betina estrus dapat merangsang pelepasan GnRH dari hipotalamus tikus jantan. Pengaktifan aksis sumbu HPA oleh pasak bumi dengan adanya pelepasan GnRH selanjutnya merangsang atau memicu pelepasan hormon gonadotropin LH dan FSH dari kelenjar hipofisis/hipofisis anterior yang ditunjukkan oleh peningkatan sel-sel basofil. Kerja sinergi dari LH dan FSH selanjutnya bekerja pada jaringan testis khususnya pada tubulus seminiferus dan sel target, yaitu sel-sel Leydig dan sel-sel Sertoli (Squires 2003). Kedua sel-sel tersebut selanjutnya bersinergi misalnya dalam pembentukan hormon testosteron dan meningkatkan perkembangan sel-sel spermatogonia dalam proses spermatogenesis, yang akan menjadi spermatozoa pada jantan dewasa. Sementara itu, Harper *et al.* (1979) dan Norman & Litwack (1987) menyebutkan kelimpahan jumlah spermatozoa dan peningkatan kadar testosteron akan juga menimbulkan peningkatan libido.

2). Tingkat Aktivitas Sel-Sel Penghasil Hormon LH

Berdasarkan temuan bahwa pada hari ke-3 pemberian seduhan pasak bumi dengan dosis 18 mg/200 g bb terjadi peningkatan bermakna sel-sel basofil pada hipofisis. Sementara itu diketahui bahwa sel-sel basofil adalah sel-sel yang memproduksi hormon LH dan FSH. Maka penelitian dilanjutkan untuk mengkaji tanggapan atau respons/kerja sel-sel penghasil hormon LH pada hipofisis melalui pendekatan metode imunohistokimia. Analisis mikromorfologi sel-sel hipofisis tikus putih jantan yang diamati adalah pada perlakuan: kontrol pada hari ke-1, dan hari ke-3, Serta pemberian dosis seduhan pasak bumi 18 mg/200 g pada hari ke-1, dan hari ke-3.

Tingkat respons kerja sel-sel penghasil hormon LH diekspresikan dalam gradasi warna kromogen yang diikat oleh kompleks antigen-antibodi LH pada sel-sel hipofisis penghasil hormon LH. Respons/kerja sel-sel penghasil LH yang sangat aktif/kuat ditandai dengan visualisasi warna cokelat tua (positif 3) yang berarti di dalam sel tersebut disintesis hormon LH dalam konsentrasi maksimal secara kualitatif. Urutan berikutnya tingkatan yang sedikit lebih rendah kandungan hormon LH ditunjukkan dengan visualisasi warna cokelat untuk positif

2 dan warna coklat muda untuk positif 1, rerata jumlah sel-sel penghasil LH sesuai dengan tingkat kelompok respons/kerja terdapat pada Tabel 7.

Tabel 7 Jumlah sel-sel penghasil LH pada hipofisis setelah perlakuan aquades dan pasak bumi pada hari ke-1 sampai hari ke-3.

No	Perlakuan	Jumlah sel-sel (rerata \pm SD) penghasil LH			
		Positif 3	Positif 2	Positif 1	Total
1	Aquades hari ke-1	7,2 \pm 0,3 ^a	19,9 \pm 0,5 ^a	15,6 \pm 2,2 ^a	41,8 \pm 2,1 ^a
2	Aquades hari ke-3	14,4 \pm 0,7 ^b	24,5 \pm 1,6 ^a	17,8 \pm 1,0 ^{ab}	56,7 \pm 1,6 ^b
3	Pasak bumi hari ke-1	8,0 \pm 0,3 ^a	21,2 \pm 1,8 ^a	17,1 \pm 1,6 ^{ab}	46,3 \pm 1,2 ^a
4	Pasak bumi hari ke-3	32,4 \pm 4,5 ^c	28,0 \pm 2,7 ^b	23,4 \pm 3,4 ^b	82,8 \pm 4,9 ^c

Keterangan: huruf kecil superskrip berbeda pada kolom yang sama menyatakan perbedaan nyata pada taraf 5 %, Uji Duncan $\alpha = 0,05$.

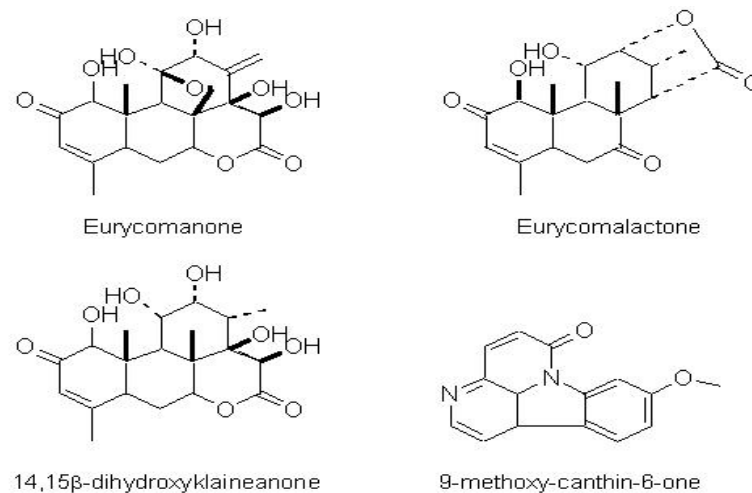
Data pada Tabel 7, menunjukkan bahwa pemberian pasak bumi dosis seduhan 1 meningkatkan aktivitas respons/kerja sel-sel penghasil hormon LH secara nyata pada hari ke-3 (uji Duncan $\alpha = 0,05$). Sel-sel penghasil LH diaktifkan kerjanya dengan kuat ditunjukkan dengan peningkatan jumlah sel-sel LH positif 3 dari hari ke-1 ke hari ke-3 (8,0 menjadi 32,4 sel), yang meningkat lebih dari dua kali lipat dibandingkan dengan kontrol (pemberian aquades) dari 7,2 sel menjadi sejumlah 14,4 sel. Demikian pula terjadi peningkatan yang nyata jumlah sel-sel penghasil LH positif 2 dan positif 1 dari hari ke-1 sampai hari ke-3 dibandingkan dengan kontrol dari hari ke-1 sampai hari ke-3. Secara keseluruhan, terjadi peningkatan produksi hormon LH intrasel yang nyata pada hipofisis setelah pemberian pasak bumi sampai hari ke-3. Total sel yang positif LH hari ke-3 adalah 82,8 sel dibandingkan kontrol pada hari ke-3, yaitu 56,7 sel (uji Duncan, $\alpha = 0,05$).

Sintesis produksi LH hipofisis pada hari ke-1 setelah pemberian pasak bumi telah terjadi peningkatan dibandingkan dengan kontrol. Peningkatan sintesis LH pada hari ke-1 ditunjukkan pada semua tingkatan kelompok respons/kerja baik positif 3, 2, maupun 1. Jumlah sel LH perlakuan semua tingkatan respons/kerja pada hari ke-1 adalah: 8,0; 21,2; 17,1; dan 46,3 sel, lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol (perlakuan aquades) hari ke-1, yaitu: 7,2; 19,9;

15,6; dan 41,8 sel . Walaupun demikian, peningkatan produksi LH pada hari ke-1 secara statistik tidak berbeda nyata dengan kontrol hari ke-1 (Tabel 7).

Berdasarkan temuan hasil (Tabel 7) maka dapat disebutkan bahwa pasak bumi merupakan *trigger* yang kuat untuk sintesis/produksi hormon LH. Mekanisme pengaktifan respons kerja sel-sel hipofisis yang memproduksi LH biasanya didahului oleh peningkatan kadar GnRH untuk LH (GnRH-LH) yang disekresikan oleh hipotalamus. Berkaitan dengan perlakuan pasak bumi sampai hari ke-3 yang meningkatkan kadar LH dapat diduga disebabkan oleh suatu senyawa kandungan pasak bumi (secara sendiri-sendiri atau bersinergi) yang memerankan fungsi GnRH-LH dari hipotalamus sehingga merangsang sel-sel produsen LH di hipofisis untuk melakukan peningkatan sintesis LH. Jadi, kandungan pasak bumi tersebut antara lain eurikomanon beserta derivatnya (Gambar 15) dan atau longilakton berperan sebagai GnRH-LH.

Mekanisme pasak bumi yang lain mungkin melalui jalan: Setelah dikenali adanya feromon dari tikus betina estrus ditambah dengan kehadiran tikus betina tersebut, maka reseptor feromon pada mukosa olfaktori tikus jantan diperkuat kerjanya. Penguatan respons/kerja diduga dilakukan oleh salah satu atau beberapa senyawa kandungan pasak bumi, misalnya eurikomanon dengan derivatnya dan atau longilakton. Reaksi sinyal dari reseptor feromon yang sudah diperkuat oleh pasak bumi ke areal *medial preoptik area* (MPO), *medial amigdala* (MEA), dan bagian bed nukleus dari stria terminalis (BST) yang berfungsi sebagai pengendali libido, dapat merangsang pelepasan GnRH-LH dari hipotalamus dan lebih lanjut merangsang atau memicu pelepasan hormon gonadotropin LH dari kelenjar hipofisis anterior (Vandenberg 1983; Johnson & Barry 1998).



Gambar 15 Struktur kimia eurikomanon bersama derivatnya (Kardono *et al.* 2003).

Luteinizing hormone (LH) adalah suatu hormon reproduksi dengan bobot molekul 28.500-30.000 dalton (28,5-30,0 kDa). Hormon LH pada wanita dan hewan betina merangsang pematangan tahap akhir dari folikel graaf, terjadinya ovulasi dan perkembangan corpus luteum. Sekresi estrogen dan progesteron dirangsang oleh LH, sedangkan fungsi LH pada laki-laki dan hewan jantan merangsang pembentukan testosteron oleh testis. LH merangsang unsur-unsur nongerminal yang terdiri atas sel-sel interstisial (sel-sel Leydig) untuk menghasilkan androgen, dehidroepiandrosteron, dan testosteron. Fungsi lain LH mempertahankan lebih lanjut proses spermatogenesis, sedangkan pada tahapan embrional berfungsi dalam persiapan perkembangan alat kelamin tambahan seperti ductus deferens, prostat, dan vesica seminalis (Harper *et al.* 1979; Squires 2003).

Reaksi dimulai dengan LH berikatan dengan reseptor-reseptor membran yang relatif spesifik pada sel-sel interstisial atau sel Leydig pada pria dan hewan jantan dan sel-sel luteal pada wanita dan hewan betina (sel-sel tersebut tidak dipengaruhi oleh FSH). Aktivitas LH memicu steroidogenesis pada sel-sel Leydig selanjutnya terjadi proses perubahan asetat menjadi squalen, suatu senyawa yang akan menjadi kolesterol dalam sintesisnya. Juga terjadi percepatan perubahan kolesterol menjadi 20 alfa-hidroksi kolesterol, suatu zat antara yang diperlukan pada sintesis hormon testosteron atau progesteron pada wanita dan hewan betina (Harper *et al.* 1979; Squires 2003).

Pengeluaran *releasing hormone* (RH) dari hormon LH dan atau FSH (LH/FSH-RH) dirangsang oleh dopamin dan beberapa prostaglandin. Sebagai akibatnya, jika terjadi inhibisi atau penghambatan sintesis prostaglandin menyebabkan pengurangan ovulasi pada wanita atau hewan mamalia betina. LH/FSH-RH (atau Gn RH untuk LH/FSH) bekerja langsung pada hipofisis untuk meningkatkan kenaikan cAMP dan pengeluaran gonadotropin. Pada hipofisis, kadar baik LH maupun FSH tidak naik dan turun secara bersama-sama. Konsentrasi LH dalam plasma dan hipofisis meningkat selama pubertas. Hormon LH dan FSH dapat membuat peka sel-sel organ reproduksi dengan meningkatkan jumlah reseptor-reseptor spesifik pada organ reproduksi (Harper *et al.* 1979; Squires 2003).

3). Tingkat Aktivitas Sel-Sel Penghasil Hormon FSH

Berdasarkan temuan bahwa pada hari ke-3 pemberian seduhan pasak bumi dosis 18 mg/200 g bb terjadi peningkatan bermakna sel-sel basofil pada hipofisis. Sel basofil diketahui sebagai sel yang memproduksi hormon LH dan FSH. Selanjutnya setelah ditemukan bahwa pasak bumi merupakan *trigger* yang kuat untuk sintesis/produksi hormon LH pada hari ke-3, penelitian dilanjutkan untuk mengkaji respons/kerja sel-sel penghasil hormon FSH pada hipofisis melalui pendekatan metode imunohistokimia. Kajian mikromorfologi sel-sel hipofisis tikus putih jantan yang diamati adalah pada perlakuan: pemberian aquades 1 ml pada hari ke-1, dan pemberian aquades 1 ml sampai hari ke-3 sebagai kontrol. Pemberian dosis seduhan pasak bumi 18 mg/200 g bb pada hari ke-1, dan pemberian dosis seduhan pasak bumi 18 mg/200 g bb sampai hari ke-3 sebagai perlakuan.

Tingkat aktivitas respons kerja sel-sel penghasil hormon FSH diekspresikan dalam gradasi warna kromogen yang diikat oleh kompleks antigen-antibodi FSH pada sel-sel hipofisis penghasil hormon FSH. Respons/kerja sel-sel penghasil FSH yang sangat aktif/kuat ditandai dengan visualisasi warna cokelat tua (positif 3) yang berarti di dalam sel tersebut disintesis hormon FSH dalam konsentrasi maksimal secara kualitatif. Urutan berikutnya tingkatan yang sedikit lebih rendah kandungan hormon FSH ditunjukkan dengan visualisasi warna

cokelat untuk positif 2 dan warna cokelat muda untuk positif 1, rerata jumlah sel-sel penghasil FSH sesuai dengan tingkat kelompok respons/kerja terdapat pada Tabel 8.

Tabel 8 Jumlah sel-sel penghasil FSH pada hipofisis setelah perlakuan kontrol aquades dan pasak bumi pada hari ke-1 sampai hari ke-3.

No	Perlakuan	Jumlah sel-sel penghasil FSH			
		Positif 3	Positif 2	Positif 1	Total
1	Aquades hari ke-1	0,0±0,0 ^a	4,3±0,4 ^a	20,4±1,5 ^a	24,7±1,7 ^a
2	Aquades hari ke-3	0,4±0,2 ^{ab}	5,6±1,2 ^{ab}	34,2±2,2 ^b	41,6±2,7 ^b
3	Pasak bumi hari ke-1	0,6±0,2 ^b	8,9±2,6 ^{ab}	25,4±1,9 ^a	34,9±3,5 ^b
4	Pasak bumi hari ke-3	0,6±0,3 ^b	10,6±1,2 ^b	70,9±3,9 ^c	82,1±5,2 ^c

Keterangan: huruf kecil superskrip berbeda pada kolom yang sama menyatakan perbedaan nyata pada taraf 5 %, Uji Duncan $\alpha = 0,05$.

Data pada Tabel 8 menunjukkan bahwa pemberian pasak bumi dosis seduhan 18 mg/200 g bb meningkatkan respons/kerja sel-sel penghasil hormon FSH positif 1 secara nyata pada hari ke-3 (uji Duncan $\alpha = 0,05$). Sel-sel penghasil FSH diaktifkan kerjanya dengan peningkatan jumlah sel-sel FSH positif 1 dari hari ke-1 ke hari ke-3 (25,4 menjadi 70,9 sel), yang meningkat dibandingkan dengan kontrol/pemberian aquades (20,4 menjadi 34,2 sel). Jumlah sel-sel penghasil FSH positif 2 dan positif 3 dari hari ke-1 sampai hari ke-3 dibandingkan dengan kontrol pemberian aquades dari hari ke-1 sampai hari ke-3 tidak berbeda nyata secara statistik (uji Duncan $\alpha = 0,05$). Jumlah sel-sel FSH positif 3 pengaruh pemberian pasak bumi hari ke-1 (0,6 sel) sampai hari ke-3 (0,6 sel) tetap tidak meningkat. Sedangkan jumlah sel penghasil FSH yang positif 2 perlakuan pasak bumi hari ke-1 sampai hari ke-3 8,9 menjadi 10,6 sel) tidak berbeda nyata secara statistik dengan kontrol sampai hari ke-3 (4,3 menjadi 5,6 sel). Secara keseluruhan terjadi peningkatan aktifitas yang lemah atau sedikit produksi hormon FSH pada hipofisis setelah pemberian pasak bumi sampai hari ke-3. Total sel positif FSH yang lemah aktivitasnya (didominasi positif 1) hari ke-3 adalah 82,1 dibandingkan kontrol pada hari ke-3, yaitu 41,6 sel (uji Duncan, $\alpha = 0,05$).

Berdasarkan data Tabel 8 tampak bahwa sintesis produksi hormon FSH hipofisis pada hari ke-1 setelah pemberian pasak bumi tidak terjadi peningkatan dibandingkan dengan kontrol. Peningkatan sintesis FSH pada hari ke-3 ditunjukkan pada tingkatan kelompok respons aktifitas positif 1 saja. Berlandaskan temuan hasil yang ditampilkan pada Tabel 8 maka dapat disebutkan bahwa pasak bumi merupakan *trigger* yang lemah untuk sintesis/produksi hormon FSH. Walaupun demikian, sintesis hormon FSH tetap dipertahankan dalam batas tertentu dan meningkat sedikit dan tidak bermakna secara statistik mengiringi peningkatan sintesis hormon LH yang kuat.

Follicle stimulating hormone (FSH) merupakan suatu glikoprotein dengan bobot molekul kira-kira 30.000 dalton (30 kDa). Kerja FSH melakukan ikatan dengan reseptor spesifik pada membran plasma sel target, selanjutnya menyebabkan peningkatan adenilat siklase dan cAMP. Fungsi FSH pada wanita dan hewan betina: 1). memperlancar pertumbuhan folikel, 2). menyiapkan folikel untuk fungsi LH, dan 3). memperbesar pengeluaran estrogen yang dirangsang oleh LH. Kadar FSH pada wanita mengalami puncak 10 X daripada kadar yang basal yang dicapai pada atau sebelum masa ovulasi (Harper *et al.* 1979; Squires 2003).

Hormon FSH pada laki-laki dan hewan jantan merangsang pertumbuhan saluran seminalis dan testis, dan berperan penting pada tingkat permulaan spermatogenesis. Konsentrasi FSH plasma meningkat selama pubertas dari kadar yang rendah pada masa anak-anak. Sekresi FSH dihambat oleh pemberian testosteron, progesteron dan mungkin FSH sendiri. FSH terikat pada sel-sel Sertoli. Inhibin, aktifin, dan folistatin (aktifin binding protein) dihasilkan oleh gonad dan mengatur pengeluaran FSH oleh hipofisis. Inhibin dan aktifin adalah anggota keluarga group TGF β polipeptida, inhibin mengurangi produksi FSH. Sementara aktifin meningkatkan produksi FSH dan tidak terpengaruh GnRH. Folistatin adalah kelompok dari glikoprotein monomer yang mengikat aktifin dan mencegah stimulasi produksi FSH (Harper *et al.* 1979; Bergman 2000; Squires 2003).

Releasing hormone (RH) untuk hormon LH dan FSH (LH/FSH-RH) dipakai untuk meningkatkan fertilitas pada pasien-pasien dengan amenorrhoeae.

Berdasarkan struktur umum kimiawi hormon LH, FSH, tiotropin, dan human chorionic gonadotropin (hCG) terdiri atas 2 rantai α & β . Rantai β panjangnya 110-120 asam amino, mempunyai aktivitas biologi yang spesifik. Rantai α sedikit lebih pendek, kurang-lebih 90 rantai asam amino. Karbohidrat yang terdapat pada gonadotropin terdiri atas asam siklat, heksosa, heksosamin (Harper *et al.* 1979; Norman & Litwack 1987; Squires 2003).

KESIMPULAN

- 1) Hipofisis mengalami perubahan proporsi sel asidofil dan basofil setelah pemberian pasak bumi dosis seduhan 18 mg/200 g bb. Peningkatan yang nyata jumlah sel-sel basofil terjadi pada hari ke-3 pemberian pasak bumi dibandingkan dengan kontrol sampai hari ke-3. Sebaliknya, sebaran sel-sel asidofil mengalami penurunan yang nyata pada hari ke-3 dibandingkan dengan kontrol sampai hari ke-3.
- 2) Identifikasi lanjutan secara imunohistokimia memperoleh bahwa sel-sel basofil yang menanggapi atau bereaksi kuat terhadap pemberian pasak bumi adalah sel-sel penghasil LH pada hipofisis. Terjadi peningkatan produksi hormon LH intrasel yang nyata pada hipofisis setelah pemberian pasak bumi sampai hari ke-3 (uji Duncan, $\alpha = 0,05$). Ditunjukkan dengan peningkatan rerata jumlah sel-sel LH positif 3 dari hari ke-1 ke hari ke-3 yang meningkat lebih dari dua kali lipat dibandingkan dengan kontrol. Berkaitan dengan itu dapat disebutkan bahwa pasak bumi merupakan *trigger* kuat untuk hormon LH.
- 3) Sementara itu, sel-sel penghasil FSH pada hipofisis diaktifkan kerjanya dengan lemah (positif 1), tidak terjadi peningkatan nyata jumlah sel-sel penghasil FSH positif 2 dan positif 3 sampai hari ke-3 dibandingkan dengan kontrol sampai hari ke-3 (uji Duncan $\alpha = 0,05$).

DAFTAR PUSTAKA

- Adimoelja A. 2000. Phytochemical and the breakthrough of traditional herbs in the management of sexual dysfunction. *Int J Androl* 23 (2): 82-84
- Bergman A. 2000. *Molecular Biology of the Cell* 4th ed. Texas, New York: Garland Science.
- Bhat R, Karim AA. 2010. Tongkat Ali (*Eurycoma longifolia* Jack) a review on its ethnobotany and pharmacological importance. *Fitoterapia* 81(7): 669-679
- Biotech 2007. *Talinum paniculatum* Gaertn <http://biotech.tipo.gov.tw/plantjpg/1/Talinum> [3/01/2007]
- Depkes 2003. Standarisasi Sediaan Obat Herba. Makalah *Seminar Dan Pameran Nasional*. Kelompok Kerja Nasional Tumbuhan Obat Indonesia. Jakarta 25-26 Maret 2003.
- Harper HA, Rodwell VW, Mayes PA. 1979. *Review of Physiological Chemistry 17th Ed.* Drawer L, Los Altos, California: Lange Medical Publications.
- Johnson MH, Barry JE. 1998. *Essential reproduction*. London: Blackwell Science Ltd.
- Kardono LBS, Artanti N, Dewiyanti ID, Basuki T. 2003. *Selected Indonesian medicinal plants: monographs and descriptions* vol 1. Jakarta: PT Gramedia Widiasarana Indonesia.
- Kiernan JA. 1990. *Histological and histochemical methods: Theory and Practice*. 2nd ed. New York: Pergamon Pr.
- Lucky MS. 2010. Psikoneuroimunologi stress. *Med zone* 88:1-3.
- Norman AW, Litwack G. 1987. *Hormones*. London, Sidney, Tokyo: Academic Press Inc.
- Pratomo H. 1987. *Efek rimpang kunyit (Curcuma domestica Val) sebagai anti piretik pada tikus putih jantan yang didemamkan* [skripsi]. Jakarta: Fakultas Biologi UNAS.
- Soedibyo BRAM. 1998. *Alam sumber kesehatan, manfaat dan kegunaan*. Jakarta: Balai pustaka.
- Squires EJ. 2003. *Applied animal endocrinology*. Wallingford UK: Cabi Publishing.

Vandenberg JG. 1983. *Pheromones and reproduction in mammals*. Orlando: Academic press Inc.

Wijayakusuma Hembing. 1994. *Tanaman berkhasiat obat di Indonesia*. Jilid 3. Jakarta: Pustaka Kartini.

UNIVERSITAS TERBUKA

PENINGKATAN KADAR TESTOSTERON SERUM SETELAH PEMBERIAN SEDUHAN PASAK BUMI

Elevating of Serum Testosterone Level after Pasak Bumi Administration

Abstrak

Penelitian sebelumnya telah menemukan bahwa pemberian pasak bumi dosis seduhan 18 mg/200 g bb telah meningkatkan aktivitas sel yang memproduksi hormon LH intrasel pada hipofisis anterior. Penelitian dilanjutkan dengan tujuan untuk menentukan kadar testosteron serum darah setelah pemberian pasak bumi sampai hari ke-3. Sampel darah diambil dari jantung pada hari tikus dikorbankan. Pengukuran testosteron dilakukan dengan menggunakan metode radioimmunoassay (RIA). Hasil penelitian menjelaskan bahwa terjadi peningkatan kadar testosteron pada serum darah pada hari ke-3 ($=9,73$ ng/ml) pemberian seduhan pasak bumi dosis 18 mg/200 g ($=90$ mg/kg) bb secara nyata dibanding kontrol hari ke-3 ($=2,46$ ng/ml) (uji Duncan, $\alpha=0,05$). Hal ini menjelaskan bahwa peningkatan LH telah direspons oleh sel-sel Leydig dengan mensintesis dan mensekresikan testosteron ke dalam darah.

Kata kunci: Pasak bumi, dosis 90 mg/kg bb, testosteron

Abstract

In conjunction with the study on the effect of Pasak Bumi as aphrodisiac this research was focus on dynamic of testosterone hormone concentrations in the blood circulation. Since Pasak Bumi increased the number of basophile cells producing LH, it may induce a release of related hormone. Blood samples were collected from intra cardiac. All collected serums were then analysed using radioimmunoassay (RIA) to measure the testosterone concentrations. The result clearly indicated that consuming Pasak bumi in dose of 90 mg/kg bw within 3 days significantly increased testosterone level in blood circulation as compared to control. This result was in line with the theory of testosterone hormone synthesis in the Leydig cells which was triggered by elevating release of LH to the blood circulation. It can be conclude that Pasak bumi may play an important role in synthesizing testosterone in interstitial cells of Leydig.

Keywords: Pasak bumi, dose of 90 mg/kg bw, testosterone

PENDAHULUAN

Penelitian pada tahapan sebelumnya menjelaskan bahwa sel-sel basofil meningkat proporsinya dibanding sel-sel asidofil pada hipofisis setelah pemberian dosis seduhan pasak bumi 18 mg/200 g bb sekali setiap pagi sampai hari ke-3. Hasil berikutnya dengan pendekatan imunohistokimia menemukan bahwa sel-sel basofil yang meningkat proporsinya tersebut ternyata adalah sel-sel yang memproduksi hormon LH. Tingkat aktivitas sel-sel yang memproduksi hormon LH pada hipofisis meningkat secara signifikan secara statistik ($\alpha=0,05$; uji Duncan) pada hari ke-3 pemberian pasak bumi. Sebaliknya, sel-sel yang memproduksi hormon FSH pada hipofisis tetap dipertahankan dan tidak meningkat aktivitasnya secara nyata pada hari ke-3 pemberian pasak bumi dibanding kontrol.

Penelitian pasak bumi pada efek lainnya telah dikerjakan misalnya sebagai hepatoprotektor oleh Panjaitan (2008). Kerusakan hati akibat terpapar senyawa yang bersifat toksik dan karsinogenik akan mengganggu fungsi hati (Cotran *et al.* 1999). Hepatoprotektor adalah senyawa atau zat yang berkhasiat melindungi sel sekaligus memperbaiki jaringan hati yang rusak akibat pengaruh zat toksik. Panjaitan (2008) menemukan bahwa pemberian akar pasak bumi fraksi metanol-air melindungi hati dari kerusakan yang diakibatkan pemberian CCl_4 .

Ekstrak pasak bumi dengan pelarut air didapati kandungan antara lain komponen fenol, tanin, polisakarida, glikoprotein, dan mukopolisakarida, juga di dalamnya termasuk eurikomanon dan longilakton (Ang & Lee 2002). Di samping itu, tiga jenis kuasinoid, yaitu eurikolakton A, B, dan C berhasil diisolasi dari akar pasak bumi (Ang *et al.* 2000), sedangkan dari batang dan kayu pasak bumi diperoleh kandungan yang sitotoksik terhadap sel karsinoma dalam percobaan, yaitu 11 dehidroklainenon, eurikomalakton, dan 5,6 dehidroeurikomalakton (Itokawa *et al.* 1992)

Fungsi LH pada laki-laki dan hewan jantan merangsang sel-sel interstisial (sel-sel Leydig) pada testis untuk menghasilkan testosteron (Harper *et al.* 1979; Squires 2003). Berdasarkan temuan bahwa pemberian seduhan pasak bumi sampai hari ke-3 meningkatkan tingkat aktivitas untuk produksi hormon intrasel

pada hipofisis, maka penelitian perlu dilanjutkan dengan mengkonfirmasi proses fisiologi akibat peningkatan LH dengan menentukan kadar hormon testosteron di dalam serum darah. Tujuan penelitian ini adalah: menentukan efek pasak bumi pada peningkatan kadar hormon testosteron di dalam serum.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium di kandang hewan pemeliharaan tikus putih di rumah sakit hewan (RSH) IPB Darmaga Bogor. Pengukuran testosteron menggunakan metode *radioimmunoassay* (RIA) dilakukan di laboratorium klinik Mandapa Jl. Raya Pajajaran Bogor. Tikus putih jantan terlebih dahulu diperlakukan seperti pada Tabel 9 sebelum dianestesi menggunakan ketamin (berisi ketamil) dan diambil darahnya untuk pengukuran hormon testosteron.

Tabel 9 Rancangan kegiatan untuk analisis kadar testosteron

Waktu	Pkl 9.00 WIB	Selang 5 jam	Pkl. 14.00 WIB	Pkl 14.12 WIB
Hari ke-1, 2, 3	Pemberian pasak bumi Peroral	Tikus ♂ istirahat	Pengamatan tingkah laku libido 10 menit	sampling darah hari ke-1 dan ke-3

Perlakuan yang dilakukan untuk analisis kadar testosteron serum, yaitu: 1) pemberian aquades 1 ml/200 g bb pada kelompok kontrol pada hari ke-1 sampai hari ke-3. 2) pemberian dosis seduhan pasak bumi terpilih, yaitu 18 mg/200 g bb pada kelompok perlakuan pada hari ke-1 sampai hari ke-3. Sampling darah yang diambil dari jantung dilakukan pada kelompok kontrol dan perlakuan pasak bumi pada hari ke-1 dan hari ke-3.

Bahan Penelitian

Hewan percobaan menggunakan tikus putih jantan dewasa *Rattus norvegicus* strain Sprague Dawley berumur 3 ½ bulan dengan bobot 121-194 g. Tikus tersebut diperoleh dari laboratorium hewan coba badan POM sejumlah 18 ekor, untuk perlakuan dengan rincian sebagai berikut: 9 ekor jantan diberi perlakuan pasak bumi setiap hari sekali, pada hari ke-1 dan ke-3 setelah perlakuan

dengan betina estrus dikorbankan masing-masing tiga ekor ($n = \text{ulangan} = 3$) untuk diambil darahnya dari jantung. Demikian juga 9 ekor jantan untuk kelompok kontrol dilakukan pemberian aquades dengan jadwal seperti perlakuan pasak bumi. Sejumlah 5 ekor tikus betina (dipilih yang sedang estrus) digunakan sebagai penggoda. Sebelum diberi perlakuan pasak bumi, tikus putih diadaptasikan di kandang hewan pemeliharaan tikus putih di rumah sakit hewan (RSH) IPB Darmaga Bogor selama 2 minggu. Selama penelitian tikus diberi pakan dan minum *ad libitum*.

Simplisia akar tanaman pasak bumi (*Eurycomae longifolia* Jack) dikuliti seperti pada pembuatan serbuk jamu lainnya dengan modifikasi (Depkes 2003; Pratomo 1987). Bagian kayu dari akar pasak bumi yang relatif keras dicuci bersih lalu ditiriskan dan dipotong-potong dengan ukuran panjang 7 cm, lebar 2 cm dan tebal 2 cm. Potongan dikeringkan dalam oven pada suhu 50°C selama 5 hari, selanjutnya dipotong kecil-kecil menggunakan pisau *stainless* tajam. Potongan akar kayu tersebut lalu digiling sampai halus menggunakan alat giling khusus untuk membuat tepung lalu disaring dengan pengayak *Mesh* 50 (ukuran pori = 300 μm). Simplisia selanjutnya disimpan dalam toples-toples di lemari kering.

Prosedur Pengukuran Hormon Testosteron

Pengukuran hormon testosteron dilakukan pada hari ke-1 dan hari ke-3 perlakuan. Metode pengukuran testosteron dengan menggunakan metode *radioimmunoassay* (RIA). Tikus jantan diberi perlakuan pasak bumi dan kontrol pada pukul 9.00 pagi, lalu pada pukul 14.00 digoda dengan tikus betina estrus di dalam kandang pengamatan bersekat. Selanjutnya dilakukan pembiusan tikus putih jantan menggunakan ketamil, tikus putih lalu diambil darahnya dari jantung menggunakan *sprit* sejumlah 1 cc, darah tersebut didiamkan 2 jam pada suhu kamar. Lalu darah disentrifus 2500 rpm selama 15 menit, serumnya diambil dan disimpan di dalam *ependorf* dengan diberi label catatan diselotip dan disimpan di dalam *freezer*. Serum tadi dipipet 50 μl kemudian di tambahkan isotop Jodium 131 (^{131}I) testosteron 1,0 ml untuk setiap tube, lalu di *vortex*. Selanjutnya diinkubasikan selama 3 jam pada suhu 37°C. Setelah itu dilakukan *decant* dan

pembacaan kadar hormon di laboratorium dengan alat pembaca sinar Gamma dari isotop Jodium 131 (^{131}I) testosteron.

Metode *radioimmunoassay* (RIA) mempunyai prinsip kerja, yaitu: antara lain prinsip yang paling banyak digunakan adalah *sandwich*. Prinsip kerja dari *sandwich* adalah reaksi suatu antibodi dalam konsentrasi yang terbatas dengan berbagai konsentrasi antigen. Bagian dari antigen yang bebas dan yang terikat yang timbul sebagai akibat dari penggunaan antibodi dalam kadar yang terbatas ditentukan dengan menggunakan antigen yang diberi label radio isotop (Greenspan & Strewler 1997; Rusmana 2005). Jumlah antigen berlabel yang terikat, antibodi pada fase padat, dan konyugat dapat ditentukan dengan suatu *radiation counter* atau *gamma counter*. Pada pengukuran hormon, label radio isotop yang digunakan adalah isotop ^{125}I untuk hormon LH, progesteron, estrogen. Isotop ^{131}I untuk testoteron. ^3H dan ^{57}Co untuk hormon FSH. Kelebihan metode RIA adalah : Sensitivitas dan presisi yang tinggi, sedangkan kekurangan metode RIA adalah : Reagen kurang stabil, memerlukan proteksi terhadap bahan radioaktif (*radioactive hazardous*) (Greenspan & Strewler 1997; Asihara & Kasahara 2001; Rusmana 2005).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Perolehan penelitian pada tahapan sebelumnya diperoleh temuan bahwa terjadi peningkatan produksi hormon LH intrasel yang nyata pada hipofisis setelah pemberian pasak bumi sampai hari ke-3. Total sel yang positif LH hari ke-3 adalah 82,8 sel dibandingkan kontrol pada hari ke-3, yaitu 56,7 sel (uji Duncan, $\alpha = 0,05$). Berdasarkan peningkatan yang signifikan tersebut, maka diperlukan informasi tentang keadaan kadar hormon testosteron di dalam serum darah sebagai kelanjutan proses fisiologi dari peningkatan kadar hormon LH.

Kadar hormon testosteron di dalam darah yang disampling dari jantung diukur pada hari ke-1 sampai hari ke-3. Kadar testosteron hari ke-1 dan ke-3 pada tikus jantan yang digoda betina estrus pada kandang pengamatan yang didahului dengan perlakuan pasak bumi dibanding kontrol terdapat pada Tabel 10.

Tabel 10 Kadar hormon testosteron serum setelah perlakuan kontrol aquades dan pasak bumi pada hari ke-1 sampai hari ke-3.

No	Perlakuan	Kadar Testosteron (ng/ml) Rerata±SD
1	Kontrol hari ke-1	0,50±0,57 ^a
2	Kontrol sampai hari ke-3	2,46±1,26 ^a
3	Pasak bumi hari ke-1	4,00±1,06 ^a
4	Pasak bumi sampai hari ke-3	9,73±2,42 ^b

Keterangan: huruf kecil superskrip berbeda pada kolom yang sama menyatakan perbedaan nyata pada taraf 5 %, Uji Duncan $\alpha = 0,05$.

Kadar hormon testosteron serum meningkat signifikan pada perlakuan pasak bumi dosis 18 mg/200 g bb sampai hari ke-3, yaitu 9,73 ng/ml dibanding perlakuan kontrol sampai hari ke-3, yaitu 4,00 ng/ml (Uji Duncan, $\alpha = 0,05$). Peningkatan kadar rerata testosteron pada perlakuan kontrol dari hari ke-1 sampai hari ke-3, yaitu 0,5 meningkat menjadi 2,46 ng/ml masih di bawah peningkatan kadar rerata testosteron pada perlakuan pasak bumi hari ke-1 sampai hari ke-3, yaitu 4,00 ng/ml meningkat menjadi 9,73 ng/ml (Tabel 10).

Kadar testosteron tidak berbeda nyata pada kontrol hari ke-3 secara statistik (Uji Duncan, $\alpha = 0,05$). Fenomena yang terjadi itu menggambarkan bahwa di bawah pengaruh perlakuan godaan dari betina estrus secara berlanjut pada jam 14.00 selama 10 menit sekali setiap hari selama 3 hari tidak signifikan meningkatkan pelepasan atau sekresi testosteron ke dalam aliran darah sebagai kontrol. Peningkatan itu menjadi signifikan (berbeda nyata) dengan perlakuan pemberian seduhan pasak bumi 18 mg/200 g bb. Kadar testosteron yang terjadi pada perlakuan pasak bumi meningkat dari hari ke-1 sampai hari ke-3 lebih tinggi dari kontrol dan secara statistik berbeda nyata (Uji Duncan $\alpha = 0,05$). Secara nyata pasak bumi mempengaruhi peningkatan sintesis testosteron di dalam sel-sel Leydig, dilanjutkan dengan sekresi testosteron ke dalam sirkulasi darah. Kadar testosteron meningkat secara nyata setelah perlakuan pasak bumi hari ke-1 sampai pada hari ke-3 (Tabel 10).

Temuan pada penelitian tahap yang lebih dulu telah menjelaskan bahwa terjadi peningkatan aktivitas sel-sel penghasil LH pada hipofisis tikus perlakuan pasak bumi. Kemudian diikuti dengan peningkatan pelepasan LH ke dalam darah,

dan didistribusikan sehingga sampai pada sel-sel Leydig sebagai sel tujuan LH. Tanggapan berikutnya adalah terjadi peningkatan aktivitas sel-sel Leydig, sehingga aktif memproduksi testosteron yang dibuktikan dengan telah terjadi peningkatan kadar hormon testosteron di dalam serum darah pada hari ke-3 perlakuan pasak bumi dibanding hari ke-1 (4,00 ng/ml meningkat menjadi 9,73 ng/ml, Tabel 10). Pada keadaan normal, kadar testosteron total pada tikus putih jantan dewasa bervariasi dari 0,5 ng/ml sampai dengan 5,4 ng/ml (Favig & Foad 2009).

Testosteron dibutuhkan untuk perkembangan normal spermatozoa. Testosteron mengaktifkan gen-gen di dalam sel-sel Sertoli yang memicu diferensiasi sel-sel spermatozoa dalam perkembangan spermatogenesis misalnya diferensiasi spermatogonia. Testosteron juga berpengaruh pada respons tanggapan jalur sumbu hipotalamus-hipofisis-adrenal (*Hypothalamic-pituitary-adrenal axis* atau HPA) (Mehta *et al.* 2008). Sejumlah besar testosteron kira-kira 95 % atau lebih diproduksi oleh testis pada jantan. Testosteron juga disintesis dalam jumlah yang jauh lebih sedikit pada betina oleh sel-sel teka dari ovarium, oleh plasenta, dan juga oleh zona reticularis dari korteks adrenal pada jantan dan betina. Pada testis, testosteron diproduksi oleh sel-sel Leydig. Kelenjar generatif jantan juga mengandung sel-sel Sertoli yang membutuhkan testosteron untuk proses spermatogenesis (Mooradian 1987; Morgentaler & Schulman 2009).

Kadar testosteron total pada tikus putih jantan dewasa bervariasi dari rerata 0,5 ng/ml sampai dengan 5,4 ng/ml pada keadaan normal. Tantawi *et al.* (2007) menyebutkan kadar testosteron total tikus putih jantan strain Sprague Dawley dewasa berumur 3 ½ bulan pada keadaan normal diukur dengan metode RIA reratanya adalah 0,5 ng/ml. Tantawi *et al.* (2007) dengan metode yang sama pada penelitian tikus putih jantan strain Sprague Dawley dewasa berumur 4 bulan pada keadaan normal mendapatkan kadar testosteron total reratanya adalah 0,8 ng/ml. Sementara itu, kadar testosteron total pada tikus putih jantan Sprague Dawley dewasa berumur 4-5 bulan pada keadaan normal diukur dengan metode RIA temuan Favig dan Foad (2009) reratanya adalah 5,4 ng/ml. Kadar testosteron total tikus putih jantan strain Wistar dewasa berumur 3 bulan pada keadaan normal diukur dengan metode RIA temuan pada penelitian Kaspul (2007)

reratanya adalah 3,3 ng/ml. Peningkatan kadar testosteron dapat terjadi pada perlakuan tertentu, misalnya tikus ditempatkan pada lokasi habitat yang lebih tinggi temperaturnya daripada habitat awal (dari 23°C ke 25°C), maka kadar testosteron total reratanya dari 5,4 ng/ml menjadi 11,4 ng/ml (Favig & Foad 2009). Berbeda dari kadar testosteron total tikus putih jantan, kadar testosteron total pria dewasa adalah berkisar dari 30 ng/ml sampai 100 ng/ml, sedangkan kadar testosteron total wanita dewasa adalah berkisar dari 3 ng/ml sampai dengan 7 ng/ml (Greenspan & Strewler 1997).

Kemungkinan Proses Kerja Pasak Bumi pada Peningkatan Testosteron

Sintesis testosteron di dalam sel Leydig dipengaruhi oleh hormon LH yang juga disebut hormon *interstitial cell stimulating hormone* (ICSH). Sekresi LH dari hipofisis anterior diperantarai oleh perangsangan siklik AMP dan sintesis kalmodulin (Squires 2003). Perangsangan itu diduga diperankan oleh salah satu senyawa kandungan dan atau dari beberapa senyawa kandungan seduhan pasak bumi yang diberikan pada hari ke-1 sampai hari ke-3 misalnya eurikomanon dan longilakton. Senyawa kandungan pasak bumi berfungsi seperti GnRH-LH, sehingga sintesis LH pada hipofisis meningkat secara nyata. Selanjutnya LH disekresikan ke dalam sirkulasi darah. LH yang sampai pada sel-sel Leydig mengaktifkan atau meningkatkan kerja sel-sel Leydig untuk mensintesis hormon testosteron. Testosteron dalam waktu relatif singkat telah didistribusikan oleh aliran darah sehingga dalam waktu 1 sampai 3 hari telah dapat ditentukan peningkatannya di dalam serum. Sebagai pengendali peningkatan testosteron terdapat mekanisme umpan balik pada sumbu testis-hipofisis-hipotalamus dalam pengaturan sekresi hormon LH dan testosteron. Kadar tinggi testosteron serum menghambat sekresi LH dan sedikit menghambat sekresi FSH. Dengan demikian, testosteron diproduksi dalam jumlah menurun kembali oleh sel-sel Leydig atas tanggapan menurunnya kadar LH. Sedangkan Inhibin suatu peptida yang dihasilkan oleh sel Sertoli dalam tubuli seminiferi berfungsi menghambat sekresi FSH (Ganiswara *et al.* 2000; Squires 2003).

Testosteron dan dehidrotetosteron (DHT) berikatan dengan reseptor di sitoplasma, kemudian kompleks steroid-reseptor mengalami modifikasi dan

translokasi ke dalam nukleus dan berikatan dengan tempat spesifik (*specific binding site*) pada kromosom. Hal ini menyebabkan aktivitas RNA polimerase meningkat diikuti dengan peningkatan sintesis protein (Ganiswara *et al.* 2000; Squires 2003). Ganiswara *et al.* 2000 menyebutkan bahwa DHT merupakan hasil dari pengubahan testosteron (90 %) oleh enzim 5 α reduktase di dalam prostat dan vesica seminalis.

Biosintesis testosteron dipicu oleh LH yang dilepaskan oleh hipofisis dan akan terikat pada reseptornya di sel-sel interstetial testis. Setelah terjadi ikatan antara LH dan reseptornya maka akan terbentuk mesenger kedua yang berupa cAMP. Terbentuknya cAMP mengaktifkan protein kinase yang akan mempengaruhi inti sel agar gen-gen yang mengatur biosintesis testostosterone menjadi aktif dan mulailah terjadi sintesis testosteron. Tahap pertama dalam biosintesis melibatkan pembelahan oksidasi dari satu sisi rantai kolesterol oleh CYP11A suatu enzim oksidase sitokrom P₄₅₀ pada mitokondria dengan hilangnya enam atom karbon untuk menjadi pregnenolon. Tahap berikutnya dua atom karbon dipindah oleh enzim CYP17A di dalam retikulum endoplasma untuk menghasilkan variasi dari steroid C19. Di samping itu, grup 3-hidroksil dioksidasi oleh 3- β -HSD untuk menghasilkan androstenedion. Pada tahap akhir, atom C-17 grup keto androstenedion direduksi oleh enzim 17- β hidroksisteroid dehidrogenase untuk menjadi testosteron (Zuber *et al.* 1986; Waterman & Keeney 1992; Squires 2003).

Sejumlah 98% testosteron dalam darah terikat suatu protein, yaitu *testosterone-estradiol-binding-globulin* (TEBG) atau *sex hormone binding globulin* (SHBG) atau dengan nama lain *androgen binding protein* (ABP) dan albumin. Dengan demikian kadar SHBG menentukan kadar testosteron bebas dalam plasma dan waktu paruhnya. Waktu paruh testosteron kira-kira 20 menit, di sisi lain testosteron menurunkan sintesis SHBG. Sementara estrogen meningkatkan sintesis SHBG sehingga kadar SHBG pada betina dua kali lipat kadarnya daripada jantan (Ganiswara *et al.* 2000; Squires 2003). Ekskresi testosteron 90 % melalui urin, 6 % melalui tinja dalam bentuk asal, metabolit dan konyugat. Sebagian besar ekskresi dari urin menggambarkan sekresi

androgen oleh korteks adrenal, yaitu: androsteron dan etiokolanolon (Ganiswara *et al.* 2000; Squires 2003).

Pada laki-laki normal, kadar testosteron normal adalah 25-100 ng/ml sehari. Kadar plasma testosteron menunjukkan irama harian dengan kadar tertinggi di waktu menjelang pagi dan di pagi hari. Kadar testosteron di dalam testis, yaitu rata-rata 100 kali daripada kadar testosteron di dalam sirkulasi darah. Kadar testosteron yang tinggi di dalam testis secara fisiologis diperlukan untuk spermatogenesis (Ganiswara *et al.* 2000; Squires 2003).

KESIMPULAN

Pemberian seduhan pasak bumi sampai hari ke-3 meningkatkan aktivitas sel-sel Leydig dalam mensintesis testosteron. Kadar testosteron dalam serum darah meningkat signifikan pada kelompok perlakuan pemberian seduhan pasak bumi lebih dari dua kali lipat dibandingkan dengan kontrol sampai hari ke-3.

UNIVERSITAS TERBUKA

DAFTAR PUSTAKA

- Ang HH, Hitotsuyanagi Y, Takeya K. 2000. Eurycolactones A-C, novel quassinoids from *Eurycoma longifolia*. *Tetrahedron Pythochem* 41(35): 6849-6853
- Ang HH, Lee KL. 2002. Effect of *Eurycoma longifolia* Jack on orientation activities in middle-aged male rats. [Abstract] *Fund & Clin Pharmacol* 16 (6): 479
- Asihara Y, Kasahara, Y. 2001. *Immunoassay and immunochemistry*. In John, B.H (eds), *Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods* 21st ed. Philadelphia: WB Saunders Co.
- Cotran RS, Kumar V, Collins T. 1999. *Robbins Pathologic Basis of Diseases*. 8th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Co
- Depkes 2003. Standarisasi Sediaan Obat Herba. Makalah *Seminar Dan Pameran Nasional*. Kelompok Kerja Nasional Tumbuhan Obat Indonesia. Jakarta 25-26 Maret 2003.
- Favig EM, Foad O. 2009. Serum and plasma levels of total and free testosterone and of sex hormone binding globulins in rats growing in the below sea level environment of the Jordan valley. *J Endocr* 5(2): 1-6.
- Ganiswara SG, Rianto S, Frans D, Purwastyastuti, Nafrialdi, editor. 2000. *Farmakologi dan terapi*. Ed ke-4. Jakarta: Bagian Farmakologi FKUI.
- Greenspan FS, Strewler GD. 1997. Appendix, in Francis S.G and Gordon J. S (Eds), *Basic and Clinical Endocrinology*. 5th Ed. London: Prentice-Hall International Inc.
- Harper HA, Rodwell VW, Mayes PA. 1979. *Review of Physiological Chemistry* 17th Ed. Drawer L, Los Altos, California: Lange Medical Publications.
- Itokawa H, Kishi E, Morita H, Takeya K. 1992. Cytotoxic quassinoids and tirucallane type triterpenes from the woods of *Eurycoma longifolia*. *Chem Pharm Bull* 40(4): 1053-1055.
- Lucky MS. 2010. Psikoneuroimunologi stress. *Med zone* 88:1-3.
- Mehta PH, Jones AC, Josephs RA. 2008. The social endocrinology of dominance: basal testosterone predicts cortisol changes and behavior following victory and defeat. *J Pers Soc Psychol* 94 (6): 1078-93.

- Mooradian AD, Morley JE, Korenman SG. 1987. Biological actions of androgens. *Endocr Rev* 8 (1): 1–28.
- Morgentaler A, Schulman C. 2009. Testosterone and prostate safety. *Front Horm Res* 37: 197–203.
- Panjaitan Ruqiah GP. 2008. *Pengujian aktivitas hepatoprotektor akar pasak bumi (Eurycoma longifolia Jack)* [disertasi]. Bogor: Sekolah Pascasarjana IPB.
- Pratomo H. 1987. *Efek rimpang kunyit (Curcuma domestica Val) sebagai anti piretik pada tikus putih jantan yang didemamkan* [skripsi]. Jakarta: Fakultas Biologi UNAS.
- Ruswana A. 2005. *Sintesis, Fungsi dan Interpretasi Pemeriksaan Hormon Reproduksi*. Bandung: Subbagian Fertilitas dan Endokrinologi Reproduksi, Bagian Obstetri dan Ginekologi, Fakultas Kedokteran Unpad.
- Squires EJ. 2003. *Applied animal endocrinology*. Wallingford UK: Cabi Publishing.
- Tantawy WHE, Abeer T, Omayma DE. 2007. Free serum testosterone in male rats treated with *Tribulus alatus* extract. *Int Braz J Urol* 33: 554-9.
- Waterman MR, Keeney DS. 1992. Genes involved in androgen biosynthesis and the male phenotype. *Horm Res* 38 (5-6): 217–21.
- Zuber MX, Simpson ER, Waterman MR. 1986. Expression of bovine 17 alpha-hydroxylase cytochrome P-450 cDNA in nonsteroidogenic (COS 1) cells. *Science* 234 (4781): 1258–61.

KERJA PASAK BUMI PADA SPERMATOGENESIS DALAM TUBULI SEMINIFERI

The Role of Pasak Bumi in the Stage of Rat Spermatogenesis in Tubulus Seminiferous

Abstrak

Dalam rangka mempelajari kerja atau peranan pasak bumi pada organ reproduksi primer, dilakukan kajian morfologi perkembangan spermatozoa tikus putih jantan dewasa. Hasil penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa pasak bumi berperan dalam sintesis testosteron pada sel-sel interstisial Leydig. Penelitian ini bertujuan untuk mengkonfirmasi efek peningkatan aktivitas sel LH intraseluler dan testosteron pada perkembangan sel spermatozoa dalam spermatogenesis pada tubuli seminiferi. Grup tikus jantan sejumlah 9 ekor diperlakukan dengan pasak bumi dosis 18 mg/200 g (=90 mg/kg) bb selama tiga hari, demikian juga 9 ekor untuk kontrol. Pada hari ke-1 dan ke-3 masing-masing disampel tiga ekor dikorbankan untuk memperoleh jaringan testis. Fiksasi dilakukan dengan 4 % paraformaldehid dan diproses menggunakan metode histologi dengan pewarnaan HE. Pengamatan menggunakan mikroskop cahaya pada tubuli seminiferi mendapatkan tahapan sel sperma dalam proses spermatogenesis. Hasilnya menjelaskan bahwa pemberian pasak bumi sampai hari ke-3: 1) meningkatkan jumlah spermatid akhir secara nyata, dan 2) mempertahankan jumlah spermatogonia, walaupun terjadi peningkatan bentuk spermatogonia tetapi sedikit dan tidak berbeda nyata secara statistik. Disimpulkan bahwa pasak bumi berperan pada tahapan tertentu spermatogenesis, yaitu pembentukan spermatid akhir dalam tubuli seminiferi testis tikus.

Kata kunci: Pasak bumi, dosis 90 mg/kg bb, HE, spermatogenesis

Abstract

In order to understand more about the involvement of Pasak bumi in primary reproductive organ, a morphological study was done on mature male rats. Since Pasak bumi play an important role on testosterone synthesise in interstitial Leydig cells of tubulus seminiferus, this study was aimed to confirm the effect of elevation of testosterone hormone value on spermatogenesis process. A group of nine mature male rats were treated a dose of 90 mg/kg bw of Pasak bumi within three days and sacrificed to provide testicle tissues samples. The 4 % paraformaldehyde fixed tissue was processed using regular histological method and stained by HE. Evaluation and identification of spermatogonium development was done under light microscope. This research found that Pasak bumi seems beneficial to: 1) increase significantly the number of late spermatids, and 2) maintain the number of spermatogonia, although there was slightly increase in number but it was not significant as compared to those in control. In conclusion Pasak bumi is involved in certain stage of spermatogenesis in tubulus seminiferus of rat testis.

Keywords: Pasak bumi, the dose of 90 mg/kg bw, HE, spermatogenesis

PENDAHULUAN

Penelitian pada tahapan sebelumnya menjelaskan bahwa pemberian pasak bumi dosis seduhan 18 mg/200 g bb dalam 1 ml aquades meningkatkan libido yang tertinggi dibanding dosis seduhan 100 mg/200 g bb, dosis seduhan 200 mg/200 g bb, dan kontrol aquades 1 ml. Berdasarkan penelitian yang telah ada diketahui dosis 18 mg/200 g bb (=90 mg/kg bb) merupakan dosis aman karena masih relatif jauh di bawah LD₅₀.

Panjaitan (2008) menemukan bahwa dosis pasak bumi dosis 13 g/kg bb hingga 92,34 g/kg bb fraksi metanol-air mematikan hewan coba. Dari temuan itu dinyatakan bahwa LD₅₀ fraksi metanol-air pasak bumi adalah setara dengan 34,65 g/kg bb tikus putih. Suatu sediaan yang mempunyai nilai LD₅₀ lebih besar dari 15 g/kg bb dinyatakan praktis tidak toksik (Lu 1995). Dengan demikian, pasak bumi merupakan bahan tidak toksik karena mempunyai LD₅₀ yang nilainya lebih besar dari 15 g/kg bb.

Sehubungan dengan penelitian pada tahapan sebelumnya melalui identifikasi lanjutan secara imunohistokimia memperoleh bahwa sel-sel basofil yang menanggapi atau bereaksi kuat terhadap pemberian pasak bumi adalah sel-sel penghasil LH pada hipofisis. Terjadi peningkatan aktivitas sel-sel yang memproduksi hormon LH intrasel pada hipofisis secara nyata (uji Duncan, $\alpha = 0,05$) setelah pemberian pasak bumi sampai hari ke-3 yang ditunjukkan dengan peningkatan jumlah sel-sel LH positif 3 dari hari ke-1 ke hari ke-3 yang meningkat lebih dari dua kali lipat dibandingkan dengan kontrol/pemberian aquades. Berkaitan dengan itu dapat disebutkan bahwa pasak bumi merupakan *trigger* relatif kuat untuk produksi hormon LH.

Penelitian tahapan sebelumnya memperoleh bukti bahwa setelah terjadi peningkatan aktivitas sel-sel hipofisis yang memproduksi LH intrasel, terjadi pula peningkatan kadar hormon testosteron serum. LH yang teridentifikasi di dalam sel-sel yang diaktifkan pada hipofisis telah terdistribusi ke dalam darah pada hari ke-3. Dengan demikian, sebagai kelanjutan peningkatan LH terjadi peningkatan aktivitas sel-sel Leydig untuk memproduksi testosteron yang dibuktikan pada

penelitian ini dengan telah terjadi peningkatan kadar hormon testosteron di dalam serum darah pada hari ke-3 perlakuan pasak bumi (4,00 ng/ml meningkat menjadi 9,73 ng/ml). Pada keadaan normal, kadar testosteron total pada tikus putih jantan dewasa bervariasi dari rerata 0,5 ng/ml sampai dengan 5,4 ng/ml (Favig & Foad 2009).

Beberapa perolehan penelitian ini sebelumnya menjelaskan bahwa pemberian pasak bumi meningkatkan libido, jumlah sel-sel basofil, tingkat aktivitas sel-sel yang memproduksi LH, mempertahankan tingkat aktivitas sel-sel yang memproduksi FSH, dan meningkatkan kadar testosteron serum. Hormon-hormon LH, FSH, dan testosteron telah dilaporkan berperan dalam perkembangan spermatogenesis (Bearden *et al.* 2004; Krisfalosi *et al.* 2006), sehingga lebih lanjut perlu dijelaskan bagaimana kinerja pasak bumi pada tahap perkembangan spermatogenesis. Penelitian dilanjutkan dengan meneliti: kinerja pasak bumi pada perkembangan tahap spermatogenesis di dalam tubuli seminiferi. Tahap sel spermatozoa yang dianalisis dan dihitung adalah: spermatogonium utuh (SPM), spermatosit primer utuh (SPST1), dan spermatid akhir (SPTDAKHR).

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Histologi Departemen Anatomi, Fisiologi, dan Farmakologi, Fakultas Kedokteran Hewan, IPB Darmaga Bogor. Pemeliharaan tikus putih dilakukan di kandang hewan percobaan di Rumah Sakit Hewan IPB Darmaga Bogor selama 2 minggu. Sebelum dianestesi menggunakan ketamil dan diambil sampel jaringan testis, tikus putih jantan terlebih dahulu diperlakukan seperti pada Tabel 11 berikut:

Tabel 11 Rancangan kegiatan untuk analisis tahap spermatogenesis dalam tubuli seminiferi testis

Waktu	Pkl 9.00 WIB	Selang 5 jam	Pkl. 14.00 WIB	Pkl 14.12 WIB
Hari ke- 1, 2, 3	Pemberian pasak bumi peroral	Tikus ♂ istirahat	Pengamatan tingkah laku libido 10 menit	sampling testis hari ke-1 dan ke-3

Perlakuan yang diberikan untuk analisis tahap spermatogenesis dalam tubuli seminiferi testis, ialah: 1) pemberian aquades 1 ml/200 g bb pada kelompok kontrol pada hari ke-1 sampai hari ke-3. 2) pemberian dosis seduhan pasak bumi terpilih, yaitu 18 mg/200 g bb pada kelompok perlakuan pada hari ke-1 sampai hari ke-3. Sampling testis dilakukan pada kelompok kontrol dan perlakuan pasak bumi pada hari ke-1 dan hari ke-3.

Bahan Penelitian

Hewan percobaan menggunakan tikus putih jantan dewasa *Rattus norvegicus* strain Sprague Dawley berumur 3 ½ bulan dengan bobot 121-194 g bulan. Tikus tersebut diperoleh dari Laboratorium Hewan Coba Badan POM sejumlah 18 ekor, untuk perlakuan dengan rincian sebagai berikut: sembilan ekor jantan dengan perlakuan pasak bumi yang akan dikorbankan masing-masing 3 ekor ($n=ulangan=3$) pada hari ke-1 dan 3 menggunakan anastesi. Sembilan ekor jantan digunakan sebagai kontrol dengan pemberian aquades yang juga dikorbankan 6 ekor masing-masing 3 ekor pada hari ke-1 dan 3. Satu ekor tikus betina dipilih yang sedang estrus digunakan sebagai penggoda dari sejumlah 5 ekor tikus betina persediaan. Sebelum diberi perlakuan pasak bumi, tikus putih diadaptasikan di kandang hewan percobaan di laboratorium anatomi dan histologi FKH. Waktu adaptasi masing-masing selama 2 minggu. Selama penelitian tikus diberi pakan dan minum ad libitum.

Simplisia akar tanaman pasak bumi (*Eurycomae longifolia* Jack) dikuliti seperti pada pembuatan serbuk jamu lainnya (Depkes 2003; Pratomo 1987). Bagian kayu dari akar pasak bumi yang relatif keras dicuci bersih lalu ditiriskan dan dipotong-potong dengan ukuran panjang 7 cm, lebar 2 cm, dan tebal 2 cm. Potongan dikeringkan dalam oven pada suhu 50°C selama 5 hari, selanjutnya dipotong kecil-kecil menggunakan pisau *stainless* tajam. Potongan akar kayu tersebut lalu digiling sampai halus menggunakan alat giling khusus untuk membuat tepung lalu disaring dengan pengayak Mesh 50 (1 inchi berisi 50 lubang, dengan ukuran pori = 300 μ m). Simplisia selanjutnya disimpan dalam toples-toples di lemari kering.

Menentukan Kerja Pasak Bumi pada Perkembangan Tahap Spermatogenesis

Perkembangan tahap spermatogenesis di dalam tubuli seminiferi dipelajari dengan pendekatan menggunakan pewarnaan HE pada preparat potongan melintang testis tikus. Sampel jaringan testis diambil pada hari ke-1 dan hari ke-3 dilakukan seperti berikut:

Perlakuan dengan tikus betina estrus penggodanya dilakukan pada pukul 14.00, setelah 10 menit diteruskan dengan sampling jaringan testis. Sebelum sampling jaringan testis, tikus putih dianestesi intra peritoneal dengan Ketamine 100 mg/ml dengan dosis 0,2 cc untuk 100-200 g bb. Penggunaan tikus dikorbankan untuk sampling jaringan sebagai berikut:

Hari ke-1 → 9 ekor tikus diberikan pasak bumi, 3 ekor untuk sampling testis.

Hari ke 2 → 6 ekor tikus diberikan pasak bumi.

Hari ke-3 → 3 ekor tikus diberikan pasak bumi, 3 ekor untuk sampling testis.

Sebagai kontrol dilakukan pemberian aquades 1 ml per oral per ekor tikus putih, dengan ulangan sejumlah 3 ekor tikus (n=3). Demikian pula setiap perlakuan pasak bumi diulang sebanyak tiga kali. Pengambilan sampel jaringan tikus kontrol dilakukan seperti kegiatan pada perlakuan, yaitu pada hari ke-1 dan ke-3. Semua sampel jaringan yang diperoleh difiksasi dalam larutan formaldehid 4% dalam NaCl fisiologis 0,9% disimpan selama 1 minggu dan selanjutnya dilakukan tahapan untuk evaluasi secara histologis (analisis mikromorfologi)

Evaluasi atau Analisis Mikromorfologi Tubuli Seminiferi

Setelah jaringan testis diperoleh, sampel disayat dengan silet, potongan bagian tengah diambil secara melintang setebal 1-2 mm, lalu difiksasi selama 1 minggu. Berikutnya dilakukan dehidrasi dengan rangkaian alkohol bertingkat selama 4 hari. Kemudian *diclearing* dengan serangkaian larutan *xylol* dan *diblocking* dengan parafin histo. Lalu disimpan dalam lemari pendingin beberapa hari, dan selanjutnya diiris dengan alat mikrotom secara hati-hati berukuran tipis 4-5 μm .

Evaluasi mikromorfologi isi tubuli seminiferi khususnya untuk menentukan tahapan sel-sel spermatozoa di dalam perkembangan spermatogenesis

dilakukan dengan pendekatan pewarnaan histokimia hematoxilin eosin (HE) mengikuti cara Kiernan (1990). Sel-sel yang dianalisis meliputi: Jumlah spermatogonium utuh (SPM), spermatosit primer utuh (SPST1), dan spermatid akhir (SPTDAKHR) yang tampak dalam bentuk kepala spermatozoa dan sebagian ekor. Penghitungan jumlah sel tahapan spermatozoa dilakukan terhadap 10 lapang pandang dari sejumlah *slide* terpilih setiap perlakuan, sehingga $n = 10$ untuk setiap kelompok perlakuan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Tahapan spermatogenesis di dalam tubuli seminiferi yang diamati setelah perlakuan pasak bumi dosis seduhan 18 mg/200 g bb dalam 1 ml aquades dan kontrol pada hari ke-1 dan ke-3 adalah: Jumlah sel spermatogonium, spermatosit primer, dan spermatid akhir. Profil tahapan sel-sel spermatozoa di dalam tubuli seminiferi setelah perlakuan tampak pada Tabel 12.

Tabel 12 Jumlah sel-sel tahapan spermatogenesis setelah perlakuan aquades dan pasak bumi pada hari ke-1 sampai hari ke-3.

No	Perlakuan	Jumlah sel tahapan spermatozoa (Rerata \pm SD)		
		SPM	SPST1	SPTDAKHR
1	Aquades hari ke-1	25,1 \pm 3,9 ^a	61,5 \pm 5,4 ^a	51,0 \pm 8,7 ^a
2	Aquades hari ke-3	28,5 \pm 4,2 ^{ab}	56,9 \pm 5,4 ^a	29,2 \pm 2,8 ^b
3	Pasak bumi hari ke-1	33,7 \pm 3,6 ^{ab}	34,2 \pm 3,5 ^b	52,0 \pm 7,7 ^a
4	Pasak bumi hari ke-3	39,6 \pm 5,0 ^b	31,3 \pm 4,6 ^b	91,0 \pm 7,6 ^c

Keterangan: huruf kecil superskrip berbeda pada kolom yang sama menyatakan perbedaan nyata pada taraf 5 %, Uji Duncan $\alpha = 0,05$.

SPM=Spermatogonium ; SPST1=Spermatosit primer

SPTDAKHR=Spermatid akhir

Berdasarkan Tabel 12, perkembangan spermatogenesis tahapan spermatid akhir, terlihat bahwa jumlah sel spermatid akhir meningkat secara nyata dalam tahapan perkembangan spermatogenesis setelah perlakuan pasak bumi dari hari ke-1 sampai hari ke-3, yaitu 52,0 sel menjadi 91,0 sel dibandingkan kontrol (uji Duncan, $\alpha = 0,05$). Pada kelompok kontrol/aquades jumlah spermatid akhir

menurun secara nyata dari hari ke-1 sampai hari ke-3 (51,0 sel menjadi 29,2 sel). Jumlah spermatid akhir pada kelompok kontrol dari hari ke-1 sampai hari ke-3 mengalami penurunan, kejadian ini mungkin dikarenakan oleh berpindahannya sebagian sejumlah spermatid akhir dari saluran tubuli seminiferi ke dalam epididimis. Sementara itu, terjadi peningkatan jumlah spermatid akhir pada perlakuan pasak bumi dari hari ke-1 sampai hari ke-3 secara nyata yang dimungkinkan oleh adanya proses pembentukan spermatosit sekunder menjadi spermatid. Peningkatan pembentukan spermatid akhir mungkin terjadi karena pengaruh hormon LH dan hormon testosteron yang meningkat nyata setelah pemberian pasak bumi sampai hari ke-3.

Berdasarkan data Tabel 12, perkembangan spermatogenesis pada tahapan spermatosit primer, tampak bahwa jumlah sel spermatosit primer pada kelompok perlakuan pasak bumi mengalami penurunan secara nyata. Penurunan jumlah sel spermatosit dari hari ke-1 sampai hari ke-3 perlakuan (34,2 sel menjadi 31,3 sel) berbeda nyata dibanding kelompok kontrol (61,5 sel menjadi 56,9 sel). Fenomena ini menjelaskan bahwa pasak bumi mendorong proses pembentukan/peningkatan spermatid akhir dalam waktu 3 hari sehingga pada saat bersamaan terjadi penurunan jumlah spermatosit primer karena sebagian telah berubah menjadi spermatosit sekunder. Tahap spermatid akhir berasal dari spermatid awal yang dirangsang untuk berkembang lebih aktif setelah perlakuan pasak bumi sampai hari ke-3.

Data pada Tabel 12 yang menjelaskan tahapan spermatogonium, tampak peningkatan jumlah spermatogonium secara nyata terjadi pada hari ke-3 (39,6 sel) dibanding kontrol hari ke-1 (25,1 sel) tetapi tidak berbeda nyata dibandingkan dengan perlakuan kontrol sampai hari ke-3 (28,5 sel) dan pasak bumi hari ke-1 (33,7 sel). Walaupun demikian, secara relatif tampak terjadi peningkatan spermatogonium yang sedikit pada perlakuan pasak bumi sampai hari ke-3 dibanding kontrol tetapi tidak berbeda nyata secara statistik. Perlakuan pasak bumi pada tahapan perkembangan spermatogonium, tidak mempunyai pengaruh yang meningkatkan jumlah spermatogonium. Tetapi pasak bumi mempertahankan jumlah atau keberadaan spermatogonium yang stabil dibanding kontrol.

Siklus proses spermatogenesis pada tikus putih terjadi kira-kira setiap 12 hari di dalam tubuli seminiferi, yang meliputi tahapan: spermatogonium, spermatosit primer, spermatosit sekunder, spermatid awal, spermatid akhir. Periode ini merupakan $\frac{1}{4}$ dari waktu sesungguhnya yang diperlukan dalam proses lengkap spermatogenesis tikus jantan secara keseluruhan (48 hari) untuk produksi menjadi spermatozoa matang, yang akan dapat dilepaskan untuk fungsi fertilisasi setelah terjadi kopulasi (Johnson & Barry 1998). Proses lengkap spermatogenesis pada manusia dan hewan jantan terjadi di dalam testis (tubuli seminiferi) dan epididimis yang membutuhkan waktu seperti pada Tabel 13.

Tabel 13 Lama waktu proses spermatogenesis pada beberapa spesies

Spesies	Waktu untuk spermatogenesis lengkap (hari)	Waktu untuk siklus spermatogenesis di Tubuli seminiferi (hari)
Pria	64	16
Sapi jantan	54	13,5
Kambing jantan	49	12,25
Babi jantan	34	8,5
Tikus jantan	48	12

Sumber: Johnson & Barry 1998.

Sehubungan dalam penelitian pada tahapan sebelumnya memperoleh temuan bahwa pemberian pasak bumi sampai hari ke-3 dengan dosis seduhan 18 mg/20 g bb, meningkatkan secara nyata aktivitas sel-sel hipofisis yang memproduksi hormon LH dibanding kontrol. Tingkat aktivitas sel-sel hipofisis yang memproduksi hormon FSH tidak meningkat tetapi dipertahankan relatif sama dengan kontrol. Di samping itu, juga ditemukan bahwa pemberian pasak bumi sampai hari ke-3 meningkatkan secara nyata kadar hormon testosteron di dalam serum darah.

Berkaitan dengan temuan tersebut, penelitian ini menjelaskan bahwa pasak bumi mengaktifkan peningkatan pembentukan spermatid akhir di dalam tubuli seminiferi yang dipengaruhi oleh peningkatan aktivitas sel-sel yang memproduksi hormon LH pada hipofisis dan secara bersamaan juga dipengaruhi oleh produksi testosteron serum oleh sel-sel Leydig/sel interstisial. Hormon testosteron secara langsung mempengaruhi proses spermatogenesis berjalan aktif (Cox & John 2005). Sementara itu, aktivitas sel-sel hipofisis yang memproduksi FSH

dipertahankan sehingga berpengaruh di dalam tubuli seminiferi dengan tidak terjadi peningkatan jumlah spermatogonia dan relatif sama dengan kontrol.

Sejalan dengan temuan tersebut, Matthiesson *et al.* (2006) menjelaskan bahwa FSH dan LH mengontrol proses spermatogenesis secara terpisah. Dibanding LH, maka FSH menunjukkan pengaruh nyata pada peningkatan jumlah spermatosit sekunder. Sementara peningkatan nyata perubahan menjadi spermatid akhir dipengaruhi oleh LH. Matthiesson *et al.* (2006) juga menemukan bahwa pematangan spermatogonia dipengaruhi oleh FSH. Proses spermiogenesis tampak jelas dipengaruhi oleh LH dan testosteron testis.

Berhubungan dengan fungsi FSH dikaitkan dengan perkembangan tahap spermatogenesis berdasarkan umur tikus jantan, Lee *et al.* (1975) menemukan bahwa pada tikus Sprague Dawley jantan umur 0-5 hari memiliki kadar FSH yang tinggi/meningkat (660 ng/ml) yang berperan meningkatkan pembentukan spermatogonia dari sel calon spermatogonia. Kadar FSH menurun ketika tikus jantan berumur 11-15 hari (282 ng/ml), pada saat itu penampilan histologi spermatogenesis pada tubuli seminiferi tidak mengalami perubahan di banding kontrol. Kadar FSH kembali tinggi/meningkat (421 ng/ml) pada tikus umur 26-30 hari dan berperan meningkatkan pembentukan spermatosit sekunder untuk menjadi spermatid awal. Sementara pembentukan spermatid akhir dan spermiogenesis (proses pelepasan spermatozoa ke lumen) dirangsang oleh LH (Matthiesson *et al.* 2006). Selanjutnya pada tikus umur 51-60 hari menunjukkan kadar FSH menurun (193 ng/ml) dan ini berkaitan dengan penurunan jumlah spermatozoa karena sebagian besar telah dilepas dari tubuli seminiferi (Lee *et al.* 1975).

KESIMPULAN

Pemberian pasak bumi sekali setiap hari selama 3 hari mendorong proses spermatogenesis, khususnya pada pembentukan spermatid akhir secara nyata (uji Duncan $\alpha = 0,05$). Pada tahapan spermatogonium, pasak bumi mempertahankan jumlah spermatogonium sampai hari ke-3 setara dibanding kontrol.

DAFTAR PUSTAKA

- Bearden HJ, John W Fukuay, Scott TW. 2004. *Applied animal reproduction* 6Th ed. New Jersey: Pearson Prentice Hall
- Cox RM and John AHB. 2005. Testosterone has opposite effects on male growth in lizards (*Sceloporus* spp.) with opposite patterns of sexual size dimorphism. *J Exp Biol* 208 (24): 4679–87.
- Depkes 2003. Standarisasi Sediaan Obat Herba. Makalah *Seminar Dan Pameran Nasional*. Kelompok Kerja Nasional Tumbuhan Obat Indonesia. Jakarta 25-26 Maret 2003.
- Favig EM, Foad O. 2009. Serum and plasma levels of total and free testosterone and of sex hormone binding globulins in rats growing in the below sea level environment of the Jordan valley. *J Endocr* 5(2): 1-6.
- Johnson MH, Barry JE. 1998. *Essential reproduction*. London: Blackwell Science Ltd.
- Kiernan JA. 1990. *Histological and histochemical methods: Theory and Practice*. 2nd ed. New York: Pergamon Pr.
- Krisfalosi M, Vivoshi M, Patricia LM, Deborah AD. 2006. Multiple glycolytic enzymes are tightly bound to the fibrous sheath of rat spermatozoa. *Biol Reprod* 75:270-278.
- Lee VWK, DM De Kreiser, B Hudson, and C Wang. 1975. Hormonal changes in male rats with age. *J Reprod Fert* 42:121-126.
- Lu FC. 1995. *Toksikologi Dasar: Asas, Organ sasaran, dan penilaian resiko*. Ed ke empat. Nugroho E, penerjemah; Jakarta: UI Press, Terjemahan dari: Basic toxicology: Fundamentals, target organs, and risk assessment. Hal 85-105
- Matthiesson KL, Robert IM, Liza OD, Mark F, David MR, Peter GS, and Sarah JM. 2006. The relative roles of FSH and LH in maintaining spermatogonial maturation and spermiation in normal men. *The J of Clin Endocrinol and Metab*. 91(10):3962-3969
- Panjaitan Ruqiah GP. 2008. *Pengujian aktivitas hepatoprotektor akar pasak bumi (Eurycoma longifolia Jack)* [disertasi]. Bogor: Sekolah Pascasarjana IPB.
- Pratomo H. 1987. *Efek rimpang kunyit (Curcuma domestica Val) sebagai anti piretik pada tikus putih jantan yang didemamkan* [skripsi]. Jakarta: Fakultas Biologi UNAS.

**PENGARUH PASAK BUMI PADA DIAMETER
DAN KUALITAS SEMEN DALAM KAUDA EPIDIDIMIS**
**The effect of pasak bumi on the diameter and semen quality
of rat epididymis**

Abstrak

Penelitian tahapan sebelumnya menemukan bahwa sel-sel hipofisis yang memproduksi LH lebih aktif dibanding sel-sel yang memproduksi FSH setelah pemberian seduhan pasak bumi dosis 18 mg//20 g bb. Penelitian selanjutnya menemukan bahwa kadar testosteron serum pada hari ke-3 perlakuan pasak bumi meningkat nyata dibanding kontrol. Lebih lanjut menemukan bahwa pemberian seduhan pasak bumi sampai hari ke-3 mengakibatkan pembentukan spermatid akhir meningkat nyata. Hasil-hasil tersebut mendorong peneliti untuk melanjutkan penelitian. Maka sebagai *end point* penelitian kinerja pasak bumi dilanjutkan dengan menentukan profil diameter kauda epididimis dan mengukur kualitas semen dan spermatozoa di dalam kauda epididimis. Tujuan penelitian selanjutnya adalah: 1). mengukur perubahan diameter kauda epididimis. 2). mengukur kualitas semen dari kauda epididimis dan 3). mengukur kualitas spermatozoa dari kauda epididimis. Metode untuk 1) pengukuran diameter kauda epididimis dilakukan dengan cara mengukur diameter saluran-saluran di dalam kauda epididimis setelah diwarnai menggunakan HE; 2) pengukuran kualitas semen kauda epididimis dilakukan dengan mengambil semen dari kauda epididimis lalu secara makroskopis diukur: warna, konsistensi, dan pH semen; 3) pengukuran kualitas spermatozoa secara mikroskopis diukur meliputi: motilitas, konsentrasi, persentase hidup, dan persentase abnormalitas spermatozoa. Hasil penelitian menyimpulkan: 1). kinerja pasak bumi meningkatkan rerata diameter saluran-saluran dalam kauda epididimis secara nyata hanya pada hari ke-1, sedangkan pada hari ke-3 tidak meningkat, sama dengan kontrol. 2). Kualitas semen kauda epididimis yang meliputi parameter: warna, konsistensi, dan pH semen tidak meningkat setelah perlakuan pasak bumi sampai hari ke-3. Walaupun demikian, 3). kinerja pasak bumi meningkatkan secara nyata konsentrasi spermatozoa dan penurunan persentase abnormalitas. Kinerja pasak bumi sampai hari ke-3 mempertahankan persentase motilitas spermatozoa dan persentase hidup spermatozoa sama dengan kontrol (uji Duncan, $\alpha=0,05$).

Kata kunci: Pasak bumi, kauda epididimis, kualitas semen, spermatozoa

Abstract

Previous result showed that the hypophysis cells produced LH hormone more active than FSH cells. Moreover by the same treatment found that testosterone synthesis increased, that could improve the development of the late spermatid stage in the tubulus seminiferous. Based on the results, research continued to document "the end point" of male reproduction were 1). to determine the diameter change of cauda epididymis tubule. 2). to measure the quality of semen of cauda epididymis and 3). to measure the quality of spermatozoon inner cauda epididymis. Methods: 1) the diameter change of inner canals of cauda epididymis

was determined by HE staining. 2). measurement the quality of semen of cauda epididymis macroscopically included color, consistency and pH of cauda epididymis semen. 3). measurement the quality of spermatozoon of cauda epididymis microscopically included the spermatozoons motility, consentrarion, life spermatozoons percentage, and percentage of spermatozoons abnormality. The result showed that 1) pasak bumi increased the tubule diameter of cauda epididymis on the first day only. 2). the quality of cauda epididymis semen included: colour, consistency, and pH of cauda epididymis semen did not increase, and stabil after three days pasak bumi treatment. Meanwhile 3). pasak bumi significantly increased consentrarion of spermatozoons and decreased percentage decreased of spermatozoons abnormality. In addition, pasak bumi could maintain the percentage of spermatozoons motility and spermatozoons life percentage equal to the control (Duncan test, $\alpha=0,05$).

Keywords: Pasak bumi, kauda epididymis, semen quality, spermatozoa

PENDAHULUAN

Serbuk akar pasak bumi seberat 1 g dengan air seduhan 100 ml diminum pria dewasa sekali setiap hari selama 3 hari dapat meningkatkan nafsu makan dan libido. (Soedibyo 1998; Kardono *et al.* 2003; Biotech 2007). Dosis tersebut setara dengan 1 g/ 70 kg bobot badan rata-rata pria dewasa, jika dikonversi dengan indeks konversi dosis 0,018 (Donatus *et al.* 1998) menjadi 18 mg/200 g bobot badan tikus putih. Sumber lain menyebutkan khasiat pasak bumi pada beberapa buku tanaman obat tradisional antara lain dinyatakan oleh Wijayakusuma (1994) dan Kardono *et al.* (2003) bahwa serbuk akar pasak bumi dengan air seduhan jika diminum beberapa kali dapat meningkatkan libido dan ketahanan ereksi pria.

Penelitian pada tahapan sebelumnya memperoleh hasil yang menjelaskan bahwa pemberian pasak bumi dosis seduhan 18 mg/200 g bb dalam 1 ml aquades meningkatkan libido yang tinggi. Penelitian selanjutnya menjelaskan bahwa seduhan pasak bumi meningkatkan proporsi jumlah sel-sel basofil hipofisis dibanding sel asidofil. Sel-sel basofil diketahui sebagai sel yang memproduksi LH dan FSH secara sendiri maupun terpisah. Sel asidofil adalah sel yang antara lain memproduksi prolaktin. Lebih lanjut pada pendeteksian tingkat aktivitas sel hipofisis ditemukan bahwa sel-sel yang memproduksi LH lebih aktif dibanding sel-sel yang memproduksi FSH setelah hari ke-3 pemberian seduhan pasak bumi dosis 18 mg/20 g bb. Peneliti memperkuat temuannya dengan hasil selanjutnya

yang menemukan bahwa kadar testosteron serum pada hari ke-3 meningkat nyata dibanding kontrol.

Peningkatan kadar hormon testosteron, tingkat aktivitas sel penghasil LH, dan kestabilan tingkat aktivitas sel penghasil FSH mempengaruhi perkembangan tahapan proses spermatogenesis. Selanjutnya, penelitian menemukan bahwa pemberian seduhan pasak bumi sampai hari ke-3 mengakibatkan pembentukan spermatid akhir meningkat nyata. Pada hari ke-3 juga disertai dengan pembentukan spermatosit primer menurun, dan mempertahankan jumlah spermatogonium dibanding kontrol. Matthiesson *et al.* (2006) juga menemukan bahwa pembelahan spermatogonia dipengaruhi oleh FSH, sedangkan proses spermiogenesis nampak jelas dipengaruhi oleh LH dan testosteron testis.

Berdasarkan beberapa hasil penelitian pada tahapan sebelumnya memperoleh temuan kinerja pasak bumi pada tikus jantan yang menghasilkan peningkatan libido, hormon-hormon reproduksi dan gambaran tahapan spermatogenesis. Maka sebagai *end point* penelitian, perlu dilanjutkan dengan menentukan profil diameter kauda epididimis dan mengukur kualitas semen dan spermatozoa di dalam kauda epididimis. Dengan demikian, penelitian ini bertujuan untuk 1). mengukur perubahan diameter kauda epididimis. 2). mengukur kualitas semen secara makroskopis, dan 3). mengukur kualitas spermatozoa secara mikroskopis.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan di laboratorium Rumah Sakit Hewan IPB Darmaga Bogor dan di Laboratorium Unit Rehabilitasi Reproduksi (URR) FKH IPB Darmaga Bogor. Pemeliharaan tikus putih dilakukan di kandang hewan percobaan di Rumah Sakit Hewan (RSH) IPB Darmaga Bogor selama 2 minggu.

Bahan Penelitian

Hewan percobaan menggunakan tikus putih jantan dewasa *Rattus norvegicus* strain Sprague Dawley berumur 3 ½ bulan dengan bobot 121-194 g. Tikus tersebut diperoleh dari Laboratorium Hewan Coba Badan POM di Jakarta sejumlah 18 ekor, untuk perlakuan dengan rincian sebagai berikut: 9 ekor jantan dengan perlakuan pasak bumi yang akan dikorbankan 6 ekor menggunakan anestesi masing-masing 3 ekor (n=ulangan=3) pada hari ke-1 dan 3 ekor pada hari ke-3. Selebihnya 9 ekor jantan digunakan sebagai kontrol dengan pemberian aquades yang juga dikorbankan 6 ekor masing-masing 3 ekor pada hari ke-1 dan 3 ekor pada hari ke-3. Sejumlah tikus betina dipilih yang sedang estrus digunakan sebagai penggodanya. Sebelum diberi perlakuan pasak bumi, tikus putih diadaptasikan di kandang hewan percobaan di Laboratorium Anatomi dan Histologi FKH. Waktu adaptasi masing-masing selama 2 minggu. Selama penelitian tikus diberi pakan dan minum ad libitum.

Simplisia akar tanaman pasak bumi (*Eurycomae longifolia* Jack) dikuliti seperti pada pembuatan serbuk jamu lainnya (Depkes 2003; Pratomo 1987). Bagian kayu dari akar pasak bumi yang relatif keras dicuci bersih lalu ditiriskan dan dipotong-potong dengan ukuran panjang 7 cm, lebar 2 cm, dan tebal 2 cm. Potongan dikeringkan dalam oven pada suhu 50°C selama 5 hari, selanjutnya dipotong kecil-kecil menggunakan pisau *stainless* tajam. Potongan akar kayu tersebut lalu digiling sampai halus menggunakan alat giling khusus untuk membuat tepung lalu disaring dengan pengayak Mesh 50 (ukuran pori = 300 µm). Simplisia selanjutnya disimpan dalam toples-toples di lemari kering.

Prosedur Penentuan Kerja Pasak Bumi pada Kauda Epididimis dan Kualitas Semen

Kerja pasak bumi pada kualitas semen di dalam kauda epididimis dipelajari dengan melakukan tiga subkegiatan penelitian, yaitu: 1). mengukur perubahan diameter kauda epididimis. 2). pemeriksaan kualitas semen secara makroskopis meliputi: warna, konsistensi dan pH, dan 3). pemeriksaan kualitas semen secara mikroskopis meliputi: motilitas, konsentrasi, persentase hidup, dan persentase abnormalitas. Tikus putih jantan terlebih dahulu diperlakukan seperti pada Tabel 14 berikut:

Tabel 14 Rancangan kegiatan untuk analisis kinerja pasak bumi pada kauda epididimis

Waktu	Pkl 9.00 WIB	Selang 5 jam	Pkl. 14.00 WIB	Pkl 14.12 WIB
Hari ke-1, 2, 3	Pemberian pasak bumi Peroral	Tikus ♂ istirahat	Pengamatan tingkah laku libido 10 menit	sampling epididimis hari ke-1 dan ke-3

Perlakuan yang diberikan untuk analisis kerja pasak bumi pada kauda epididimis dan kualitas semen, ialah: 1) pemberian aquades 1 ml/200 g bb pada kelompok kontrol pada hari ke-1 sampai hari ke-3. 2) pemberian dosis seduhan pasak bumi terpilih, yaitu 18 mg/200 g bb pada kelompok perlakuan pada hari ke-1 sampai hari ke-3. Sampling kauda epididimis dilakukan pada kelompok kontrol dan perlakuan pasak bumi pada hari ke-1 dan hari ke-3. Kajian kerja pasak bumi pada kualitas semen di dalam kauda epididimis dilakukan setelah perlakuan, seperti pada Tabel 14, lalu tikus jantan dianastesi menggunakan ketamil dan dibedah untuk diambil bagian kauda epididimis.

1) Mengukur Perubahan Diameter Kauda Epididimis

Kauda epididimis tikus putih berbentuk saluran-saluran selinder yang menyimpan sel-sel spermatozoa. Dengan demikian, ketika kauda epididimis penuh dengan spermatozoa dan terjadi peningkatan volume maka akan mendorong sisi bagian dalam dinding kauda epididimis menjadi lebih luas dibanding sebelum meningkat. Profil diameter kauda epididimis akan menjelaskan perubahan volume yang dialami setelah perlakuan pasak bumi dan kontrol aquades. Pengukuran diameter dilakukan terhadap 20 saluran kauda epididimis dari 3 slide ulangan untuk setiap perlakuan. Jaringan kauda epididimis dipotong di bagian tengah secara melintang lalu dilakukan pewarnaan HE. Selanjutnya pengukuran dilakukan menggunakan alat *eyepiece* dan micrometer 2 μm yang dipasang pada mikroskop binokuler.

2) Pemeriksaan Kualitas Semen Secara Makroskopis

Cara mengukur beberapa parameter kualitas semen pada kauda epididimis secara makroskopis meliputi pengukuran: warna, konsistensi, dan pH semen.

Semen dikoleksi dengan terlebih dahulu memotong testis dan dikuliti sehingga memperoleh dua belahan testis. Dua belah testis tersebut diletakkan dalam cawan petri yang diisi NaCl fisiologis. Bagian kauda epididimis dari salah satu testis disayat dengan silet lalu ditekan untuk mengeluarkan semen dan diletakkan pada alat tabung atau cawan petri yang lain.

Warna Semen

Pengukuran warna semen dilakukan dengan cara: semen yang diambil dari torehan kauda epididimis diletakkan di cawan petri. Lalu dilihat dengan menggunakan mata telanjang dan diamati warnanya. Indikator warna dari putih jernih sampai agak kuning. Warna putih jernih = kurang/tidak baik; Putih-krem susu = baik; krem-keabu abuan = sangat baik; agak kuning = normal cenderung kurang baik.

Konsistensi Semen

Pengukuran konsistensi atau kekentalan semen dengan cara memiringkan tabung penampung semen, sebagai indikator adalah kecepatan semen untuk turun dari dinding tabung penampung semen tersebut. Semakin cepat semen turun berarti konsistensi semen semakin encer. Demikian sebaliknya, semakin lama waktu yang diperlukan semen turun dari dinding tabung penampung semen maka semakin kental konsistensi semen.

pH Semen

pH semen diukur dengan cara mencelupkan ujung kertas indikator pH (*pH indicator paper 1.09557.0003*) merek Merck dengan skala terkecil 0,1 dari kisaran 6,4 – 8,0 ke dalam semen, dan didiamkan sebentar sampai kertas indikator tersebut berubah warna permanen. Nilai pH diperoleh dengan menyamakan warna yang diperoleh dengan standar warna yang terdapat pada kotak indikator pH tersebut.

3). Pemeriksaan Kualitas Semen Secara Mikroskopis

Cara mengetahui kualitas semen secara mikroskopis setelah pemberian pasak bumi dan kontrol dilakukan dengan pengukuran meliputi: motilitas, konsentrasi, persentase hidup, persentase abnormalitas spermatozoa di dalam semen pada kauda epididimis.

Motilitas Spermatozoa

Pengamatan motilitas spermatozoa dilakukan dengan cara, mencampurkan satu tetes semen dari kauda epididimis dengan dua tetes NaCl fisiologis di atas kaca objek secara merata. Lalu diambil sedikit dan ditutup dengan *cover glass*. Motilitas atau gerakan spermatozoa diamati dengan mikroskop pada pembesaran 40 kali. Spermatozoa yang bergerak ke depan diamati dibandingkan dengan yang tidak bergerak atau bergerak di tempat. Spermatozoa yang bergerak maju dinyatakan dalam persentase. Penghitungan dilakukan dari beberapa lapang pandang.

Konsentrasi Spermatozoa

Penghitungan spermatozoa dengan menggunakan *neubauer chamber* dilakukan dengan cara: mencampurkan semen dari kauda epididimis tikus jantan sejumlah 1 μl dengan larutan formolsalin 499 μl . Pencampuran dilakukan dengan cara memasukkan semen 1 μl ke dalam tabung ependorf yang telah berisi formolsalin sejumlah 499 μl , sehingga kadar pengenceran=1:500. Campuran di homogenkan lalu ditetaskan pada kamar hitung neubauer, dan dilakukan penghitungan di bawah mikroskop dengan pembesaran 40 X. Penghitungan spermatozoa dilakukan dengan sistem acak teratur, yaitu dari 25 kamar hitung yang ada hanya dihitung 5 kamar saja terdiri atas bagian sudut-sudut dan tengah (sudut kanan atas dan bawah, sudut kiri atas dan bawah, serta tengah). Konsentrasi spermatozoa diperoleh dari hasil penghitungan jumlah spermatozoa 5 kotak besar $(N) \times 25 \times 10^6$ spermatozoa/ml.

Persentase Hidup Spermatozoa

Spermatozoa hidup diamati dengan cara: satu tetes semen dari kauda epididimis diteteskan di atas kaca objek dan diteteskan pula (tiga tetes) eosin negrosin. Lalu dicampurkan dengan ujung kaca objek yang lain dan dibuat preparat ulas pada kaca objek yang lainnya. Hasil preparat ulas diletakkan di atas meja penghangat (*hot plate*) sampai kering. Pengamatan dilakukan di bawah mikroskop dengan pembesaran 40X atau 100X, dihitung spermatozoa yang hidup berwarna putih/bening karena tidak menyerap warna eosin dan dibandingkan dengan seluruh spermatozoa yang ada dan dinyatakan dalam persentase. Penghitungan dilakukan pada beberapa lapang pandang dari tiga kali ulangan (tiga tikus setiap perlakuan), hasil penghitungan selanjutnya dirata-rata.

Persentase Abnormalitas Spermatozoa

Spermatozoa abnormal diamati dengan cara: satu tetes semen dari kauda epididimis diteteskan di atas kaca objek dan diteteskan pula (tiga tetes) eosin negrosin disitu. Lalu dicampurkan dengan ujung kaca objek yang lain dan dibuat preparat ulas pada kaca objek yang lainnya. Hasil preparat ulas diletakkan di atas meja penghangat (*hot plate*) sampai kering. Pengamatan dilakukan di bawah mikroskop dengan pembesaran 40X atau 100X, dihitung spermatozoa yang berbentuk abnormal (tidak normal) dibandingkan dengan jumlah semua spermatozoa yang ada dalam lapang pandang dan dinyatakan dalam persentase. Penghitungan dilakukan pada beberapa lapang pandang dari ulangan tiga kali (tiga tikus setiap perlakuan), hasil penghitungan selanjutnya dirata-rata.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Efek pasak bumi pada kauda epididimis dan kualitas semen meliputi kajian: 1). Perubahan diameter kauda epididimis setelah perlakuan pasak bumi, Bagian 2). Kerja Pasak bumi pada kualitas semen secara makroskopis, dan 3). Kerja Pasak bumi pada kualitas spermatozoa secara mikroskopis.

1). Perubahan Diameter Kauda Epididimis

Perubahan diameter kauda epididimis yang diamati setelah perlakuan pasak bumi adalah: ukuran diameter setiap sampel saluran terpilih, di dalam kauda epididimis. Profil diameter kauda epididimis tampak pada Tabel 15.

Tabel 15 Diameter kauda epididimis setelah perlakuan pasak bumi

No	Perlakuan	Rerata diameter kauda epididimis (μm)
1	Aquades hari ke-1	195, 26 \pm 11,47 ^a
2	Aquades hari ke-3	332, 35 \pm 10,82 ^{b,c}
3	Pasak bumi hari ke-1	308, 01 \pm 19,82 ^b
4	Pasak bumi hari ke-3	366, 00 \pm 21,05 ^c

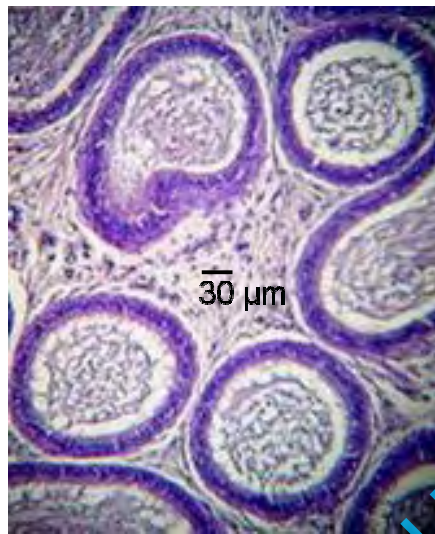
Keterangan: huruf kecil superskrip pada setiap kolom yang sama menyatakan perbedaan nyata pada taraf 5 %, Uji Duncan $\alpha = 0,05$.

Berdasarkan data pada Tabel 15, diameter kauda epididimis meningkat secara nyata pada hari ke-3 (366,00 μm) pemberian pasak bumi dibanding kontrol/aquades pada hari ke-1 (195, 26 μm) dan pasak bumi hari ke-1 (308, 01 μm), tetapi tidak berbeda nyata dengan kontrol pada hari ke-3 (332, 35 μm). Hal ini menjelaskan bahwa pemberian pasak bumi sekali setiap hari selama tiga hari tidak meningkatkan secara nyata diameter kauda epididimis yang juga secara tidak langsung menunjukkan bahwa volume spermatozoa di dalam kauda epididimis tidak meningkat nyata.

Volume spermatozoa di dalam kauda epididimis secara tidak langsung ditunjukkan dengan profil diameter saluran-saluran dalam kauda epididimis yang mengalami peningkatan sedikit (tidak nyata) dengan pemberian pasak bumi. Diameter kauda epididimis tampak meningkat nyata hanya pada hari ke-1 dibandingkan dengan kontrol hari ke-1. Peningkatan volume spermatozoa hari ke-1 di dalam kauda epididimis diduga terkait dengan peningkatan libido yang terjadi pada hari ke-1 pemberian pasak bumi, sehingga mendorong sebagian cairan semen dan spermatozoa yang meningkat di dalam tubuli seminiferi berpindah ke saluran-saluran spermatozoa di dalam kauda epididimis.

Spermatozoa mengalami maturasi atau pematangan di dalam epididimis. Proses pematangan (maturasi) spermatozoa sangat diperlukan karena ketika spermatozoa memasuki vasa eferentia tidak cukup mampu untuk bergerak dan tidak dapat membuahi oosit. Spermatozoa dibawa oleh cairan dari tubulus seminiferus (Gambar 16) ke rete testis, disana terjadi sedikit perubahan ion-

ionnya. Selanjutnya dibawa oleh cairan vasa eferentia dan masuk ke duktus epididimis.



Gambar 16 Potongan melintang saluran – saluran di dalam kauda epididimis. Bagian lumen diisi oleh sejumlah besar spermatozoa (pewarnaan HE).

Uraian berikut menjelaskan proses pematangan (maturasi) spermatozoa (Norman & Litwack 1987; Johnson & Barry 1998): Cairan dari vasa eferentia yang mengandung banyak spermatozoa di dalam epididimis diserap kembali (reabsorpsi) sehingga konsentrasi spermatozoa menjadi lebih pekat, yaitu 100 kali dari konsentrasi semula. Di samping itu, epididimis mensekresikan senyawa-senyawa antara lain karnitin, gliseroposporilkolin, fruktosa, dan glikoprotein. Dua senyawa yang terakhir membungkus permukaan spermatozoa.

Proses pematangan (maturasi) spermatozoa di dalam duktus epididimis berkaitan dengan perubahan-perubahan biokimiawi dan morfologi spermatozoa. Setelah mendiami kauda epididimis, spermatozoa mampu aktif bergerak berenang dan melakukan fertilisasi, terutama setelah keluar terlepas dari saluran jantan. Sel-sel di dalam saluran-saluran/duktus epididimis mempunyai reseptor, reseptor-reseptor intraseluler mengikat/mengambil androgen dan 5α reduktase, mengubah testosteron menjadi dihidrotosteron untuk menghasilkan tingkat jaringan yang lebih aktif terhadap androgen aktif. Kebanyakan androgen yang memicu fungsi epididimis bukan berasal dari sirkulasi darah tetapi dari limfa dan cairan rete testis (Norman & Litwack 1987; Johnson & Barry 1998).

Perubahan-perubahan semen dan spermatozoa di dalam epididimis (Norman & Litwack 1987; Johnson & Barry 1998) antara lain: Konsentrasi kepekatan semen meningkat dibanding ketika di vasa eferen, pematangan inti, dan bentuk akrosom menjadi lengkap. Kolesterol dan fosfolipid secara selektif dimetabolisme untuk keseimbangan menjadi diasil gliserol, asam lemak tak jenuh, dan kolesterol. Meningkatnya ketergantungan pada fruktosa eksternal untuk produksi energi melalui glikolisis. Peningkatan ikatan disulfida antara protein-protein di bagian luar serat padat ekor spermatozoa sehingga lebih keras dan lebih kuat bergetar. Kandungan cAMP ekor spermatozoa meningkat.

Ketika spermatozoa meninggalkan kauda epididimis menuju vas deferens, spermatozoa berada dalam bentuk sangat kental. Transpor spermatozoa mengikuti pergerakan cairan yang terutama ditimbulkan oleh kegiatan otot (*muscular activity*) dari epididimis dan vas deferens. Pada ketiadaan ejakulasi, spermatozoa akan bergerak menuju terminal ampulla dari vas deferens ke dalam urethra dan selanjutnya dialirkan keluar bersama dalam urin (Norman & Litwack 1987; Johnson & Barry 1998).

2). Kerja Pasak Bumi pada Kualitas Semen Secara Makroskopis

Kajian kerja pasak bumi pada kualitas semen pada kauda epididimis secara makroskopis dilakukan melalui pengamatan pada beberapa parameter kualitas semen yang meliputi: 1. warna, 2. konsistensi dan 3. pH. Kajian kinerja pasak bumi dilakukan setelah perlakuan pada hari ke-1 sampai dengan hari ke-3, hasil pengamatan ditampilkan pada Tabel 16.

Tabel 16 Kualitas semen pada kauda epididimis setelah perlakuan kontrol/aquades dan pasak bumi pada hari ke-1 sampai hari ke-3.

No	Perlakuan	pH	Rerata	
			Warna	Konsistensi
1	Kontrol hari ke-1	6,8 ± 0,17 ^a	Putih	Kental
2	Kontrol sampai hari ke-3	6,9 ± 0,17 ^a	Putih	Kental
3	Pasak bumi hari ke-1	6,8 ± 0,17 ^a	Putih	Kental
4	Pasak bumi hari ke-3	6,9 ± 0,17 ^a	Putih	Kental

Keterangan: huruf kecil superskrip berbeda pada kolom yang sama menyatakan perbedaan nyata pada taraf 5 %, Uji Duncan $\alpha = 0,05$.

Berlandaskan data pada Tabel 16 diperoleh bahwa kualitas semen dengan perlakuan pasak bumi sekali setiap hari pada hari ke-1 sampai dengan hari ke-3 dibandingkan dengan kontrol pada hari ke-1 sampai dengan hari ke-3 menunjukkan nilai yang sama. Pada hari ke-3, perlakuan pasak bumi sama hasilnya dengan perlakuan kontrol pada hari ke-3, walaupun menunjukkan sedikit peningkatan pada kadar pH dari 6,8 menjadi 6,9 tetapi tidak berbeda nyata secara statistik (uji Duncan, $\alpha = 0,05$). Pada parameter lainnya, yaitu parameter warna dan konsistensi semen tidak terjadi peningkatan kualitas, yaitu tetap sama berwarna putih dan berkonsistensi kental. Kualitas semen dengan indikator warna putih, konsistensi kental, dan dengan pH berkisar antar 6,7 sampai 7,1 merupakan parameter kualitas semen secara makroskopis yang menunjukkan tikus dalam keadaan sehat normal (Juniarto 2004; Iswara 2009).

Berkaitan dengan hasil kualitas semen perlakuan pasak bumi maupun kontrol pada hari ke-1 sampai hari ke-3 secara makroskopis dapat dijelaskan sebagai berikut:

1. Kerja pasak bumi tidak berbeda nyata dalam meningkatkan kualitas semen secara makroskopis untuk parameter: warna, konsistensi dan pH semen di dalam kauda epididimis, dibandingkan dengan kontrol. Berlandaskan temuan pada penelitian tahapan sebelumnya bahwa perlakuan pasak bumi telah meningkatkan kerja sel hormonal LH pada hipofisis secara nyata (disebut sebagai *trigger* sel hormonal LH). Pasak bumi juga telah meningkatkan produksi hormon testosteron serum secara nyata. Maka dalam proses fisiologi pada kauda epididimis tentunya diperkirakan juga meningkatkan secara kuantitatif kualitas semen yang di dalamnya terdapat spermatozoa. Dengan demikian, penelitian dilanjutkan dengan mengukur kualitas semen secara mikroskopis yang akan mendapatkan informasi yang diperlukan secara kuantitatif, dan dapat menjelaskan adanya suatu peningkatan kualitas spermatozoa akibat perlakuan pasak bumi.

2. Perlakuan kontrol menggunakan aquades pada hari ke-1 sampai hari ke-3 berdasarkan analisis secara statistik tidak bekerja mempengaruhi proses fisiologis di dalam kauda epididimis yang berkaitan dengan kualitas warna dan konsistensi semen. Walaupun demikian, terjadi sedikit peningkatan pH, dari rerata

pH = 6,8 pada hari ke-1 menjadi pH =6,9 pada hari ke-3. Demikian pula pada kelompok perlakuan pasak bumi terjadi peningkatan yang tidak nyata secara statistik dari rerata pH=6,8 pada hari ke-1 menjadi pH=6,9 pada hari ke-3. Peningkatan yang tidak signifikan tersebut mungkin dipengaruhi oleh adanya sedikit peningkatan kerja pada sel-sel dinding kauda epididimis. Mungkin dalam hal keseimbangan volume cairan ekstraseluler yang menimbulkan terjadi peningkatan sedikit kation natrium untuk mengimbangi sedikit peningkatan konsentrasi cairan ekstra seluler karena peningkatan libido. Berdasarkan terjadinya sedikit peningkatan kation natrium maka akan diikuti oleh sedikit peningkatan pH pada lumen saluran-saluran kauda epididimis, walaupun peningkatan pH tersebut tidak berbeda nyata (uji Duncan, $\alpha = 0,05$).

3). Kerja Pasak Bumi pada Kualitas Semen Secara Mikroskopis

Sebagai lanjutan pengukuran kualitas semen secara makroskopis dilakukan pengukuran kualitas spermatozoa di dalam kauda epididimis secara mikroskopis yang mendapatkan informasi kualitas secara kuantitatif. Pengukuran kualitas spermatozoa secara mikroskopis meliputi parameter: motilitas sperma, konsentrasi, persentase hidup, dan persentase abnormalitas sperma. Hasil pengukuran ditampilkan pada Tabel 17.

Tabel 17 Kualitas spermatozoa pada kauda epididimis secara mikroskopis setelah perlakuan kontrol dan pasak bumi pada hari ke-1 sampai ke-3.

No	Parameter yang dikaji	Perlakuan			
		Kontrol hari ke-1	Kontrol sampai hari ke-3	Pasak bumi hari ke-1	Pasak bumi sampai hari ke-3
1	Motilitas Spermatozoa (%)	71,67 $\pm 2,88^a$	70,00 $\pm 0,00^a$	76,67 $\pm 2,88^a$	76,67 $\pm 5,77^a$
2	Konsentrasi Spermatozoa (Juta/ml)	287,57 $\pm 3,82^a$	290,62 $\pm 7,50^a$	310,62 $\pm 0,66^{ab}$	335,40 $\pm 8,32^b$
3	Persentase hidup sperma	88,95 $\pm 0,73^{ab}$	87,29 $\pm 2,72^a$	90,85 $\pm 0,77^b$	90,12 $\pm 0,93^{ab}$
4	Persentase abnormalitas spermatozoa	21,39 $\pm 1,60^c$	15,28 $\pm 0,45^b$	13,02 $\pm 1,18^a$	12,77 $\pm 1,15^a$

Keterangan: huruf superskrip berbeda pada baris yang sama menyatakan perbedaan nyata pada taraf 5 % (Uji Duncan, $\alpha = 0,05$).

Motilitas Spermatozoa

Data hasil penelitian pada Tabel 17 menunjukkan bahwa motilitas spermatozoa yang berasal dari kauda epididimis sedikit meningkat pada kelompok perlakuan pasak bumi hari ke-1 sampai hari ke-3 dibandingkan dengan kelompok kontrol pada hari ke-1 sampai hari ke-3. Persentase motilitas spermatozoa pada kelompok kontrol hari ke-1 dan hari ke-3, yaitu 71,67 % dan 70,00 % meningkat relatif sedikit menjadi 76,67 % pada hari ke-1 dan hari ke-3 pada kelompok perlakuan pasak bumi. Walaupun demikian, peningkatan tersebut tidak berbeda nyata secara statistik (uji Duncan, $\alpha = 0,05$).

Berdasarkan data bahwa dengan perlakuan pasak bumi (18 mg/200 g bb dalam 1 ml aquades) memperoleh motilitas spermatozoa pada hari ke-3 sebesar 76,67 % (Tabel 17) adalah lebih tinggi dibandingkan dengan temuan dalam penelitian Juniarto (2004) yang menggunakan tumbuhan purwoceng dan pasak bumi. Juniarto (2004) memperoleh rerata motilitas spermatozoa dengan perlakuan purwoceng (*Pimpinella alpina*, 25 mg dalam 2 ml aquades), yaitu 62,7 %, dan rerata motilitas spermatozoa 64,8 % dengan perlakuan pasak bumi (*Eurycoma longifolia*, 25 mg dalam 2 ml aquades). Perlakuan pada penelitian Juniarto (2004), ialah menggunakan purwoceng dibandingkan dengan pasak bumi yang masing-masing perlakuan diberikan sekali setiap pagi selama 53 hari pada tikus jantan Sprague Dawley.

Hasil persentase motilitas spermatozoa pada kontrol pemberian aquades hari ke-1 sampai hari ke-3 tidak mengalami peningkatan nyata/nonsignifikan. Pada kelompok kontrol, setelah 3 hari terjadi relatif sedikit menurun, yaitu dari sejumlah rerata 71,67 % menjadi 70,00 % (Tabel 17). Sedikit persentase penurunan motilitas spermatozoa pada kontrol hari ke-3 yang tidak berbeda nyata secara statistik (uji Duncan, $\alpha = 0,05$) mungkin disebabkan oleh penggunaan individu yang berbeda antara hari ke-1 dengan hari ke-3. Pada penelitian Iswara (2009) persentase motilitas spermatozoa pada kelompok kontrol tikus strain Wistar adalah sebesar 47,5 %. Perbedaan rerata motilitas kelompok kontrol antara temuan penelitian ini sebesar 70,00 % dengan temuan Iswara (2009) sebesar 47,5 % dan Juniarto (2004) sebesar 45,7 % mungkin disebabkan antara lain oleh perbedaan individu yang digunakan. Di samping itu juga adanya perbedaan durasi

atau lama waktu yang diterapkan dalam penelitian Juniarto (2004) dan Iswara (2009).

Kinerja pasak bumi pada kauda epididimis yang berkaitan dengan motilitas spermatozoa dipengaruhi oleh adanya peningkatan energi yang berkaitan dengan peningkatan kadar hormon testosteron serum yang tampak pada hari ke-3 perlakuan pasak bumi. Bearden *et al.* (2004) menjelaskan bahwa testosteron memicu kerja sel-sel kelenjar seminal vesikel dan kauda epididimis untuk mensintesis senyawa-senyawa sumber energi, yaitu: fruktosa dan sorbitol yang diproduksi oleh kelenjar seminal vesikel, dan gliserilposporilkolin (GPC) yang diproduksi oleh epididimis. Senyawa sumber energi yang utama untuk motilitas dan daya hidup spermatozoa adalah fruktosa, Di samping sorbitol dan GPC.

Metabolisme energi di dalam spermatozoa, yaitu mengubah substrat berenergi menjadi senyawa bentuk energi siap pakai. Enzim-enzim untuk perubahan tersebut berada pada selubung mitokondria. Di samping fruktosa, sorbitol (gula alkohol) dan GPC yang berada di dalam plasma semen yang disebut dengan plasmalogen. Lipid ditemukan dalam spermatozoa sebagai cadangan energi yang dapat digunakan ketika substrat lain terbatas (Bearden *et al.* 2004).

Konsentrasi Spermatozoa

Hasil penelitian pada Tabel 17 menunjukkan bahwa konsentrasi spermatozoa yang berasal dari kauda epididimis meningkat nyata pada kelompok perlakuan pasak bumi hari ke-1 sampai hari ke-3 dibandingkan dengan kelompok kontrol pada hari ke-1 sampai hari ke-3 (uji Duncan, $\alpha=0,05$). Perlakuan pasak bumi telah meningkatkan konsentrasi spermatozoa dari 287,57 juta/ml dan 290,62 juta/ml kelompok kontrol hari ke-1 dan ke-3 menjadi 310,62 juta/ml dan 335,40 juta/ml pada hari ke-1 dan ke-3 pada kelompok perlakuan pasak bumi. Sementara itu, penelitian pada tahapan sebelumnya menjelaskan bahwa setelah pemberian pasak bumi selama 3 hari, terjadi peningkatan aktivitas sel produsen LH di hipofisis dan kadar testosteron serum darah. Dengan demikian, seperti temuan Matthiesson *et al.* (2006) bahwa proses spermiogenesis secara nyata dipengaruhi oleh LH dan testosteron testis, maka konsentrasi spermatozoa pada kauda

epididimis pada penelitian ini juga meningkat setelah pemberian pasak bumi sampai hari ke-3.

Temuan penelitian dengan perlakuan pasak bumi dosis seduhan 18 mg/200 g bb yang memperoleh konsentrasi spermatozoa sampai pada hari ke-3 sebesar, yaitu 335,40 juta/ml. Konsentrasi spermatozoa dengan perlakuan pasak bumi temuan pada penelitian ini (Tabel 16) juga masih lebih tinggi dibandingkan dengan konsentrasi spermatozoa kelompok kontrol dalam penelitian Juniarto (2004), yaitu 106,7 juta/ml. Sedangkan hasil konsentrasi spermatozoa pada perlakuan kontrol dengan pemberian aquades hari ke-1 sampai hari ke-3 pada penelitian ini tidak mengalami peningkatan nyata/non signifikan. Konsentrasi spermatozoa pada kelompok kontrol setelah 3 hari tidak berbeda nyata secara statistik dengan kelompok kontrol hari ke-1 (uji Duncan, $\alpha = 0,05$). Peningkatan sedikit dari sejumlah 287,57 juta/ml menjadi 290,62 juta/ml mungkin disebabkan oleh penggunaan individu yang berbeda antara hari ke-1 dengan hari ke-3.

Kerja pasak bumi pada kauda epididimis yang berkaitan dengan konsentrasi spermatozoa yang meningkat nyata pada hari ke-3 (Tabel 17) dipengaruhi langsung oleh adanya peningkatan nyata jumlah sel-sel spermatid akhir di dalam tubulus seminiferus seperti yang ditunjukkan hasil (uji Duncan, $\alpha = 0,05$) yang berkaitan dengan peningkatan hormon testosteron yang tampak pada hari ke-3 perlakuan pasak bumi. Melalui pengaruhnya pada jantan/pria maka hormon testosteron membantu mempertahankan kondisi optimum dalam proses spermatogenesis di dalam tubuli seminiferi (Norman & Litwack 1987; Bearden *et al.* 2004). Testosteron dan Dehidrotetosteron (DHT) berikatan dengan reseptor di sitoplasma, kemudian kompleks steroid-reseptor mengalami modifikasi dan translokasi ke dalam nukleus dan berikatan dengan tempat spesifik (*specific binding site*) pada kromosom. Hal ini menyebabkan aktivitas RNA polimerase meningkat diikuti dengan peningkatan sintesis protein yang dibutuhkan dalam proses spermatogenesis (Ganiswara *et al.* 2000; Squires 2003).

Persentase Hidup Spermatozoa

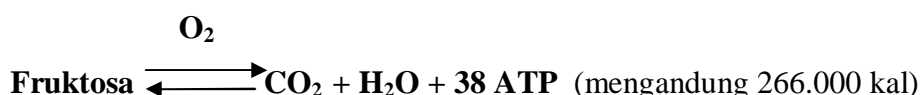
Hasil penelitian pada Tabel 17 menunjukkan bahwa persentase hidup spermatozoa yang berasal dari kauda epididimis meningkat pada kelompok

perlakuan pasak bumi hari ke-1 sampai hari ke-3 dibandingkan dengan kelompok kontrol pada hari ke-1 sampai hari ke-3. Peningkatan persentase hidup spermatozoa, yaitu dari 88,95 % dan 87,29 % pada kelompok kontrol hari ke-1 dan hari ke-3 menjadi 90,85 % dan 90,12 % pada hari ke-1 dan hari ke-3 pada kelompok perlakuan pasak bumi. Peningkatan persentase hidup spermatozoa berbeda nyata secara statistik terutama antara kelompok perlakuan pasak bumi hari 1 dan hari ke-3 dengan kelompok kontrol hari ke-3 (uji Duncan, $\alpha = 0,05$).

Kemungkinan mekanisme kerja pasak bumi pada peningkatan persentase hidup spermatozoa bermula dari adanya tingkat aktivitas sel-sel produsen LH pada hipofisis yang dirangsang oleh senyawa kandungan pasak bumi misalnya: eurikomanon, longilakton, atau lainnya secara sendiri ataupun bersinergi. Kerja pasak bumi pada peningkatan persentase hidup spermatozoa berkaitan dengan peningkatan nyata sel-sel produsen hormon LH pada hipofisis temuan penelitian Pada tahapan sebelumnya dan peningkatan testosteron serum pada hari ke-3 perlakuan pasak bumi. Kedua hormon tersebut mengaktifkan sel-sel epididimis untuk mensekresikan senyawa-senyawa antara lain carnitin, gliseroposporilkolin, fruktosa, dan glikoprotein. Dua senyawa yang terakhir membungkus permukaan spermatozoa (Norman & Litwack 1987; Johnson & Barry 1998). Kemampuan daya hidup yang dinyatakan dalam persentase hidup spermatozoa berhubungan dengan kecukupan nutrisi dan energi di dalam semen. Plasma semen mengandung di antaranya: protein, asam askorbat, natrium, kalium, dan kalsium, komponen protein dan natrium terdapat cukup besar (Nurcholidah *et al.* 2008; Safarinejad *et al.* 2010).

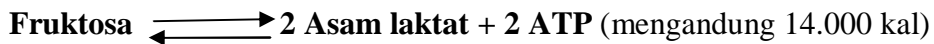
Bentuk energi yang dapat dipakai oleh spermatozoa, yaitu senyawa ATP dalam keadaan 1). aerob maupun 2). anaerob. ATP diproduksi/diubah dari bahan fruktosa dalam reaksi sebagai berikut (Bearden *et al.* 2004):

- 1). Aerob (jumlah energi yang dihasilkan tinggi) dengan persamaan reaksi, yaitu:

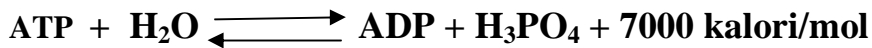


- 2). Anaerob (jumlah energi yang dihasilkan relatif rendah) dengan persamaan reaksi, yaitu:

Tanpa O₂



Pemecahan ATP untuk memperoleh energi secara ringkas melalui reaksi sebagai berikut:



Persentase Abnormalitas Spermatozoa

Hasil penelitian yang disajikan pada Tabel 17 menunjukkan bahwa rerata persentase abnormalitas spermatozoa yang berasal dari kauda epididimis menurun secara nyata pada kelompok perlakuan pasak bumi hari ke-1 sampai hari ke-3 dibandingkan dengan kelompok kontrol pada hari ke-1 sampai hari ke-3. Penurunan rerata persentase abnormalitas spermatozoa, yaitu dari 21,39 % dan 15,28 % pada kelompok kontrol hari ke-1 dan hari ke-3 menjadi 13,02 % dan 12,77 % pada hari ke-1 dan hari ke-3 pada kelompok perlakuan pasak bumi.

Penurunan rerata persentase abnormalitas spermatozoa berbeda nyata secara statistik antara kelompok kontrol hari ke-1 dan hari ke-3 dengan kelompok perlakuan pasak bumi hari 1 dan hari ke-3 (uji Duncan, $\alpha = 0,05$) menjelaskan bahwa pasak bumi mempunyai kemampuan untuk menurunkan persentase abnormalitas spermatozoa dalam waktu 3 hari. Kelainan atau bentuk abnormal spermatozoa yang berasal dari kauda epididimis yang tampak di bawah mikroskop pada penelitian ini adalah terutama ekor spermatozoa melengkung, ekor melingkar, juga dijumpai ekor putus, dan ekor bercabang. Di samping itu kelainan pada bentuk kepala spermatozoa yang tampak adalah kepala tanpa ekor, kepala berbentuk pisang, kepala tidak berbentuk lengkung agak sabit tetapi cenderung lurus seperti tombak, dan kepala kecil.

Mekanisme kinerja pasak bumi terhadap penurunan abnormalitas spermatozoa dimungkinkan melalui jalur rangkaian proses fisiologi melalui jalur: 1) peningkatan aktivitas sel hipofisis untuk memproduksi LH dan selanjutnya terjadi 2) peningkatan testosteron serum dan lebih lanjut terjadi 3) peningkatan proses pembentukan spermatid akhir, yang ketiga hal itu telah terbukti dari hasil penelitian sebelumnya. Penyempurnaan bentuk morfologi sperma makin meningkat terkait dengan adanya peningkatan pada: tingkat aktivitas sel LH

hipofisis, kadar testosteron serum dan pembentukan spermatid akhir tadi sehingga terjadi penurunan rerata persentase abnormalitas spermatozoa. Fenomena yang berhubungan tersebut juga dikuatkan oleh temuan Matthiesson *et al.* (2006) bahwa kesempurnaan proses spermiogenesis nampak jelas dipengaruhi oleh LH dan testosteron testis. Sedangkan Matthiesson *et al.* (2006) juga menyebutkan bahwa khusus untuk kesempurnaan proses tahap pematangan spermatogonia dipengaruhi oleh hormon FSH.

Sementara itu, Barth & Oko (1989); Kuster *et al.* (2004); dan Yudi *et al.* (2010) menyebutkan kelainan spermatozoa yang dijumpai pada ejakulat hewan lain, yaitu sapi dan anoa antara lain pada ekor spermatozoa, yaitu: *abaxial* (penempelan ekor tidak pada titik tengah dasar kepala), *around the head* (ekor melingkari kepala), *abnormal piece* (kelainan pada *mid piece*), *droplet* sitoplasma proksimal dan distal. Sedangkan Hellstrom *et al.* (2006) menyebutkan bentuk – bentuk morfologi spermatozoa abnormal pada manusia yang ditemui pada ejakulat adalah: bentuk kepala spermatozoa makro, kepala mikro, kepala taper, kepala piri, kepala *double*, kepala *amorf*, kepala *round*, kepala *pin*, *midpiece* abnormal, sitoplasma *droplet*, ekor *double*, ekor koil, ekor *bent*.

Johnson and Barry (1998) menyebutkan persentase abnormalitas spermatozoa pada tikus yang sehat adalah $\leq 30\%$. Abnormalitas yang dikaji adalah dari pengamatan morfologi yang mengalami bentuk-bentuk kelainan atau cacat dari spermatozoa terutama: ekor spermatozoa melengkung, ekor melingkar, juga dijumpai ekor putus, dan ekor bercabang. Di samping itu kelainan pada bentuk kepala spermatozoa yang tampak adalah kepala tanpa ekor, kepala berbentuk pisang, kepala tidak berbentuk lengkung agak sabit tetapi cenderung lurus seperti tombak, dan kepala kecil. Berdasarkan hal itu, abnormalitas spermatozoa tikus jantan yang diperoleh dari perlakuan pasak bumi dan kontrol berkisar antara 12,77% - 21,39% masih berada di bawah 30%, sehingga tikus-tikus tersebut berdasarkan kualitas spermatozoanya dapat dinyatakan sehat.

Sedangkan kualitas spermatozoa pria yang sehat menurut temuan Hellstrom *et al.* (2006) sebagai berikut: 1) untuk kelompok umur 45-47 tahun, yaitu volume spermatozoa satu kali ejakulat 2-2,8 ml, motilitas spermatozoa 55%, morfologi spermatozoa normal 59%, total spermatozoa 145 juta, konsentrasi

spermatozoa 60,5 juta/ml semen. 2) untuk kelompok umur 56-80 tahun, yaitu volume spermatozoa satu kali ejakulat 1,40-1,95 ml, motilitas spermatozoa 50 %, morfologi spermatozoa normal 55 %, total spermatozoa 114 juta, dan konsentrasi spermatozoa 52,9 juta/ml semen.

KESIMPULAN

1. Pasak bumi dapat meningkatkan kualitas spermatozoa secara nyata yang meliputi: 1). peningkatan konsentrasi spermatozoa dan 2). penurunan abnormalitas spermatozoa.
2. Pasak bumi tidak mempengaruhi perubahan diameter tubulus pada kauda epididimis dan kualitas semen/spermatozoa tikus pada nilai: 1)., 2) warna, 3). konsistensi, 4). pH, 5). motilitas spermatozoa dan 6). persentase hidup spermatozoa.

UNIVERSITAS TERBUKA

DAFTAR PUSTAKA

- Barth AD and Oko RJ. 1989. *Abnormal morphology of bovine spermatozoa*. Iowa: Iowa State University.
- Bearden HJ, John W Fukuay, Scott TW. 2004. *Applied animal reproduction* 6Th ed. New Jersey: Pearson Prentice Hall
- Biotech 2007. *Talinum paniculatum* Gaertn <http://biotech.tipo.gov.tw/plantjpg/1/Talinum> [3/01/2007]
- Depkes 2003. Standarisasi Sediaan Obat Herba. Makalah *Seminar Dan Pameran Nasional*. Kelompok Kerja Nasional Tumbuhan Obat Indonesia. Jakarta 25-26 Maret 2003.
- Donatus IA, Nurlaila, Djoko S, Lukman H, Mulyono, Djoko W, Sugiyanto. 1998. *Petunjuk praktikum toksikologi*. Yogyakarta: Lab. Farmakologi dan Toksikologi, Fakultas Farmasi UGM.
- Ganiswara SG, Rianto S, Frans D, Purwantyastuti, Nafrialdi, editor. 2000. *Farmakologi dan terapi*. Ed ke-4. Jakarta: Bagian Farmakologi FKUI.
- Hellstrom WJG, James WO, Suresh CS, Jonathan D, Sanjeev A, Amy MH, Gregory DS. 2006. Semen and sperm reference ranges for men 45 years of age and older. *J of Androl* 27(30):51-56.
- Iswara A. 2009. Pengaruh pemberian antioksidan vitamin C dan E terhadap kualitas spermatozoa tikus putih terpapar allethrin [skripsi], Semarang. Jurusan Biologi FMIPA Universitas Negeri Semarang.
- Johnson MH and Barry JE. 1998. *Essential reproduction*. London: Blackwell Science Ltd.
- Juniarto A Z. 2004. Perbedaan pengaruh pemberian serbuk *Eurycoma longifolia* dan *Pimpinella alpina* pada spermatogenesis tikus Sprague Dawley [tesis]. Semarang: Pascasarjana ilmu Biomedik Universitas Diponegoro.
- Kardono LBS, Artanti N, Dewiyanti ID, Basuki T. 2003. *Selected Indonesian medicinal plants: monographs and descriptions* vol 1. Jakarta: PT Gramedia Widiasarana Indonesia.
- Kuster CE, RA Hess, George CA. 2004. Immunofluorescence reveals ubiquitination of retained distal cytoplasmic droplets on ejaculated porcine spermatozoa. *J Androl* 25:340-347.

- Matthiesson KL, Robert IM, Liza OD, Mark F, David MR, Peter GS, and Sarah JM. 2006. The relative roles of FSH and LH in maintaining spermatogonial maturation and spermiation in normal men. *The J of Clin Endocrinol and Metab.* 91(10):3962-3969
- Norman AW and Litwack G. 1987. *Hormones*. London, Sidney, Tokyo: Academic Press Inc.
- Nurcholidah S, Rohiyat Idi, Siti Darodjah, Muhammad Rizal, Maya Fitriati, 2008. Kualitas spermatozoa kauda epididimis sapi peranakan Ongol (PO) dalam pengencer susu, tris, sitrat kuning telur pada penyimpanan 4-5⁰C. *Anim Prod* 10(1): 22-29.
- Pratomo H. 1987. *Efek rimpang kunyit (Curcuma domestica Val) sebagai anti piretik pada tikus putih jantan yang didemamkan [skripsi]*. Jakarta: Fakultas Biologi UNAS (disamakan).
- Safarinejad MR, Seyyed YH, Farid D, Majid AA. 2010. Relationship of omega 3 and omega 6 fatty acids with semen characteristics and antioxidant status of seminal plasma: comparison between fertile and infertile men. *Clin Nutri* 29: 100-105.
- Soedibyo BRAM. 1998. *Alam sumber kesehatan, manfaat dan kegunaan*. Jakarta: Balai pustaka.
- Uchino E, Toshibumi T, Katsuhiko I. 1990. The effect of age and sex on seven elements in Sprague Dawley rat organs. *Lab Anim* 24: 253-264.
- Yudi, Yusuf TL, Purwantara B, Agil M, Wresdiyati T, Sayuthi D, Aditya, Manansang J, Sudarwati R, Hastuti YT 2010. Morfologi dan biometri spermatozoa anoa (*Bubalus* sp) yang diwarnai dengan pewarna William's dan eosin negrosin. *Media Peternakan* 33(2):88-94.

PEMBAHASAN UMUM

Penelitian dilakukan dengan perlakuan pemberian pasak bumi selama tiga hari, sekali sehari setiap pagi jam 9.00 wib dengan dosis seduhan 1=18 mg/200 g bb, 2=100 mg/200 g bb, 3=200 mg/200 g bb, dan 4=kontrol= 1 ml aquades/200 g bb. Selanjutnya dilakukan pengamatan dalam kandang dengan betina estrus disekat pada jam 14.00 wib memperoleh hasil sebagai berikut: Dosis seduhan 100 mg/200 g bb dan 200 mg/200 g bb meningkatkan perhatian tikus jantan pada lingkungan dalam kandang dan nafsu makan. Sedangkan dosis seduhan 18 mg/200 g bb mempunyai pengaruh terhadap peningkatan tingkah laku seksual yang berkaitan dengan keinginan kawin atau libido lebih tinggi dibanding pemberian dosis seduhan 100 mg/200 g bb, 200 mg/200 g bb dan kontrol (uji Duncan, $\alpha=0,05$). Tingkah laku yang menunjukkan libido yang tinggi perolehan dalam penelitian ini adalah : mendekati sekat/betina, berhadapan muka antara jantan dan betina, dan jantan mengais/menggigit sekat pemisah.

Berkaitan dengan hasil tersebut mekanisme kerja pasak bumi pada peningkatan libido diduga bermula dari penambahan tingkat aktivitas reseptor pada mukosa olfaktori tikus jantan. Libido tikus jantan dibangkitkan dengan adanya kehadiran wujud tikus betina yang estrus, karena *vaginal fluid* tikus betina estrus berfungsi sebagai feromon. Setelah itu kandungan pasak bumi (berbagai senyawa misalnya: longilakton A dan B, eurikomanol, eurikomalakton, dan longilakton, secara sendiri-sendiri atau gabungan yang bersinergi) bekerja meningkatkan libido yang telah muncul melalui mekanisme peningkatan aktivitas reseptor feromon, yaitu kemoreseptor spesifik pada mukosa olfaktori tikus putih jantan yang akan dilanjutkan ke sistem limbik. Beberapa peneliti telah mengidentifikasi keberadaan reseptor feromon yang diekspresikan pada mukosa olfaktori. Perangkat jaringan mukosa olfaktori telah diketahui sebagai kemoreseptor spesifik yang ikut terlibat dalam proses lanjutan pelepasan hormon, kontrol serta koordinasi aktivitas seksual seperti tingkah laku libido (Harper *et al.* 1979; Vandenberg 1983; Bergman 2000).

Berdasarkan temuan tadi maka dosis seduhan 18 mg/200 g bb menjadi dosis terpilih untuk penelitian berikutnya. Temuan penelitian pada tahapan

sebelumnya dengan menggunakan dosis 18 mg/200 kg bb pasak bumi telah meningkatkan secara nyata jumlah sel-sel basofil hipofisis pada hari ke-3 dibandingkan dengan kontrol sampai hari ke-3. Sebaliknya sebaran sel-sel asidofil mengalami penurunan yang nyata pada periode yang sama. Diketahui bahwa sel-sel basofil adalah sel penghasil LH dan FSH. Identifikasi lanjutan secara imunohistokimia diperoleh bahwa sel-sel basofil yang bekerja menanggapi pemberian pasak bumi adalah sel-sel penghasil LH pada hipofisis. Terjadi peningkatan produksi hormon LH intra sel yang nyata (sel-sel LH positif 3 meningkat nyata) pada hipofisis setelah pemberian pasak bumi sampai hari ke-3. Sementara itu, sel-sel penghasil FSH pada hipofisis dipertahankan dengan aktivitasnya lemah (sel FSH positif 1).

Berdasarkan temuan peningkatan produksi hormon LH intra sel yang nyata maka dapat disebutkan bahwa pasak bumi merupakan *trigger* yang kuat untuk sintesis/produksi hormon LH. Mekanisme pengaktifan respons sel-sel hipofisis yang memproduksi LH biasanya didahului oleh peningkatan kadar GnRH untuk LH (GnRH-LH) yang disekresikan oleh hipotalamus (Bearden *et al.* 2004). Berkaitan dengan perlakuan pasak bumi sampai hari ke-3 yang meningkatkan kadar LH dapat diduga disebabkan oleh suatu senyawa kandungan pasak bumi (secara sendiri-sendiri atau bersinergi) yang memerankan fungsi sebagai GnRH-LH dari hipotalamus. Dengan demikian, senyawa tersebut merangsang sel-sel produsen LH di hipofisis untuk melakukan peningkatan sintesis LH. Jadi, kandungan pasak bumi yang antara lain eurikomanon beserta derivatnya (Gambar 15) dan atau longilakton yang berperan sebagai GnRH-LH.

Mekanisme pasak bumi lainnya yang meningkatkan aktivitas sel-sel produsen LH di hipofisis diduga sebagai berikut: Reaksi sinyal dari reseptor feromon yang sudah diperkuat oleh pasak bumi diteruskan ke areal medial preoptik area (MPO), medial amigdala (MEA) dan inti dasar atau bed nukleus dari stria terminalis (BST) yang berfungsi sebagai pengendali libido. Selanjutnya peningkatan sinyal pada areal MPO, MEA, dan BST dapat merangsang pelepasan GnRH-LH dari hipotalamus dan lebih lanjut memicu peningkatan aktivitas sel-sel produsen LH untuk memproduksi dan mensekresikan hormon gonadotropin LH dari kelenjar hipofisis anterior (Vandenberg 1983; Johnson & Barry 1998)

Pemberian seduhan pasak bumi sampai hari ke-3 telah meningkatkan aktivitas sel-sel Leydig di dalam testis sehingga terjadi peningkatan sintesis testosteron. Pada penelitian diperoleh bahwa kadar testosteron dalam serum darah meningkat secara signifikan. Temuan ini melanjutkan perolehan terjadinya peningkatan tingkat aktivitas sel-sel produsen LH di hipofisis. Kadar testosteron serum pada kelompok perlakuan pemberian seduhan pasak bumi sampai hari ke-3 meningkat lebih dari dua kali lipat dibandingkan dengan kontrol pemberian aquades sampai hari ke-3.

Berkaitan dengan itu, mekanisme kinerja pasak bumi yang mungkin dapat menyebabkan peningkatan testosteron sebagai berikut: Senyawa kandungan pasak bumi (mungkin antara lain longilakton A dan B, eurikomanol, eurikomalakton, secara sendiri-sendiri atau gabungan yang bersinergi) telah meningkatkan aktivitas sel-sel produsen LH di hipofisis. dalam hal demikian senyawa tersebut dalam jumlah tertentu berfungsi sebagai GnRH-LH. Sebab itu, produksi LH ditingkatkan, yang selanjutnya LH disekresikan dan didistribusikan ke sirkulasi darah. LH yang meningkat diterima oleh reseptor-reseptor sel interstisial testis atau sel Leydig.

Proses lanjutannya adalah penerimaan LH pada reseptornya di sel Leydig. Setelah terjadi ikatan antara LH dan reseptornya maka akan terbentuk mesenger kedua yang berupa cAMP. Terbentuknya cAMP mengaktifkan protein kinase yang akan mempengaruhi inti sel agar gen-gen yang mengatur biosintesis testosteroe menjadi aktif dan mulailah terjadi sintesis testosteron. Tahap pertama dalam biosintesis melibatkan pembelahan oksidasi dari satu sisi rantai kolesterol oleh CYP11A suatu enzim oksidase sitokrom P₄₅₀ pada mitokondria dengan hilangnya enam atom karbon untuk menjadi pregnenolon. Tahap berikutnya dua atom karbon dipindah oleh enzim CYP17A di dalam retikulum endoplasma untuk menghasilkan variasi dari steroid C19. Di samping itu, grup 3-hidroksil dioksidasi oleh 3- β -HSD untuk menghasilkan androstenedion. Pada tahap akhir, atom C-17 grup keto androstenedion direduksi oleh enzim 17- β hidroksisteroid dehidrogenase untuk menjadi testosteron (Zuber *et al.* 1986; Waterman & Keeney 1992; Squires 2003).

Pasak bumi telah bekerja mempengaruhi proses tahapan tertentu di dalam spermatogenesis pada tubuli seminiferi. Perlakuan pasak bumi sampai hari ke-3 dengan dosis seduhan 18 mg/20 g bb tampak nyata mempengaruhi spermatogenesis. Pemberian pasak bumi sekali setiap hari selama 3 hari mendorong proses pembentukan spermatid akhir secara nyata (uji Duncan $\alpha = 0,05$). Sementara itu, pada hari ke-3 juga terjadi penurunan jumlah spermatosit primer di dalam tubuli seminiferi. Sedangkan pada tahapan spermatogonium, pasak bumi mempertahankan jumlah spermatogonium sampai hari ke-3 setara dibanding kontrol.

Mekanisme kinerja pasak bumi yang meningkatkan pembentukan spermatid akhir secara nyata adalah sebagai berikut. Pasak bumi telah menyebabkan peningkatan aktivitas sel-sel yang memproduksi hormon LH pada hipofisis dan pada periode 3 hari yang sama juga terjadi peningkatan kadar testosteron serum. Peningkatan LH dan testosteron selanjutnya menyebabkan peningkatan pembentukan spermatid akhir di dalam tubuli seminiferi. Fenomena itu sejalan dengan temuan Matthiesson *et al.* (2006). Matthiesson *et al.* (2006) menjelaskan bahwa LH dan FSH mengontrol proses spermatogenesis secara terpisah. Tahapan perkembangan pada proses spermiogenesis nampak jelas dipengaruhi oleh LH dan testosteron testis. Peningkatan nyata perubahan menjadi spermatid akhir di pengaruhi oleh LH. Sementara hormon FSH menunjukkan pengaruh nyata terhadap peningkatan jumlah spermatosit sekunder. Matthiesson *et al.* (2006) juga menemukan bahwa pematangan spermatogonia dipengaruhi oleh FSH. Penelitian juga menemukan bahwa tingkat aktivitas sel-sel FSH dipertahankan sama dengan kontrol sehingga pada proses spermatogenesis tampak pengaruhnya bahwa pembentukan spermatogonia tidak meningkat nyata atau sama dengan kontrol secara statistik.

Kinerja pasak bumi pada diameter kauda epididimis, kualitas semen, dan kualitas spermatozoa menemukan bahwa: hanya pada hari ke-1 meningkatkan diameter saluran-saluran dalam kauda epididimis secara nyata dibanding kontrol hari ke-1. Pasak bumi mempertahankan kualitas semen pada parameter: Warna, Konsistensi, dan pH sama dengan kontrol sampai hari ke-3. Di samping itu kinerja pasak bumi mempertahankan: 1). persentase motilitas spermatozoa dan 2).

persentase hidup spermatozoa sama dengan kontrol sampai hari ke-3. Tetapi pasak bumi meningkatkan kualitas spermatozoa secara nyata dalam hal: 1) meningkatkan konsentrasi spermatozoa dan 2). menurunkan persentase bentuk abnormal spermatozoa.

Berkaitan dengan hasil tersebut, mekanisme kerja pasak bumi pada peningkatan konsentrasi spermatozoa di dalam kauda epididimis berkaitan dengan adanya peningkatan nyata jumlah sel-sel spermatid akhir di dalam tubulus seminiferus. Peningkatan spermatid akhir juga berkaitan dengan peningkatan hormon testosteron yang tampak pada hari ke-3 perlakuan pasak bumi. Melalui pengaruhnya pada tikus jantan maka hormon testosteron membantu mempertahankan kondisi optimum dalam proses spermatogenesis di dalam tubuli seminiferi (Norman & Litwack 1987; Bearden *et al.* 2004). Testosteron dan Dehidrotetosteron (DHT) berikatan dengan reseptor di sitoplasma, kemudian kompleks steroid-reseptor mengalami modifikasi dan translokasi ke dalam nukleus dan berikatan dengan tempat spesifik (*specific binding site*) pada kromosom. Hal ini menyebabkan aktivitas RNA polimerase meningkat diikuti dengan peningkatan sintesis protein yang dibutuhkan dalam proses spermatogenesis (Ganiswara *et al.* 2000; Squires 2003).

Mekanisme kinerja pasak bumi terhadap penurunan abnormalitas spermatozoa dimungkinkan melalui jalur rangkaian proses fisiologi melalui jalur: 1) peningkatan aktivitas sel hipofisis untuk memproduksi LH dan selanjutnya terjadi 2) peningkatan testosteron serum dan lebih lanjut terjadi 3) peningkatan proses pembentukan spermatid akhir, yang ketiga hal terjadi pada hari ke-3 pemberian pasak bumi, sehingga testis dan kauda epididimis berfungsi optimal, lebih lanjut mempengaruhi penurunan persentase abnormalitas spermatozoa. Fenomena yang berhubungan tersebut juga dikuatkan oleh antara lain temuan Matthiesson *et al.* (2006) bahwa kesempurnaan proses spermiogenesis secara nyata dipengaruhi oleh kerja hormon LH dan testosteron testis.

KESIMPULAN UMUM

1. Pasak bumi dosis seduhan 18 mg/200 g bb dalam 1 ml aquades meningkatkan libido yang tertinggi dibanding dosis seduhan 100 mg/200 g bb, dosis seduhan 200 mg/200 g bb, dan kontrol aquades 1 ml. Tingkah laku libido tikus jantan yang menonjol di dalam kandang pengamatan adalah: 1). mendekati sekat/betina, 2). bertemu muka/hadapan muka, 3). mengais/menggigit sekat betina. Dosis seduhan 18 mg/200 g bb menjadi dosis terpilih untuk penelitian berikutnya.
2. Sel-sel basofil pada hipofisis lebih meningkat aktivitasnya dibanding sel-sel asidofil. Sel-sel basofil jumlahnya lebih banyak secara nyata daripada sel-sel asidofil setelah pemberian pasak bumi dosis seduhan 18 mg/200 g bb pada hari ke-3 dibandingkan dengan kontrol. Sel-sel basofil adalah sel-sel penghasil LH dan FSH pada hipofisis anterior. Identifikasi menggunakan pewarnaan imunohistokimia memperoleh bahwa sel-sel basofil yang bereaksi menanggapi pemberian pasak bumi adalah sel-sel penghasil LH. Terjadi peningkatan produksi hormon LH intra sel (sel LH positif 3) yang nyata pada hipofisis pada hari ke-3. Berkaitan dengan itu dapat disebutkan bahwa pasak bumi merupakan *trigger* kuat untuk produksi hormon LH. Sementara itu, sel-sel penghasil FSH pada hipofisis diaktifkan kerjanya oleh pasak bumi dengan lemah (sel FSH positif 1), dengan kata lain dipertahankan sama dengan kontrol sampai hari ke-3.
3. Pemberian seduhan pasak bumi meningkatkan aktivitas sel-sel Leydig dalam mensintesis testosteron. Kadar testosteron dalam serum darah meningkat signifikan lebih dari dua kali lipat setelah pemberian seduhan pasak bumi dibandingkan dengan kontrol sampai hari ke-3.
4. Tampak nyata bahwa spermatogenesis diaktifkan pada tahapan spermatid akhir oleh pasak bumi. Pemberian pasak bumi sekali setiap hari selama 3 hari mendorong proses pembentukan spermatid akhir secara nyata (uji Duncan α

= 0,05). Sedangkan pada tahapan spermatogonium, pasak bumi mempertahankan jumlah spermatogonium sampai hari ke-3 sama dengan kontrol.

5. Pasak bumi meningkatkan kualitas spermatozoa secara nyata, yaitu: 1) meningkatkan konsentrasi spermatozoa dan 2). menurunkan persentase spermatozoa abnormal. Tetapi pasak bumi meningkatkan diameter saluran-saluran dalam kauda epididimis secara nyata hanya pada hari ke-1. Kualitas semen yang meliputi parameter: 1). Warna, 2). Konsistensi, dan 3). pH dipertahankan oleh pasak bumi sampai hari ke-3 sama dengan kontrol. Kerja pasak bumi juga mempertahankan: 1). persentase motilitas spermatozoa dan 2). persentase hidup spermatozoa sama dengan kontrol.

Dengan demikian disimpulkan secara umum bahwa pasak bumi dapat meningkatkan secara nyata kualitas fungsi organ reproduksi primer dan sekunder. Mekanisme kerja pasak bumi terutama dimulai dari fungsinya yang berperan seperti GnRH-LH (*trigger* LH) yang merangsang sel-sel produsen LH pada hipofisis anterior untuk lebih aktif mensintesis LH. Dilanjutkan dengan peningkatan produksi testosteron serum, peningkatan libido, peningkatan pembentukan spermatid akhir, peningkatan konsentrasi spermatozoa, dan penurunan persentase abnormalitas spermatozoa.

SARAN

Perlu penelitian lebih lanjut untuk menentukan senyawa bioaktif kandungan pasak bumi yang bekerja menghasilkan peningkatan kualitas reproduksi terkait temuan-temuan pada penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Adimoelja A. 2000. Phytochemical and the breakthrough of traditional herbs in the management of sexual dysfunction. *Int J Androl* 23 (2): 82-84
- Ajayi AA, Newaz M, Hercule H. 2003. Endothelin-like action of *Pausyntalia yohimbe aquaeus* extract on vascular and renal regional haemodynamics in Sprague Dawley rats. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 25(10):817-822
- Allen SP, Maden M, Price JS. 2002. A role for retinoic acid in regulating the regeneration of deer antlers. *Dev Biol* 251 (2):409-423
- Ang HH, Hitotsuyanagi Y, Takeya K. 2000. Eurycolactones A-C, novel quassinoids from *Eurycoma longifolia*. *Tetrahedron Pythochem* 41(35): 6849-6853
- Ang HH and Lee KL. 2002. Effect of *Eurycoma longifolia* Jack on orientation activities in middle-aged male rats. [Abstract] *Fund & Clin Pharmacol* 16 (6): 479
- Ang HH, Lee KL, Kiyoshi M. 2004. Sexual arousal in sexually sluggish old male rats after oral administration of *Eurycoma longifolia* Jack - tongkat Ali [Abstract]. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 15(3-4):303-9.
- Ang HH and Sim MK. 1997. *Eurycoma longifolia* Jack enhances libido in sexually experienced male rats. *Exp Anim* 6(4):287-90.
- Asihara Y and Kasahara, Y. 2001. *Immunoassay and immunochemistry*. In John, B.H (eds), *Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods* 21st ed. Philadelphia: WB Saunders Co.
- Barth AD and Oko RJ. 1989. *Abnormal morphology of bovine spermatozoa*. Iowa: Iowa State University.
- Bearden HJ, John W Fukuay, Scott TW. 2004. *Applied animal reproduction* 6th ed. New Jersey: Pearson Prentice Hall
- Bergman A. 2000. *Molecular Biology of the Cell* 4th ed. Texas, New York: Garland Science.
- Bhat R and Karim AA. 2010. Tongkat Ali (*Eurycoma longifolia* Jack) a review on its ethnobotany and pharmacological importance. *Fitoterapia* 81(7): 669-679
- Biotech 2007. *Talinum paniculatum* Gaertn <http://biotech.tipo.gov.tw/plantjpg/1/Talinum> [3/01/2007]

- Coolen LM, Peters HJP, Veening JG. 1998. Anatomical interrelationships of the medial preoptic area and other brain regions activated following male sexual behavior: a combined fos and tract-tracing study. *J Comp Neurol* 397: 421–435.
- Cotran RS, Kumar V, Collins T. 1999. *Robbins Pathologic Basis of Diseases*. 8th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Co
- Cox RM and John AHB. 2005. Testosterone has opposite effects on male growth in lizards (*Sceloporus* spp.) with opposite patterns of sexual size dimorphism. *J Exp Biol* 208 (24): 4679–87.
- Depkes 2003. Standarisasi Sediaan Obat Herba. Makalah *Seminar Dan Pameran Nasional*. Kelompok Kerja Nasional Tumbuhan Obat Indonesia. Jakarta 25-26 Maret 2003.
- Dissanayake DMAB, PS Wijesinghe, WD Ratnasooriya, and S Wimalasena. 2009. Zinc consumption boosts sexual activity in male rat. *J Hum Reprod Sci* 2(2): 57–61.
- Donatus IA, Nurlaila, Djoko S, Lukman H, Mulyono, Djoko W, Sugiyanto. 1998. *Petunjuk praktikum toksikologi*. Yogyakarta: Lab. Farmakologi dan Toksikologi, Fakultas Farmasi UGM
- Ekaluo UB, Ekei VI, Aniekan EU. 2009. Sperm head abnormal and mutagenic effect of aspirin, paracetamol, and caffeine containing analgesic in rats. *J Toxicol* 7(1): 2-10.
- Fauzi TM. 2009. Pengaruh pemberian timbal asetat dan vitamin C terhadap kadar malondialdehyde dan kualitas spermatozoa di dalam epididimis tikus putih [tesis]. Medan: Sekolah Pascasarjana Universitas Sumatera Utara.
- Favig EM and Foad O. 2009. Serum and plasma levels of total and free testosterone and of sex hormone binding globulins in rats growing in the below sea level environment of the Jordan valley. *J Endocr* 5(2): 1-6.
- Ganiswara SG, Rianto S, Frans D, Purwastyastuti, Nafrialdi, editor. 2000. *Farmakologi dan terapi*. Ed ke-4. Jakarta: Bagian Farmakologi FKUI.
- Gerard DF. 1989. *Clinical evaluation of New Zealand deer velvet antler on muscle strength and endurance in healthy male university athletes*. New Zealand: Ag search Invermay.
- Gréco, B, Blasberg ME, Kosinski EC, Blaustein JD. 2003. Response of ER α -IR and ER β -IR cells in the forebrain of female rats to mating stimuli. *Horm Behav* 43: 444–453.

- Greenspan FS and Strewler GD. 1997. Appendix, in Francis S.G and Gordon J. S (Eds), *Basic and Clinical Endocrinology*. 5th Ed. London: Prentice-Hall International Inc.
- Guyton AC. 1983. *Buku ajar fisiologi kedokteran*. Edisi 5, Alih bahasa Adji Dharma dan P Lukmanto. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Harper HA, Rodwell VW, Mayes PA. 1979. *Review of Physiological Chemistry* 17th Ed. Drawer L, Los Altos, California: Lange Medical Publications.
- Hellstrom WJG, James WO, Suresh CS, Jonathan D, Sanjeev A, Amy MH, Gregory DS. 2006. Semen and sperm reference ranges for men 45 years of age and older. *J of Androl* 27(30):51-56.
- Iswara A. 2009. Pengaruh pemberian antioksidan vitamin C dan E terhadap kualitas spermatozoa tikus putih terpapar allethrin [skripsi], Semarang. Jurusan Biologi FMIPA Universitas Negeri Semarang.
- Itokawa H, Kishi E, Morita H, Takeya K. 1992. Cytotoxic quassinoids and tirucallane type triterpenes from the woods of *Eurycoma longifolia*. *Chem Pharm Bull* 40(4): 1053-1055.
- Johnson MH and Barry JE. 1998. *Essential reproduction*. London: Blackwell Science Ltd.
- Juniarto A Z. 2004. Perbedaan pengaruh pemberian serbuk *Eurycoma longifolia* dan *Pimpinella alpina* pada spermatogenesis tikus Sprague Dawley [tesis]. Semarang: Pascasarjana ilmu Biomedik Universitas Diponegoro.
- Kamhi E. 2004. Natural Pharmacy, Natural aphrodisiacs. <http://www.naturalnurse.com/naturalaphro.htm>. [30/08/2007]
- Kardono LBS, Artanti N, Dewiyanti ID, Basuki T. 2003. *Selected Indonesian medicinal plants: monographs and descriptions* vol 1. Jakarta: PT Gramedia Widiasarana Indonesia.
- Kaspul. 2007. Buah Kadar Testosteron Tikus Putih (*Rattus norvegicus* L) Setelah Mengkonsumsi Terong Tukak (*Solanum Torvum* Sw). *Bioscientiae* 4(1): 1-8
- Kartawinata S, Sudarto B, Pramono S, 1996. Pengaruh akar *Talinum paniculatum* Gaertn terhadap libido tikus putih jantan, Di dalam: *Prosiding seminar nasional Pokjanas tanaman obat Indonesia IX*. Surabaya.
- Kiernan JA. 1990. *Histological and histochemical methods: Theory and Practice*. 2nd ed. New York: Pergamon Pr.

- Krisfalosi M, Vivoshi M, Patricia LM, Deborah AD. 2006. Multiple glycolytic enzymes are tightly bound to the fibrous sheath of rat spermatozoa. *Biol Reprod* 75:270-278.
- Kuster CE, RA Hess, George CA. 2004. Immunofluorescence reveals ubiquitination of retained distal cytoplasmic droplets on ejaculated porcine spermatozoa. *J Androl* 25:340-347.
- Lee VWK, DM De Kretser, B Hudson, and C Wang. 1975. Hormonal changes in male rats with age. *J Reprod Fert* 42:121-126.
- Lemmens RHMJ. 2003. *Eurycoma* Jack. Di dalam: Lemmens RHMJ dan N Bunyapraphatsara, Editor. *Medicinal and poisonous plants 3. Plants Resources of South East Asia. No.12 (3)*. Leiden, Backhuys Publishers.
- Lin B Z, Kan H, Calvin HK. 2000. Effect of a lipidic extract from *Lepidium meyenii* on sexual behaviour in mice and rats. *Urology* 55(4):598-602
- Lu FC. 1995. *Toksikologi Dasar: Asas, Organ sasaran, dan penilaian resiko*. Ed ke empat. Nugroho E, penerjemah; Jakarta: UI Press, Terjemahan dari: Basic toxicology: Fundamentals, target organs, and risk assessment. Hal 85-105
- Lucky MS. 2010. Psikoneuroimunologi stress. *Med zone* 88:1-3.
- Malik S, Sudoyo H, Marzuki S. 2000. Microphotometric analysis of NADH-tetrazolium reductase deficiency in fibroblast of patient with lever hereditary optic neuropathy. *J Inherit Metab Dis*. 23:730-744.
- Matthiesson KL, Robert IM, Liza OD, Mark F, David MR, Peter GS, and Sarah JM. 2006. The relative roles of FSH and LH in maintaining spermatogonial maturation and spermiation in normal men. *The J of Clin Endocrinol and Metab*. 91(10):3962-3969
- Mc Donald LE. 1989. *Veterinary endocrinology and reproduction*. 4th ed. Great Britain London: Bailliere Tindall.
- Mc Kay D. 2004. Nutrients and botanicals for erectile dysfunction: Examining evidence. *Alternative Med. Review* 9(1):4-16.
- Mehta PH, Jones AC, Josephs RA. 2008. The social endocrinology of dominance: basal testosterone predicts cortisol changes and behavior following victory and defeat. *J Pers Soc Psychol* 94 (6): 1078–93.
- Meinhardt U and Mullis PE. 2002. The essential role of the aromatase/p450arom. *Semin Reprod Med* 20 (3): 277–84.

- Menteri Pertanian RI 2004. Sambutan Pada Indonesian Biopharmaca Exhibition and Congress. *Prosiding Seminar Nasional* Yogyakarta 14 Juli 2004.
- Meston CM and Worcel M. 2002. The effect of yohimbine plus L-arginine glutamate on sexual arousal in postmenopausal women with sexual disorders. *Arch Sex Behav* 31 (4): 323-327.
- Mooradian AD, Morley JE, Korenman SG. 1987. Biological actions of androgens. *Endocr Rev* 8 (1): 1-28.
- Morgentaler A, Schulman C. 2009. Testosterone and prostate safety. *Front Horm Res* 37: 197-203.
- Murphy LL and Lee TJ. 2002. Ginseng, sex behavior and nitric oxide. *Ann N Y Acad Sci* 962:372-377.
- Nadelhaft I, Miranda, Sousa AJ, Vera PL. 2002. Separate urinary bladder and prostate neurons in the central nervous system of the rat: simultaneous labeling with two immunohistochemically distinguishable pseudorabies viruses. *BMC Neurosci* 3: 1-11.
- Ningsih, 2005. *Pria dan impotensi*. Topik Kesehatan. Pos Kesehatan Jaktim. <http://www.poskes-jaktim.or.id>. [12/9/2007]
- Nordenberg T. 2000. *The facts about Aphrodisiacs*. FDA's Center for drug evaluation and research. <http://www.cfsan.fda.gov/html> [30/09/2007].
- Norman AW and Litwack G. 1987. *Hormones*. London, Sidney, Tokyo: Academic Press Inc.
- Nugroho YA, Oentung Soeradi, Hernani 2000. *Khasiat dan keamanan som jawa (Talinum paniculatum Gaertn) dan kolesom (Talinum triangulare Willd)* [laporan penelitian]. Jakarta: Puslibang Farmasi, Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Departemen Kesehatan RI.
- Nurcholidah S, Rohiyat Idi, Siti Darodjah, Muhammad Rizal, Maya Fitriati, 2008. Kualitas spermatozoa kauda epididimis sapi peranakan ongol (PO) dalam pengencer susu, tris, sitrat kuning telur pada penyimpanan 4-5⁰C. *Anim Prod* 10(1): 22-29.
- O. Connell RJ, Singer AG, Stern FL. 1981. Aphrodisiac. *Behav Neural Biol* 31:457-464.
- Paisley JC, Huddleston GG, Denman HN, Carruth LL, Grober MS, Petrulis A, Clancy AN. 2005. Inhibition of estrogen receptor synthesis in the medial preoptic area, but not the medial amygdala, reduces male rat mating behavior. *Horm Behav* 48: 94-101

- Panjaitan Ruqiah GP. 2008. *Pengujian aktivitas hepatoprotektor akar pasak bumi (Eurycoma longifolia Jack)* [disertasi]. Bogor: Sekolah Pascasarjana IPB.
- Pratomo H. 1987. *Efek rimpang kunyit (Curcuma domestica Val) sebagai anti piretik pada tikus putih jantan yang didemamkan* [skripsi]. Jakarta: Fakultas Biologi UNAS.
- Randall VA. 1994. Role of 5 alpha-reductase in health and disease. *Baillieres Clin Endocr Metab* 8 (2): 405–31.
- Reed WL, Clark ME, Parker PG, Raouf SA, Arguedas N, Monk DS, Snajdr E, Nolan V, Ketterson ED. 2006. Physiological effects on demography: a long-term experimental study of testosterone's effects on fitness. *Am Nat Sci* 167 (5): 667–83.
- Roselli CF, Cross E, Poonyagariyagorn HK, Stadelman HL. 2003. Role of aromatization in anticipatory and consummatory aspects of sexual behavior in male rats. *Horm Behav* 44: 14-16
- Ruswana A. 2005. *Sintesis, Fungsi dan Interpretasi Pemeriksaan Hormon Reproduksi*. Bandung: Subbagian Fertilitas dan Endokrinologi Reproduksi, Bagian Obstetri dan Ginekologi, Fakultas Kedokteran Unpad.
- Saether T, Thien NT, Helge R, Hans JG, Bjørn OC and Trine B. 2007. Essential fatty acid deficiency induces fatty acid desaturase expression in rat epididymis, but not in testis. *J Reprod* 133: 467-477.
- Safarinejad MR, Seyyed YH, Farid D, Majid AA. 2010. Relationship of omega 3 and omega 6 fatty acids with semen characteristics and antioxidant status of seminal plasma: comparison between fertile and infertile men. *Clin Nutri* 29: 100-105.
- Sampoerno. 2003. Kebijakan Pengembangan Jamu/Obat Tradisional/Obat Herbal Indonesia. *Makalah Seminar dan Pameran Nasional*. Kelompok Kerja Nasional Tumbuhan Obat Indonesia. Jakarta 25-26 Maret 2003.
- Singer AG, Agosta WC, O'Connell RJ. 1976. Chemical signals in vertebrates. *Science* 191:948-950.
- Soedibyo BRAM. 1998. *Alam sumber kesehatan, manfaat dan kegunaan*. Jakarta: Balai pustaka.
- Squires EJ. 2003. *Applied animal endocrinology*. Wallingford UK: Cabi Publishing.
- Sul'ain M D, Siti A S, D'souza, Urban J, Hasnan J, and Syed M S. 2011. Revising the sexual behavior of naive and experienced male Sprague Dawley rats. *Internat Med J* 18 (1): 8 - 13

- Tantawy WHE, Abeer T, Omayma DE. 2007. Free serum testosterone in male rats treated with *Tribulus alatus* extract. *Int Braz J Urol* 33: 554-9.
- Terrichan. 2010. *Spermatogenesis*. <http://imueos.wordpress.com/2010/05/24/04/11/2011/>.
- Uchino E, Toshibumi T, Katsuhiko I. 1990. The effect of age and sex on seven elements in Sprague Dawley rat organs. *Lab Anim* 24: 253-264.
- Vandenberg JG. 1983. *Pheromones and reproduction in mammals*. Orlando: Academic press Inc.
- Varisli O, Cevdet U, Cansu A, Yuksel A. 2009. Various physical stress factor on rat sperm motility, integrity of acrosome, and plasma membrane *J Androl* 30:1-20.
- Waterman MR and Keeney DS. 1992. Genes involved in androgen biosynthesis and the male phenotype. *Horm Res* 38 (5-6): 217-21.
- Wiat C. 2006. *Medicinal Plants of Asia and the Pacific*. London, New York: Taylor and Francis group.
- Wijayakusuma MH, Dalimartha S, Wirian AS. 1996. *Tanaman berkhasiat obat di Indonesia*. Vol 4. Jakarta: Pustaka Kartini
- Wijayakusuma Hembing. 1994. *Tanaman berkhasiat obat di Indonesia*. Jilid 3. Jakarta: Pustaka Kartini.
- Wilkinson JMS, Halley PA, Towers. 2000. Comparison of male reproductive parameters in three rat strains: Dark Agouti, Sprague Dawley and Wistar. New South Walles Australia: *Laboratory animal* 34:70-75.
- Yim TK, Wu WK, Pak WF. 2003. The radical scavenging effect of stilbene glucosides from *Polygonum multiflorum*. *Arch Pharm Res* 25(5):636-639.
- Yudi, TL Yusuf, B Purwantara, M Agil, T Wresdiyati, D Sayuthi, Aditya, J Manansang, R Sudarwati, YT Hastuti. 2010. Morfologi dan biometri spermatozoa anoa (*Bubalus* sp) yang diwarnai dengan pewarna William's dan eosin negrosin. *Media Peternakan* 33(2):88-94.
- Zuber MX, Simpson ER, Waterman MR. 1986. Expression of bovine 17 alpha-hydroxylase cytochrome P-450 cDNA in nonsteroidogenic (COS 1) cells. *Science* 234 (4781): 1258-61.

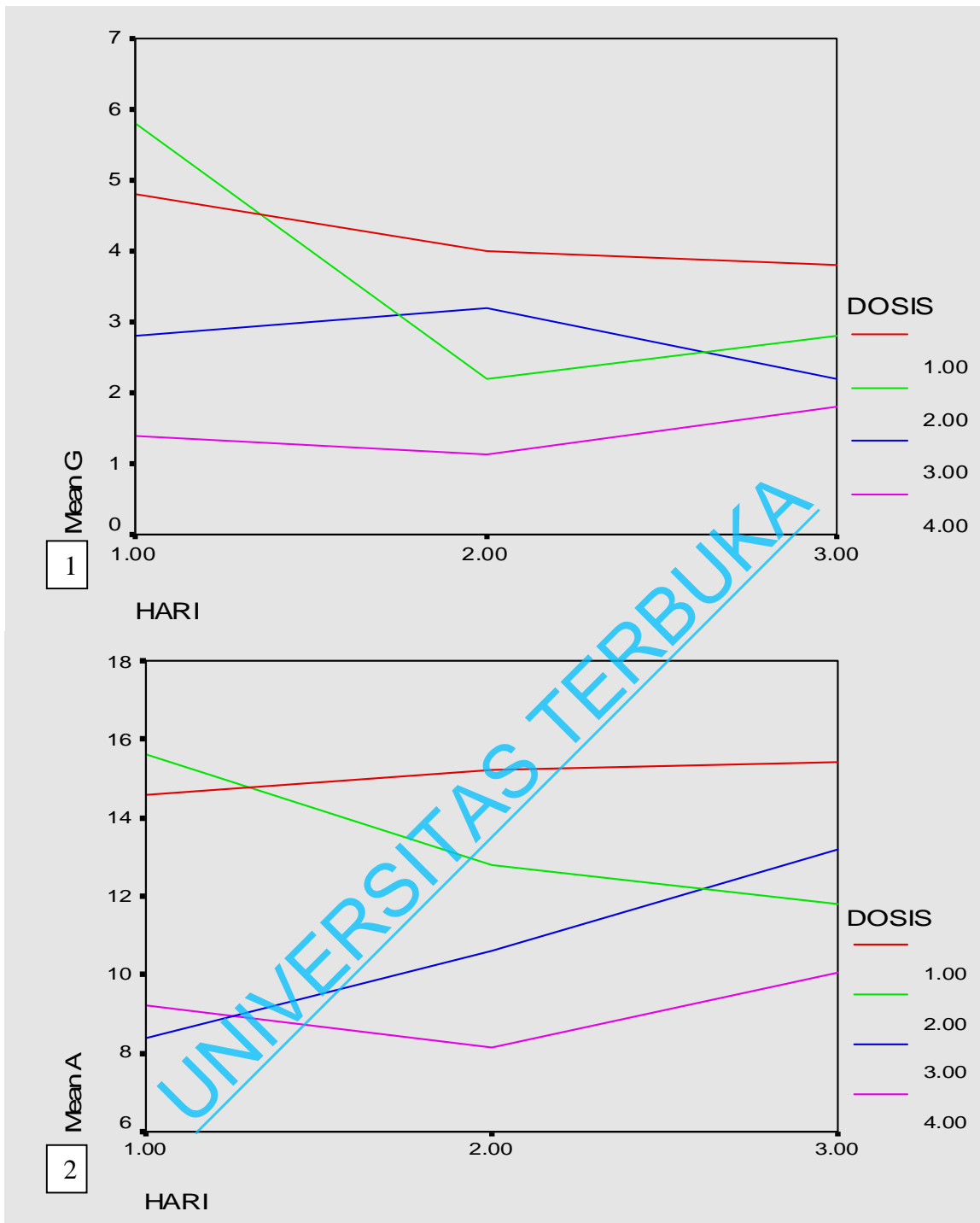
LAMPIRAN

Prosedur Sebelum Melakukan Pewarnaan Histologi (8 langkah)

1. **Trimming:** Potongan sampling organ dipotong tipis setebal 2-3 mm sesuai besarnya organ sehingga diperoleh jaringan sampel. Organ hipofisis tidak dipotong lagi karena ukurannya yang kecil dan sifat jaringannya sangat lunak. Organ hipofisis tipis 2-3 mm hipofisis sampling ditaruh dalam basket histo, lalu direndam di dalam paraformaldehid 4 % dalam NaCl fisiologis 0,9 %. Perendaman yang bersifat fiksasi di dalam basket histo dilakukan 4-7 hari. Basket histo diberi label menggunakan pensil 2B.
2. **Dehidrasi:** Basket histo dan isi sampling dipindahkan ke wadah botol/tabung bertutup yang berisi alkohol 70 %, direndam selama 3 jam, lalu ke konsentrasi alkohol lebih tinggi secara bertingkat, yaitu 80 %, 90 %, 95 %, masing-masing 3 jam dilanjutkan ke tabung alkohol absolut 1, 2, 3 masing-masing 1 jam.
3. **Clearing:** Melanjutkan tahapan dehidrasi dengan perendaman basket histo berisi sampling ke dalam tabung bertutup berisi larutan xylol 1, 2, dan 3 masing-masing 40 menit. Basket histo di dalam langkah perendaman xylol 3 tadi hanya direndam 20 menit, dilanjutkan dengan meletakkan ke dalam inkubator selama 20 menit pada suhu 65 °C. Pemandahan dilakukan di luar inkubator, yaitu di atas mesin pemanas parafin di bagian yang bersuhu hangat. Basket di buka, sampling diambil dengan pinset khusus parafin dan dipindah ke tabung/botol parafinasi. Botol parafin diberi label, jumlah botol parafin disesuaikan dengan kebutuhan. Label berisikan nama potongan sampling, macam perlakuan, tanggal pembuatan.
4. **Parafinasi:** Potongan sampling di rendam dalam botol berisi parafin histo cair secara bertahap, yaitu parafin 1, 2, dan 3 masing-masing 40 menit di dalam inkubator.
5. **Embedding:** Potongan sampling yang telah diparafinasi dibekukan dalam wadah cetakan parafin yang berbentuk kotak atau tabung ceper. Pembekuan dilakukan dengan mengucurkan cairan parafin menggunakan alat embeding parafin ke dalam wadah kotak atau tabung ceper hingga penuh lalu

meletakkan potongan jaringan sampling ke dalamnya. Wadah yang telah terisi didinginkan dengan diangin-anginkan lalu ditaruh di atas air. Setiap wadah tersebut diberi keterangan pada kertas label.

6. **Blocking:** Hasil embeding dipotong/dibentuk kotak dengan tetap melindungi potongan sampling, lalu di tempelkan ke potongan alas kayu yang berguna untuk pegangan ketika akan dipotong di alat mikrotom. Penempelan menggunakan skalpel panas. Setiap blok kayu berparafin berisi potongan sampling lalu di beri label.
7. **Pemotongan sampling untuk pembuatan slide:** Block parafin berisi potongan sampling dipotong setebal 4 μm dengan menggunakan alat mikrotom. Sebelum dipotong block tersebut diletakkan pada bantalan es. Setelah diperoleh potongan slide sampling yang baik di apungkan pada air hangat ditempelkan pada kaca objek. Setiap kaca objek/slide sampling diberi label dan ditaruh dalam kotak preparat disimpan dalam inkubator 40°C selama beberapa hari sampai 1 minggu.
8. **Deparafinasi dan rehidrasi untuk pewarnaan:** Kaca objek /slide diletakkan ke dalam rak pencelupan untuk pewarnaan lalu di deparafinasi dan rehidrasi dengan cara memindahkan perendaman dari satu tabung ke tabung lain sebagai berikut: xylel 3, 2, 1 lalu alkohol absolut 3, 2, 1, selanjutnya ke alkohol 95 %, 90 %, 80 %, 70 %, waktu perendaman semuanya masing-masing 1-2 menit.



Gambar lampiran 1 Grafik 1 Rerata frekuensi jantan bertemu muka, dan Grafik 2 Rerata mendekati sekat betina pada hari ke-1, 2, 3.

Keterangan: Mean G= rerata frekuensi bertemu muka;

Mean A=rerata frekuensi mendekati sekat betina

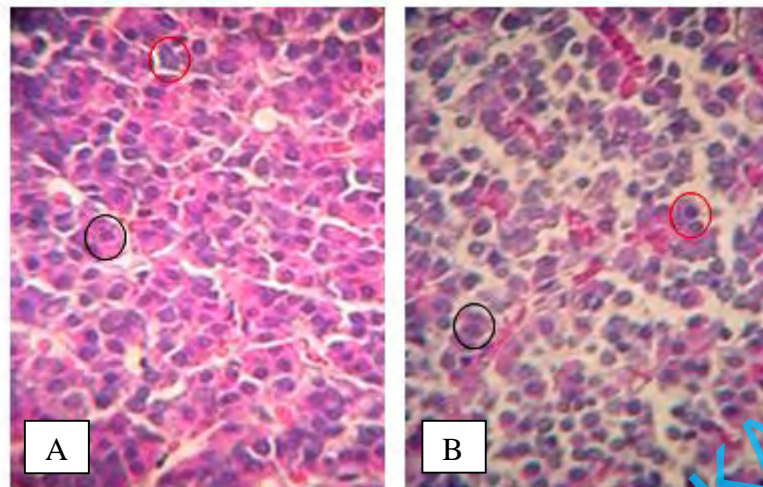
1.00= Dosis 1 = seduhan pasak bumi 18 mg/200 g bb (garis merah)

2.00= Dosis 2 = seduhan pasak bumi 100 mg/200 g bb (garis hijau)

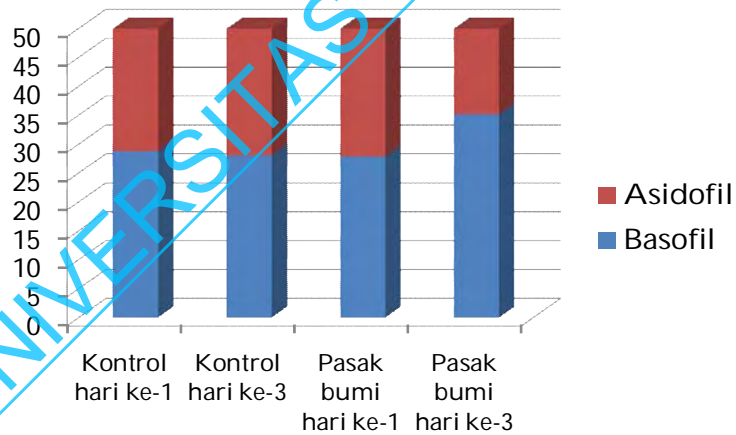
3.00= Dosis 3 = seduhan pasak bumi 200 mg/200 g bb (garis biru)

4.00= Dosis 4 = kontrol, aquades 1 ml (garis pink)

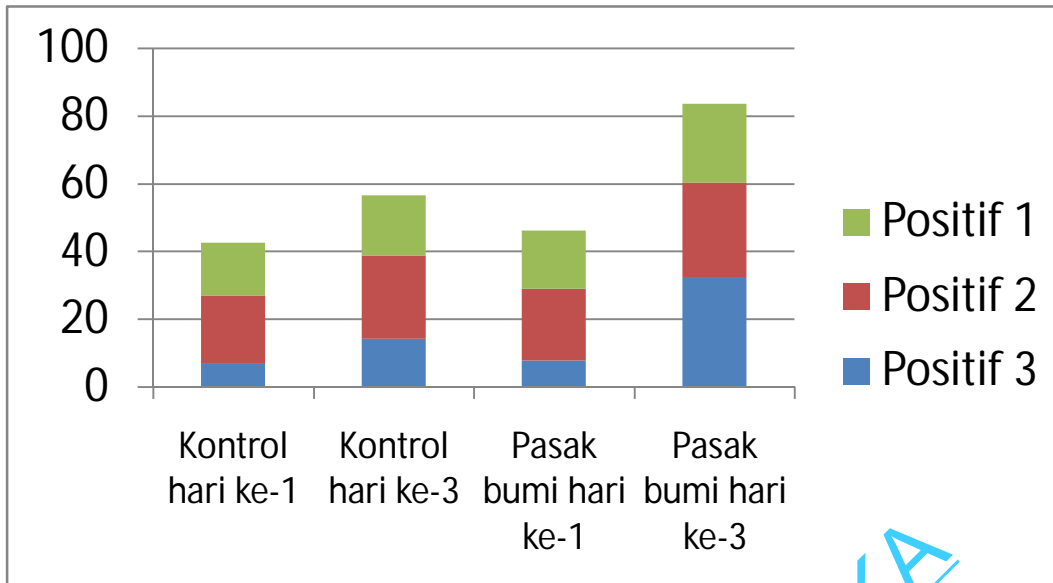
SEBARAN SEL ASIDOFIL DAN BASOFIL HIPOFISA



Gambar lampiran 2 Sebaran sel asidofil dan basofil hipofisis (pewarnaan HE).
Lingkaran merah=sel basofil; lingkaran hitam=sel asidofil
A. Perlakuan kontrol hari ke-3
B. Perlakuan pasak bumi hari ke-3

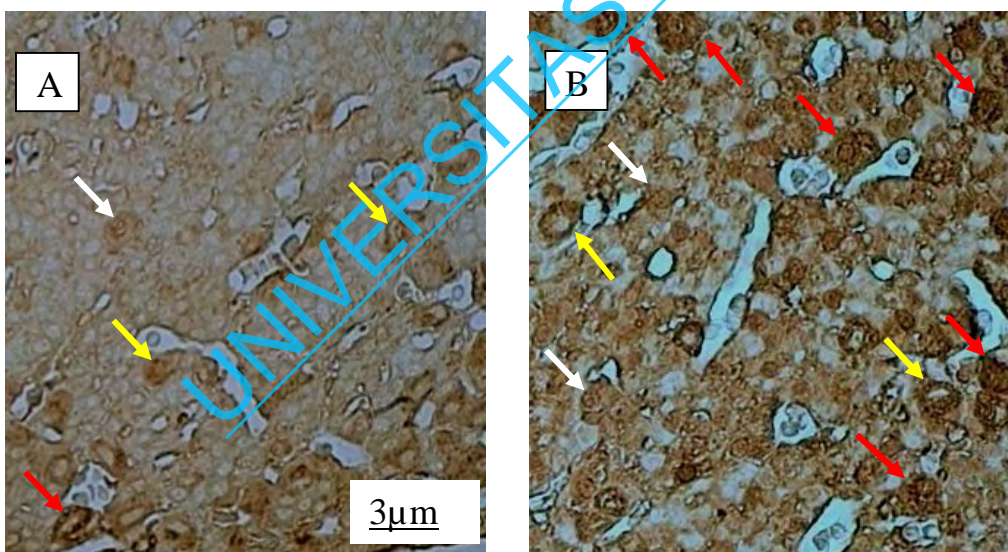


Gambar lampiran 3 Grafik distribusi jumlah sel asidofil dan basofil pada hipofisa anterior setelah perlakuan kontrol dan pasak bumi pada hari ke-1 dan ke-3



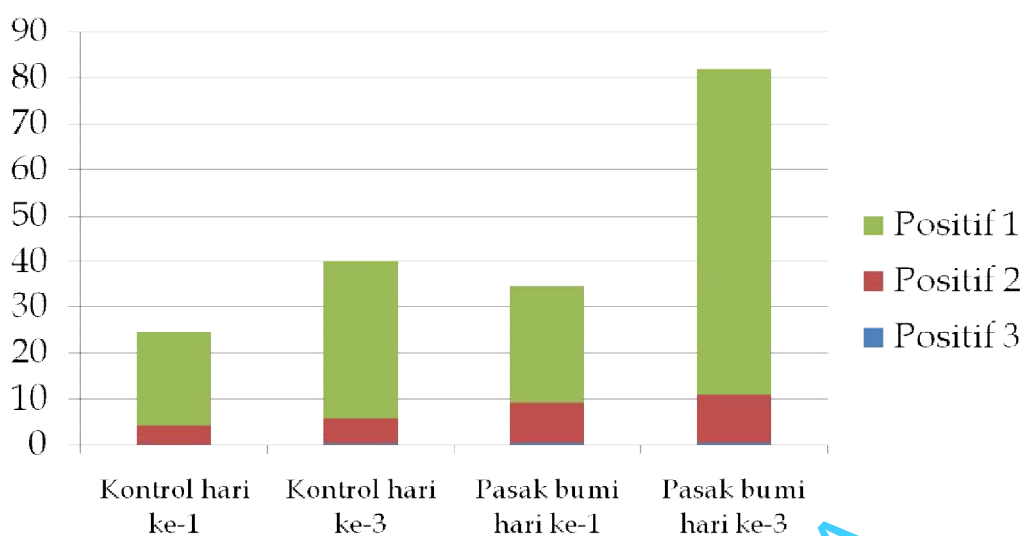
Gambar lampiran 4 Grafik rerata jumlah sel penghasil LH pada hipofisis anterior setelah perlakuan kontrol dan pasak bumi pada hari ke-1 dan ke-3.

Keterangan: Positif 3=aktivitas produksi LH intrasel kuat, Positif 2=sedang, Positif 1=lemah.

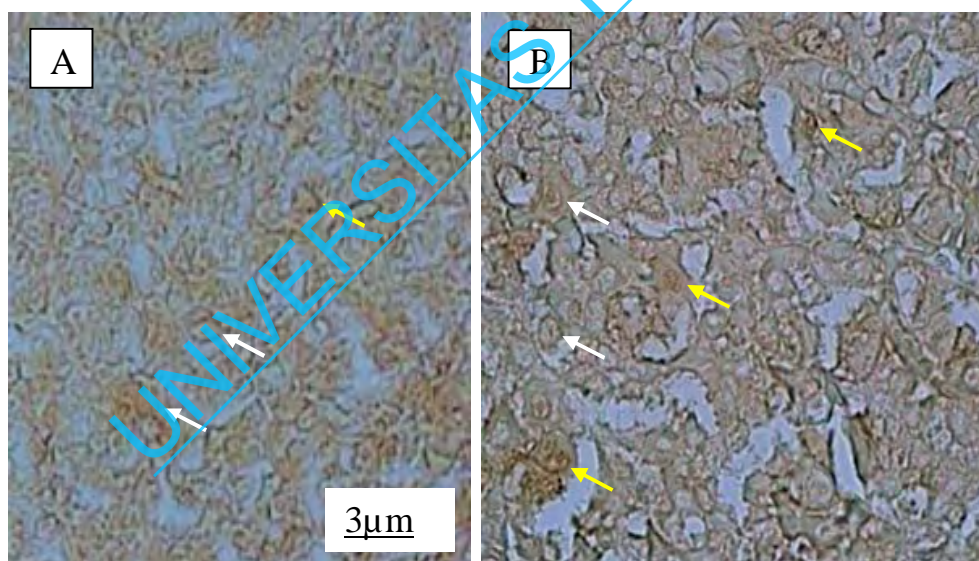


Gambar lampiran 5 Sebaran sel penghasil hormon LH hipofisis pada: A. kontrol hari ke-3, dan B. perlakuan pasak bumi sampai hari ke-3.

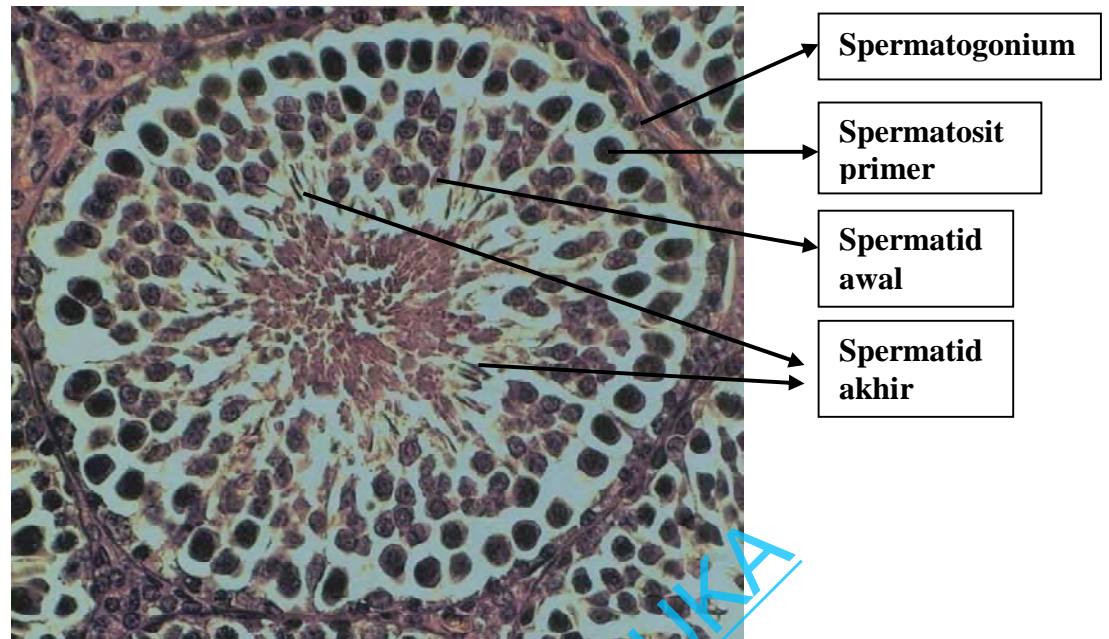
Sel berwarna cokelat tua=positif 3= aktivitas produksi LH intrasel kuat. Sel berwarna cokelat =positif 2= aktivitas produksi LH intrasel sedang. Sel berwarna cokelat muda/samar=positif 1= aktivitas produksi LH intrasel lemah. (pewarnaan imunohistokimia dengan antibodi anti LH)



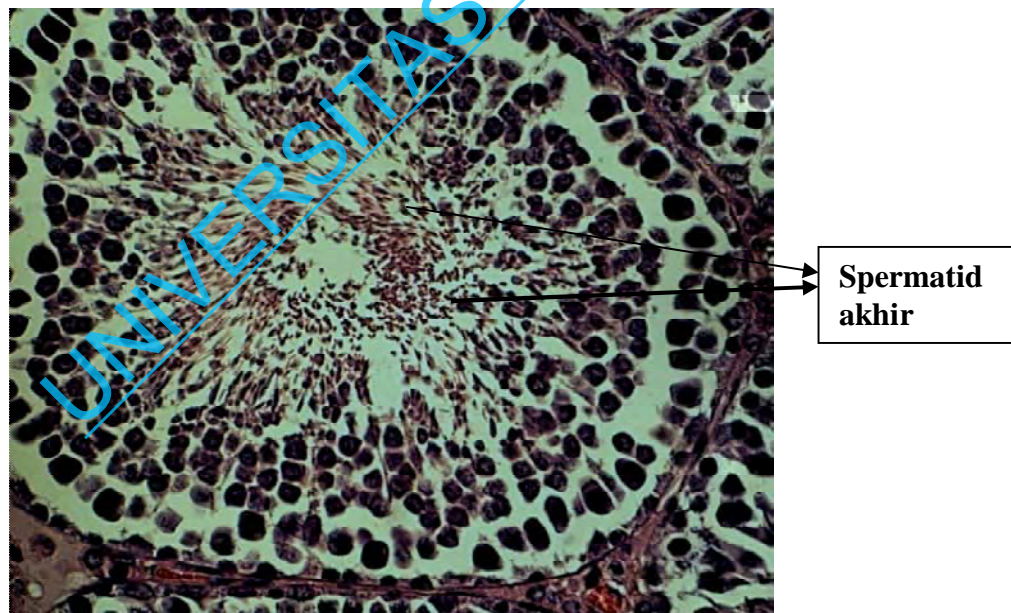
Gambar lampiran 6 Grafik rerata jumlah sel penghasil FSH pada hipofisis anterior setelah perlakuan kontrol dan pasak bumi pada hari ke-1 dan ke-3. Keterangan: Positif 3=aktivitas produksi FSH intrasel kuat (tidak tampak karena sangat sedikit), Positif 2=sedang, Positif 1=lemah.



Gambar lampiran 7 Sebaran sel penghasil hormon FSH hipofisis pada: A. kontrol hari ke-3, dan B. perlakuan pasak bumi sampai hari ke-3. Sel berwarna coklat tua=positif 3= aktivitas produksi FSH intrasel kuat (sangat jarang). Sel berwarna coklat =positif 2= aktivitas produksi FSH intrasel sedang. Sel berwarna coklat muda/samar=positif 1= aktivitas produksi FSH intrasel lemah (banyak dijumpai). (pewarnaan imunohistokimia dengan antibodi anti FSH).



Gambar lampiran 8 Perkembangan tahapan spermatogenesis dalam tubuli seminiferi testis pada kontrol hari ke-3. (pewarnaan HE).



Gambar lampiran 9 Perkembangan tahapan spermatogenesis dalam tubuli seminiferi testis pada perlakuan pasak bumi hari ke-3. Tampak nyata peningkatan jumlah spermatid akhir dibandingkan dengan kontrol hari ke-3. (pewarnaan HE).