

INDONESIAN JOURNAL OF  
**Clinical Pathology and  
Medical Laboratory**

Majalah Patologi Klinik Indonesia dan Laboratorium Medik

IJCP & ML (Maj. Pat. Klin. Indonesia & Lab. Med.)	Vol. 19	No. 2	Hal. 65-139	Surabaya Maret 2013	ISSN 0854-4263
---	---------	-------	-------------	------------------------	-------------------

Diterbitkan oleh Perhimpunan Dokter Spesialis Patologi Klinik Indonesia

*Published by Indonesian Association of Clinical Pathologists*

Terakreditasi No: 66b/DIKTI/KEP/2011, Tanggal 9 September 2011



INDONESIAN JOURNAL OF  
**CLINICAL PATHOLOGY AND  
MEDICAL LABORATORY**

Majalah Patologi Klinik Indonesia dan Laboratorium Medik

---

**Susunan Pengelola Jurnal Ilmiah Patologi Klinik Indonesia  
(*Indonesian Journal of Clinical Pathology and Medical Laboratory*)**

Perhimpunan Dokter Spesialis Patologi Klinik Indonesia Masa Bakti 2010–2013

(surat keputusan pengurus pusat PDSPATKLIN Nomor 06/PP-PATKLIN/VIII/2011 Tanggal 29 Agustus 2011)

**Pelindung:**

Ketua Perhimpunan Dokter Spesialis Patologi Klinik Indonesia

**Ketua:**

Prihatini

**Wakil Ketua:**

Maimun Z. Arthamin

**Sekretaris:**

Dian Wahyu Utami

**Bendahara:**

Bastiana Bermawi

**Anggota:**

Osman D. Sianipar

**Penelaah Ahli:**

Riadi Wirawan, AAG Sudewa, Rustadi Sosrosumihardjo, Rahayuningsih Dharma

**Penyunting Pelaksana:**

Yuli Kumalawati, Ida Parwati, FM Yudayana, Krisnowati, Tahono,  
Nurhayana Sennang Andi Nanggung, Sidarti Soehita, Purwanto AP, Jusak Nugraha, Endang  
Retnowati, Aryati, Maimun Z. Arthamin, Noormartany

**Berlangganan:**

3 kali terbit per tahun

Anggota dan anggota muda PDSPATKLIN mulai Tahun 2011 gratis setelah melunasi iuran

Bukan Anggota PDSPATKLIN: Rp 175.000,-/tahun

Uang dikirim ke alamat:

**Bastiana Bermawi dr. SpPK,  
Bank Mandiri KCP SBY PDAM  
No AC: 142-00-1079020-1**

**Alamat Redaksi:**

d/a Laboratorium Patologi Klinik RSUD Dr. Soetomo Jl. Majend. Prof. Dr Moestopo 6-8 Surabaya.  
Telp/Fax (031) 5042113, 085-790298772 Email: majalah.ijcp@yahoo.com

INDONESIAN JOURNAL OF  
**CLINICAL PATHOLOGY AND  
 MEDICAL LABORATORY**

Majalah Patologi Klinik Indonesia dan Laboratorium Medik

**DAFTAR ISI**

**PENELITIAN**

Gambaran Klinis Sepsis dan Kadar Nitric Oxide pada Mencit yang Diimbas dengan Lipopolysaccharide ( <i>Clinical Manifestation Sepsis and Nitric Oxide Level on Mice Induced by Lipopolysaccharide</i> ) <b>Sotianingsih, Soeharyo, Lisyani S, Guntur H</b> .....	65-68
<b>Air Gandarusa (<i>Justicia gendarussa</i> Burm. f.) dan Gambaran Gen Hyaluronidase Lewat Analisis PCR (<i>Gandarusa (<i>Justicia gendarussa</i> Burm. f.) Water and Expression of Hyaluronidase Gene by PCR Analysis</i>)</b> <b>Sri Lestari Utami, Didik P Restanto, Bambang Prajogo EW</b> .....	69-75
Proteinuria dalam Strok Disertai Diabetes Melitus dan Tanpa Disertai Diabetes Melitus ( <i>Proteinuria in Stroke With and Without Diabetic</i> ) <b>Misnah, Suci Aprianti, Fitriani Mangerangi, Burhanuddin Bahar</b> .....	76-78
Pendekatan Stewart dalam pH Darah yang Mendasari Asidosis Metabolik ( <i>The Stewart's Approach in Blood pH Underlying Metabolic Acidosis</i> ) <b>Efrida, Ida Parwati, Ike Sri Redjeki</b> .....	79-87
Kuman dan Kepekaan Antimikroba di Kasus Patah Tulang Terbuka ( <i>Microbes and Antimicrobial Sensitivity in Open Fracture</i> ) <b>Yanty Tandirogang, Tenri Esa, Nurhayana Sennang</b> .....	88-91
Katekin Daun Teh Hijau ( <i>Camelia sinensis</i> ) terhadap Malondialdehyde dan Super Oxide Dismutase ( <i>Katekin from Green Tea Leaves (<i>Camellia sinensis</i>) to Malondialdehyde and Super Oxide Dismutase</i> ) <b>Sukina B, Gwenny I.P Suhartati, Harianto N</b> .....	92-97
Procalcitonin dan Interleukin-6 pada Sepsis dengan Gejala Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) ( <i>Procalcitonin and Interleukin-6 in Sepsis with Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS)</i> ) <b>Indranila KS, Tjahjati DM, Emma</b> .....	98-104
Identifikasi Bakteri Aerob Gram Negatif dan Gram Positif Menggunakan Metode Konvensional dan Otomatik ( <i>Gram Negative and Gram Positive Aerobic Bacteria Identification Using Conventional and Automatic Method</i> ) <b>Patricia M. Tauran, Irda Handayani, Nurhayana Sennang</b> .....	105-111
Immature Platelet Fraction (IPF) dan Trombopoietin di Sirosis Hati ( <i>Immature Platelet Fraction (IPF) and Thrombopoietin in Liver Cirrhosis</i> ) <b>Esti Rohani, Yetti Hernaningsih, Suprpto Ma'at, Ummi Maimunah</b> .....	112-118
Eosinopenia dan Procalcitonin dalam Sepsis ( <i>Eosinopenia and Procalcitonin in Sepsis</i> ) <b>Danny Luhulima, W. Hidayati, IGAAP Sri Rejeki, R. Permatasari</b> .....	119-125

TELAAH PUSTAKA

C-X-C Receptor 4 (CXCR4) Metastasis Kanker Payudara ( <i>C-X-C Receptor 4 (CXCR4) in Metastasis of Breast Cancer</i> ) <b>I Wayan Sudarsa, I Wayan Putu Sutirta Yasa</b> .....	126-131
--	---------

LAPORAN KASUS

Leukemia Sel Berambut ( <i>Hairy Cell Leukaemia</i> ) <b>Reini Meilani Isbach, Agus Alim Abdullah, Mansyur Arif</b> .....	132-135
---	---------

INFOMASI LABORATORIUM MEDIK TERBARU .....	136-139
---	---------

**Ucapan terima kasih kepada penyunting Vol. 19 No. 2 Maret 2013**

Krisnowati, Maimun Z. Arthamin, Rahayuningsih Dharma, Purwanto AP, Ida Parwati, AAG Sudewa,  
Endang Retnowati, Jusak Nugraha, Noormartany, M. Yolanda Probahoosodo

Dewan Redaksi Majalah IJCP

# AIR GANDARUSA (*Justicia gendarussa* Burm. f.) DAN GAMBARAN GEN HYALURONIDASE LEWAT ANALISIS PCR

(*Gandarusa (Justicia gendarussa* Burm. f.) Water and Expression of Hyaluronidase Gene by PCR Analysis)

Sri Lestari Utami<sup>1</sup>, Didik P. Restanto<sup>2</sup>, Bambang Prajogo EW<sup>3</sup>

## ABSTRACT

*Gandarusa (J. gendarussa* Burm. f.) is an etnomedicine which is used as a male contraceptive alternative, known to inhibit the enzyme function of spermatozoa hyaluronidase during fertilization. One of the ideal contraceptive conditions is the safety (among others non mutagenic), requiring a long research during the verification process. The early research is the gene expression of hyaluronidase mice (*M. musculus* L.) testis given water fraction of the *gandarusa* with PCR analysis. The total RNA was isolated from the normal mice testis (as the negative control or no treatment group) and the mice testis from the treatment groups. The treatment groups consisted of group I and II treated with water fraction of the *gandarusa* 15 mg/20 gr BW and 7.5 mg/20 gr BW, subsequently, the positive control group was also given hesperidins 1 mg/20 gr BW once a day per oral during the 1.5 times of spermatogenesis cycle (for 55 days). The results of the study showed that (1) the cDNA fragment confirmed as the gene of hyaluronidase mice testis (with 710 bp length of nucleotide) passed through RT-PCR at the total RNA negative control group, sequenced, isolated and alignment in the NCBI gene bank. (2) the same cDNA fragment gene of hyaluronidase mice testis (from the negative control group) did not transcript in the treatment I and positive control groups (where there is no band), but this gene will be transcribed in the treatment II group (where the band is emerged).

**Key words:** Male contraception, *gandarusa*, hyaluronidase gene, PCR analysis

## ABSTRAK

*Gandarusa (J. gendarussa* Burm. f.) sebagai etnomedisin merupakan pilihan kontrasepsi dari laki-laki, yaitu bahan yang diketahui dapat menghambat fungsi enzim hyaluronidase di kepala akrosom spermatozoa selama pembuahan. Di antara syarat kontrasepsi yang baik adalah bahan tersebut aman penggunaannya (di antaranya adalah non mutagenik), dan untuk itu selama pembuktiannya memerlukan penelitian yang lama. Penelitian awalnya adalah mengenai ekspresi gen hyaluronidase testis mencit (*Mus musculus* L.) yang diberi fraksi air *gandarusa* menggunakan analisis PCR. RNA lengkap diisolasi dari testis mencit sehat (sebagai kelompok pembandingan negatif atau tanpa perlakuan) dan kelompok perlakuan. Kelompok perlakuan: kelompok I dan II diberi fraksi air *gandarusa* 15 mg/20 gr BB dan 7,5 mg/20 gr BB serta kelompok pembandingan positif diberi hesperidin mg/20 gr BB sebanyak satu kali sehari lewat rongga mulut selama 1,5 kali siklus pembentukan spermatogenesis (55 hari). Hasil kajian ini adalah: Fragmen cDNA yang dapat dipastikan sebagai gen hyaluronidase testis mencit (dengan panjang nukleotida 710 bp), yang didapatkan melalui RT-PCR di RNA lengkap kelompok pembandingan negatif, diurutkan, diisolasi dan diujarkan menggunakan bahan dari Bank gen NCBI; Fragmen cDNA dari gen hyaluronidase kelompok pembandingan negatif tersebut tidak ditranskripsikan di kelompok perlakuan I dan pembandingan positif (tidak ada pita), tetapi ditranskripsikan di kelompok perlakuan II (terlihat pita).

**Kata kunci:** Kontrasepsi laki-laki, *gandarusa*, gen hyaluronidase, analisis PCR

## PENDAHULUAN

Sekarang ini banyak dikembangkan metode kontrasepsi untuk laki-laki, karena hanya terdapat tiga (3) jenis kontrasepsi yang benar-benar umum dipakai olehnya, yaitu senggama terputus (*coitus interruptus/withdrawal*), kondom dan vasektomi (sterilisasi laki-laki).<sup>1-2</sup> Padahal menurut hasil *survey* lebih dari 50% laki-laki mengatakan, bahwa mereka bersedia menggunakan kontrasepsi hormonal untuk meringankan beban perempuan pasangannya

dan berusaha lebih memegang kendali.<sup>3</sup> Metode kontrasepsi yang umum dipakai dianggap mempunyai kelemahan di antaranya adalah senggama terputus kurang tepat guna (4–24%), kondom akan menghadapi resistensi psikologis dan mempunyai tingkat kegagalan 3–15% dan sifat reversibilitas vasektomi yang tidak dapat diandalkan. Di samping itu vasektomi diduga terkait dengan timbulnya kanker prostat yang mungkin terjadi kemudian.<sup>1,4-6</sup>

*Gandarusa (J. gendarussa* Burm. f.) digunakan sebagai kontrasepsi untuk laki-laki oleh masyarakat

<sup>1</sup> Bagian Biomedik Fakultas Kedokteran-Universitas Wijaya Kusuma Surabaya. E-mail: tami\_napra@yahoo.com

<sup>2</sup> Jurusan Budi daya Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Jember

<sup>3</sup> Bagian Ilmu Bahan Alam Fakultas Farmasi Universitas Airlangga

Sentani (Papua).<sup>7</sup> Di antara penelitian terkait gandarusa adalah pemberian infusnya akan menyebabkan ada penurunan daya pisah/dispersi *kumulus oophorus* manusia di lingkup buatan;<sup>8</sup> Sari metanolnya akan menghambat penetrasi spermatozoa, menurunkan aktivitas akrosin dan  $\beta$ -glukosidase kelinci;<sup>9</sup> Secara kualitatif keberadaan sifat penghambat *hyaluronidase* di testis sapi;<sup>10</sup> Kandungan senyawa aktif di gandarusa dari golongan flavonoid (di antaranya disebut sebagai gendarusin A dan B) akan mencegah penetrasi spermatozoa mencit pada pembuahan di lingkup buatan (IVF) serta menunjukkan ada penurunan aktivitas *hyaluronidase* tersebut.<sup>11</sup> Hesperidin (termasuk glikosida flavonoid dan sebagai kajian pembandingan pada penelitian ini) dapat mencegah penetrasi spermatozoa mencit dalam proses IVF.<sup>10-13</sup> Hesperidin juga menurunkan aktivitas enzim *hyaluronidase* spermatozoa mencit dan bersifat penghambat *hyaluronidase* testis sapi.<sup>14</sup> Enzim *hyaluronidase* terdapat di akrosom spermatozoa yang berperan dalam melonggarkan matriks luar sel kumulus oophorus sebagai penghalang spermatozoa pada pembuahan.<sup>15</sup> Bukti yang terdapat tidak dapat diragukan bahwa flavonoid tertentu bersifat mutagenik, sehingga berkemampuan sebagai karsinogenik.<sup>16</sup>

Sebagian besar ekspresi materi genetik yang terjadi melalui hasil proteinnya, yang melibatkan dua (2) langkah yang berurutan dan tempat penjelasan perubahan dari satu bentuk ke bentuk yang lain: transkripsi (DNA  $\rightarrow$  RNA) dan pengalihan (RNA  $\rightarrow$  protein).<sup>17</sup> Ekspresi gen dapat terlihat di pembentukan spermatogenesis,<sup>18-19</sup> sehingga RNA lengkap yang dihasilkan di spermatogenesis oleh sel spermatogenik sangat tinggi.<sup>20</sup>

Analisis banyaknya RNA merupakan segi kajian gambaran gen yang penting dan merupakan inti pemahaman mekanisme yang mengatur aktivitas gen.<sup>21</sup> Penerapan teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*) di kajian tentang gambaran gen di berbagai kepustakaan akan mengarah kepada RT-PCR.<sup>22-23</sup> RT-PCR (*Reverse Transcriptase atau Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction*) merupakan salah satu terobosan utama dari bermacam-macam tatalangkah PCR yaitu menemukan RNA.<sup>24</sup> Tatalangkah RT-PCR terbukti lebih peka dan merupakan pembeda yang jelas daripada dengan analisis *Northern blot*, uji perlindungan nuklease dan hibridisasi *in situ*. Di samping itu tatalangkah ini lebih cepat, mudah dikerjakan, dapat dilakukan analisis bersamaan beberapa transkripsi dari RNA lengkap dan dapat digunakan untuk perkiraan relatif atau mutlak dari mRNA-mRNA. Tatalangkah ini juga murah dan bahkan dapat digunakan untuk mempelajari RNA walaupun dalam jumlah yang sangat

sedikit serta biasanya hanya terlihat satu gen pada waktu tertentu.<sup>24,25-30</sup>

Berdasarkan latar belakang di atas, maka penelitian ini ditujukan untuk menganalisis gambaran gen *hyaluronidase* testis mencit pada pemberian fraksi air gandarusa dengan teknik PCR (melalui RT-PCR) sebagai awal pembuktian gandarusa sebagai “pil laki-laki” yang bagus (bukan merupakan bahan yang mutagenik).

## METODE

Bahan tanaman yang digunakan adalah daun tanaman gandarusa yang diperoleh di daerah Trawas, Mojokerto dan hewan yang diteliti adalah mencit jantan galur *Balb C* yang diperoleh dari Pusvetma Surabaya, berumur antara 2–3 bulan, berat badannya antara 20–30 gram dan sehat.

### Penyarian fraksi air daun Gandarusa (*J. gandarusa* Burm. f.)

Daun gandarusa yang diperoleh dipilah yang masih segar (basah), dicuci, dikeringkan pada suhu kamar dan diserbuk. Serbuk daun gandarusa disarikan secara maserasi dan perkolasi dengan pelarut n-heksan dan etanol 60%. Sari etanol kemudian akan diuapkan sampai mengering dalam *rotavapour* dan lemari asam. Kemudian akan diasamkan dengan HCl 2 N sampai pH 3–4 dan dikocok dengan kloroform. Di tahap air dan kloroform akan dipisahkan. Tahapan air yang didapat akan dibasakan dengan  $\text{NH}_4\text{OH}$  25% sampai pHnya antara 9–10. Setelah itu dikocok kembali dengan kloroform dan tahapan air dipisahkan kembali dari tahapan kloroform. Kemudian akan didapatkan tahapan air dan kloroform lagi. Sari tahapan air ini kemudian akan digunakan sebagai bahan uji.

### Pemberian bahan uji di kelompok perlakuan

Penimbangan berat badan mencit dilakukan setiap minggu. Bahan uji berupa fraksi air gandarusa dan hesperidin, lama pemberiannya adalah 55 hari (mengikuti 1,5 kali siklus spermatogenesis) satu kali sehari lewat rongga mulut. Setiap kelompok perlakuan terdiri dari 15 ekor mencit yang terbagi atas: kelompok perlakuan I dan II yang diberi fasa air gandarusa dengan dosis 15 mg/20 gr BB dan 7,5 mg/20 gr BB serta kelompok perlakuan pembandingan positif yang diberi hesperidin sebanyak 1 mg/20 gr BB.

### Analisis PCR (melalui RT-PCR)

Primer yang digunakan adalah *forward* dan *reverse* yang dirancang terlebih dahulu dengan program

*Genetic Mark (McIntosh)* homologik dengan beberapa gen *hyaluronidase* testis di NCBI.

RNA lengkap yang digunakan di RT-PCR akan diisolasi dari testis mencit kelompok tanpa perlakuan (pembanding negatif) dan kelompok perlakuan dengan *buffer* homogenisasi *guanidium thiosianat* dan CsCl<sup>31</sup>. Hasil isolasi RNA lengkap akan diukur kepekatannya dengan spektrofotometer pada  $\lambda$  260 nm. Sedangkan perangkat RT-PCR dan PCR yang digunakan adalah *Access RT-PCR Introductory Systems* dan *PCR Core Systems* buatan *Promega*.

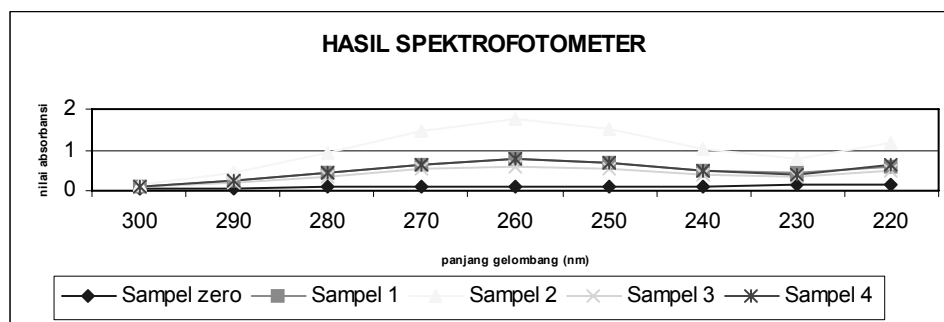
Pengelektroforesis gel agarose dilakukan untuk memperlihatkan RNA lengkap dan fragmen cDNA yang didapat. Kepekatan gel agarose yang digunakan adalah 1% (w/v), yang dialirkan dengan tegangan arus listrik sebesar 100 Volt dan larutan TBE 1X. Pewarnaannya menggunakan *ethidium bromida* dan dilihat dengan UV *illuminator* setelah ditambahkan *loading dye*. Petanda yang digunakan adalah *1 Kb Plus DNA Ladder*.

Isolasi fragmen cDNA dari gel agarose 1% dilakukan dengan metode mendialis membran, yang dielektroforesiskan selama 1,5–2 jam dengan tegangan arus listrik sebesar 100 Volt dalam TBE 1X. Kemudian berturut-turut diperlakukan dengan PCI, etanol p.a. dan natrium (*sodium*) asetat 3M pH 5,2. Setelah pengendapan akan dilakukan pencucian dengan etanol 70% sebanyak 2 kali. *Pellet* yang didapat akan dikeringkan dalam pengering pompa kecap udara, diberi *buffer* TE dan divisualisasi.

Pengurutannya akan didahului dengan isolasi fragmen cDNA dari *low melting agarose* dan kemudian dilakukan penempelan nama dengan *Big Dye Terminator*. Sementara mesin yang digunakan adalah mesin *DNA Sequencer ABI Prism 310*.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Beberapa urutan nukleotida gen *hyaluronidase* testis dari NCBI yang dihomologikan mempunyai kode gen (*accession numbers*), yaitu: AY228460; AK005638;



**Gambar 1.** Hasil gambaran spektrum isolasi RNA lengkap (menggunakan spektrofotometer) ukuran daya serapnya pada  $\lambda$  (nm) tertentu.

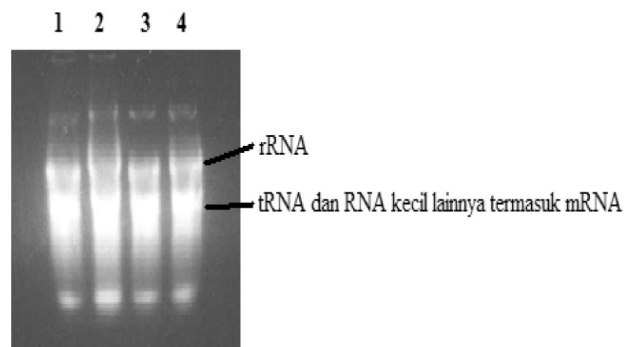
**Tabel 1.** Hasil absorbansi RNA lengkap testis mencit pembanding negatif menggunakan spektrofotometer dengan  $\lambda$  260 nm.

Sampel	Daya serap $\lambda$ 260 nm	Kepekatan RNA ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )
Zero (akuabidest steril)	0,093	-
1	0,776	4,188
2	1,761	10,008
3	0,604	3,066
4	0,757	3,984

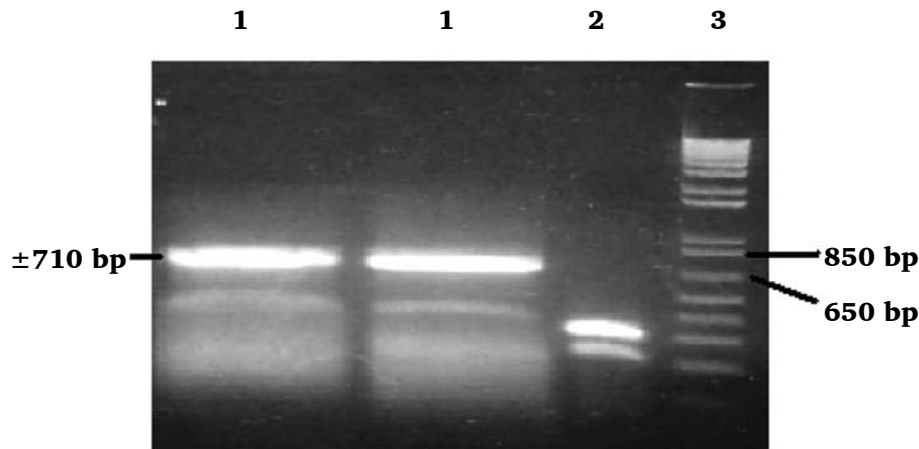
MU35958 dan RN2BIANGN. Primer yang didapat akan mempunyai 20 basa nukleotida, yang setiap urutan basanya adalah: *forward*: 5'- GCT TAG CTA TCA TTG ACT GG- 3' dan *reverse*: 5'- GCA CAT TTT GGC TGC TAG GG- 3'. *Melting temperature* untuk primer adalah antara 58 °C – 62 °C, yang berperan pada penentuan suhu *annealing*.

Hasil mengisolasi RNA lengkap (empat/4 sampel) akan digunakan untuk mendapatkan fragmen cDNA dari kelompok pembanding negatif, yang berfungsi sebagai pembanding kelompok perlakuan. Hasil mengukur dan penggambarannya dapat dilihat di Tabel 1, Gambar 1 dan Gambar 2.

RT-PCR yang dilakukan menggunakan RNA *template* dari sampel ke-2 (kepekatan akhir 0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ), primer *forward* dan *reverse* (kepekatan akhir 10



**Gambar 2.** Hasil mengelektroforesis isolasi RNA lengkap, gambaran nomor 1–4 menunjukkan sampel 1, 2, 3 dan 4.



**Gambar 3.** Hasil mengelektroforesis RT-PCR. (1) Fragmen cDNA pembanding negatif, (2) Pembanding positif diambil dari perangkat RT-PCR dan (3) Petanda.

pmol/ $\mu$ L) dan suhu *annealing*-nya adalah 55 °C. Hasil visualisasi fragmen cDNA dengan prakiraan panjang nukleotida  $\pm$  710 bp (berdasarkan kesesuaian primer yang digunakan dengan gen *hyaluronidase* testis mencit dari bank gen NCBI dan masih ada yang berpita (*band*) dan *smear* dapat dilihat di Gambar 3.

Kemudian akan dilakukan isolasi fragmen cDNA dari gel elektroforesis 1%, yang penggambarannya dapat dilihat di Gambar 4.

Didasari pembacaan histogram (hasil mengurut fragmen cDNA) dan penjajaran menggunakan bank gen NCBI (pengerjaan *BLAST*) didapat kesesuaian dengan gen *hyaluronidase* testis mencit, yaitu gen dengan *accession numbers*: AK005638 (*Mus musculus adult male testis cDNA, RIKEN full-length enriched library*) dan AY228460 (*Mus musculus sperm hyaluronidase PH-20 protein mRNA*) (dengan angka tertinggi (*bits*) = 955). Gambar 5 menunjukkan urutan nukleotida dan asam amino dari fragmen cDNA (panjang 710 bp dan terletak di basa bernomor 736–1443) yang didapatkan melalui program *Genetyx-Win* versi 3.1 dari homologis histogram dan gen dengan *accession numbers*: AK005638.

Fragmen cDNA gen *hyaluronidase* testis mencit 710 bp diperkuat dengan PCR menggunakan primer *forward* dan *reverse* (kepekatan akhir 10 pmol/ $\mu$ L), DNA *template* (konsentrasi akhir < 0,5  $\mu$ g/50  $\mu$ l) dan perbaikan suhu *annealing* adalah 57° (tidak adanya pita yang *smear*). Penggambaran hasil PCR dan isolasi

fragmen cDNA hanya dapat dilihat di Gambar 4 dan Gambar 6.

Dalam analisis PCR kelompok perlakuan akan didahului dengan isolasi RNA lengkap, yang kepekatan dan penggambarannya dapat dilihat di Tabel 2, Gambar 7 dan Gambar 8.

RNA lengkap yang diperoleh akan digunakan sebagai RNA *template* di RT-PCR dengan kepekatan akhir disamakan, yaitu 0,48  $\mu$ g/ $\mu$ L. Primer yang digunakan sama dengan RT-PCR di kelompok pembanding negatif dengan suhu *annealing* 57 °C (sebagai hasil perbaikan suhu *annealing*). Penggambaran fragmen cDNA 710 bp dari RT-PCR kelompok perlakuan dan kelompok pembanding negatif (lihat Gambar 9) menunjukkan kelompok perlakuan I dan pembanding positif tidak terdapat adanya pita yang diinginkan. Di kelompok perlakuan II menunjukkan ada pita yang diinginkan.

Hal ini menunjukkan bahwa gen *hyaluronidase* testis mencit di kelompok perlakuan I dan pembanding positif tidak tergambar, yaitu tidak terjadi transkripsi dari gen tersebut setelah diberi perlakuan. Hal ini berbeda dengan di kelompok perlakuan II yang gennya masih tergambar walaupun telah diberi gandarusa dengan dosis separuh dari milik kelompok perlakuan I. Hal ini menunjukkan bahwa besarnya dosis gandarusa yang diberikan sangat



**Gambar 4.** Hasil mengelektroforesis isolasi fragmen cDNA dari gel terelektroforesis, yang berbeda besar isi muatannya, yaitu (1) 10 $\mu$ L dan (2) 2 $\mu$ L.

**Tabel 2.** Hasil daya serapan RNA lengkap testis mencit kelompok perlakuan menggunakan spektrofotometer dengan  $\lambda$  260 nm

Sampel	Daya serap $\lambda$ 260 nm	Kepekatan RNA ( $\mu$ g/ $\mu$ l)
Zero (akuabidest steril)	0,204	-
Kelompok perlakuan I	0,273	0,552
Kelompok perlakuan II	0,473	2,152
Pembanding positif	0,360	1,2

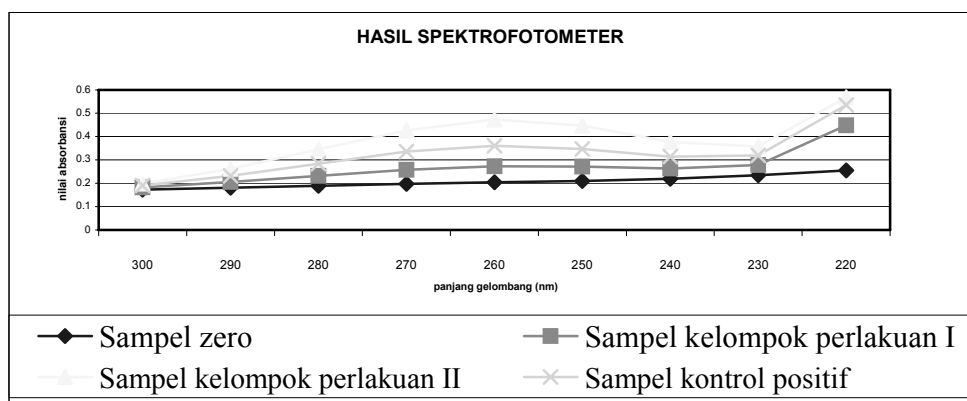


0..... 740      750      760      770      780  
 gcttagctatcattgactgggaagaatggaggcctacctgggtgaga  
                   L A I I D W E E W R P T W L R  
 790      800      810      820      830      840  
 aactggaaacctaaggataactacaggaataagtctattgaattggccaatcaactaat  
 N W K P K D N Y R N K S I E L V Q S T N  
 850      860      870      880      890      900  
 ccaggacttagtatcacagaagccaccagaaagccatacaacaatttgaagaggcagga  
 P G L S I T E A T Q K A I Q Q F E E A G  
 910      920      930      940      950      960  
 aggaagtttatggaaggaactttacacctgggaaattccttcgaccaaaccagctatgg  
 R K F M E G T L H L G K F L R P N Q L W  
 970      980      990      1000      1010      1020  
 ggttattatctatcttctgattgttataacaataagtttcaagaccctaagtatgatggg  
 G Y Y L F P D C Y N N K F Q D P K Y D G  
 1030      1040      1050      1060      1070      1080  
 cagtgccttgctgtgaaaagaaaagaatgataatcttaaatggctatggaaagcaagc  
 Q C P A V E K K R N D N L K W L W K A S  
 1090      1100      1110      1120      1130      1140  
 accggcctttaccatctgtctatattgaagaagacttgaagtccaatcgacaagctacc  
 T G L Y P S V Y L K K D L K S N R Q A T  
 1150      1160      1170      1180      1190      1200  
 ctctatgtccgctaccgagttgtggaagctatcagagtgtccaaggttgggaatgcatcg  
 L Y V R Y R V V E A I R V S K V G N A S  
 1210      1220      1230      1240      1250      1260  
 gatccagtcctgattttgtctatatccgtcttgttttactgatcgtacctctgaatac  
 D P V P I F V Y I R L V F T D R T S E Y  
 1270      1280      1290      1300      1310      1320  
 cttctagaggatgacctgtgaatacaattgggtgaaattgttgcctcgggtacctctgga  
 L L E D D L V N T I G E I V A L G T S G  
 1330      1340      1350      1360      1370      1380  
 attataatatgggatgctatgagtttagcacaacgtgcccaggttgccaatcctacat  
 I I I W D A M S L A Q R A A G C P I L H  
 1390      1400      1410      1420      1430      1440  
 aaatacatgcagacgacctgaatccatacatagtcaatgttacccctagcagccaaaatg  
 K Y M Q T T L N P Y I V N V T L A A K M  
 ..... 2100  
 tgc  
 C

**Gambar 5.** Hasil mengurut fragmen cDNA gen *hyaluronidase* testis mencit pembanding negatif.



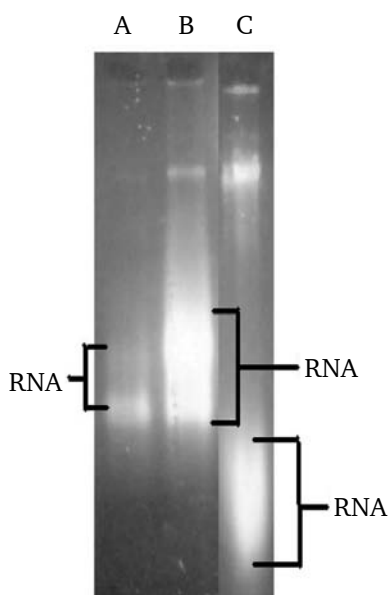
**Gambar 6.** Hasil mengelektroforesis dengan PCR, (a) petanda, (b) dan (c) fragmen cDNA (710 bp).



**Gambar 7.** Hasil gambaran spektrofotometer pada  $\lambda$  300–220 nm dari isolasi RNA lengkap kelompok perlakuan.

berpengaruh di ekspresi gen *hyaluronidase* testis mencit. Keadaan tersebut sesuai dengan penelitian sebelumnya yang menyebutkan ada kandungan senyawa aktif di gendarusa yang terdapat di golongan flavonoid (di antaranya sebagai gendarusin A dan

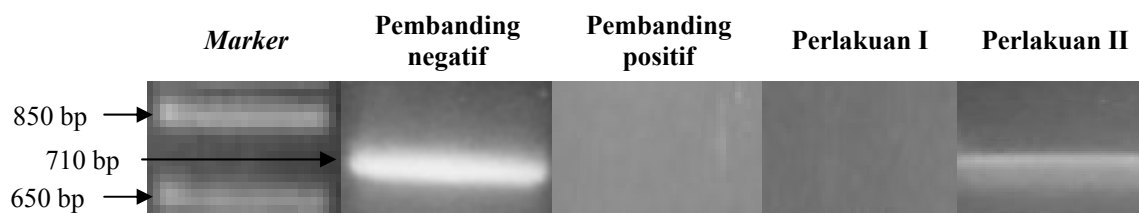
B) akan mencegah penetrasi spermatozoa mencit pada pembuahan di lingkup buatan (IVF) (dosis 15 mg/20 g BB dan 30 mg/20 g BB) serta menunjukkan adanya penurunan aktivitas hyaluronidase.<sup>11</sup> Di kajian hesperidin dalam pengerjaan IVF juga akan mencegah penetrasi spermatozoa mencit.<sup>10</sup>



**Gambar 8.** Hasil mengelektroforesis isolasi RNA lengkap, (A) Kelompok perlakuan I, (B) Kelompok perlakuan II dan (C) Kontrol positif.

Tidak terekspresinya gen *hyaluronidase* testis mencit di kelompok perlakuan I dan pembanding positif (tidak terjadi transkripsi) dapat terjadi karena banyak sebab, di antaranya terdapat senyawa aktif gendarusa seperti gendarusin A dan B atau dari hesperidin yang menyebabkan: Transkripsi tidak terjadi atau menyebabkan penghalangan ekspresi seperti ada penghalangan fungsi dari faktor transkripsi atau promotor atau; Perubahan kecepatan transkripsi gen, atau perubahan kecepatan transkrip RNA yang diproses saat masih berada dalam nukleus dan perubahan kemantapan molekul mRNA yang berarti kecepatan saat mereka didegradasi.<sup>32</sup>

Di samping itu terdapat dua (2) keadaan yang mempengaruhi keberhasilan atau kegagalan terselesaikannya molekul cDNA individual di RT-PCR, yaitu (1) dihasilkannya *truncated* cDNA karena selalu adanya kemungkinan tidak terselesaikan dengan sempurna pembuatan satu atau beberapa untai cDNA dan (2) keberadaan pasangan basa intramolekul RNA juga dapat mengarah pada penyalinan yang tidak lengkap.<sup>33</sup>



**Gambar 9.** Foto hasil mengelektroforesis PCR hasilan kelompok tanpa perlakuan (pembanding negatif) dan kelompok perlakuan (perlakuan I, II dan pembanding positif).

## SIMPULAN

Fragmen cDNA di pembanding negatif (710 bp) sesuai dengan gen *hyaluronidase* testis mencit dengan primer *forward*: 5' - GCT TAG CTA TCA TTG ACT GG - 3' dan *reverse*: 5' - GCA CAT TTT GGC TGC TAG GG - 3'. Hasil ekspresi lewat analisis PCR (melalui RT-PCR) diketahui, bahwa gen *hyaluronidase* testis mencit di kelompok perlakuan I dan pembanding positif tidak tergambar (tidak ada pita di 710 bp). Gen di telitian ini yang terdapat di kelompok perlakuan II tergambar (kemunculan pita di 710 bp).

## DAFTAR PUSTAKA

- Hatcher RA, Trussel J, Nelson AL, Cates WJ, Stewart FH, Kowal D. *Contraceptive Technology*, 19<sup>th</sup> Ed., Contraceptive Technology Communications Inc. 2009; 21-4.
- Hatcher RA, Stewart F, Trussell J et. al. *Contraceptive Technology* 1990-1992. New York, Irvington Publishers, 1990; 153.
- Beck M, "Honey, Its Your Turn ...", *The Wall Street Journal*, Maret 2012, HealthJournal@wsj.com (accessed March 30, 2012)
- Comhaire FH. Male contraception: hormonal, mechanical and other. *Hum. Reprod.*, 1994; April 9 (4): 586-590.
- Engelmann VH, Schramek P, Tomamichel G., Vasectomy reversal in central Europe: result of questionnaire of urologists in Austria, Germany and Switzerland. *Journal of Urology*, 1990; 143: 64-67.
- Hargreave TB. Towards reversible vasectomy. *International Journal of Andrology*, 1992; 15: 455-459.
- Moeso S, Agus P. Laporan Perjalanan ke Jayapura Sentani (Irian Jaya). Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada (Fakultas Biologi), 1985; 19.
- Lestari S, Sutarjadi, Hinting A dan Prajogo EW., Bambang. Pengaruh Ekstrak Diklormetan dan Metanol Daun *Gendarussa vulgaris* Nees terhadap Aktivitas Enzim Hyaluronidase Spermatozoa pada Kumulus Oophorus Ovum Manusia in vitro. Simposium Penelitian Bahan Obat Alami IX. Yogyakarta. 1997.
- Prajogo EW-B, Matty NS, Santa IGP dan Pieter-Sono O. Pengaruh Ekstrak Diklormetan dan Metanol Daun *Gendarussa vulgaris* Nees terhadap Aktivitas Enzim Akrosin Spermatozoa Kelinci, POKJANAS TOI XVIII, Malang, 1998.
- Prajogo EW-B, Widjiati, Lunardhi H. dan Hinting A. Hambatan Hesperidin terhadap Penetrasi Spermatozoa Mencit dalam Proses Fertilisasi in vitro, Simposium Penelitian Bahan Obat Alami IX, Yogyakarta, 1997.
- Prajogo EW-B. Aktivitas Antifertilitas Flavonoid Daun *Justicia gendarussa* Burm.f.. Disertasi, Surabaya, Universitas Airlangga, 2002; 146-7.
- Farnsworth NR and Waller DP. Current status of plant products reported to inhibit sperm. *Research Frontiers in Fertility Regulation*, 1982; 2 (1): 1-16.
- Zaneveld LJD. Sperm Enzyme Inhibitors an Antifertility Agents. In: *Human Semen and Fertility Regulation in Men*. Editor: Hafedz, ESE. London, CV Mosby Company, 1976; 576-78.
- Prajogo EW-B, Eka YM, Lunardhi H, Widjiati dan Noor Cholies Z. Pengaruh Hesperidin pada Aktivitas Hyaluronidase Spermatozoa Mencit (*Mus musculus*), *Media Kedokteran Hewan*, 2001; Vol 17 (No 1, April): 1-8.
- Ikawa M, Inoue N, Benham AM, Okabe M, Fertilization: a Sperm's Journey to and Interaction with the Oocyte, *The Journal of Clinical Investigation*, 2010; 120 (4):1-11. <http://www.jci.org>.
- Middleton Jr E. *The flavonoids*. TIPS (Agustus), Amsterdam: Elviesier Science Publishers BV, 1984; 335-338.
- Dale JW and Park SF, *Molecular Genetics of Bacteria*, 5<sup>th</sup> Ed., John Wiley and Sons Ltd, 2010; 21.
- LeBlond CP, Steinberger E & Roosen-Runge EC. Mechanisms Concerned with Conception. In: *Spermatogenesis*. Editor: Hartman CG, New York, Macmillan Co. 1963; 1-72.
- Roosen-Runge EC., *The process of spermatogenesis in mammals*, *Biol. Rev.*, 1962; 31: 343-77.
- Carlson BM. *Human Embryology and Developmental Biology*. Missouri, Mosby-Year Book Inc. 1994; 3-32.
- Chelly J and Kahn A. RT-PCR and mRNA Quantitation. In: *Polymerase Chain Reaction*. Editor: Mullis KB, Ferre F and Gibbs RA, Boston, Birkhauser, 1994; 97-109.
- Chelly J, Kaplan J-C, Maire P, Gautron S, Kahn A. Transcription of the dystropin gene in human muscle and non-muscle tissues. *Nature* (London), 1988; 333: 858-860.
- Rappolee DA, Mark D, Banda MJ, Werb Z. Wound macrophages express TGF- $\alpha$  and others growth factors in vivo: analysis by mRNA phenotyping. *Science*, 1988; 241:708-712.
- Richards JE and Hawley RS, *The Human Genome: A User's Guide*, 3<sup>rd</sup> Ed., Elsevier Inc. 2011; 95.
- Becker-Andre M, Hahlbrock K. Absolute mRNA quantification using the polymerase chain reaction (PCR). A novel approach by a PCR aided transcript titration assay (PATTY). *Nucl Acids Res*, 1989; 17: 9437-9446.
- Chelly J, Montarras D, Pinset C, Berwald-Netter Y, Kaplan J-C and Kahn A. Quantitative estimation of minor mRNAs by cDNA-polymerase chain reaction. Application to dystropin mRNA in cultures myogenic and brain cells. *Eur J Biochem*, 1990; 187: 691-698.
- Gilliland G, Perrin S, Blanchard K, Bunn FF. Analysis of cytokins mRNA and DNA: detection and quantitation by competitive polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990; 87: 2725-2729.
- Rappolee DA, Wang A, Mark D, Werb Z. Novel method for studying mRNA phenotypes in single or small numbers of cells. *J Cell Biochem*, 1989; 39: 1-11.
- Singer-Sam J, Robinson MO, Bellve A, Simon M, Riggs A. Measurement by quantitative PCR of changes in HPRT, PGK-1, PGK-2, APRT, Mtase and Zfy gene transcripts during spermatogenesis. *Nucl Acids Res*, 1990; 18: 1255-1259.
- Wang AM, Doyle MV, Mark DE. Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989; 86: 9717-9721.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning a Laboratory Manual*. 2<sup>nd</sup> Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; 719-722.
- Kimball JW. *Nucleotide, The Double Helix, Base Pairing, The Genetic Code, Gene Expression: Transcription, Gene Translation: RNA  $\rightarrow$  Protein, Retrovirus, The PCR, DNA sequencing*. In: *Biology*. H<http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages> (accessed 30 Maret 2012).
- Brown TA. *Genomes*. Oxford, BIOS Scientific Publishers Ltd, 1999; 3-12 dan 86-110.