

280
FAR

LAPORAN

EFEK ANTI-FERTILITAS EKSTRAK FRAKSI RIMPANG
COSTUS SPECIOSUS J. SM. PADA TIKUS BETINA

DIP

1994/1995

PUSAT PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN FARMASI
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN
DEPARTEMEN KESEHATAN RI

LAPORAN

EFEK ANTI-FERTILITAS EKSTRAK FRAKSI RIMPANG
COSTUS SPECIOSUS J. SM. PADA TIKUS BETINA

DIP

1994/1995

PUSAT PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN FARMASI
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN
DEPARTEMEN KESEHATAN RI

**EFEK ANTI-FERTILITAS EKSTRAK DAN FRAKSI RIMPANG *Costus speciosus*
J.Sm. PADA TIKUS BETINA**

Lukman Hakim^{*}, C.J.Soegihardjo^{*}, Imono Argo Donatus^{*}, Sa'roni⁺,
Moch.Noerhadi⁺, Yun Astuti⁺, S.T.Megawati Siregar⁺, Sudjaswadi
Wirjowidagdo⁺

* Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta 55281.

+ Pusat Penelitian dan Pengembangan Farmasi, Badan Penelitian
dan Pengembangan Kesehatan, Departemen Kesehatan,
Republik Indonesia

PRAKATA

Pengendalian jumlah penduduk melalui gerakan keluarga berencana merupakan prioritas dalam kebijaksanaan pembangunan. Salah satu upaya yang ditempuh dalam program pembatasan kelahiran tersebut ialah dengan penggunaan alat kontrasepsi.

Alat kontrasepsi yang berasal dari bahan-bahan alam sebenarnya sudah biasa digunakan oleh nenek moyang kita, namun hal ini cukup mendapat perhatian untuk dikembangkan secara ilmiah sehingga dapat diterima penggunaannya oleh masyarakat moderen.

Dalam kaitan inilah penelitian ini dilakukan, dalam rangka menyingkapkan bahan aktif yang terkandung di dalam tanaman pacing (*Costus speciosus* J.Sm.).

Akhirnya para peneliti mengucapkan terima kasih kepada Pemimpin Bagian Proyek Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, dan Kepala Pusat Penelitian dan Pengembangan Farmasi yang telah membeayai penelitian ini melalui dana DIP 1993/1994.

Semoga hasil penelitian ini bermanfaat bagi dunia farmasi dan kesehatan.

Peneliti.

DAFTAR ISI

Judul	i
Prakata	ii
Daftar isi	iii
I. Pendahuluan	1
A. Latar belakang	1
B. Tujuan penelitian	2
II. Tinjauan pustaka	3
A. <i>Costus speciosus</i>	3
B. Perkembangan sistem reproduksi tikus betina	5
III. Cara penelitian	8
A. Bahan dan alat	8
B. Pembuatan sediaan	8
C. Preparasi hewan percobaan	10
D. Pemberian ekstrak dan autopsi	11
E. Fiksasi organ	12
F. Kriteria pengambilan keputusan	12
G. Pemeriksaan KLT	13
IV. Hasil penelitian dan pembahasan	14
V. Kesimpulan dan saran	23
Daftar pustaka	24

I. PENDAHULUAN

A. Latar belakang

Dalam PJPT II pengendalian jumlah penduduk melalui gerakan keluarga berencana masih merupakan prioritas dalam kebijaksanaan pembangunan. Salah satu upaya yang selama ini ditempuh dalam program pembatasan kelahiran tersebut ialah dengan penggunaan alat kontrasepsi, diantaranya pil kontrasepsi (Anonim,1990).

Seperti diketahui, pil kontrasepsi mengandung senyawa kimia hormonal (estrogen dan progesteron) dari hasil sintesis. Walaupun paling efektif dalam mencegah ovulasi (kehamilan), namun pil kontrasepsi memiliki efek samping yang berat, misalnya kanker payudara atau uterus, diabetes, hipertensi, osteoporosis, dan toksik embrio (Carey,1978; Tuchmann-Duplessis,1975). Selanjutnya estrogen dalam pil dapat dikurangi (dan bahkan dihilangkan) efektivitasnya karena pengaruh obat lain (misalnya rifampisin, garam Mg, induktor enzim) sehingga cenderung terjadi risiko kehamilan (Hansten,1973; Pond,1984).

Karena keburukan sifat estrogen (etinil estradiol) inilah, maka perlu dicari senyawa anti-fertilitas lain yang lebih aman dan efektif, misalnya yang berasal dari bahan alam, salah satunya ialah tanaman *Costus speciosus* J.Sm. Kurniawati (1990) telah membuktikan dengan teknik ovariektomi bahwa sari kering *C. speciosus* memiliki aktivitas estrogenik pada tikus betina, hal mana merupakan indikasi adanya sifat anti-fertilitas. Namun teknik ovariektomi tersebut tidak bersifat alami, sehingga harus dibuktikan lebih lanjut dengan teknik *mating* (tikus betina yang telah dibuntingi diberi ekstrak dan fraksi ekstrak), apakah sari *C.speciosus* benar-benar berpengaruh sebagai anti-fertilitas pada hewan utuh (tanpa diambil ovariumnya).

B. Tujuan penelitian

1. Tujuan umum

Mencari senyawa baru yang berkhasiat anti-fertilitas yang lebih efektif dan aman dibandingkan dengan estrogen dan progestin sintetik.

2. Tujuan khusus

Membuktikan secara alami efek anti-fertilitas ekstrak dan fraksi ekstrak rimpang *Costus speciosus* pada tikus betina tanpa dihilangkan ovariumnya (ovariektomi) menggunakan teknik *mating*, yaitu mengawinkan tikus betina yang telah diberi ekstrak atau fraksi rimpang *Costus speciosus* dengan tikus jantan.

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. *Costus speciosus*

1. Pemerian

Nama tanaman *Costus speciosus* J.Sm. di Indonesia bermacam-macam. Di Sumatera disebut tabar-tabar, galoba utan, kelacin, sitawar, setawar, tawar-tawar, tawa-tawa, atau tubu-tubu, sedangkan di Jawa bernama pacing, pacing tawar, topung tawar, poncang-pancing, atau bunto. Tanaman ini di Sulawesi dinamai lingkuas, lincuas, pola ibatang, tampung tawara, tepu tawara, atau tepu tepung, sedangkan di Maluku muri-muri, tabe pusa, tehu lopu, atau uga-uga (Anonim,1985).

Adapun klasifikasi pacing ialah (Heyne,1950; Steenis,1972):

Divisi : Spermatophyta
Sub-divisi: Angiospermae
Kelas : Monocotyledoneae
Bangsa : Zingiberales
Suku : Zingiberaceae
Marga : *Costus*
Spesies : *Costus speciosus*

Pacing adalah herba dengan tinggi 0,5-3 m, tangkai daun maksimal 1,5 cm, helaian daun memanjang berbentuk lonset, ujung meruncing, dan bagian bawah daun berambut seperti beledu. Tanaman ini berbunga duduk, berbentuk bulir termi-

nal rapat, dan berwarna putih merah muda. Kelopak tidak rontok serupa tulang. Panjang tabung mahkota sekitar 1 cm, lebar 0,5 cm, dan berbentuk corong; bibir bergaris tengah kuning, pada pangkal berbentuk buluh, panjangnya 4-15,5 cm. Buah kotak berbentuk telur, berwarna merah, tinggi 1,5-3 cm. Tanaman ini tumbuh pada tempat lembab dan teduh (Steenis,1972).

2. Manfaat dalam kefarmasian

Pacing, selain merupakan tanaman hias, dikenal sebagai tanaman obat. Akarnya untuk obat sifilis atau luka gigitan ular, batang daun muda untuk penyubur rambut, dan getahnya sebagai obat disentri dan cacar (Atjung,1985). Rimpangnya untuk obat diare, batuk, atau untuk mengeluarkan keringat, penyakit mata (di Jawa), atau kusta, atau untuk lulur ketika mandi (di Malaysia) (Perry & Metzger, 1980).

Kurniawati (1990) sebelumnya telah membuktikan bahwa dengan teknik ovariektomi, ekstrak kering (alkohol 70%, dan hasil hidrolisisnya) rimpang pacing memiliki efek anti-fertilitas yang bersifat estrogenik. Ekstrak tersebut dapat meningkatkan berat uterus sebesar 48-55% dari kontrol, dengan dosis 35,7-1785 mg/kg per oral, sedangkan hasil hidrolisis ekstrak tersebut dapat menaikkan berat uterus 70% menggunakan dosis 1785 mg/kg. Hasil skrining fitokimia menunjukkan bahwa kemungkinan rimpang pacing mengandung setidaknya empat senyawa steroid (salah satunya diosgenin), tiga senyawa fenol, 6 senyawa flavonoid, empat senyawa tanin, dan minyak atsiri.

Namun seperti yang telah dikemukakan, teknik ovariektomi tersebut tidak bersifat alami, sehingga harus dibuktikan lebih lanjut dengan teknik *mating*, apakah sari *C.speciosus* benar-benar berpengaruh sebagai anti-fertilitas pada hewan utuh (tanpa diambil ovariumnya).

B. Perkembangan sistem reproduksi tikus betina

Alat reproduksi betina dapat dibagi menjadi dua bagian yaitu alat kelamin luar dan dalam. Alat kelamin luar terdiri dari tundun (*mons veneris*), bibir besar dan kecil (*labia mayora dan minora*), kelentit (*clitoris*), dan pukas (*vulva*). Alat kelamin dalam terdiri dari liang sanggama (*vagina*), rahim (*uterus*), saluran telur (*tuba Fallopi*), dan indung telur (*ovarium*).

1. Vagina

Vagina merupakan saluran terdepan sistem reproduksi betina, terletak antara alat kelamin luar dan serviks. Dindingnya terdiri dari 3 lapis, yakni mukosa, otot polos, dan jaringan ikat. Lapisan mukosa terdiri dari epitel dan lamina propria. Lapisan epitel pada primata dalam keadaan normal tidak menanduk, tetapi menanduk pada rodentia (biasanya dijumpai pada usap vagina; Yatim, 1982).

Lamina propria kaya akan pembuluh darah, dan ketika terjadi rangsangan sewaktu koitus merupakan sumber cairan yang membasahi vagina. Lapisan otot polos terdiri dari berkas yang melingkar dan memanjang, dan di dekat lubang luar ada sedikit otot lurik berupa cincin. Lapisan jaringan ikat banyak mengandung pembuluh darah vena, berkas urat syaraf dan sedikit sel syaraf.

2. Uterus.

Organ ini bertugas menerima ovum selama ovulasi, dan jika terjadi pembuahan menjadi tempat pertumbuhan janin. Uterus dibedakan menjadi tiga bagian :

fundus (tempat bermuaran tuba), corpus (bagian atas), serviks (bagian bawah). Dinding uterus terdiri dari tiga lapis, yaitu endometrium (lapisan mukosa), miometrium (lapisan otot polos), dan serosa.

Endometrium berfungsi menyiapkan dan ikut aktif dalam proses nidasi (implantasi) serta ikut membina plasenta dari induk. Setelah ovulasi di ovarium, endometrium tumbuh pesat dan menjadi tebal untuk keperluan nidasi serta pembentukan plasenta jika terjadi pembuahan. Jika tidak terjadi pembuahan, endometrium yang tebal tadi terkelupas pada saat menstruasi, akhirnya menjadi tipis kembali.

Miometrium sebagian besar mengisi tebal dinding uterus, menyebabkan uterus berkontraksi. Fungsi kontraksi otot ini ialah untuk mengisap spermatozoa sewaktu koitus, melancarkan aliran spermatozoa, dan untuk meluruhkan janin, plasenta atau endometrium sewaktu melahirkan atau menstruasi.

Sistem reproduksi tikus atau mencit berkembang pesat pada usia dewasa, yaitu antara usia 40-60 hari (English,1980). Pada hewan ini terdapat daur estrus (siklus menstruasi pada manusia), yang terdiri dari 4 stadia : (Lee,1985)

1. Stadium estrus

Pada stadium ini betina siap menerima jantan, ditandai dengan gairah yang nyata, dan labia mayora atau liang vagina berlendir. Sel-sel epitel vagina mengalami penebalan, tanpa inti, mengkerut atau cenderung terlipat dan tidak seragam. Pada akhir stadium ini sel epitel *cornified*.

2. Stadium matestrus

Stadium ini terjadi setelah ovulasi, dimana korpus lutea terbentuk dan berfungsi menghasilkan hormon dalam waktu pendek (sesuai dengan masa matestrus

yang pendek) yaitu 6 jam sampai dengan 1 hari.

3. Stadium diestrus

Pada stadium ini alat reproduksi inaktif, dimana folikel dan uterus mengecil, epitel vagina menipis, dan selnya terdapat leukosit (berbentuk seperti pasir).

4. Stadium proestrus

Perkembangan uterus dan vagina mulai terjadi lagi pada stadium ini; sel epitel skuamosa besar dan berinti berbentuk bulat.

III. CARA PENELITIAN

A. Bahan dan alat

1. Bahan

Rimpang *Costus speciosus* berasal dari daerah Sleman (Daerah Istimewa Yogyakarta) dan Hortus Medicus (Tawangmangu), tikus betina dewasa perawan dan tikus jantan dewasa (keduanya galur Sprague-Dawley), etanol, metanol, aseton, heksan, etil asetat, eter, polivinil pirolidon (PVP berat molekul 25.000 (Merck, Darmstadt), akuabides (Lab. Farmakologi & Toksikologi, Fakultas Farmasi UGM).

2. Alat

Intubator oral, alat-alat bedah, sangkar metabolik, rotavapor, penangas air, panci infus, kipas angin, alat-alat gelas, perangkat kromatografi lapis tipis (Alufoil GF-254; Merck, Darmstadt), lampu ultraviolet, neraca analitik (Chyo Jupiter, Tokyo),

B. Pembuatan sediaan

1. Pembuatan ekstrak air 20%

Serbuk rimpang *Costus speciosus* yang telah diayak halus (20 g) dimasukkan ke dalam air mendidih (120 ml), kemudian direbus selama 15 menit sambil diaduk-

aduk dan diperoleh massa seperti bubur. Setelah massa mendingin, diserkai dengan kain katun sampai diperoleh volume 100 ml.

2. Pembuatan ekstrak etanol

Kepada serbuk rimpang *Costus speciosus* yang telah diayak halus (80 g) dimaserasi di dalam etanol 70% (400 ml) selama 24 jam di tempat gelap. Setelah aliquot disaring, massa padat dimaserasi sekali lagi dengan cara di atas. Aliquot dikumpulkan, dan dipekatkan menggunakan rotavapor pada tekanan rendah dan suhu sekitar 50°C, sampai tidak ada cairan yang menetes. Kemudian ekstrak yang berada di dalam labu dipindah ke cawan porselin, dan dipanasi (50-60°C) di atas penangas air sambil diaerasi (dengan kipas angin), sampai diperoleh massa pekat. Dengan cara ini didapat rendemen sebesar 3,32 g.

3. Preparasi sediaan per oral

Ekstrak etanol (3,32 g) ditambah 500 mg polivinil pirolidon (berat molekul 25000), digerus sampai homogen di dalam mortir. Massa ini dilarutkan dalam air sedikit demi sedikit sampai volume 33.2 ml sambil diaduk-aduk sehingga diperoleh kadar 10% ekstrak.

4. Penyimpanan sediaan

Jika sedang tidak digunakan, ekstrak air disimpan di dalam almari es (4°C).

C. Preparasi hewan percobaan (Lee, 1985)

1. Pemilihan hewan percobaan betina dan jantan

Dipilih hewan betina dewasa galur Sprague-Dawley yang masih perawan, dengan siklus estrus teratur (dengan pemeriksaan *vaginal smear* setiap hari setidaknya selama 2-kali siklus estrus, atau 10 hari berturut-turut), dan hewan diberi makanan cukup. Tikus betina yang tidak kawin selama 2-kali siklus tidak digunakan dalam penelitian.

Tikus pejantan dewasa dari galur yang sama dipilih yang subur, atau yang telah terbukti mampu membuntingi betina. Seekor pejantan hanya digunakan sekali dalam tiap percobaan, dikawinkan dengan seekor atau maksimum dua ekor betina.

2. Pengawinan tikus

Jika didapatkan tikus betina dalam keadaan proestrus di pagi hari, yakni ditandai dengan adanya sel epitel bernukleus pada uji mikroskopik lendir vagina (perbesaran 100-kali), atau vagina telah membuka, maka pada sore harinya (antara pukul 16.00-18.00) tikus betina dikawinkan dengan pejantan, dan dibiarkan sekan-dang satu malam.

Jika di pagi harinya, pada pemeriksaan mikroskopik terhadap lendir vagina didapatkan sperma, atau pada pintu vagina terdapat *plug* putih, maka hari itu dianggap sebagai hari pertama kebuntingan (H-1). Setelah kopulasi, pejantan dipisah dari hewan betina.

D. Pemberian ekstrak dan autopsi

Dalam tiap kelompok terdapat 8-14 tikus betina yang telah dikawinkan. Ekstrak cair diberikan tiap hari (sehari sekali) per oral kepada hewan betina tersebut mulai dari H-1 sampai hari kesepuluh kebuntingan (H-10). Volume cairan yang diberikan ialah 10 ml/kg berat badan.

1. Kelompok kontrol

Hewan kontrol mendapat cairan vehikel (tanpa obat) pada H-1 sampai H-10 dan hewan diautopsi pada H-16 kebuntingan.

2. Kelompok perlakuan 1

Dosis ekstrak air yang diberikan kepada tikus betina yang telah dikawinkan (ekivalen dengan 2 g serbuk/kg berat badan) pada H-1 sampai H-10 dan hewan diautopsi pada H-16 kebuntingan.

3. Kelompok perlakuan 2

Ekstrak alkoholik ekivalen dengan 24 g serbuk/kg berat badan diberikan kepada tikus pada H-1 sampai H-10 dan hewan diautopsi pada H-16 kebuntingan.

Sebelum hewan diautopsi, ditimbang berat badannya. Autopsi hewan dilakukan dengan membuka bagian perut dengan arah melintang sewaktu hewan dibius ringan dengan eter (sekitar 4 menit di dalam ruang tertutup), atau dengan dislokasi servikal. Setelah uterus diangkat, dihitung jumlah korpus lutea pada ovarium kiri

dan kanan (sebagai tolok ukur jumlah ova yang dikeluarkan oleh ovarium), jumlah fetus baik yang hidup atau mati, normal atau cacat (setelah dipisahkan dari plasenta), jumlah resorpsi, dan jumlah tempat implantasi (Odenbro & Kihlstrom,1977; Lee,1985).

E. Fiksasi organ

Sebelum ditimbang, tiap-tiap fetus difiksasi dengan mence- lupkannya di dalam larutan asam setat + etanol absolut (1 + 3) selama 1 jam (Joneja,1976). Penimbangan fetus dilakukan setelah solven menguap. Organ-organ dari hewan induk (hepar, ginjal, dan uterus) diambil dan diawetkan di dalam formalin 10% yang didapar pada pH 7,4 untuk pemeriksaan mikroskopis (Brown dkk,1976).

F. Kriteria pengambilan keputusan

Untuk menjaga kebermaknaan statistik pada tingkat $p < 0,05$ antara hewan kontrol dengan hewan bunting karena pemberian sediaan uji, digunakan beberapa kriteria berikut (Lee,1985) :

1. Jika kelompok kontrol mempunyai angka kebuntingan 100%, kelompok perlakuan dianggap positif (berkhasiat antifertilitas) jika hewan yang bunting kurang dari atau sama dengan 60%. Namun jika angka kebuntingan kelompok kontrol 90%, maka yang dianggap positif jika kebuntingan pada kelompok perlakuan sebesar 50% atau kurang. Jika angka kebuntingan 80% pada kelompok kontrol, maka jumlah hewan per kelompok harus dinaikkan menjadi 16 ekor, dan percobaan harus diulangi terutama untuk kelompok perlakuan yang hasilnya meragukan.

Peringkat	Efek Anti-fertilitas		
	Aktif	Moderat	Inaktif
A (jumlah hewan bunting/ jumlah hewan)	bunting = < 60%	bunting 70%	bunting > = 70%
B (jumlah tempat implantasi)	berkurang > = 60%	berkurang 40%	berkurang < 40%
C (jumlah fetus)	normal = < 20%	normal 40%	normal > 40%
D (jumlah korpora lutea)	berkurang > = 60%	berkurang 40%	berkurang < 40%

2. Selanjutnya hasil percobaan dibuat peringkat-peringkat menurut prioritas, yaitu peringkat A, B, C, dan D. Peringkat A merupakan peringkat yang paling menentukan, sedangkan C paling rendah. Peringkat B, C, dan D berlaku untuk hewan yang tetap bunting setelah diberi sediaan uji.

G. Pemeriksaan kromatografi lapis tipis

Untuk keperluan fraksinasi ekstrak alkoholik, dalam studi pendahuluan serbuk pacing (5 g) disari dengan etanol 70% (50 ml) sampai diperoleh cairan tidak berwarna. Kemudian ekstrak ini disari dengan heksan. Setelah fraksi etanol dan heksan masing-masing dikentalkan, masing-masing ditotolkan ke atas lempeng kromatografi lapis tipis (KLT) Al-foil GF-254.

Fraksi etanol dan fraksi heksan (hasil penyarian ekstrak etanol dengan heksan; Singh dkk, 1985) dipisahkan fase gerak etil asetat + eter (4 + 1), dan bercak dilihat dibawah sinar ultraviolet pada 254 dan 360 nm.

IV. HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Seperti yang telah disebutkan dimuka, Kurniawati (1990) telah membuktikan dengan teknik ovariektomi bahwa sari kering *Costus speciosus* memiliki aktivitas estrogenik pada tikus betina, hal mana merupakan indikasi adanya sifat anti-fertilitas. Namun teknik ovariektomi tersebut tidak bersifat alami, sehingga harus dibuktikan lebih lanjut dengan teknik *mating* (mengawinkan tikus betina yang telah diberi sediaan uji dengan tikus jantan), apakah sari *Costus speciosus* benar-benar berpengaruh sebagai anti-fertilitas pada hewan utuh (tanpa ovariektomi).

Perlu dicatat bahwa metode yang diadopsi di dalam penelitian ini adalah metode Lee (1985), dimana pengertian anti-fertilitas disini ialah pencegahan melekatnya ova yang telah dibuahi ke dinding uterus (anti-implantasi). Metode anti-implantasi ini juga digunakan oleh Singh dkk (1985) dan Wadhwa dkk (1986) untuk skrining tanaman yang berkhasiat anti-fertilitas karena eksekusinya relatif cepat. Bedanya ialah bahwa metode Lee memberikan sediaan uji selama 10 hari, yaitu ketika saat implantasi dan organogenesis awal sudah terjadi, sedangkan dalam metode Singh dan Wadhwa sediaan uji diberikan selama 6 hari, yaitu sampai terjadinya implantasi.

Untuk membuktikan bahwa ekstrak atau fraksinya berkhasiat anti-fertilitas, maka dilakukan percobaan kontrol, hal mana sekelompok hewan uji (tikus betina yang telah dikawinkan dengan pejantan) hanya mendapat cairan tanpa ekstrak, dan hasilnya akan digunakan sebagai pembanding kelompok-kelompok hewan lainnya yang telah diberi ekstrak atau fraksi (sediaan uji) (Tabel 1).

Tabel 1 . Berat badan, jumlah korpus lutea, tempat implantasi, dan jumlah fetus setelah tikus Sprague-Dawley betina bunting diberi cairan vehikel (10 ml/kg) per oral setiap hari selama 10 hari (kontrol); pemeriksaan pada hari ke-16 kebuntingan*

BB-1	BB-16	KL	IMPL	Fetus		
				Resorpsi	Jumlah	Berat badan ⁺
242	260	11	13	2	11	280,18
184	198	11	10	2	8	331,63
189	222	9	9	0	9	172,11
188	220	9	9	0	9	267,78
188	221	12	12	1	11	254,55
176	217	10	9	1	8	270,00
175	220	11	11	0	11	545,45
179	190	9	9	0	9	356,51
190	290	12	12	2	10	345,50
175	191	8	8	0	8	377,00
190	221	10	8	0	8	408,46
130	146	7	7	1	6	104,95
185	224	11	11	0	11	122,95
250	335	14	14	0	14	118,68
Mean	10,29	10,14	0,64	9,50	328,11	
SD	1,82	2,07	0,84	1,99	98,11	

* BB-1 dan BB-16 = berat badan induk (gram) berturut-turut pada hari ke-1 dan ke-16 kebuntingan; KL = jumlah korpus lutea; IMPL = jumlah tempat implantasi.

+ Berat badan fetus = berat badan rata-rata (dalam mg) fetus dalam satu induk.

Seperti nampak pada tabel 1, jumlah hewan betina yang digunakan untuk percobaan kontrol sebanyak 14 ekor, dengan berat badan awal (H-1) berkisar antara 130 - 250 g. Dari percobaan ini diketahui bahwa tikus betina yang digunakan semuanya menjadi bunting setelah dikawinkan dengan hewan jantan. Hal ini menunjukkan bahwa kondisi hewan yang digunakan, termasuk cara pemeliharaannya, telah memenuhi persyaratan untuk melakukan penelitian selanjutnya.

Jumlah rata-rata korpus lutea yang ditemukan pada kedua ovaria tiap tikus sebanyak $10,29 \pm 1,82$ (berkisar dari 7-14), sedangkan jumlah tempat implantasi rata-rata per tikus $10,14 \pm 2,07$. Jumlah tempat implantasi yang diperoleh dari percobaan ini ternyata mirip dengan perolehan Wadhwa dkk (1986) untuk hewan betina kontrol, yaitu $10,0 \pm 0,6$ ($N=7$), atau sedikit lebih tinggi dibandingkan dengan perolehan Garg (1974) sebesar $8,8 \pm 1,99$ dan Singh dkk (1985) sebesar $9,0 \pm 0,6$. Jumlah fetus yang mengalami resorpsi berkisar dari 0-2, dengan rata-rata per tikus 0,64. Jika angka resorpsi ini dibandingkan dengan jumlah rata-rata fetus yang hidup, maka ternyata fetus yang mengalami resorpsi kurang dari 10%. Angka resorpsi yang rendah ini, karena bersifat alami (Stula & Krauss, 1977), juga merupakan indikasi tingkat fertilitas tikus betina yang digunakan. Jumlah fetus yang hidup berkisar antara 6-14 ekor per induk, atau rata-rata $9,50 \pm 1,99$ ekor, hal mana masih lebih tinggi dari perolehan Garg (1974), yaitu $8,0 \pm 1,4$ ekor. Dari tabel tersebut dapat disimpulkan bahwa hewan betina yang kemungkinan sesuai untuk penelitian anti-fertilitas ialah yang memiliki berat badan lebih dari 150 g.

Setelah dilakukan percobaan kontrol, langkah selanjutnya ialah memberi hewan betina dengan ekstrak air dalam bentuk rebusan 20%. Alasan utama penggunaan rebusan ialah untuk menyesuaikan pemakaian rimpang pacing oleh masyarakat, hal mana serbuk lazimnya diseduh atau direbus dengan air.

Pada penelitian pendahuluan menggunakan 4 ekor tikus yang sudah dikawinkan, dan kepadanya diberikan rebusan 20% selama 6 hari berturut-turut sekali sehari (metode Singh dan Wadhwa), kemudian hewan uji diautopsi pada hari ke-16, ternyata 3 ekor tikus menjadi bunting. Jumlah fetus rata-rata 7 ekor (begitu pula dengan jumlah tempat implantasi) dengan berat rata-rata $336,57 \pm 19,39$ mg (tanpa difiksasi di dalam asam asetat + etanol). Selanjutnya jumlah rata-rata korpus lutea sebanyak $10,5 \pm 2,4$. Karena hasil ini kurang meyakinkan, sebab mirip dengan nilai kontrol (tabel 1), maka pemberian rebusan diperlama menjadi 10

hari berturut-turut sejak dikawinkan (tabel 2).

Dari Tabel 2 nampak bahwa berat badan rata-rata tikus mula-mula (pada H-1) sebesar 195 ± 35 g, dan beratnya naik menjadi 229 ± 30 g pada H-16, yaitu sebelum hewan diautopsi, atau naik 15% dari berat semula. Namun kenaikan berat badan untuk tikus bunting (dengan fetus) sebesar 25%, sedangkan kenaikan berat badan tikus yang tidak bunting hanya 5%.

Tabel 2 . Berat badan, jumlah korpus lutea, tempat implantasi, dan jumlah fetus setelah tikus Sprague-Dawley betina (N= 12) diberi rebusan 20% sekali sehari (10 ml/kg) per oral setiap hari selama 10 hari (perlakuan 1); pemeriksaan pada hari ke-16 setelah dikawinkan*

BB-1	BB-16	KL	IMPL	Fetus		
				Resorpsi	Jumlah	Berat badan ⁺
247	275	10	0	0	0 ^a	-
156	172	13	0	0	0	- ^b
279	c	10	0	0	0	-
258	266	16	3	3	0	-
201	204	10	0	3	0	-
167	220	8	8	1	7	230,71
226	265	10	12	1	11	237,96
178	214	10	10	1	9	218,44
165	230	9	9	0	9	241,78
169	221	12	11	1	10	231,66
183	217	8	8	0	8	220,45
195	235	9	9	1 ^d	8	225,55
195	229	10,4	5,8	1	5,2	229,51 (Mean)
35	30	2,3	4,8	1	4,7	8,64 (SD)

* BB-1 dan BB-16 = berat badan induk (gram) berturut-turut pada hari ke-1 dan ke-16 kebuntingan; KL = jumlah korpus lutea; IMPL = jumlah tempat implantasi.

+ Berat badan fetus = berat badan rata-rata (dalam mg) fetus dalam satu induk.

a. Fetus menyatu seperti bola berisi cairan kental coklat.

b. Uterus menggembung berisi cairan jernih.

c. Hewan mati pada hari ke-15.

d. Satu fetus mengalami lisis, sehingga dianggap resorpsi.

Pada hewan yang tidak bunting, sebenarnya terdapat cukup banyak korpus lutea (berkisar 10-16) yang mengeluarkan ova, namun tidak terjadi implantasi zigot. Hal ini disebabkan karena terjadi resorpsi awal terhadap sel telur yang telah dibuahi, sebesar 4,6. Untuk hewan yang bunting, jumlah korpus lutea, tempat implantasi, dan jumlah fetus masih dalam batas-batas normal (bandingkan dengan tabel 1).

Dari data di atas, menurut kriteria Lee (1985) rebusan 20% dapat dikatakan memberikan efek kontrasepsi sebab hanya 58% diantara jumlah total hewan yang diberi sediaan uji menjadi bunting. Karena nilai ini mendekati nilai ambang kriteria Lee (yaitu 60%; Peringkat A), maka kemungkinan dosis yang diberikan kurang besar. Hal ini diperkuat dengan jumlah implantasi yang mengalami pengurangan sebesar 42% dari normal (Peringkat B). Seperti yang telah dikemukakan, berkurangnya tempat implantasi ini disebabkan karena terjadinya resorpsi awal terhadap zigot, sehingga mengurangi jumlah calon janin di dalam uterus. Di lain pihak, menggunakan kriteria jumlah fetus dan korpora lutea (Peringkat C dan D), pemberian rebusan ini kurang menunjukkan aktivitas anti-fertilitas. Namun hal ini perlu ditegaskan lagi, apakah dengan dosis rebusan (dan bahan aktif) yang lebih besar, efek anti-fertilitas masih konsisten.

Perlu dicatat bahwa dua dari 12 tikus yang diberi rebusan 20% sekali sehari mengalami perdarahan vagina, tetapi ternyata satu diantaranya bunting. Pada tikus ke-1, dimana fetusnya menyatu menjadi satu gumpalan, hal ini merupakan contoh begitu efektifnya kerja rebusan sebagai anti-implantasi. Selanjutnya untuk tikus yang mati pada hari ke-15, setelah diautopsi ternyata tidak terdapat fetus di dalam uterus; namun mengenai sebab-sebab kematiannya belum dapat diterangkan. Dari hasil penelitian ini, mengingat jumlah hewan yang bunting dan tempat implantasi masuk dalam kisaran moderat (atau mendekati efektif) maka dicoba dengan kelompok lain dengan dosis 2-kali sehari (Tabel 3).

Tabel 3 . Berat badan, jumlah korpus lutea, tempat implantasi, dan jumlah fetus setelah tikus Sprague-Dawley betina (N = 8) diberi rebusan 20% 2-kali sehari (10 ml/kg) per oral setiap hari selama 10 hari (perlakuan 2); pemeriksaan pada hari ke-16 setelah dikawinkan*

BB-1	BB-16	KL	IMPL	Fetus		
				Resorpsi	Jumlah	Berat badan ⁺
178	223	9	8	1	7	301,43
166	224	9	7	0	7	359,71
165	212	7	7	2	5	375,40
169	225	8	6	0	6	357,83
190	232	10	10	0	10	358,81
136	165	8	7	0	7	306,12
120	162	6	6	0	6	297,79
139	177	10	9	2	7	378,00
158	203	8,38	7,50	0,63	6,88	341,88
24	29	1,41	1,41	0,92	1,46	34,11

* BB-1 dan BB-16 = berat badan induk (gram) berturut-turut pada hari ke-1 dan ke-16 kebuntingan; KL = jumlah korpus lutea; IMPL = jumlah tempat implantasi.
 + Berat badan fetus = berat badan rata-rata (dalam mg) fetus dalam satu induk.

Dengan pemberian rebusan yang lebih sering (dosis 2-kali sehari) dimaksudkan untuk menjamin ketersediaan zat aktif berada di dalam darah di atas nilai ambang efektivitasnya sebagai anti-fertilitas. Nampak dari Tabel 3 bahwa terdapat peningkatan efek yang terlihat dari pengurangan jumlah rata-rata korpus lutea yang siap fertilisasi (menerima sperma), berkurang dari 10.29 menjadi 8,38, atau terdapat pengurangan produksi korpus sebesar 20% dari kontrol. Jika data ini dibandingkan dengan pemberian rebusan sekali sehari dengan dosis yang sama, ternyata jumlah korpus lutea setelah pemberian dua kali sehari masih lebih rendah (20%).

Hal ini menandakan adanya penekanan pada jumlah sel telur yang siap dibuahi. Namun demikian, dalam hal tempat implantasi nampak ketidak-ajegan dalam jumlah nidasi tersebut; seharusnya dengan pemberian 2-kali sehari (tempat implantasi rata-rata 7,5), jumlah tempat implantasi lebih rendah dari pemberian sekali sehari (tempat implantasi rata-rata 5,8). Mengenai sebab-sebab ketidak-ajegan ini belum dapat dipastikan, apakah hal ini dikarenakan faktor hayati antar-individu, ataukah perbedaan simplisia yang digunakan (sumber, tempat tumbuh, atau varietas).

Tabel 4. Berat badan, jumlah korpus lutea, tempat implantasi, dan jumlah fetus setelah tikus Sprague-Dawley betina (N=7) diberi ekstrak alkoholik sekali sehari (10 ml/kg) per oral setiap hari selama 10 hari (perlakuan 3); pemeriksaan pada hari ke-16 setelah dikawinkan*

BB-1	BB-16	KL	IMPL	Fetus		
				Resorpsi	Jumlah	Berat badan ⁺
122 ^a	205	6	6	0	6	351,88
159 ^a	215	9	9	0	9	267,92
210 ^a	273	9	9	0	9	328,45
209	256	15	15	1	14	298,33
167	230	10	9	0	9	329,65
148	207	8	8	0	8	315,56
160	206	9	9	0	9	341,15
168	227	9,43	9,29	0,14	9,14	318,99
32	27	2,76	2,75	0,38	2,41	28,35

* BB-1 dan BB-16 = berat badan induk (gram) berturut-turut pada hari ke-1 dan ke-16 kebuntingan; KL = jumlah korpus lutea; IMPL = jumlah tempat implantasi.
 + Berat badan fetus = berat badan rata-rata (dalam mg) fetus dalam satu induk.
 a. Menggunakan ekstrak etanol (95%) yang berasal dari bahan dengan sumber yang sama dengan Kurniawati (1990).

Perlakuan 3 (Tabel 4) dikerjakan dengan tujuan untuk menguji apakah ekstrak etanolik mampu bekerja sebagai kontrasepsi (anti-implantasi) pada hewan uji utuh (tanpa ovariektomi; Kurniawati, 1990) yang sehari sebelumnya telah dikawinkan dengan pejantan. Perlu dicatat bahwa bahan rimpang yang digunakan disini berasal dari sumber yang sama dengan bahan yang digunakan Kurniawati, tetapi telah disimpan kurang lebih 4 tahun. Berbeda dengan temuan Kurniawati (1990) ekstrak etanol (70%) yang diperoleh dari simplisia tersebut ternyata kurang larut di dalam etanol, metanol, atau aseton, tetapi bahkan mudah larut dalam air. Ekstrak tersebut diberikan kepada tiga tikus pertama pada Tabel 4.

Hasil penelitian ternyata mirip dengan harga kontrol. Dalam penelitian pendahuluan ini belum dapat dipastikan sebab-sebab ketidak-efektifan fraksi etanolik rimpang pacing. Namun dapat dikemukakan, *pertama*, bahwa teknik eksperimen berbeda; *kedua*, bahwa kemungkinan besar zat aktif sudah mengalami perubahan setelah disimpan 4 tahun; dan *ketiga*, bahwa zat aktif tidak tersari oleh etanol. Untuk memperkuat alasan yang tersebut tera-khir bahwa selama pembuatan rebusan rimpang pacing diperoleh larutan yang kental (banyak mengandung amilum), sehingga diduga zat aktif di dalam rimpang terikat oleh komponen amilum dan sukar disari langsung dengan etanol. Barangkali perlu dicoba cara ekstraksi lain yaitu setelah ikatan tersebut dihidrolisa terlebih dahulu dengan air, baru dilakukan fraksinasi.

Pada pemeriksaan KLT, diperoleh informasi bahwa rimpang pacing banyak mengandung senyawa-senyawa yang berfluoresen. Dalam sari etanol 70%, diperoleh 3 senyawa yang berfluoresen ketika diradiasi pada 360 nm, masing-masing dengan Rf 0 (kuning), 0,92 (biru muda), dan Rf 1,0 (ungu), serta 2 senyawa yang tidak berfluoresen, dengan Rf 0,58 dan 0,79. Di dalam fraksi heksan ternyata didapat senyawa-senyawa berfluoresen tersebut (bersifat non-polar), masing-

masing dengan harga Rf yang sama dengan di atas.

Tujuan semula fraksinasi dengan KLT ialah untuk mendapatkan eluen atau solven yang tepat agar zat aktif anti-fertilitas dapat disari. Namun karena fraksinasi ini dikerjakan sebelum studi in-vivo, maka langkah ini dianggap kurang tepat, sebab ternyata efektivitas sari etanolik rimpang pancing kurang meyakinkan dibanding sari air (rebusan 20%). Oleh karenanya strategi yang lebih tepat ialah setelah dibuktikan ekstrak yang paling efektif, baru dilakukan studi KLT untuk mencari solven untuk penyarian atau fraksinasi. Dalam hal ini yang dimaksud ialah menyari rebusan tersebut dengan berbagai solven yang memiliki polaritas berbeda, kemudian sisa rebusan (setelah penyarian penyarian) dan sari organik itu sendiri diperiksa aktivitasnya secara invivo.

Hasil skrining fitokimia menunjukkan bahwa kemungkinan rimpang pancing mengandung setidaknya empat senyawa steroid (salah satunya diosgenin), tiga senyawa fenol, 6 senyawa flavonoid, empat senyawa tanin, dan minyak atsiri (Kurniawati,1990).

V. KESIMPULAN DAN SARAN

Dari penelitian pendahuluan ini disimpulkan bahwa ekstrak air (berupa rebusan 20% dalam air) rimpang pacing (*Costus speciosus* J. Sm.) ternyata memiliki aktivitas anti-fertilitas pada tikus betina, sedangkan fraksi etanolik tidak berkhasiat anti-fertilitas. Selain itu, nampaknya rimpang pacing yang berasal dari dataran tinggi (Tawangmangu) kurang berkhasiat dibandingkan dengan rimpang yang tumbuh di dataran rendah (Yogyakarta).

Berdasarkan pengalaman yang diperoleh dari studi di atas, disarankan agar fraksinasi dilakukan terhadap rebusan, misalnya dengan penyarian cair-cair secara sekuensial, dimana digunakan solven organik dari yang paling non-polar sampai polar. Sisa rebusan dan tiap-tiap ekstrak organik kemudian diperiksa khasiatnya secara *invivo*. Disamping itu, kadar estrogen (dan progesteron) dari tiap-tiap perlakuan perlu dipantau, untuk mencari korelasi antara fluktuasi kadar hormon dengan ketidaksuburan.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim (1985) Tanaman obat Indonesia, Departemen Kesehatan RI
- Atjung (1985) Tanaman obat dan minuman segar, Yasaguna, Jakarta
- Brown,MH, Szczech,GM, Furlanis,BP (1976) Teratogenic and toxic effects of ochratoxin A in rats. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 37: 331-338
- Carey,HM (1978) Clinical uses of female sex steroids, Butterworths, Sydney
- Farnsworth,NR, Bingel,AS, Cordel,GA, Crane,FA, Song,HHS (1975) Potential value of plants as sources of new antifertility agents. *J. Pharm. Sci.* 64: 535-547, 717-741
- Garg,SK (1974) Effect of Curcuma longa (rhizomes) on fertility in experimental animals. *Planta Med.* 26: 225-227
- Hansten,PD (1973) Drug interactions, 2nd ed, Lea & Febiger, Philadelphia
- Heyne,K (1950) De nuttige planten van Indonesia, Dell I, 3e Druk, NV Uitgeverij, Van Hoeve's Gravenhage
- Inglis,JK (1980) Introduction to laboratory animal science and technology, 4th edn, Pergamon Press, Oxford
- Joneja,MG (1976) A Study of teratological effects of iv, sc, and intragastric administration of tetrahydrocannabinol in mice. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 36: 151-162
- Kurniawati,D (1990) Uji aktivitas estrogenik ekstrak kering dan hasil hidrolisis ekstrak kering rimpang pacing (*Costus speciosus* J.Sm.) pada tikus betina dan skrining fitokimia nya. Skripsi S-1, Fakultas Farmasi UGM, Yogyakarta
- Lee,EB (1985) A Methodologi for female antifertility assay. Dalam Lee,EB & Chi,HJ (ed.) Female antifertility evaluation of natural products, Seoul National University, Seoul
- Odenbro,A & Kihlstrom,JE (1977) Frequency of pregnancy and ova implantation in triethyl lead-treated mice. *Toxicol.Appl. Pharmacol.* 39: 359-363
- Perry,LM & Metzger,J (1980) Medicinal plant of East and South-East Asia, MIT Press, Cambridge, 438-439
- Pond,SM (1984) Pharmacokinetic drug interactions. Dalam LZ Benet, N.Massoud, JG Gambertoglio (eds) Pharmacokinetic basis for drug treatment, Raven Press, New York
- Singh,MM, Gupta,DN, Wadhwa,V, Jain,GK, Khanna,NM, Kamboj,VP (1985) Contraceptive efficacy and hormonal profile of ferujol : a new coumarin from *Ferula jaeschkeana*. *Planta Med.*, 268-270
- Steenis, CGGJ (1975) Flora untuk sekolah di Indonesia, Pradnya Paramita, Jakarta
- Stula,EF & Krauss,WC (1977) Embryotoxicity in rats and rabbits from cutaneous application of amide-type solvents and substituted ureas. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 41: 35-55
- Tuchman-Duplessis,H (1975) Drug effects on the fetus, ADIS Press, New York
- Wadhwa,V, Singh,MM, Gupta,DN, Singh,C, Kamboj,VP (1986) Contraceptive and hormonal properties of *Achyranthes aspera* in rats and hamsters. *Planta Med.*, 231-233
- Yatim,W (1977) Reproduksi dan embriologi, edisi II, Tarsito, Bandung

