

## STUDI EFEKTIVITAS NANOEMULSI EKSTRAK ETANOL PURWOCENG PADA PERBAIKAN FUNGSI REPRODUKSI TIKUS PUTIH JANTAN PASCA INDUKSI *SLEEP DEPRIVATION*

### *Study of the Effectiveness of Purwoceng Ethanol Extract Nanoemulsion on Improvement of the Reproductive Function of Male White Rats Post Sleep Deprivation Induction*

Denok Tri Hardiningsih<sup>1</sup>, Tuti Sri Suhesti<sup>2</sup>, Dody Novrial<sup>3</sup>, Fitranto Arjadi<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Magister Biomedis, Fakultas Kedokteran, Universitas Jenderal Soedirman, Jl. Dr. Gumbreg No. 1 Purwokerto, Indonesia

<sup>2</sup>Departemen Teknologi Farmasetika, Jurusan Farmasi, Fakultas Ilmu-Ilmu Kesehatan, Universitas Jenderal Soedirman, Jl. Dr. Soeparno Kampus Karangwangkal, Purwokerto, Banyumas, Jawa Tengah, 53123, Indonesia

<sup>3</sup>Departemen Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas Jenderal Soedirman, Jl. Dr. Gumbreg No. 1 Purwokerto, Indonesia

<sup>4</sup>Departemen Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas Jenderal Soedirman, Jl. Dr. Gumbreg No. 1 Purwokerto, Indonesia

\*Corresponding author: [fitranto.arjadi@unsoed.ac.id](mailto:fitranto.arjadi@unsoed.ac.id)

#### ABSTRACT

*Paradoxical sleep deprivation (PSD) or sleep disorders can affect sexual function and potentially reduce fertility rates. The active substance of purwoceng (*Pimpinella pruatjan* Molck.), namely flavonoid and tannin compounds can improve the quality of function. Drug nanoemulsion is expected to increase the therapeutic effect and reduce toxicity. This study aims to determine the effect of purwoceng nanoemulsion on serum testosterone levels, testicular volume and testicular histopathology of male wistar rats after stress induction of paradoxical sleep deprivation for 96 hours. This research is an experimental study with a post-test only design with a control group. A total of 24 rats were divided into 6 treatment groups. Group A was given PSD, group B was given PSD and sleep recovery, group C was given PSD and purwoceng extract 25 mg/300 gBW/day, group D was given PSD and purwoceng nanoemulsion 25 mg/300 gBW/day, group E was given PSD and purwoceng nanoemulsion 50 mg/300 gBW/day, and group F was given PSD and purwoceng nanoemulsion 75 mg/300 gBW/day. Serum testosterone levels were measured by the ELISA method, testicular volume and histopathology determined using Image J software and data were analyzed by One Way ANOVA test and followed by Post Hoc Bonferroni test. Statistical analysis showed that there were significant differences in serum testosterone levels, testicular volume and testicular histopathology ( $p < 0.005$ ). Administration of purwoceng nanoemulsion affects serum testosterone levels, testicular volume, and thickness of the seminiferous tubule seminiferous after PSD induction*

**Keywords :** *Purwoceng nanoemulsion, Reproductive function, Sleep deprivation*

#### ABSTRAK

*Paradoxical sleep deprivation (PSD) atau gangguan tidur dapat mempengaruhi fungsi seksual dan berpotensi menurunkan tingkat fertilitas. Zat aktif purwoceng (*Pimpinella pruatjan* Molck.) yaitu senyawa flavonoid dan tanin dapat meningkatkan kualitas fungsi organ reproduksi. Peningkatan teknologi pembuatan sediaan ekstrak menggunakan nanoemulsi diharapkan dapat meningkatkan efek terapi dan mengurangi toksisitas. Penelitian ini bertujuan mengetahui pengaruh nanoemulsi purwoceng terhadap kadar testosteron serum, volume testis dan histopatologi testis tikus putih wistar jantan pasca induksi stres PSD selama 96 jam. Metode penelitian adalah eksperimental dengan desain post-test only with control*

Revised 30-05-2023  
Accepted 21-06-2023  
Published 31-07-2023

group pada 24 ekor tikus yang dibagi menjadi 6 kelompok perlakuan ; Kelompok A (PSD), kelompok B (PSD+sleep recovery), kelompok C (PSD+ekstrak purwoceng 25 mg/300 gBB/hari), kelompok D (PSD+nanoemulsi purwoceng 25 mg/300 gBB/hari), kelompok E (PSD + nanoemulsi purwoceng 50 mg/300 gBB/hari), dan kelompok F (PSD+ nanoemulsi purwoceng 75 mg/300 gBB/hari). Kadar testosteron serum diukur dengan metode ELISA, volume dan histopatologi testis diukur menggunakan *software Image J* dan data dianalisis dengan uji *One Way ANOVA* dan dilanjutkan uji *Post-Hoc Bonferroni*. Uji statistik menunjukkan terdapat perbedaan bermakna pada kadar testosteron serum, volume testis dan histopatologi testis ( $p < 0,005$ ). Pemberian nanoemulsi purwoceng mempengaruhi kadar testosterone serum, volume testis, dan ketebalan epitel tubulus seminiferus pasca induksi PSD.

**Kata kunci:** Fungsi reproduksi, Nanoemulsi purwoceng, *Sleep deprivation*

## PENDAHULUAN

Gangguan tidur ditandai dengan penurunan kualitas dan kuantitas tidur sebagai konsekuensi dari tuntutan pekerjaan, kerja bergilir, dan peningkatan penggunaan perangkat elektronik hingga larut malam (Tobaldini *et al.*, 2019). Studi epidemiologi dan eksperimental telah mengaitkan durasi tidur yang singkat dengan peningkatan risiko mortalitas, disregulasi metabolik & obesitas, penyakit kardiovaskular, gangguan performa *neurobehavioral* dan gangguan psikologis/psikiatri (Grandner *et al.*, 2010) dan mempengaruhi fungsi seksual dan berpotensi menurunkan tingkat fertilitas (Luboshitzky *et al.*, 2002). *Sleep deprivation* meningkatkan glukokortikoid dan menurunkan jumlah antioksidan sehingga menimbulkan stres oksidatif yang mengganggu fungsi fertilitas. *Sleep deprivation* juga meningkatkan kadar melatonin yang dapat berpengaruh terhadap sistem reproduksi karena melatonin bersifat *antigonadal* atau *antigonadotrophic* yang menurunkan sekresi FSH dan LH, testosteron dan mengganggu spermatogenesis (Arjadi *et al.*, 2014).

Purwoceng (*Pimpinella pruatjan* Molk.) merupakan salah satu tanaman obat asli Indonesia secara empiris berkhasiat sebagai afrodisiak (meningkatkan gairah seksual), meningkatkan stamina tubuh dan diteliti mampu meningkatkan kualitas spermatogenesis dalam testis, jumlah spermatozoa, serta motilitas spermatozoa tikus putih. Hal tersebut berkaitan dengan kandungan antioksidan pada akar purwoceng yaitu senyawa flavonoid dan tanin yang dapat menangkap radikal bebas dalam tubuh (Arjadi *et al.*, 2019).

Dalam aplikasi formulasi obat, pengembangan nanopartikel dalam teknologi formulasi obat terfokus pada peningkatan efektivitas penghantaran obat pada jumlah yang tepat dan dalam obat herbal diharapkan dapat meningkatkan efek terapi dan mengurangi toksisitas (Hanutami & Budiman, 2017). Keuntungan nanoemulsi ialah dapat meningkatkan absorpsi, membantu melarutkan obat yang bersifat pemberian obat rute oral, topikal, dan intravena, tidak menimbulkan masalah inheren, kriming, flokulasi, koalesen, dan sedimentasi, memiliki tegangan permukaan yang tinggi, dan energi bebas yang menjadikan nanoemulsi sebagai sistem transport yang efektif, serta membutuhkan jumlah energi yang relatif sedikit (Kumar *et al.*, 2017). Penelitian mengenai efektivitas dan toksisitas ekstrak purwoceng sudah dilakukan, namun penelitian mengenai efektivitas nanoemulsi purwoceng dalam memperbaiki fungsi reproduksi dalam hal ini dilihat dari kadar testosteron, volume testis dan lebar tubulus seminiferus akibat kurang tidur belum pernah dilakukan.

## METODE

Penelitian ini menggunakan metode eksperimental dengan desain *post-test only with control group design*. Persetujuan etik didapatkan dari KEPK Fakultas Kedokteran Universitas Jenderal Soedirman No. 099/KEPK/V2022.

### **Paradoxical Sleep Deprivation (PSD) dan Sleep Recovery (SR)**

Induksi stres model PSD dilakukan selama 5 hari dengan 20 jam *sleep deprivation* pukul 11.00-07.00 WIB dan 4 jam istirahat pukul 07.00-11.00 WIB dengan metode *modified multiple platform method* (MMPM) yaitu menggunakan tangki berisi air berukuran 145 x 145 x 45 cm yang dilengkapi alat *muscle atonia* untuk memberikan efek kejut listrik secara otomatis setiap 10 menit yang membuat tikus selalu terjaga. *Sleep recovery* adalah pemberian tidur tanpa gangguan dengan persediaan makanan dan air yang cukup selama 5 hari pukul 07.00-07.00 WIB (Arjadi *et al.*, 2015).

### **Alat dan Bahan**

Alat yang digunakan untuk membuat nanoemulsi ekstrak etanol purwoceng meliputi peralatan gelas dan non gelas laboratorium, timbangan analitik, ayakan 60 mesh, *dissolution tester*, *homogenizer*, *hotplate stirrer*, *magnetic stirrer*, mesin sentrifuge, pH meter, *powder X-Ray diffraction*, *rotary evaporator*, corong *Buchner*, *Scanning Electron Microscopy*, spektrofotometer UV-Vis, *waterbath*, dan alat *Particle Size Analyzer* (PSA). Bahan yang digunakan meliputi akar purwoceng kering setelah dilakukan determinasi, akuades, HPMC (*Hydroxypropyl Methylcellulose*), larutan etanol 96%, VCO (*Virgin Coconut Oil*), Tween 80, dan PEG 400.

Alat yang digunakan untuk pengukuran kadar testosterone adalah mesin sentrifuge, mikropipet, tabung hematokrit, tabung *vacutainer plain*, *vortex mixer*, dan spektrofotometer UV-Vis. Bahan yang digunakan adalah serum darah tikus putih yang diambil dari sinus orbitalis mata menggunakan pipet hematokrit sebanyak 3 cc dan *working reagent*.

Penelitian menggunakan 24 tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur wistar jantan, berusia 3-4 bulan, dan bobot badan 200-300 g. Hewan coba diaklimatisasi selama 7 hari dan dibagi dalam 6 kelompok perlakuan, meliputi kelompok A (perlakuan PSD), kelompok B (perlakuan PSD dan SR), kelompok C (perlakuan PSD dan ekstrak purwoceng 25 mg/300 gBB/ hari), kelompok D (perlakuan PSD dan nanoemulsi purwoceng 25 mg/300 gBB/ hari), kelompok E (perlakuan PSD dan nanoemulsi Purwoceng 50 mg/300 gBB/ hari) dan kelompok F (perlakuan PSD dan nanoemulsi purwoceng 75 mg/300 gBB/ hari) (Nasihun, 2006).

### **Pembuatan Ekstrak Etanol Purwoceng**

Tanaman purwoceng diperoleh dari Desa Batur, Kecamatan Batur, Kabupaten Banjarnegara sebanyak 2 kg. Sertifikat determinasi tanaman diperoleh dari Laboratorium Taksonomi Tumbuhan, Fakultas Biologi sedangkan proses pengolahan Tanaman dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi, Fakultas Ilmu-ilmu Kesehatan Universitas Jenderal Soedirman. Seluruh bagian tanaman dipisahkan (daun, batang dan akar), dikeringkan menggunakan oven pengering selama 3 hari, digiling menjadi serbuk simplisia. Bagian akar dibuat ekstrak dengan metode maserasi bertingkat menggunakan pelarut etanol 96% hingga diperoleh ekstrak kental.

### **Pembuatan Nanoemulsi Purwoceng**

Pembuatan nanoemulsi diawali dengan melakukan penimbangan bahan formula yaitu 7,5 % b/v ekstrak etanol akar purwoceng sebagai zat aktif, *Virgin Coconut Oil* (VCO) 0,5 % b/v sebagai fase minyak, Tween 80 16% b/v sebagai surfaktan, PEG 400 1% b/v sebagai kosurfaktan dan akuades *ad* 100 ml sebagai fase air. Ekstrak etanol akar purwoceng yang digunakan memiliki konsentrasi 25 mg/3 mL, dicampurkan dengan Tween 80, diaduk menggunakan *magnetic stirrer*

dengan kecepatan 500 rpm selama 15 menit dan ke dalam campuran tersebut ditambahkan PEG 400 + VCO dan diaduk menggunakan *magnetic stirrer* dengan kecepatan 500 rpm selama 15 menit. Akuades sedikit demi sedikit ke dalam campuran sambil diaduk menggunakan *magnetic stirrer* dengan kecepatan 1000 rpm selama 15 menit dan disonikasi pada suhu 25-40°C selama 30 menit (Ariviani W & Sri, 2018).

#### **Uji Tapis dan Karakteristik Larutan Nanoemulsi Purwoceng**

Uji nanoemulsi ekstrak purwoceng meliputi uji tapis fitokimia dan uji karakteristik. Uji tapis fitokimia dilakukan dengan cara 250 mg ekstrak purwoceng ditambahkan dengan 25 mL air mendidih selama 10 menit, disaring dan terbentuk 5 ml filtrat yang selanjutnya ditambahkan serbuk magnesium, amil alkohol dan 2 mL HCl 2 N, dan jika berwarna jingga atau kuning berarti flavonoid positif (+). Dua gram filtrat ditambahkan 5 mL ammonia 25%, lalu digerus dan diberi 25 mL kloroform, diteteskan pada kertas saring, ditambahkan pereaksi Mayer, jika timbul warna merah atau jingga menunjukkan adanya alkaloid. Uji karakteristik meliputi uji zeta potensial, uji indeks polidispersitas dan persentase transmitan. Uji zeta potensial digunakan untuk mengukur keadaan permukaan nanoemulsi dan memprediksi stabilitas nanoemulsi jangka panjang, dengan nilai rentang  $>+30$  mV sampai  $<-30$  mV yang menunjukkan larutan stabil secara elektrostatis. Indeks polidispersitas menunjukkan homogenitas larutan koloidal dan memiliki rentang 0-1, nilai mendekati 0 menunjukkan homogenitas disperse dan nilai  $> 0,5$  berarti tinggi heterogenitasnya. Persentase transmitan (% T) mengukur kejernihan nanoemulsi dengan melihat kejernihan sampel 1 ml ekstrak etanol dengan menggunakan spektrofotometer panjang gelombang 650 nm pada blanko akuades dan nilai persen transmitan yang mendekati 100% berarti ukuran tetapan dispersi yang dihasilkan sudah mencapai ukuran nanometer (Apriliyati *et al.*, 2020).

#### **Cara Pemberian Nanoemulsi Ekstrak Purwoceng**

Larutan nanoemulsi ekstrak purwoceng dimasukkan ke mulut tikus dengan sonde *gavage* 1 kali per hari selama 7 hari sesuai dosis. Penentuan dosis ekstrak purwoceng didasarkan pada penelitian terdahulu yaitu sebesar 25 mg/mL/hari untuk bobot badan tikus sebesar 300 g selama dan menggunakan larutan stok yang mengandung 50 mg/mL ekstrak yang telah dinanoemulsikan sehingga jumlah larutan nanoemulsi yang diberikan ke tikus sebesar 0,5 mL. Penetapan dosis 25 mg/mL/hari untuk bobot 300 gram adalah dosis optimal terendah yang ditetapkan pada kelompok perlakuan pertama (Arjadi *et al.*, 2022). Pemberian ekstrak etanol purwoceng (kelompok C) maupun nanoemulsi ekstrak purwoceng berbagai dosis (kelompok D, E dan F) dilakukan selama 7 hari secara per sonde setelah induksi stres PSD.

#### **Pengukuran Kadar Testosteron Serum**

Alat yang digunakan adalah mesin sentrifuge, mikropipet, tabung hematokrit, tabung *vacutainer plain*, *vortex mixer*, dan spektrofotometer UV-Vis. Bahan yang digunakan adalah serum darah tikus putih yang diambil dari sinus orbitalis mata menggunakan pipet hematokrit sebanyak 3 cc dan *working reagent*. Kadar testosteron serum diukur menggunakan metode ELISA.

#### **Pemeriksaan Volume dan Histopatologi Testis**

Pengambilan spesimen testis pada tikus digunakan untuk pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis testis. Pengambilan sampel dilakukan dengan cara memberikan anestesi (kombinasi *ketaminexylazine* dosis 0,1 mg/200 gBB) dan dieuthanasia melalui emboli pada jantung. Garis median abdominal diinsisi untuk menunjukkan organ reproduksi dan testis ditarik keluar dari skrotum, dibersihkan dari jaringan disekitarnya dan dimasukkan ke dalam pot organ berisi NBF 10% untuk dibuatkan preparat histopatologi. Pengukuran volume testis menggunakan gelas ukur.

Persiapan pemeriksaan histopatologi dilakukan dengan cara ditanam dalam blok parafin, dipotong dengan mikrotom dan dilakukan pewarnaan hematoxilin eosin. Pengamatan histopatologi jaringan testis pada bagian tubulus seminiferus menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 100 kali (10x10) dan 400 kali (10x40) dan difoto dengan kamera mikroskopis digital (Optilab®). Pengukuran ketebalan epitel tubulus seminiferus testis dilakukan pada 15 tubulus seminiferus yang utuh dan bundar secara acak dengan *software Image J* (Munaya *et al.*, 2018).

**Analisis Statistik**

Analisis data meliputi uji univariat terdiri atas *mean* dan standar deviasi data per kelompok, uji normalitas distribusi data menggunakan *Shapiro-Wilk*, uji homogenitas dan varian data menggunakan *Levene's Test*. Analisis bivariat menggunakan uji *One Way ANOVA* dan apabila bermakna dilanjutkan uji *Post-Hoc Bonferroni* untuk menentukan adanya perbedaan yang signifikan antara kelompok.

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

**Uji Tapis dan Karakteristik Larutan Nanoemulsi Purwoceng**

Pengujian nanoemulsi purwoceng meliputi uji tapis fitokimia dan uji karakteristik (uji transmittan, uji zeta potensial dan uji distribusi partikel) dengan sebagai berikut:

Tabel 1. Uji Transmittan, Zeta Potensial dan Distribusi Praktikel Nanoemulsi Purwoceng

Parameter	Replika	Ekstrak	Nanoemulsi
Skrining fitokimia alkaloid			(+)
Skrining fitokimia flavonoid			(+)
Uji persentase transmittan (%T)			84,5
Ukuran partikel (nm)	1	427,7	153,1
	2	427,7	123,2
	3	421,5	95,31
Nilai rerata ± SD		425,63 ± 3,57	123,87 ± 28,90
Indeks polidispersitas	1	0,153	0,29
	2	0,172	0,335
	3	0,14	0,499
Nilai rerata ± SD		0,15 ± 0,01	0,37 ± 0,11
Zeta potensial (mV)	1	-1,08	-17,1
	2	-1,34	-17,4
	3	-1,34	-15,2
Nilai rerata ± SD		-1,25 ± 0,15	-16,56 ± 1,19

Uji tapis fitokimia nanoemulsi purwoceng (tabel 1) menunjukkan kandungan metabolit sekunder yaitu alkaloid dengan dibuktikan adanya endapan putih pada saat ditambahkan dengan reagen Mayer dan flavonoid yang ditandai dengan perubahan warna menjadi kuning jingga saat diberikan 0,1 g dan 5 tetes HCl pekat. Uji transmittan menunjukkan ukuran kejernihan dan kemurnian nanoemulsi yang terbentuk, didapatkan pada angka 84,5% dan Uji transmittan nanoemulsi Purwoceng menunjukkan angka 84,5% yang menunjukkan bahwa jika hasil persen transmittan mendekati persen transmittan air yakni 100%, maka sampel tersebut memiliki kejernihan atau transparansi yang mirip dengan air (Listyorini *et al.*, 2018). Uji distribusi ukuran partikel larutan nanoemulsi purwoceng menunjukkan angka 123,87 nm ± 28,9 yang berarti

distribusi ukuran partikel sudah ideal karena berada pada kisaran 20 – 200 nm, sehingga stabilitas dan persebaran molekul dalam media disolusi termasuk optimal. Hasil dari indeks polidispersitas larutan nanoemulsi purwoceng menunjukkan angka  $0,37 \pm 0,11$  yang menandakan baik karena memiliki nilai di bawah 0,5 (Ariviani & Sri, 2018). Nilai zeta potensial yang mengukur keadaan permukaan nanoemulsi dan memprediksi stabilitas jangka panjang dari nanoemulsi, pada sampel nanoemulsi purwoceng menunjukkan nilai  $-16,56 \pm 1,2$  mV yang berada pada rentang yaitu lebih kecil dari -30 mV dan lebih besar dari +30 mV (Laili *et al.*, 2014) yang menandakan larutan sampel dikatakan stabil secara elektrostatik.

*Sleep deprivation* menyebabkan stres oksidatif pada berbagai organ setelah pembatasan tidur minimal 72 jam (Taha *et al.*, 2018) dan strategi pencegahan dan pengobatan dapat menggunakan obat herbal sebagai alternatif karena mengandung antioksidan alami untuk mengimbangi antioksidan endogen yang tidak mampu menangkal radikal bebas (Zalukhu *et al.*, 2016). Nanoemulsi purwoceng telah dilakukan uji transmitan dan diperoleh hasil 84% memiliki kejernihan atau transparansi yang mirip dengan air karena persentase transmitan mendekati persen transmitan air yakni 100% dan tetesan nanoemulsi telah mencapai ukuran nanometer karena semakin jernih atau semakin besar nilai transmitannya (Listyorini *et al.*, 2018). Uji zeta potensial dan uji ukuran partikel nanoemulsi purwoceng menunjukkan sistem koloid nanoemulsi Purwoceng stabil karena memiliki nilai zeta potensial yang telah sesuai rentang yaitu antara -30 mV sampai + 30 mV, yaitu -16,56 mV (Laili *et al.*, 2014). Indeks polidispersitas menggambarkan distribusi keseragaman globul-globul dalam nanoemulsi dan bernilai baik jika memiliki nilai di bawah 0,5 sedangkan hasil rerata indeks polidispersitas pada sampel nanoemulsi purwoceng di bawah 0,5 ( $PI < 0,37$ ) (Wahyuningsih & Putranti, 2015).

#### **Kadar Testosteron Serum, Volume Testis, dan Histopatologi Testis**

Pada uji *One Way* ANOVA untuk variabel kadar testosteron serum, volume testis dan ketebalan epitel tubulus seminiferus diperoleh nilai  $p=0,000$  ( $p<0,05$ ) sehingga menunjukkan bahwa terdapat pengaruh nanoemulsi purwoceng terhadap kadar testosteron serum, volume testis dan ketebalan epitel tubulus seminiferus tikus putih wistar jantan yang diinduksi stres model PSD. Hasil data penelitian (Tabel 2) untuk melihat pengaruh nanoemulsi purwoceng terhadap kadar testosteron serum tikus putih yang diinduksi stres model PSD menunjukan kelompok A memiliki rata-rata kadar testosteron paling rendah di antara kelompok lainnya. Hal itu disebabkan oleh adanya perlakuan PSD yang sesuai dengan penelitian sebelumnya bahwa PSD menurunkan rerata kadar testosteron serum dibanding model stres lainnya (Arjadi *et al.*, 2014). *Paradoxical sleep deprivation* mempercepat stres oksidatif dengan meningkatkan kadar glukokortikoid, yang memicu peningkatan ROS dan memulai apoptosis sel Leydig yang mengakibatkan penurunan kadar hormon testosteron. Glukokortikoid dapat secara langsung menghambat biosintesis testosteron dengan menekan 11-beta-hidroksisteroid dehidrogenase-1 ( $11\beta$ -HSD1), enzim dalam sel Leydig yang mengontrol konsentrasi glukokortikoid aktif intraseluler, sehingga melindungi sel Leydig dari efek negatif glukokortikoid. Level enzim  $11\beta$ -HSD1 yang menurun meningkatkan kadar glukokortikoid intraseluler, selanjutnya menghambat fungsi steroidogenik intraseluler sel Leydig dengan menekan biosintesis enzim testosteron (Arjadi *et al.*, 2014).

Tabel 2. Rerat Kadar Testosteron Serum, Volume Testis, dan Ketebalan Epitel Tubulus Seminiferus

Parameter	PSD	PSD + <i>sleep recovery</i>	PSD + ekstrak purwoceng 25 mg/300g BB/ hari	PSD + nanoemulsi purwoceng 25 mg/300g BB/ hari	PSD + nanoemulsi purwoceng 50 mg/300g BB/ hari	PSD + nanoemulsi purwoceng 50 mg/300g BB/ hari
	A	B	C	D	E	F
Kadar testosteron serum	0,155±0,021	0,253±0,026	0,329±0,053	0,389±0,045	0,261±0,044	0,253±0,046
Volume testis	1,000±0,100	0,972±0,0984	1,275±0,150	1,450±0,129	1,100±0,100	0,997±0,085
Ketebalan epitel tubulus seminiferus	114,19±11,03	98,49±6,21	128,23±9,19	140,21±5,61	118,47±8,73	104,10±5,19

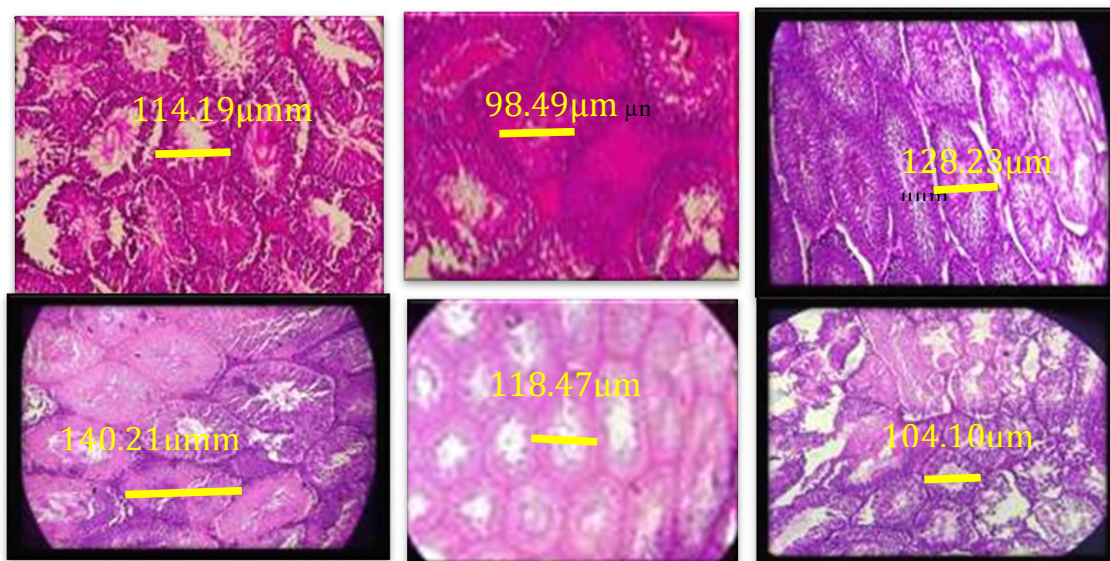
Kelompok B mengalami peningkatan rata-rata kadar testosteron dibanding kelompok A dikarenakan adanya *sleep recovery*, yaitu metode untuk memperbaiki dampak stres oksidatif dari *sleep deprivation* pada hewan coba (El-aziz & Mostafa, 2012). Rerata kadar testosteron serum pada kelompok C lebih meningkat dari kelompok kontrol dan E serta F, tetapi lebih rendah dari kelompok D, yang disebabkan dosis ekstrak 25 mg/ 300 gBB memiliki pengaruh terhadap kadar testosteron tetapi belum mendekati dosis optimal. Kelompok D menunjukkan rerata kadar testosteron tertinggi dibandingkan kelompok lainnya yang disebabkan dosis nanoemulsi purwoceng sudah mencapai dosis optimal. Timbulnya respon obat farmakologis ditentukan oleh konsentrasi obat yang beredar, jumlah reseptor dan afinitas reseptor dalam mengikat obat (Arjadi *et al.*, 2019) Rerata kelompok perlakuan C atau dan kelompok perlakuan ekstrak 25 mg/ 300gBB lebih rendah dibandingkan perlakuan D atau kelompok perlakuan pemberian nanoemulsi purwoceng 25 mg/300 gBB. Pemberian nanoemulsi ekstrak purwoceng dalam dosis rendah atau 25 mg/300 gBB (kelompok D) memiliki pengaruh lebih baik dibandingkan ekstrak etanol purwoceng 25 mg/300 gBB (kelompok C), yang menunjukkan bahwa nanoemulsi adalah salah satu bentuk sediaan yang dapat meningkatkan kelarutan dan penetrasi obat (Ernoviya & Nurpermatasari, 2020). Beberapa kelebihan nanopartikel adalah kemampuan untuk menembus ruang-ruang antar sel yang hanya dapat ditembus oleh ukuran partikel koloidal, kemampuan untuk menembus dinding sel yang lebih tinggi, baik melalui difusi maupun opsonifikasi, dan fleksibilitasnya untuk dikombinasi dengan berbagai teknologi lain (Ernoviya & Nurpermatasari, 2020).

Kelompok perlakuan D atau kelompok perlakuan pemberian nanoemulsi purwoceng 25 mg/300 gBB memiliki nilai rerata volume testis yang lebih besar (1,450±0,129 mm<sup>3</sup>) dibandingkan kelompok perlakuan lainnya menunjukkan bahwa dosis tersebut sudah mencapai dosis optimal untuk meningkatkan volume testis (tabel 1). Pada kelompok pemberian nanoemulsi purwoceng dengan dosis yang lebih tinggi (E dan F) volume testis mengalami penyusutan ukuran yang dapat disebabkan bahwa dosis nanoemulsi purwoceng dosis 50 mg dan 75 mg belum optimal untuk meningkatkan volume testis. Penelitian Nasihun (2009), menyebutkan bahwa pemberian ekstrak Purwaceng dosis 50 mg/hari selama 7 hari belum mampu menimbulkan respon farmakologik yang diduga konsentrasi Purwaceng yang beredar dalam darah masih rendah atau belum mampu mencapai konsentrasi efektif minimal, sehingga belum efektif untuk berikatan ikatan (*coupling*) dengan reseptor sel yang mampu merubah konformasi dan respon farmakologik. Selain itu stres, dalam penelitian karena tidur yang terganggu, dapat menyebabkan



hiperprolaktinemia, penurunan sekresi gonadotropin releasing hormone (GnRH), LH, dan FSH yang berujung ke proses spermatogenesis di testis.

Uji statistik pada kadar testosteron, volume testis dan lebar tubulus seminiferus testis menggunakan uji Levene karena jumlah data <50 dan uji normalitas menggunakan *Saphiro-Wilk*. menunjukkan bahwa seluruh data homogen dan terdistribusi normal ( $p>0,05$ ). Uji *One Way ANOVA* menunjukkan hasil signifikan ( $p=0,000<0,05$ ) sehingga terdapat pengaruh nanoemulsi purwoceng terhadap kadar testosteron serum tikus, volume testis dan lebar tubulus seminiferus testis yang diinduksi PSD. Uji *Post-Hoc* menggunakan uji *Bonferroni* menunjukkan nanoemulsi purwoceng berpengaruh terhadap kadar testosteron, volume testis dan lebar tubulus seminiferus testis tikus jantan yang diinduksi PSD.



Gambar 1. Fotomikrograf Tubulus Seminiferus A (PSD), kelompok B (PSD+SR), kelompok C (PSD+ ekstrak purwoceng 25 mg/300 gBB/hari), D (PSD+nanoemulsi purwoceng 25 mg/300 gBB/hari), E (PSD+nanoemulsi purwoceng 50 mg/300 gBB/hari), kelompok F (PSD+nanoemulsi purwoceng 75 mg/300 gBB/hari) (100X, HE,) Keterangan: garis kuning = rerata ketebalan epitel tubulus seminiferus.

Hasil pengamatan histopatologi menunjukkan bagian adluminal pada kelompok perlakuan pemberian nanoemulsi purwoceng 25 mg/300 gBB, menunjukkan gambaran sel spermatozoa yang lebih banyak pada setiap tubulus seminiferus dibandingkan dengan kelompok perlakuan lainnya. Epitel tubulus seminiferus pada kelompok kontrol lebih intak antar sel spermatogenik maupun antara membran basalis dengan sel spermatogenik. Sel spermatogenik yang tidak intak antarselnya maupun dengan membran basalis menyebabkan hasil pengukuran histomorfometri ketebalan epitel tubulus seminiferus pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan ekstrak 25 mg/300 gBB, kelompok perlakuan pemberian nanoemulsi purwoceng 50 mg/300 gBB dan kelompok perlakuan pemberian nanoemulsi purwoceng 75 mg/300 gBB lebih rendah dibandingkan kelompok perlakuan pemberian nanoemulsi purwoceng 25 mg/300 gBB. Hasil pengukuran rata-rata ketebalan epitel tubulus seminiferus pada kelompok perlakuan berturut-turut adalah sebagai berikut pemberian nanoemulsi purwoceng 25 mg/300 g BB terlihat paling tinggi dibandingkan pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan ekstrak 25 mg/300g BB, kelompok perlakuan nanoemulsi 50 mg/300 g BB, dan kelompok perlakuan pemberian nanoemulsi purwoceng 75 mg/300 g BB. Hal ini menunjukkan bahwa dosis nanoemulsi



purwoceng 25 mg/300 g BB sudah optimal untuk meningkatkan ketebalan tubulus seminiferous dan pemberian dalam bentuk nanoemulsi lebih efektif dibandingkan dengan bentuk ekstrak.

*Paradoxical sleep deprivation* menurunkan hormon gonadotropin sehingga kadar LH dan FSH menurun sehingga kadar testosteron ikut menurun dan terjadi penyusutan volume testis (Arjadi *et al.*, 2014). *Paradoxical sleep deprivation* sebagai stres kronis merubah struktur testis seperti penurunan jumlah dan diameter tubulus seminiferus, serta penurunan jumlah dan ukuran sel leydig dan sel spermatogenik, selain itu menimbulkan penurunan area epitel seminiferus pada tahap I-VIII dari siklus spermatogenik (Rojas *et al.*, 2017). Kandungan yang terdapat pada akar purwoceng yaitu derivat furanokumarin yaitu stigmasterol dan  $\beta$ -sitosterol adalah prekursor hormon testosteron yang dapat dikonversi menjadi testosteron di jaringan perifer (Darwati & Roostika, 2016). Penelitian Taufiqurrahman dan Wibowo (2006), menunjukkan bahwa pemberian dosis 50 mg purwoceng meningkatkan kadar testosteron hingga 125% dan menaikkan hormon luteinizing sampai 29,2%. Peningkatan kadar testosteron ini disebabkan efek stimulasi ekstrak purwoceng terhadap LH dan konversi fitosterol yang ada pada ekstrak purwoceng menjadi testosteron pada jaringan hewan coba. *Euricomalacton* dan *amarolinda* juga merupakan senyawa androgenik yang dapat meningkatkan sensitivitas reseptor GnRH pada hipofisis sehingga mempermudah pelepasan FSH dan LH, sehingga meningkatkan kadar testosteron, jumlah sel Leydig dan memperbaiki fungsi reproduksi (Arjadi *et al.*, 2019). Zat aktif utama akar purwoceng adalah flavonoid berfungsi sebagai antioksidan eksogen yang dapat meningkatkan kadar antioksidan dalam tubuh dan dapat menurunkan *reactive oxygen species*, sehingga mencegah kerusakan jaringan testis. Senyawa golongan flavonoid yang akar Purwaceng diserap oleh tubuh melalui pembuluh darah dan berikatan dengan reseptor estrogen alfa ( $RE\alpha$ ) pada testis dan epididimis dan dapat menggantikan fungsi estrogenik dan bekerja sama dengan testosteron untuk pematangan spermatozoa (Akiles & Inara, 2011).

## KESIMPULAN

Pemberian nanoemulsi purwoceng mempengaruhi kadar testosteron serum, volume testis, dan ketebalan epitel tubulus seminiferus tikus putih wistar jantan pasca induksi *stress model* PSD.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Tim peneliti mengucapkan terima kasih kepada Ketua Lembaga Penelitian dan Pengembangan Universitas Jenderal Soedirman atas dana hibah Penelitian Skema Riset Terapan dengan nomer kontrak T/516/UN23.18/PT.01.03/2021, Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jenderal Soedirman, Kepala Departemen Anatomi, Departemen Farmakologi dan Terapi, dan Departemen Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Jenderal Soedirman, serta Kepala Departemen Teknologi Farmasetika Jurusan Farmasi Fakultas Ilmu-Ilmu Kesehatan Universitas Jenderal Soedirman, para laboran dan semua pihak terlibat dan mendukung pelaksanaan penelitian ini.

## DAFTAR PUSTAKA

- Akiles AJ, I. C. (2011). Potensi rumput Kebar (*Biophytum petersianum klotzsch*) dalam meningkatkan kinerja reproduksi. *Seminar Nasional Pengembangan Pulau-Pulau Kecil*, 329–333.
- Apriliyati, W. W., Vifta, R. L., & Erwiyani, A. R. (2020). Pengaruh Kecepatan dan Lama Pengadukan Nanopartikel Buah Parijoto (*Medinilla speciosa*) Terhadap Ukuran dan Distribusi Partikel, Persen Transmittan, dan Morfologi Partikel. *Laporan Penelitian, Universitas Ngudi Waluyo*. <http://repository2.unw.ac.id/id/eprint/755>
- Ariviani W, W. A., & Sri, R. (2018). Characterization and Digestive Stability Evaluation of  $\beta$ -Carotene Nanoemulsions Prepared by Spontaneous Emulsification Method. *Agritech*, 38(1), 30–38. <https://doi.org/https://doi.org/10.22146/agritech.29087>
- Arjadi, F., Siswandari, W., Wibowo, Y., Krisnansari, D., & Muntafiah, A. (2019). Purwoceng Roots Ethanol Extract Make no Improvement in Leydig Cells Activity to Male White Rats (*Rattus norvegicus*) Exposed by Paradoxical Sleep Deprivation (Psd) Stress Models. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 255(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/255/1/012022>
- Arjadi, Fitranto, Mustofa, M., Wibowo, Y., Gumilas, N. S. A., & Fuadi, D. R. (2022). Combination of Vitamin C and E Improves Spermatogenesis of White Male Rat Model of Paradoxical Sleep Deprivation Stress. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*, 32(1), 8–12. <https://doi.org/DOI:https://doi.org/10.21776/ub.jkb.2022.032.01.2>
- Arjadi, Fitranto, Partadireja, G., Maurits, L. S., & Pangestu, M. (2015). Paradoxical sleep deprivation changes testicular malondialdehyde and caspase-3 expression in male rats. *Universa Medicina*, 34(2), 87. <https://doi.org/10.18051/univmed.2015.v34.87-95>
- Arjadi, Fitranto, Soejono, S. K., & Pangestu, M. (2014). *Paradoxical sleep deprivation decreases serum testosterone and Leydig cells in male rats*. 33(1), 27–35. <https://doi.org/https://doi.org/10.18051/UnivMed.2014.v33.27-35>
- Darwati, I., & Roostika, I. (2016). Status Penelitian Purwoceng (*Pimpinella alpina* Molk.) di Indonesia. *Buletin Plasma Nutfah*, 12(1), 9. <https://doi.org/10.21082/blpn.v12n1.2006.p9-15>
- El-aziz, E. A. A., & Mostafa, D. G. (2012). Impact of Sleep Deprivation and Sleep Recovery on Reproductive Hormones and Testicular Oxidative Stress in Adult Male Rats. *Al Azhar Assiut Medical Journal*, 11(3), 160–188. <http://www.aamj.eg.net/inner/jarticle.aspx?aid=1839>
- Ernoviya, & Nurpermatasari, A. (2020). Formulasi dan Evaluasi Nanoemulsi Ketokonazole (Formulation and Evaluation of Nanoemulsion Ketokonazole). In *Jurnal Dunia Farmasi* (Vol. 4, Issue 3). <https://doi.org/tps://doi.org/10.33085/jdf.v4i3.4698>
- Grandner, M.A., Patel, N.P., Gehrman, P.R., Perlis, M.L., Pack, A. . (2010). Problems Associated with Short Sleep: Bridging the Gap Between Laboratory and Epidemiological Studies. *Sleep Medicine Reviews*, 14(4), 47–239. <https://doi.org/10.1016/j.smr.2009.08.001>
- Hanutami, B., & Budiman, A. (2017). Penggunaan Teknologi Nano Pada Formulasi Obat Herbal. *Farmaka*, 15, 29–39. <https://doi.org/https://doi.org/10.24198/jf.v15i2.12947>
- Kumar, R., Soni, G. C., & Prajapati, S. K. (2017). Formulation development and evaluation of Telmisartan Nanoemulsion. *International Journal of Research and Development in Pharmacy & Life Sciences*, 06(04), 2711–2719. [https://doi.org/DOI:10.21276/IJRDPL.2278-0238.2017.6\(4\).2711-2719](https://doi.org/DOI:10.21276/IJRDPL.2278-0238.2017.6(4).2711-2719)
- Laili, H. , Winarti, L., & Sari, L. O. R. . (2014). Preparasi dan Karakterisasi Nanopartikel Kitosan-Na ringenin dengan Variasi Rasio Massa Kitosan-Natrium Tripolifosfat. *E-Jurnal Pustaka Kesehatan*, 2 (2)(2), 308–313. <https://jurnal.unej.ac.id/index.php/JPK/article/view/1897>
- Listyorini, N. M. D., Wijayanti, N. L. P. D., & Astuti, K. W. (2018). Optimasi Pembuatan Nanoemulsi Virgin Coconut Oil. *Jurnal Kimia*, 8. <https://doi.org/10.24843/jchem.2018.v12.i01.p02>
- Luboshitzky, R., Aviv, A., Hefetz, A., Herer, P., Shen-Orr, Z., Lavie, L. (2002). Decreased Pituitary-Gonadal Secretion in Men with Obstructive Sleep Apnea. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 87(7), 3394–3398. <https://doi.org/DOI:10.1210/jcem.87.7.8663>
- Munaya, N., Brahmadi, A., & Budi Handoyo Sakti, Y. (2018). Efek Stres Puasa terhadap Ketebalan Epitel dan Diameter Tubulus Seminiferus *Rattus norvegicus*. *Mutiara Medika: Jurnal Kedokteran Dan Kesehatan*, 18(1), 1–7. <https://doi.org/10.18196/mm.180107>
- Nasihun T. (2006). Pengaruh Pemberian Ekstrak Purwoceng ( *Pimpinella alpina* Molk ) terhadap Peningkatan Indikator Vitalitas Pria Studi Eksperimental pada Tikus Jantan Sprague Dawley. *Sains Medika*, 1(1), 53–62. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.26532/sainsmed.v1i1.1682>
- Rojas, J., Lizbeth, Fahiel, C., & Socorro, R. M. (2017). Stress and Cell Death in Testicular Cells. *Journal of Antimicrobial Agents*, 06(01). <https://doi.org/10.4172/2167-0250.1000183>
- Taha, M., Rady, H. Y., & Olama, N. K. (2018). Effect of sleep deprivation on the liver, kidney and heart:

- histological and immunohistochemical study. *International Journal of Scientific Reports*, 4(7), 172. <https://doi.org/10.18203/issn.2454-2156.intjsci20182728>
- Tobaldini, E., Fiorelli, E. M., Solbiati, M., Costantino, G., Nobili, L., & Montano, N. (2019). Short sleep duration and cardiometabolic risk: from pathophysiology to clinical evidence. *Nature Reviews Cardiology*, 16(4), 213–224. <https://doi.org/10.1038/s41569-018-0109-6>
- Wahyuningsih, I., & Putranti, W. (2015). Optimasi Perbandingan Tween 80 dan Polietilenglikol 400 Pada Formula Self Nanoemulsifying Drug Delivery System (SNEDDS) Minyak Biji Jinten Hitam. *Pharmacy*, 12(02), 223–241. <http://jurnalnasional.ump.ac.id/index.php/PHARMACY/article/view/333>
- Zalukhu, M. L., Phyma, A. R., & Pinzon, R. T. (2016). Tinjauan Pustaka Proses Menua, Stres Oksidatif, dan Peran Antioksidan. *Cermin Dunia Kedokteran*, 43(10), 733–736. <https://doi.org/http://www.cdkjournal.com/index.php/CDK/article/view/870>.