

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL 96 % BEKATUL BERAS MERAH  
TERHADAP MOTILITAS DAN MORFOLOGI SPERMATOZOA PADA TIKUS  
PUTIH (*Rattus norvegicus*) DEWASA JANTAN GALUR *Sprague dawley* YANG  
DIINDUKSI ASAP ROKOK KRETEK**

(Skripsi)

Oleh  
**LENI AMELIA**



**FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS LAMPUNG  
BANDAR LAMPUNG  
2018**

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL 96% BEKATUL  
BERAS MERAH TERHADAP MOTILITAS DAN MORFOLOGI  
SPERMATOZOA TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*) DEWASA  
JANTAN GALUR *Sprague dawley* YANG DIINDUKSI  
ASAP ROKOK KRETEK**

Oleh  
**LENI AMELIA**

**Skripsi**

**Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Memperoleh Gelar  
SARJANA KEDOKTERAN**

**Pada**

**Fakultas Kedokteran Universitas Lampung**



**FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS LAMPUNG  
BANDAR LAMPUNG  
2018**

## ABSTRACT

THE EFFECT OF 96% ETHANOL EXTRACT OF RED RICE BRAN ON MOTILITY AND MORPHOLOGY SPERM OF MALE RAT (*Rattus norvegicus*) *Sprague dawley* STRAIN INDUCED BY KRETEK CIGARETTE'S SMOKE

By

LENI AMELIA

**Background:** The prevalence of smokers in Indonesia reach 33,4%. Cigarette's smoke is one of free radical that has the oxidative stress effect on the body. Rice bran extract contains antioxidants which have high potential to neutralize free radicals so oxidative stress doesn't occur.

**Methods:** The type of this study is laboratory experimental with complete randomize design. The sample consist of 25 male rats divided into 5 groups, K1 is the negative control which isn't give rice bran and cigarette's smoke in 30 days. K2 is the positive control which is only give cigarette smoke. P1,P2, and P3 have different dossage of rice bran. P1 with 20 mg, P2 with 40 mg, and P3 with 80 mg. Each dossage is dissolved with 0.5 ml of aquades.

**Result:** Analysis is by using *One-Way ANOVA* namely  $p= 0,000$  for sperm motility and morphology. The highest motility were found in K1 followed by P3,P2,P1,K2 while on morphology were found in P3, followed by P2, K1, P1, and K2.

**Conclusion:** There was effect of 96 % ethanol extract of red rice bran on motility and morphology of male rat spermatozoa that induced by kretek cigarette's smoke.

**Keyword:** cigarette's smoke, motility, morphology, rice bran extract.

## ABSTRAK

PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL 96% BEKATUL BERAS MERAH TERHADAP MOTILITAS DAN MORFOLOGI SPERMATOZOA TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*) DEWASA JANTAN GALUR *SPRAGUE DAWLEY* YANG DIINDUKSI ASAP ROKOK KRETEK

Oleh

LENI AMELIA

**Latar Belakang:** Prevalensi perokok di Indonesia mencapai 33,4%. Asap rokok yang dihasilkan merupakan salah satu sumber radikal yang memiliki efek stres oksidatif terhadap tubuh. Ekstrak bekatul mengandung antioksidan yang berpotensi tinggi menangkal radikal bebas sehingga stres oksidatif tidak terjadi.

**Metode:** Jenis penelitian eksperimental laboratorium dengan rancangan acak lengkap. Sampel terdiri dari 25 ekor tikus jantan dibagi menjadi 5 kelompok, yaitu kelompok kontrol negatif (K1) yang tidak diberikan ekstrak bekatul dan asap rokok, kelompok kontrol positif (K2) hanya diberikan asap rokok selama 30 hari. P1, P2, dan P3 diberikan ekstrak bekatul dengan dosis yang berbeda dan asap rokok selama 30 hari. P1 diberikan 20 mg, P2 diberikan 40 mg, dan P3 diberikan 80 mg. Masing-masing dosis dilarutkan dalam 0,5 ml aquades.

**Hasil:** Analisis menggunakan *One-Way ANOVA* menunjukkan 0,000 untuk motilitas dan morfologi spermatozoa. Motilitas tertinggi terdapat pada kelompok kontrol negatif (K1) diikuti oleh P3, P2, P1, kontrol positif (K2) sedangkan pada morfologi terdapat pada kelompok P3, diikuti dengan P2, kontrol negatif (K1), P1, kontrol positif (K2).

**Simpulan:** Terdapat pengaruh pemberian ekstrak etanol 96% bekatul beras merah terhadap motilitas dan morfologi spermatozoa tikus jantan yang dipaparkan asap rokok kretek.

**Kata Kunci:** asap rokok, ekstrak bekatul, motilitas, morfologi.

**Judul Skripsi**

**: PENGARUH PEMBERIAN  
EKSTRAK ETANOL 96% BEKATUL  
BERAS MERAH TERHADAP  
MOTILITAS DAN MORFOLOGI  
SPERMATOZOA TIKUS PUTIH  
(*Rattus norvegicus*) DEWASA  
JANTAN GALUR SPRAGUE  
DAWLEY YANG DIINDUKSI ASAP  
ROKOK KRETEK**

**Nama Mahasiswa**

**: Leni Amelia**

**No. Pokok Mahasiswa**

**: 1418011117**

**Program Studi**

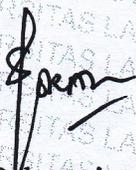
**: Pendidikan Dokter**

**Fakultas**

**: Kedokteran**

**MENYETUJUI**

**Komisi Pembimbing,**



**Soraya Rahmanisa, S. Si, M.Sc**  
**NIP 198504122010122003**



**dr. Syazli Mustofa, S. Ked., M. Biomed**  
**NIP 198307132008121003**

**MENGETAHUI**

**Dekan Fakultas Kedokteran**



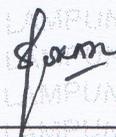
**Dr. dr. Muhartono, S. Ked., M. Kes., Sp. PA**  
**NIP. 197012082001121001**

**MENGESAHKAN**

**1. Tim Penguju**

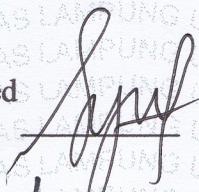
**Ketua**

**: Soraya Rahmanisa, S.Si., M. Sc**



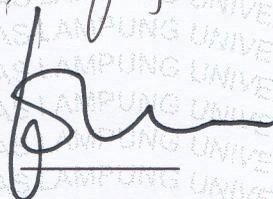
**Sekretaris**

**: dr. Syazili Mustofa, S. Ked., M. Biomed**



**Penguji**

**Bukan Pembimbing : Dr. dr. Asep Sukohar, S. Ked., M. Kes**



**2. Dekan Fakultas Kedokteran**



**Dr. dr. Muhartono, S. Ked., M. Kes., Sp. PA**

**NIP. 19701208 200112 1 001**

**Tanggal Lulus Ujian Skripsi: 25 Januari 2018**

## LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertandatangan dibawah ini:

Nama : Leni Amelia

NPM : 1418011117

Tempat Tanggal Lahir: Gisting, 14 Mei 1996

Alamat : Jl Raya Mincang RT/RW 001/005 Negeri Agung Kec.  
Talang Padang Kab. Tanggamus, Lampung

Dengan ini menyatakan bahwa skripsi dengan judul “Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol 96% Bekatul Beras Merah Terhadap Motilitas dan Morfologi Spermatozoa Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Dewasa Jantan Galur *Sprague dawley* Yang Diinduksi Asap Rokok Kretek” adalah benar hasil karya penulis bukan hasil menjiplak atau hasil karya orang lain. Jika dikemudian hari ternyata ada hal yang melanggar dari ketentuan akademik universitas maka saya bersedia bertanggung jawab dan diberi sanksi sesuai dengan peraturan yang berlaku.

Demikian pernyataan ini penulis buat dengan sebenarnya. Atas perhatiannya terima kasih.

Bandar Lampung, Januari 2018

Pembuat pernyataan,



  
Leni Amelia

NPM.1418011117

## RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan di Gisting pada tanggal 14 Mei 1996, sebagai anak terakhir dari empat bersaudara, dari Zamzami dan Nuraini.

Pendidikan Sekolah Dasar diselesaikan di SDN 1 Negeri Agung, Tanggamus pada tahun 2008. Sekolah Menengah Pertama (SMP) diselesaikan di SMPN 1 Talang Padang, Tanggamus pada tahun 2011, dan Sekolah Menengah Atas (SMA) diselesaikan di SMA N 1 Pringsewu pada tahun 2014.

Tahun 2014, Penulis terdaftar sebagai mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Selama menjadi mahasiswa penulis pernah mengikuti organisasi BEM FK UNILA pada tahun 2014-2017 sebagai anggota divisi Pendidikan dan Profesi (Pendpro). Penulis juga pernah mengikuti organisasi LUNAR FK UNILA tahun 2014-2017 sebagai Sekretaris bidang *Social and Partnership* dan Sekretaris Umum serta FSI Ibnu Sina pada tahun 2014-2016 sebagai anggota bidang kaderisasi.

*Alhamdulillah...*

*Dengan rasa syukur kepada Allah SWT*

*Kupersembahkan skripsi ini untuk orang yang selalu  
kusayangi dan menyayangiku*

*Mama, Papa, dan Kakak-kakak ku*

## SANWACANA

Assalamu'alaikum Wr.Wb.

Alhamdulillahirabbil'alamiin. Segala rasa syukur hanya kepada Allah SWT. Rabb semesta alam, atas segala nikmat, petunjuk dan kasih sayang-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.

Skripsi penulis dengan judul “Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol 96% Bekatul Beras Merah Terhadap Motilitas dan Morfologi Spermatozoa Tikus Putih (*Rattus Norvegicus*) Dewasa Jantan Galur *Sprague Dawley* Yang Diinduksi Asap Rokok Kretek” ini, merupakan salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran di Fakultas Kedokteran Universitas Lampung.

Dalam menyelesaikan skripsi ini, penulis mendapat banyak saran, bimbingan, dukungan, dan doa dari berbagai pihak. Maka dalam kesempatan ini penulis ingin menyampaikan rasa terimakasih kepada :

1. Bapak Prof. Dr. Ir. Hasriadi Mat Akin, M.P., selaku Rektor Universitas Lampung;
2. Dr. dr. Muhartono, S.Ked., M.Kes., Sp.PA., selaku Dekan Fakultas Kedokteran Rektor Universitas Lampung;

3. Ibu Soraya Rahmanisa, S.Si., M.Sc., selaku Pembimbing I atas kesedian memberikan bimbingan, ilmu, kritik, saran, nasehat, motivasi dan bantuan bagi penulis untuk menyelesaikan skripsi ini;
4. dr. Syazili Mustofa, S.Ked., M. Biomed., selaku Pembimbing II atas kesedian memberikan bimbingan, ilmu, kritik, saran, nasehat, motivasi dan bantuan bagi penulis untuk menyelesaikan skripsi ini;
5. Dr.dr. Asep Sukohar, S.Ked., M.Kes., selaku Pembahas atas kesediaan dalam memberikan koreksi, kritik, saran, nasehat, motivasi dan bantuan untuk perbaikan skripsi penulis;
6. dr. Hanna Mutiara, S.Ked., M.Kes., selaku Pembimbing Akademik penulis atas kesedian dalam memotivasi dalam bidang akademik penulis;
7. Mama dan Papa tercinta, ibunda Nur'aini dan ayahanda Zamzami yang tidak henti-hentinya mendo'akan, mendukung, memberi semangat dan motivasi;
8. Kakak-kakak tercinta, Yuni Lisafitri, S.P., M. Si., Lana Puspitasari, S. Hut., dan Irpan Zamzami S. Ikom. dan keponakan tersayang, Azril At-Thalah Prasetyo serta keluarga besar tercinta yang selalu memberikan semangat dalam menggapai cita-cita serta senantiasa memberikan saran, dorongan dan motivasi;
9. Sahabat tersayang The Fun (Vermitia, Lulu, Nana, Vika, Osy, Ratu) yang selalu ada untuk saling membantu dan mendukung serta mendoakan;
10. Tim BEKATUL (Nana, Ocsi, Nandya) yang selama kurang lebih 2 bulan saling bahu-membahu bekerja dalam tim penelitian;
11. Sahabat-sahabatku (Dita, Ratu, Yesi, Uli, Echa, Fika);
12. Keluarga besar LUNAR FK UNILA, FSI Ibnu Sina dan BEM FK Unila yang telah memberikan pengalaman, pelajaran, dan rasa kebersamaan berorganisasi;

13. Keluarga KKN Gunung Raya (Ara, Betara, Eka, Andey, Ade, dan Kak Ata);
14. Keluarga besar FK UNILA (Teman sejawat tercinta CRANIAL FK Unila 2014) atas kebersamaannya selama ini, staff dan karyawan serta adik-adik angkatan 2015, 2016, 2017 atas kebersamaan dalam semangat satu kedokteran;
15. Untuk seluruh orang yang terlibat dalam membantu penelitian ini.

Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi pembacanya.

Bandar Lampung, Januari 2018

Penulis

Leni Amelia

## KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis haturkan kepada Allah SWT atas segala rahmat, nikmat dan kasih sayang-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini. Sholawat serta salam tak lupa penulis curahkan kepada Nabi Muhammad SAW.

Skripsi dengan judul “*Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol 96% Bekatul Beras Merah Terhadap Motilitas dan Morfologi Spermatozoa Tikus Putih (Rattus norvegicus) Dewasa Jantan Galur Sprague dawley Yang Diinduksi Asap Rokok Kretek*” bertujuan untuk memenuhi salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana pendidikan dokter bagi mahasiswa program S1 Fakultas Kedokteran Universitas Lampung dan untuk melanjutkan ke tahap selanjutnya, yaitu ujian komprehensif skripsi.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan, oleh sebab itu penulis mengharapkan kritik dan saran yang bersifat membangun dari semua pihak demi perbaikan skripsi ini. Semoga bermanfaat bagi kita semua.

Bandar Lampung, Januari 2018

Penulis

Leni Amelia

## DAFTAR ISI

|  | Halaman |
|--|---------|
| DAFTAR ISI.....  | vi      |
| DAFTAR TABEL.....  | viii    |
| DAFTAR GAMBAR.....   | ix      |
| <br>   |         |
| BAB 1 PENDAHULUAN .....  | 1       |
| 1.1 Latar Belakang .....   | 1       |
| 1.2 Rumusan Masalah .....  | 5       |
| 1.3 Tujuan .....   | 5       |
| 1.3.1 Tujuan Umum .....  | 5       |
| 1.3.2 Tujuan Khusus .....  | 6       |
| 1.4 Manfaat Penelitian .....                                     | 6       |
| BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA .....                                     | 7       |
| 2.1 Sistem Reproduksi Pria .....                                 | 7       |
| 2.1.1 Spermatogenesis.....                                       | 7       |
| 2.1.2 Peran Hormon Pada Spermatogenesis .....                    | 8       |
| 2.1.3 Morfologi Spermatozoa .....                                | 10      |
| 2.1.4 Motilitas Spermatozoa .....                                | 11      |
| 2.2 Tikus Putih .....  | 13      |
| 2.3 Rokok Kretek .....   | 14      |
| 2.3.1 Pengaruh Rokok Terhadap Kesehatan Reproduksi Pria .....    | 15      |
| 2.4 <i>Reactive Oxygen Species (ROS)</i> / Stres Oksidatif ..... | 18      |
| 2.5 Antioksidan .....  | 22      |
| 2.6 Bekatul dan Efek Antioksidannya.....                         | 23      |
| 2.7 Kerangka Teori.....  | 27      |
| 2.8 Kerangka Konsep .....  | 28      |
| 2.9 Hipotesis.....   | 28      |
| BAB 3 METODE PENELITIAN.....                                     | 29      |
| 3.1 Jenis dan Desain Penelitian.....                             | 29      |
| 3.2 Waktu dan Tempat Penelitian .....                            | 29      |
| 3.3 Populasi dan Sampel .....                                    | 30      |
| 3.3.1 Populasi.....  | 30      |
| 3.3.2 Sampel.....  | 30      |

|  |           |
|--|-----------|
| 3.3.3 Kelompok Perlakuan.....                              | 31        |
| 3.3.4 Kriteria Inklusi dan Eksklusi.....                   | 32        |
| 3.3.4.1 Kriteria Inklusi .....                             | 32        |
| 3.3.4.2 Kriteria Eksklusi .....                            | 32        |
| 3.4 Variabel dan Definisi Operasional.....                 | 33        |
| 3.4.1 Variabel Penelitian.....                             | 33        |
| 3.4.2 Definisi Operasional.....                            | 34        |
| 3.5 Alat dan Bahan.....                                    | 35        |
| 3.5.1 Alat.....  | 35        |
| 3.5.2 Bahan .....  | 35        |
| 3.6 Prosedur Penelitian .....                              | 36        |
| 3.6.1 <i>Ethical Clearance</i> .....                       | 36        |
| 3.6.2 Pengadaan Hewan Coba.....                            | 36        |
| 3.6.3 Pemeliharaan Hewan Coba .....                        | 36        |
| 3.6.4 Pembuatan Ekstrak Bekatul .....                      | 37        |
| 3.6.5 Pemberian dan Perhitungan Dosis Ekstrak Bekatul..... | 38        |
| 3.6.6 Pemaparan Asap Rokok .....                           | 40        |
| 3.6.7 Proses Pembedahan.....                               | 41        |
| 3.6.8 Pengambilan dan Pengamatan Spermatozoa.....          | 41        |
| 3.7 Analisis Data .....                                    | 43        |
| 3.8 Alur Penelitian .....                                  | 45        |
| <b>BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>                     | <b>46</b> |
| 4.1 Hasil Penelitian .....                                 | 46        |
| 4.1.1 Motilitas Spermatozoa .....                          | 47        |
| 4.1.2 Morfologi Spermatozoa .....                          | 49        |
| 4.2 Pembahasan.....  | 53        |
| 4.2.1 Motilitas Spermatozoa .....                          | 53        |
| 4.2.2 Morfologi Spermatozoa .....                          | 58        |
| <b>BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>                    | <b>64</b> |
| 5.1 Kesimpulan .....                                       | 64        |
| 5.2 Saran.....   | 64        |

## DAFTAR PUSTAKA

## LAMPIRAN

## DAFTAR TABEL

| Tabel   | Halaman |
|---|---------|
| Tabel 1. Kelompok perlakuan hewan coba .....                        | 32      |
| Tabel 2. Kriteria motilitas sperma.....                             | 42      |
| Tabel 3. Hasil Perhitungan Motilitas Spermatozoa (%).....           | 47      |
| Tabel 4. Hasil Perhitungan Normalitas Motilitas Spermatozoa.....    | 48      |
| Tabel 5. Hasil Perhitungan Homogenitas Motilitas Spermatozoa. ....  | 48      |
| Tabel 6. Hasil Uji <i>Post-Hoc</i> Motilitas Spermatozoa Tikus..... | 49      |
| Tabel 7. Hasil Perhitungan Morfologi Spermatozoa (%).....           | 50      |
| Tabel 8. Hasil Perhitungan Normalitas Morfologi Spermatozoa.....    | 50      |
| Tabel 9. Hasil Uji <i>Post-Hoc</i> Morfologi Spermatozoa Tikus..... | 52      |

## DAFTAR GAMBAR

| Gambar  | Halaman |
|---|---------|
| Gambar 1. Proses Spermatogenesis .....  | 8       |
| Gambar 2. Peran Hormon pada Spermatogenesis.....                                | 9       |
| Gambar 3. Morfologi Spermatozoa.....  | 10      |
| Gambar 4. Tipe produk rokok yang dikonsumsi perokok.....                        | 15      |
| Gambar 5. Ilustrasi kompetisi oksigen dan karbonmonoksida. ....                 | 16      |
| Gambar 6. Mekanisme Pembentukan ROS pada Spermatozoa .....                      | 19      |
| Gambar 7. Stres oksidatif pada sistem reproduksi pria.....                      | 20      |
| Gambar 8. Struktur Biji Padi .....  | 23      |
| Gambar 9. Bekatul . ....  | 24      |
| Gambar 10. Struktur Kimia <i>α-tocopherol</i> .....                             | 24      |
| Gambar 11. Struktur tiga komponen <i>γ-oryzanol</i> .....                       | 25      |
| Gambar 12. Kerangka Teori.....  | 27      |
| Gambar 13. Proses Ekstraksi Bekatul .....                                       | 37      |
| Gambar 14. Pemaparan Asap Rokok .....   | 41      |
| Gambar 15. Morfologi Spermatozoa Normal dan Abnormal. ....                      | 43      |
| Gambar 16. Diagram Alur Penelitian.....   | 45      |
| Gambar 17. Morfologi Normal Spermatozoa .....                                   | 52      |
| Gambar 18. Morfologi Abnormal. ....   | 53      |
| Gambar 19. Lokasi Persebaran Antioksidan Spermatozoa Manusia. ....              | 56      |
| Gambar 20. Reaksi kimia <i>α-tocopherol</i> menghentikan peroksidasi lipid..... | 62      |

# **BAB 1**

## **PENDAHULUAN**

### **1.1 Latar Belakang**

Indonesia dihadapkan pada dua beban masalah kesehatan, yaitu penyakit menular dan penyakit degeneratif. Saat ini, penyakit menular belum dapat diselesaikan karena Indonesia termasuk daerah endemis. Sedangkan prevalensi penyakit degeneratif semakin meningkat akibat dari gaya hidup yang salah. Salah satu gaya hidup yang salah adalah perilaku merokok, dimana perilaku merokok ini sudah terjadi di sebagian besar negara di dunia termasuk Indonesia (Kemenkes RI, 2012).

Jumlah angka perokok di Indonesia sangat besar. *Global Adults Tobacco Survey* (GATS) tahun 2011 menyebutkan bahwa Indonesia menduduki peringkat ke-2 perokok terbanyak di dunia. Hasil Riskesdas tahun 2013 menyatakan bahwa prevalensi perokok di Indonesia mencapai 33,4%. Proporsi terbesar terdapat pada kelompok petani, nelayan, dan buruh yaitu sebesar 44,5%. Bahkan perilaku merokok ini telah dimulai pada usia remaja (Kemenkes RI, 2013; WHO, 2012). *Global Youth Tobacco Survey* (GYTS) 2014 menyebutkan bahwa Indonesia adalah negara dengan perokok remaja yang tertinggi di dunia. Sebanyak 80% perokok mulai merokok saat usia

kurang dari 19 tahun. Lampung merupakan salah satu provinsi yang proporsi merokok pada rentang usia 15-19 tahun melebihi rerata angka nasional yaitu sebesar 60,9% dengan usia 10 tahun keatas yang tiap hari merokok sebesar 26,5%. Data diatas menunjukkan bahwa perilaku merokok telah menjadi kebiasaan di Indonesia dan kebiasaan ini dapat menimbulkan masalah kesehatan (Kemenkes RI, 2015; WHO, 2014).

Salah satu masalah kesehatan yang ditimbulkan oleh rokok adalah infertilitas. Sebanyak 30-40% kasus infertilitas disebabkan oleh faktor laki-laki. Rokok mengandung zat berbahaya yang dapat merusak spermatozoa dengan mempengaruhi kualitas semen, menyebabkan kerusakan morfologi sperma, kerusakan oksidatif pada mitokondria, dan meningkatkan risiko impotensi sampai dengan 50% yang akhirnya dapat menyebabkan infertilitas pada pria. Beberapa studi telah dilakukan untuk membuktikan pengaruh merokok terhadap kerusakan spermatozoa (HIFERI, PERFITRI, IAUI *et al.*, 2013; Kementerian Kesehatan RI, 2013).

Banyak bukti ilmiah yang membuktikan rokok dapat merusak spermatosit. Penelitian oleh Polyzos *et al* (2009) yang menggunakan tikus sebagai sampel, menunjukkan bahwa terjadi gangguan kemampuan motilitas, fragmentasi DNA, dan abnormalitas integritas kromatin spermatozoa (Polyzos *et al.*, 2009). Hal ini selaras dengan studi *cross sectional* skala besar pada populasi umum orang sehat oleh Ramlau-Hansen *et al* (2007). Hasil pengamatan menunjukan terdapat efek negatif merokok pada konsentrasi, hitung total, dan

kemampuan motilitas sperma. Mekanisme kerusakan sperma oleh asap rokok didasari oleh adanya stres oksidatif (Ramlau-Hansen *et al.*, 2007).

Stres oksidatif yang diakibatkan oleh rokok mendasari mekanisme terjadinya kerusakan sperma yang akhirnya menyebabkan penurunan kualitas sperma pada pria. Mekanisme tersebut diantaranya adalah peroksidasi lipid, protein, dan asam nukleat yang akhirnya mengakibatkan cedera seluler pada spermatosit. Stres oksidatif adalah kondisi dimana terjadi ketidakseimbangan antara kadar *reactive oxygen species* (ROS) atau radikal bebas dalam tubuh dan kemampuan tubuh untuk mendetoksifikasinya (pertahanan antioksidan). Ketidakseimbangan ini dapat terjadi akibat peningkatan ROS atau kurangnya produksi antioksidan. Radikal bebas didefinisikan sebagai suatu molekul dengan atom yang memiliki elektron tidak berpasangan diorbit terluarnya. Oleh sebab itu, radikal bebas tidak stabil dan sangat reaktif sehingga dapat mudah berikatan dengan hampir semua komponen sel (karbohidrat kompleks, protein, lipid, dan asam nukleat) di dalam tubuh dan merusaknya (Aprioku, 2013). Kerusakan oksidatif atau kerusakan akibat radikal bebas ini pada dasarnya dapat diatasi oleh antioksidan endogen diantaranya adalah enzim *catalase* yang berikatan dengan Fe, *glutathione peroxidase* dan *glutathione S-transferase* yang berikatan dengan Se, *superoxide dismutase* yang berikatan dengan Cu, Zn, dan Mn. Namun jika senyawa radikal bebas terdapat dalam jumlah yang besar atau melebihi batas kemampuan proteksi antioksidan seluler, maka dibutuhkan antioksidan tambahan dari luar atau antioksidan eksogen untuk menetralkan radikal bebas yang terbentuk dan mencegah kerusakan sel. Antioksidan secara alami dapat diperoleh dari tanaman. Salah

satu tanaman yang berpotensi sebagai antioksidan adalah bekatul (Agarwal *et al.*, 2015).

Bekatul mengandung senyawa antioksidan yang dapat melindungi sperma dari kerusakan oksidatif. Bekatul sendiri merupakan hasil sampingan dari penggilingan padi dan oleh masyarakat biasa dijadikan pakan ternak. Selain memiliki nilai ekonomis yang tinggi, bekatul ternyata berpotensi sebagai sumber antioksidan. Senyawa antioksidan yang terkandung pada bekatul diantaranya *tokoferol*, *γ-oryzanol*, dan  $\beta$ -karoten (Mumpuni dan Ayustaningwarno, 2013). *Tokoferol* berperan penting pada pertahanan integritas membran dengan mencegah peroksidasi asam lemak tak jenuh. *Tokoferol* memindahkan hidrogen fenolat pada membran sel kepada radikal hidroksil sehingga rantai radikal bebas terputus dan tidak terjadi peroksidasi lipid. Hal ini dibuktikan oleh Herdis *et al.* (2009), dalam studinya menunjukkan bahwa penambahan *tokoferol* sampai dosis 0,04g/100ml cenderung meningkatkan persentase motilitas, viabilitas, dan membran plasma utuh spermatozoa. Hal ini diduga karena *tokoferol* mampu menghambat proses peroksidasi lipid (Herdis *et al.*, 2009). *γ-oryzanol* mempunyai fungsi antioksidan karena pada struktur kimianya terdapat asam ferulat, yang termasuk antioksidan kuat dan bekerja dengan mencegah ikatan radikal bebas (Islam *et al.*, 2011). Begitu juga kandungan  $\beta$ -karoten atau pigmen warna pada bekatul beras merah dapat berperan dalam pencegahan stres oksidatif. Adanya gugus hidroksil yang terikat pada cincin aromatis pada molekul senyawa fenolik dan kemampuan mendonorkan proton ke senyawa radikal sehingga dapat berperan sebagai antioksidan (Rattanachitthawat *et al.*, 2010).

Studi oleh Habibuh Nur Laili (2016), menyimpulkan bahwa pemberian ekstrak bekatul dosis 200 mg/kg BB secara signifikan meningkatkan *Total Antioxidant Status* (TAS) pada tikus yang diinduksi *Monosodium Glutamat* (MSG) (Laili, 2016).

Berdasarkan uraian diatas, peneliti tertarik untuk meneliti apakah terdapat pengaruh pemberian bekatul terhadap kualitas (motilitas dan morfologi) spermatozoa tikus putih dewasa jantan galur *Sprague dawley* yang diinduksi asap rokok.

## **1.2 Rumusan Masalah**

Dari latar belakang yang telah dijelaskan, didapatkan rumusan masalah sebagai berikut:

1. Apakah pemberian ekstrak bekatul beras merah mempengaruhi motilitas spermatozoa tikus jantan galur *Sprague dawley* yang diinduksi asap rokok?
2. Apakah pemberian ekstrak bekatul beras merah mempengaruhi morfologi spermatozoa tikus jantan galur *Sprague dawley* yang diinduksi asap rokok?

## **1.3 Tujuan Penelitian**

### **1.3.1 Tujuan Umum**

Untuk mengetahui pengaruh pemberian bekatul terhadap kualitas spermatozoa tikus jantan galur *Sprague dawley* yang diinduksi asap rokok.

### 1.3.2 Tujuan Khusus

1. Untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak bekatul beras merah terhadap motilitas spermatozoa tikus jantan galur *Sprague dawley* yang diinduksi asap rokok.
2. Untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak bekatul beras merah terhadap morfologi spermatozoa tikus jantan galur *Sprague dawley* yang diinduksi asap rokok.

### 1.4 Manfaat Penelitian

Adapun manfaat penelitian ini adalah:

1. Bagi peneliti, dapat menambah wawasan dan pengalaman meneliti terkait pengaruh pemberian ekstrak bekatul beras merah terhadap kualitas (motilitas dan morfologi) spermatozoa pada tikus jantan galur *Sprague dawley* yang terpapar asap rokok.
2. Bagi masyarakat umum, diharapkan dapat menambah informasi terkait manfaat bekatul beras merah bagi kesehatan.
3. Bagi peneliti selanjutnya, memberikan referensi agar dapat dikembangkan pada penelitian di masa mendatang.
4. Bagi institusi, menambah informasi dan referensi terkait kekhususan institusi pada bidang *agromedicine*, bekatul berpotensi sebagai senyawa antioksidan sehingga dapat mencegah terjadinya stres oksidatif pada sel.

## **BAB 2**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **2.1 Sistem Reproduksi Pria**

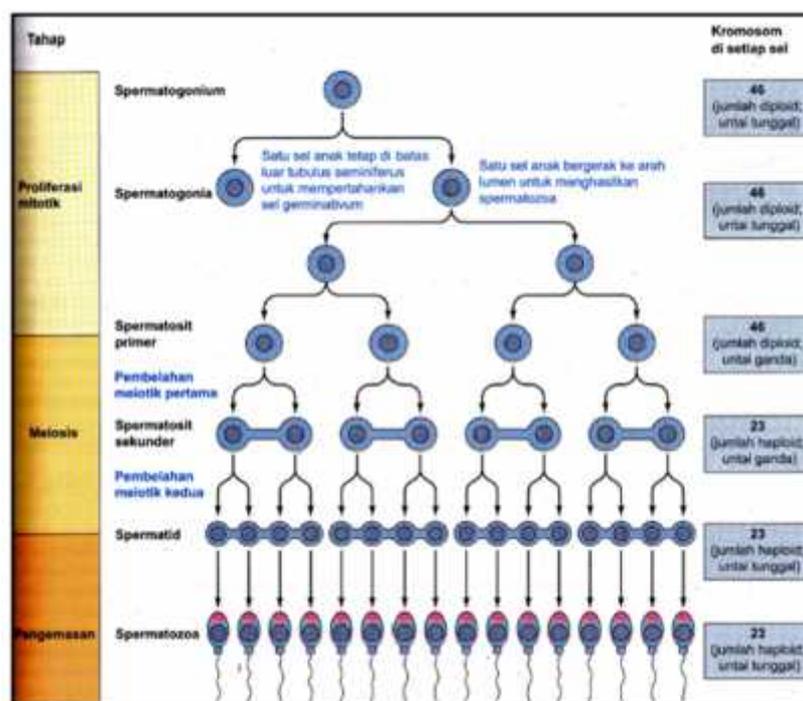
Sistem reproduksi pria mencakup gonad, saluran reproduksi, dan kelenjar aksesorius. Gonad pada pria terdiri dari sepasang testis. Gonad matur mempunyai dua fungsi, yaitu menghasilkan gamet (gametogenesis) dan testosteron. Sekitar 80% massa testis terdiri dari tubulus seminiferus yang panjangnya sekitar 250m, tersusun berkelok-kelok dan menjadi tempat berlangsungnya spermatogenesis (Sherwood, 2011).

##### **2.1.1 Spermatogenesis**

Spermatogenesis adalah proses kompleks dimana sel germinativum primordial (spermatogonia yang relatif belum berdiferensiasi) berubah menjadi motil. Proses ini memerlukan waktu 64 hari dan dihasilkan ratusan juta sperma matang setiap harinya (Sherwood, 2011).

Tahap spermatogenesis terdiri dari: proliferasi mitotik, meiosis, dan spermiogenesis (Sherwood, 2011). Tahap ini dimulai dengan spermatogonia sebagai stem sel ( $2n$ ) mengalami pembelahan mitotik menghasilkan dua spermatogonia. Satu spermatogonia tetap berada

di lamina basal tubulus seminiferus untuk mempertahankan sel germinativum dan yang lainnya berdiferensiasi menjadi spermatosit primer. Pembelahan meiotik I mengubah Spermatosit primer ( $2n$ ) menjadi spermatosit sekunder ( $n$ ). Spermatosit sekunder ( $n$ ) menjadi spermatid ( $n$ ) pada meiotik II. Selanjutnya pada tahap spermiogenesis, spermatid akan diubah menjadi spermatozoa ( $n$ ) (Aryoseto, 2009).

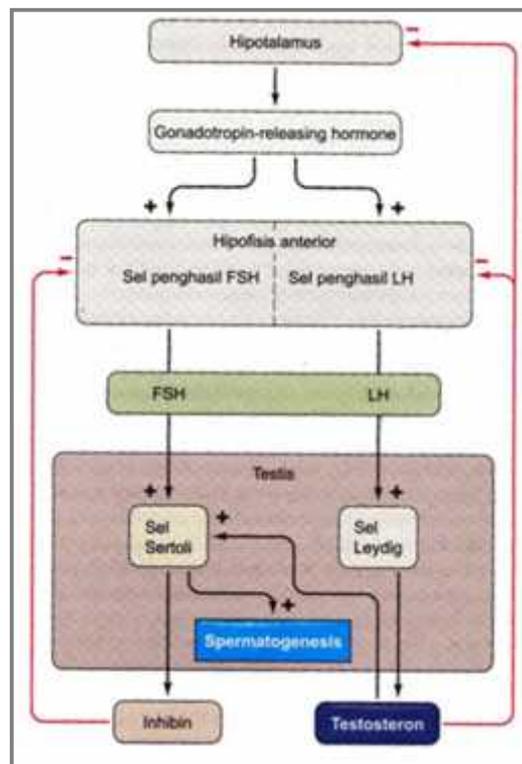


Gambar 1. Proses Spermatogenesis (Sherwood, 2011).

### 2.1.2 Peran Hormon pada Spermatogenesis

Peran hormonal pada spermatogenesis dipengaruhi oleh aksis hipotalamus-hipofisis-testis. Hipotalamus menghasilkan *gonadotropin releasing hormone* (GnRH) yang menstimulus hipofisis anterior untuk mensekresikan *Folicle-stimulating hormone*

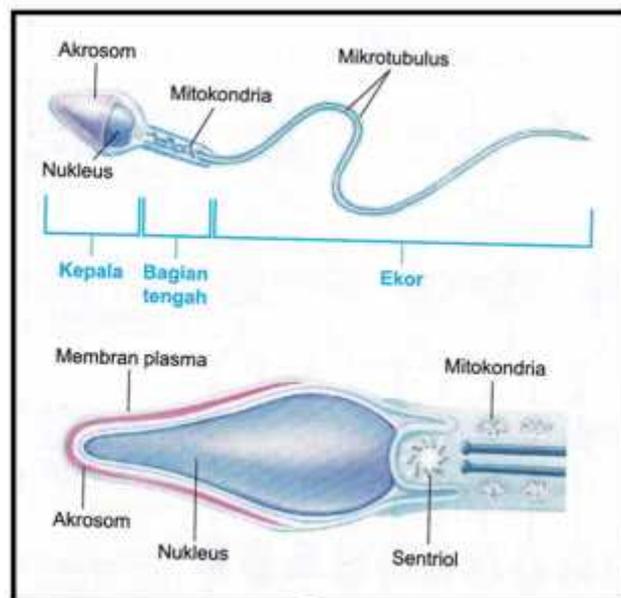
(FSH) dan *leutinizing hormone* (LH). FSH akan mempengaruhi sel sertoli, sedangkan LH akan menstimulasi sel leydig untuk menghasilkan testosteron. LH juga dapat merangsang sel sertoli. Sel sertoli berperan sebagai pemasok nutrisi pada spermatogenesis dan menghasilkan inhibin yang mempengaruhi sekresi FSH dan LH. Inhibin memiliki mekanisme umpan balik negatif pada hipofisis anterior, yaitu menginhibisi sekresi FSH. Sedangkan testosteron memiliki dua mekanisme umpan balik negatif yaitu pada hipotalamus untuk mengurangi produksi GnRH dan hipofisis anterior untuk menginhibisi sekresi LH (Aprioku, 2013).



Gambar 2. Peran Hormon pada Spermatogenesis (Sherwood, 2011).

### 2.1.3 Morfologi Spermatozoa

Morfologi spermatozoa didapatkan setelah terjadi proses spermiogenesis. Pada spermiogenesis, spermatid akan menjadi spermatozoa dengan menghilangkan beberapa sitoplasmanya dan mengumpulkan sisa sitoplasma serta membran sel pada salah satu ujung sel untuk membentuk ekor. Kemudian mengatur kembali bahan kromatin dari inti spermatid untuk membentuk satu kepala spermatozoa yang padat (Aryoseto, 2009).



Gambar 3. Morfologi Spermatozoa (Sherwood, 2011).

Spermatozoa memiliki empat bagian yaitu kepala, akrosom, bagian tengah, dan ekor. Kepala terdiri dari sel berinti padat yang mengandung informasi genetik dengan sedikit sitoplasma. Pada dua pertiga anterior luar membran terdapat selubung tebal disebut akrosom, berupa agregasi vesikel-vesikel yang diproduksi oleh badan golgi sebelum organel ini disingkirkan. Vesikel berisi enzim

serupa dengan hialuronidase dan proteolitik kuat pada lisosom sel tertentu yang dapat mencerna filamen proteoglikan dari jaringan serta berperan pada saat sperma menembus dinding ovum. Ekor spermatozoa atau flagela berbentuk panjang seperti cambuk, memiliki 3 komponen utama, yaitu: rangka pusat, membran sel, dan sekelompok mitokondria pada proksimal ekor yang berfungsi menghasilkan energi untuk motilitas (Aryoseto, 2009).

Abnormalitas morfologi (teratospermia) dapat dinilai dari struktur spermatozoa. Struktur yang dapat dinilai adalah yaitu kepala, bagian tengah, dan ekor. Spermatozoa dengan bentuk abnormal selalu dapat ditemukan pada setiap sediaan sampel normal, namun jumlahnya tidak lebih atau sama dengan 30 persen. Spermatozoa dikatakan normal bila memiliki struktur kepala, ekor, dan leher normal. Rasio panjang dan lebar kepala sperma normal yaitu 1,5-1,75. Leher merupakan bagian sempit yang menghubungkan antara kepala dan ekor, panjang ekor kurang lebih 9 kali panjang kepala sperma dan terbagi menjadi tiga bagian, yaitu *principle piece*, *middle piece* dan *end piece* (Apriora et al., 2015).

#### **2.1.4 Motilitas Spermatozoa**

Kemampuan motilitas sperma didapatkan setelah melalui berbagai proses. Setelah sperma terbentuk di dalam tubulus seminiferus, sperma akan melewati epididimis sepanjang kurang lebih enam meter dalam waktu beberapa hari. Sperma yang bergerak dari

tubulus seminiferus dan awal epididimis adalah sperma yang belum motil serta tidak dapat membuahi ovum. Setelah 18-24 jam di dalam epididimis, sperma akan memiliki kemampuan motilitas. Meskipun kemampuan motilitas masih dihambat oleh protein dalam cairan epididimis, sampai setelah terjadi ejakulasi. Kemampuan motilitas setelah ejakulasi ini berperan penting dalam proses fertilisasi (Aryoseto, 2009).

Mekanisme fertilisasi pada manusia membuktikan kemampuan motilitas pada sperma sangat penting. Motilitas sangat diperlukan oleh spermatozoa untuk mencapai ovum dan mengadakan penetrasi kedalamnya. Oleh sebab itu, walaupun jumlah spermatozoa dalam batas cukup, infertilitas pada pria masih dapat terjadi oleh karena gangguan motilitas (Widodo, 2006).

Gangguan motilitas dapat ditimbulkan oleh beberapa faktor. Faktor tersebut dapat disebabkan oleh kurangnya energi yang dihasilkan mitokondria, terlalu banyak zat koagulasi dalam semen sehingga menghalangi gerakan spermatozoa, dan kerusakan struktur normal terutama pada ekor (flagel) yang merupakan satu-satunya alat gerak pada spermatozoa. Kerusakan pada ekor yang dimaksud dapat berupa kerusakan tingkat ultrastruktural seperti kerusakan membran pembungkus ekor spermatozoa dan kerusakan aksonema (Widodo, 2006).

Motilitas spermatozoa dapat dihitung secara manual. Penghitungan manual dapat secara kuantitatif dan kualitatif. Secara kuantitatif ditentukan dengan menghitung spermatozoa motil dan imotil pada minimal 10 lapangan pandang secara acak. Persentase spermatozoa motil dihitung dari rerata persentase motilitas untuk semua lapangan pandang yang dihitung. Nilai yang diperoleh dibulatkan mendekati nilai yang dapat dibagi 5%. Perhitungan kualitatif ditentukan secara subjektif berdasarkan pergerakan spermatozoa, yang dibagi menjadi empat derajat, yaitu:

- Derajat a : Gerakan cepat dan maju lurus
- Derajat b : Gerakan lambat dan sulit maju lurus
- Derajat c : Tidak bergerak maju
- Derajat d : Tidak bergerak

Semen normal menunjukkan lebih dari atau sama dengan 60% spermatozoa motil yang sebagian besar menunjukkan pergerakan baik sampai sangat baik dalam waktu setengah sampai tiga jam setelah ejakulasi (Widodo, 2006).

## **2.2 Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)**

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague dawley* termasuk ke dalam kelompok mamalia. Ciri-ciri galur ini adalah memiliki tubuh dan ekor panjang, bagian ekor lebih panjang daripada kepala, kepala lebih sempit, mata berwarna merah, telinga tebal dan pendek dengan rambut halus. Pada usia dua belas minggu, bobot badan tikus putih jantan mencapai 240 gram, sedangkan betina mencapai 200 gram. Tikus ini memiliki lama hidup

berkisar antara 4-5 tahun dengan berat badan tikus jantan berkisar 267-500 gram dan betina 225-325 gram (Akbar, 2010).

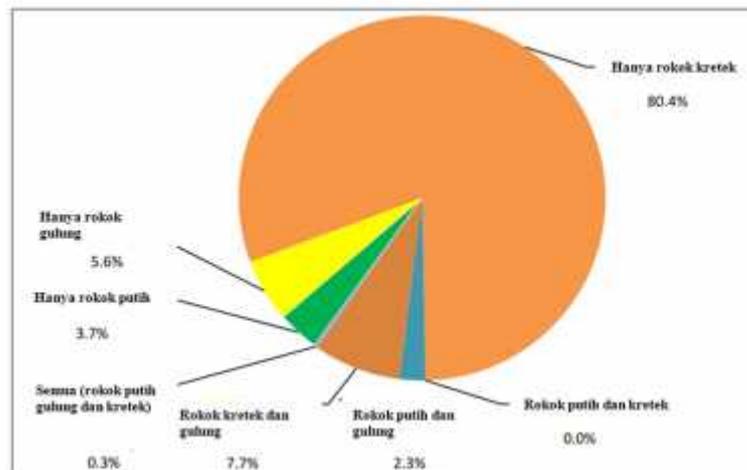
|              |                            |
|--------------|----------------------------|
| Kingdom      | : Animalia                 |
| Filum        | : Chordata                 |
| Kelas        | : Mamalia                  |
| Ordo         | : Rodentia                 |
| Subordo      | : Sciurognathi             |
| Famili       | : Muridae                  |
| Sub-Famili   | : Murinae                  |
| Genus        | : <i>Rattus</i>            |
| Spesies      | : <i>Rattus norvegicus</i> |
| Galur/Strain | : <i>Sprague dawley</i>    |

Klasifikasi tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague dawley* (Akbar, 2010).

### 2.3 Rokok Kretek

Rokok merupakan salah satu olahan tembakau dengan atau tanpa menggunakan bahan tambahan. Rokok dengan bahan tambahan berupa cengkeh disebut rokok kretek, sedangkan rokok tanpa bahan tambahan cengkeh disebut sebagai rokok putih. Rokok kretek baik yang diproduksi menggunakan mesin atau digulung memiliki kadar tar lebih tinggi daripada rokok putih (lebih dari 10 mg tar). Rokok kretek dengan tingkat tar yang sedang, paling umum digunakan adalah 14 mg tar dan 1 mg nikotin (WHO, 2012).

Rokok kretek merupakan produk asli Indonesia yang unik dan diakui dunia. Mayoritas perokok (sekitar 90 persen) di Indonesia mengonsumsi rokok kretek. Sedangkan prevalensi masyarakat Indonesia yang hanya mengonsumsi rokok kretek sebesar 80,4% (Sunaryo, 2013; WHO, 2012).



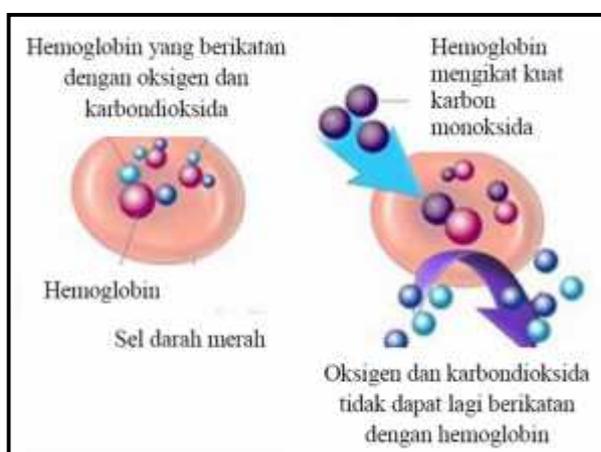
Gambar 4. Tipe produk rokok yang dikonsumsi perokok (WHO, 2012).

### 2.3.1 Pengaruh Rokok Terhadap Kesehatan Reproduksi Pria

Satu batang rokok mengandung sekitar 4000 macam bahan kimia. Sepersepuluh macam dari bahan kimia tersebut bersifat toksik. Seperti tar, nikotin, nitrosamin, karbonmonoksida, fenol, karbonil, klorin, senyawa *Poly-nuclear Aromatic Hydrogen* (PAH), dioksin dan furan (Batubara *et al.*, 2013).

Rokok mengandung dua komponen, yaitu komponen gas dan partikel. Komponen gas terdiri dari nitrogen dan senyawa hidrokarbon. Sedangkan komponen partikel beberapa diantaranya terdiri dari tar, nikotin, benzopiren, fenol dan cadmium. Namun hanya terdapat tiga komponen paling toksik, yaitu karbonmonoksida, nikotin, dan tar (Batubara *et al.*, 2013). Karbonmonoksida merupakan gas racun yang

tidak berwarna dan tidak berbau. Karbonmonoksida memiliki daya pengikat (afinitas) 200 kali lebih kuat dibandingkan oksigen untuk berikatan dengan hemoglobin (Hb) membentuk karboksihemoglobin (COHb). COHb dapat menurunkan kapasitas oksigen dalam mengangkut sel darah merah sehingga dapat terjadi hipoksia jaringan (Ahmad dan Restadiamawati, 2014).



Gambar 5. Ilustrasi kompetisi oksigen dan karbonmonoksida (Ahmad & Restadiamawati, 2014).

Nikotin dapat masuk ke dalam pembuluh darah melalui paru-paru dan dengan cepat (10-20 detik) bersirkulasi menuju ke otak, menembus *blood-brain barrier*. Pada otak, nikotin dapat menghambat sekresi testosteron sehingga kadar testosteron akan menurun. Testosteron berperan penting dalam spermatogenesis. Sehingga menurunnya kadar testosteron dalam darah akan mengakibatkan gangguan pada tahap pematangan spermatid menjadi spermatozoa matur, hal tersebut dapat mengakibatkan abnormalitas spermatozoa. Abnormalitas morfologi dan motilitas spermatozoa dapat menurunkan 40% kesempatan untuk

dapat hamil secara alamiah pada pasangan perokok. Selain itu, nikotin juga memiliki efek vasokonstriktor yang mengakibatkan gangguan ereksi dan mengakibatkan kejadian impotensi. Vasokonstriksi atau penyempitan lumen pembuluh darah dapat memicu terjadinya atherosklerotik di daerah pelvis sehingga aliran darah ke penis menjadi lambat. Sedangkan ereksi terjadi jika aliran darah ke daerah penis adekuat (Apriora *et al.*, 2015). Tar merupakan bahan karsinogenik kompleks yang dihasilkan saat proses pemanasan. Tar menyebabkan berbagai penyakit diantaranya kanker, penyakit jantung, bronkitis, gangguan kehamilan, dan impotensi (Batubara *et al.*, 2013).

Beberapa Studi dilakukan untuk membuktikan efek bahan kimia yang terkandung dalam rokok terhadap gangguan spermatogenesis. Merokok mengakibatkan gangguan spermatogenesis melalui peningkatan produksi radikal bebas atau ROS dan menurunkan antioksidan pada semen, menimbulkan kerusakan DNA melalui fragmentasi DNA seluler sehingga terjadi abnormalitas morfologi (kepala, leher dan ekor) spermatozoa. Hal ini dibuktikan dengan peningkatan kadar 8-OhdG (marker fragmentasi DNA) sebesar 50% pada spermatozoa pria perokok (Fraga CG dalam Quratul'ainy, 2006). Merokok juga dapat memicu reaksi inflamasi dan meningkatkan jumlah leukosit pada plasma seminal. Dimana leukosit dalam plasma seminal merupakan sumber dari ROS (Aryoseto, 2009; Sabeti *et al.*, 2016).

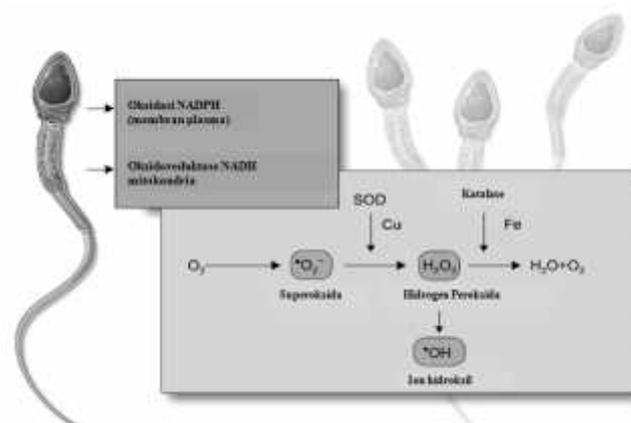
#### 2.4 *Reactive Oxygen Species (ROS) dan Stres Oksidatif*

Radikal bebas sering disamakan dengan senyawa oksigen reaktif (ROS). Radikal bebas diartikan sebagai suatu molekul dengan atom yang memiliki satu atau lebih elektron tidak berpasangan diorbit terluarnya, sehingga memiliki reaktivitas yang sangat tinggi dan tidak stabil. Elektron tidak berpasangan ini selalu berusaha mencari pasangan baru, sehingga mudah bereaksi dengan zat lain (protein, lemak maupun DNA) dalam tubuh. Pada dasarnya molekul biologi tidak bersifat radikal. Namun, jika molekul non radikal ini bertemu dengan radikal bebas, maka akan terbentuk suatu molekul radikal baru (Mulyono, 2015). Disamping itu, ROS atau oksidan juga dapat mengubah suatu molekul menjadi suatu radikal. Berdasarkan kemiripan sifat ini, keduanya sering dianggap sama. Namun, tidak setiap oksidan merupakan radikal bebas. Radikal bebas lebih berbahaya dibandingkan dengan senyawa oksidan non radikal karena dapat menyebabkan reaksi berantai pembentukan radikal baru (Sayuti dan Yenrina, 2015).

ROS bisa dibagi menjadi dua kelas, yaitu *oxygen-centered radicals* dan *oxygen-centered non-radicals*. Adapun yang termasuk *oxygen-centered radicals* adalah anion superoksida ( $O_2^-$ ), radikal hidroksil (OH), radikal alkoksil (RO) dan radikal peroksil (ROO). Sedangkan yang tergolong kedalam *oxygen-centered non-radicals* adalah hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ), dan *singlet oxygen* ( $O_2$ ) (Sayuti dan Yenrina, 2015).

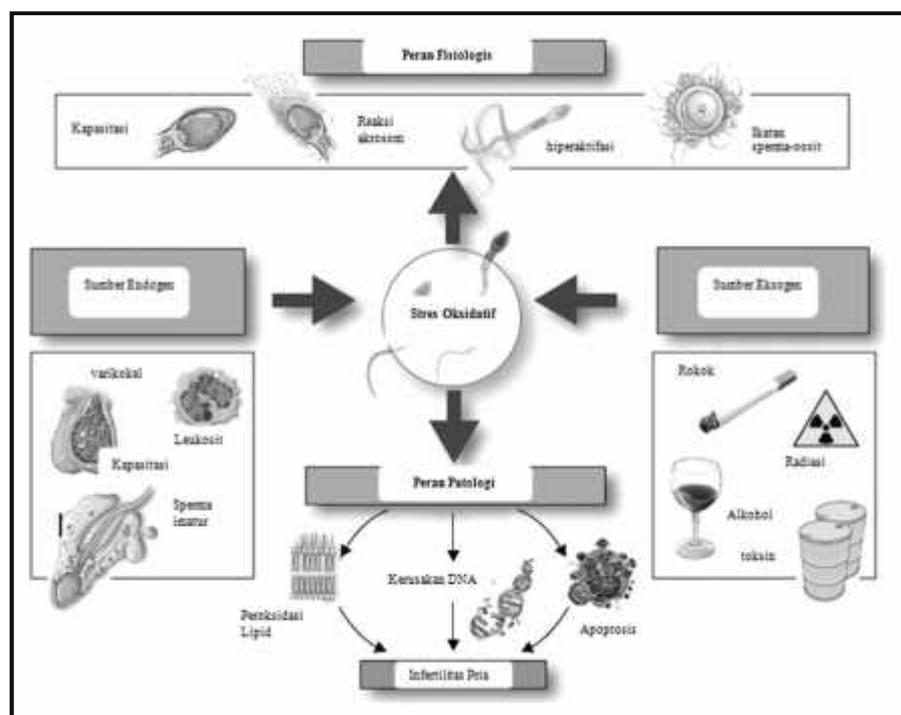
Radikal bebas menyebabkan kerusakan sel dengan tiga cara yaitu: (1). Peroksidasi komponen lipid dari membran sel dan sitosol akan menyebabkan serangkaian reduksi asam lemak (otokatalisis) yang mengakibatkan kerusakan membran dan organel sel, (2). Kerusakan DNA, dapat mengakibatkan mutasi DNA bahkan dapat menimbulkan kematian sel, (3). Modifikasi protein teroksidasi oleh karena terbentuknya *cross linking* protein, melalui mediator sulfidril atas beberapa asam amino labil seperti sistein, metionin, lisin dan histidin (Sayuti dan Yenrina, 2015).

Radikal bebas bisa terbentuk ketika komponen makanan diubah menjadi bentuk energi melalui proses metabolisme. Pada proses metabolisme ini, sering kali terjadi kebocoran elektron. Dalam kondisi ini, mudah sekali terbentuk radikal bebas seperti anion superoksida, hidroksil dan lain-lain. Radikal bebas juga dapat terbentuk dari senyawa lain yang sebenarnya bukan radikal bebas, tetapi mudah berubah menjadi radikal bebas. Misalnya Hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ). Kedua kelompok senyawa tersebut diistilahkan sebagai ROS (Sayuti dan Yenrina, 2015).



Gambar 6. Mekanisme Pembentukan ROS pada Spermatozoa (Modifikasi dari Agarwal *et al.*, 2014).

ROS pada spermatozoa dihasilkan melalui 2 mekanisme yaitu: sistem oksidasi *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate* pada tingkat membran plasma sperma, dan/ atau reaksi *nicotinamide adenine dinucleotide-dependent oxido-reductase* pada tingkat mitokondria. Hal ini diakibatkan oleh mitokondria mempunyai peranan penting untuk menghasilkan ATP melalui metabolisme aerob untuk motilitas spermatozoa. *Ion superoksida* [ $O_2^-$ ] akan bereaksi dengan dirinya sendiri membentuk *hidrogen peroksida* [ $H_2O_2$ ]. Radikal [ $OH^\cdot$ ] sangat poten untuk inisiasi kaskade lipid peroksidasi (LPO) yang dapat menyebabkan hilangnya fungsi sperma dengan mengganggu membran fluiditasnya (Agarwal *et al.*, 2014; Sabeti *et al.*, 2016).



Gambar 7. Stres oksidatif pada sistem reproduksi pria (Modifikasi dari Agarwal *et al.*, 2014).

Sumber ROS di dalam plasma seminal dapat berasal dari endogen maupun eksogen. ROS endogen berasal dari leukosit (netrofil, makrofag), spermatozoa yang imatur, dan spermatozoa abnormal. Sedangkan sumber ROS eksogen berasal dari kebiasaan mengkonsumsi alkohol, merokok, dan faktor lingkungan lain seperti radiasi, toksin, polutan. Adanya peningkatan ROS dapat menyebabkan stres oksidatif (Agarwal *et al.*, 2014; Sabeti *et al.*, 2016). Stres oksidatif diartikan sebagai keadaan dimana terjadi ketidakseimbangan antara produksi ROS dan pertahanan sistem antioksidan untuk menetralisasi ROS (Walczak-Jedrzejowska *et al.*, 2013).

ROS dapat menyebabkan reaksi patologis pada struktur DNA, protein, membran lipid. Reaksi patologis ini menyebabkan peroksidasi lipid, fragmentasi DNA, kerusakan axonemal, denaturasi enzim, pembentukan radikal bebas superoksida di mitokondria (Sabeti *et al.*, 2016), dan memicu apoptosis. Sehingga dapat menurunkan motilitas, jumlah, dan menyebabkan abnormalitas morfologi sperma. Mekanisme utama pengaruh ROS terhadap kualitas dan fungsi spermatozoa yaitu dengan menginduksi peroksidasi lipid dan kerusakan DNA (Walczak-Jedrzejowska *et al.*, 2013). Spermatozoa sangat rentan terhadap stres oksidatif karena memiliki kandungan asam lemak tak jenuh ganda yang tinggi, kekurangan enzim intrinsik dalam antioksidan intraseluler serta terbatasnya kapasitas perbaikan DNA merupakan faktor penting terjadinya infertilitas pada pria (Talevi *et al.*, 2013).

## 2.5 Antioksidan

Antioksidan adalah senyawa untuk pertahanan tubuh dari radikal bebas. Senyawa antioksidan secara kimia diartikan sebagai senyawa pemberi elektron (*electron donor* atau reduktan). Secara biologis, pengertian antioksidan adalah senyawa yang dapat menangkal atau meredam dampak negatif oksidan. Antioksidan bekerja dengan mendonorkan satu elektronnya kepada senyawa oksidan untuk mencegah reaksi oksidasi, sehingga tidak terjadi stres oksidatif dan kerusakan sel (Sayuti dan Yenrina, 2015).

Antioksidan merupakan agen yang dapat membatasi efek dari reaksi oksidasi dalam tubuh. Secara langsung efek yang diberikan oleh antioksidan dalam tubuh, yaitu dengan mereduksi radikal bebas dalam tubuh, dan secara tidak langsung, yaitu dengan mencegah terjadinya pembentukan radikal (Sayuti dan Yenrina, 2015).

Antioksidan dikategorikan menjadi senyawa enzimatik dan non-enzimatik. Senyawa antioksidan enzimatik meliputi *Superoksida dismutase* (SOD), *catalase* (CAT), *glutathione peroksidase* (GPx), dan *glutathione reduktase*. Senyawa antioksidan non-enzimatik meliputi *glutathione*, *-tocopherol* (vitamin E), *ascorbic acid* (vitamin C), *uric acid*, bilirubin, *melatonin* and plasma protein (Sabeti *et al.*, 2016).

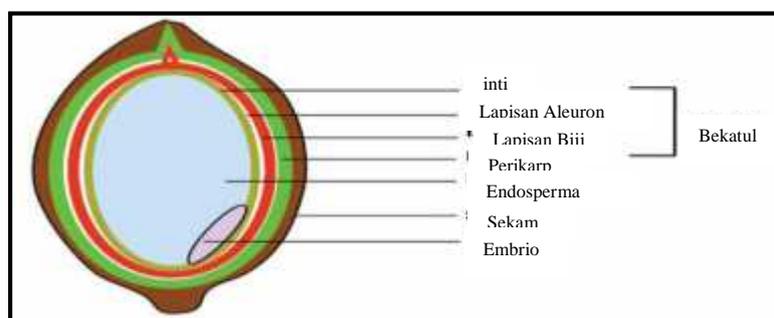
Plasma seminal memiliki pertahanan antioksidan endogen yang secara alami dibentuk didalam tubuh untuk mengimbangi produksi radikal bebas. Namun, sebagian besar antioksidan hilang saat spermiogenesis sehingga jumlahnya sedikit. Oleh karena itu, apabila kadar radikal bebas akibat faktor

stres, radiasi UV, polusi udara berlebih, pertahanan antioksidan endogen tidak dapat menetralsirnya, sehingga diperlukan tambahan antioksidan eksogen (Walczak-Jedrzejska *et al.*, 2013).

Antioksidan eksogen terdiri dari antioksidan alami dan sintetis. Namun, karena adanya kekhawatiran kemungkinan efek samping yang belum diketahui dari antioksidan sintetis, sehingga menyebabkan antioksidan alami menjadi alternatif yang sangat dibutuhkan. Antioksidan alami banyak terdapat pada tumbuh-tumbuhan, sayur-sayuran dan buah-buahan (Sayuti dan Yenrina, 2015). Salah satu bahan alami yang berpotensi sebagai antioksidan adalah bekatul.

## 2.6 Bekatul dan Efek Antioksidannya

Bekatul merupakan hasil penyosohan kedua yang terdiri dari lapisan sebelah dalam dari butiran padi. Lapisan tersebut terdiri dari lapisan aleuron, endosperm, dan embrio sehingga bekatul memiliki tekstur yang halus. Namun, karena alat penggilingan belum dapat memisahkan antara bekatul dan dedak, seringkali dedak dan bekatul bercampur (Islam *et al.*, 2011).

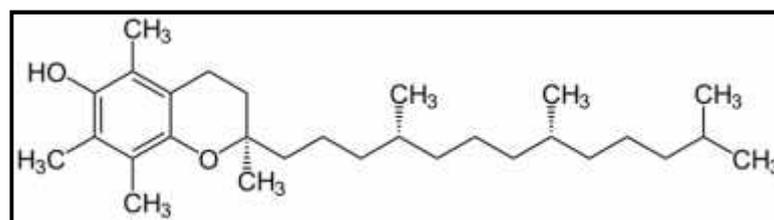


Gambar 8. Struktur Biji Padi (Islam *et al.*, 2011).



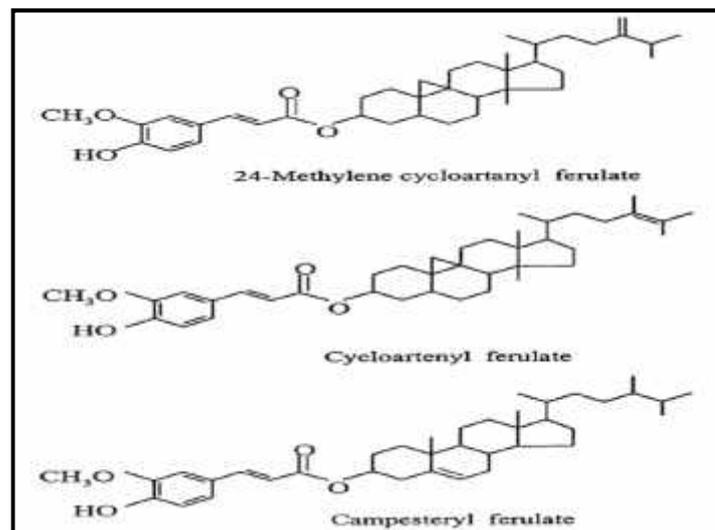
Gambar 9. Bekatul (Islam *et al.*, 2011).

Bekatul mengandung beberapa senyawa antioksidan. Senyawa ini merupakan asam lemak tak jenuh dan fraksi tak tersabunkan yang larut dalam lemak yaitu tokoferol, tokotrienol, dan *oryzanol*. Tokoferol dan tokotrienol adalah komponen pembentuk vitamin E yang termasuk antioksidan kuat. Vitamin E diketahui berfungsi sebagai pemecah rantai antioksidan yang mencegah propagasi dari reaksi radikal bebas. Tokotrienol telah dilaporkan terlibat dalam aktivitas anti kanker. Adanya gugus hidroksil pada struktur kimia *-tochoferol* memberikan kemampuan untuk mendonorkan proton ke senyawa radikal sehingga dapat berperan sebagai antioksidan (Mumpuni dan Ayustaningwarno, 2013).



Gambar 10. Struktur Kimia *-tochoferol* (Patel dan Naik, 2004).

*Oryzanol* termasuk kelompok ester asam ferulat dalam alkohol trierpen dan fitosterol (Kusbiantoro dan Rakhmi, 2007) dan memiliki tiga komponen utama, yaitu *Cycloartenyl ferulet*, *24-methylene cycloartenyl*, dan *campesteryl ferulate*. Diketahui bahwa *-oryzanol* merupakan antioksidan yang sangat kuat bahkan empat kali lebih efektif dalam menghentikan oksidasi dalam jaringan tubuh dibanding vitamin E. *-oryzanol* bekerja dengan mencegah ikatan radikal bebas (Patel dan Naik, 2004). *-oryzanol* mempunyai fungsi antioksidan karena pada struktur kimianya terdapat asam ferulat, yang termasuk antioksidan kuat (Islam *et al.*, 2011). Hasil penelitian juga menunjukkan bahwa bekatul mengandung komponen bioaktif yang tinggi seperti antioksidan senyawa fenolik (I W.R Widarta *et al.*, 2013).

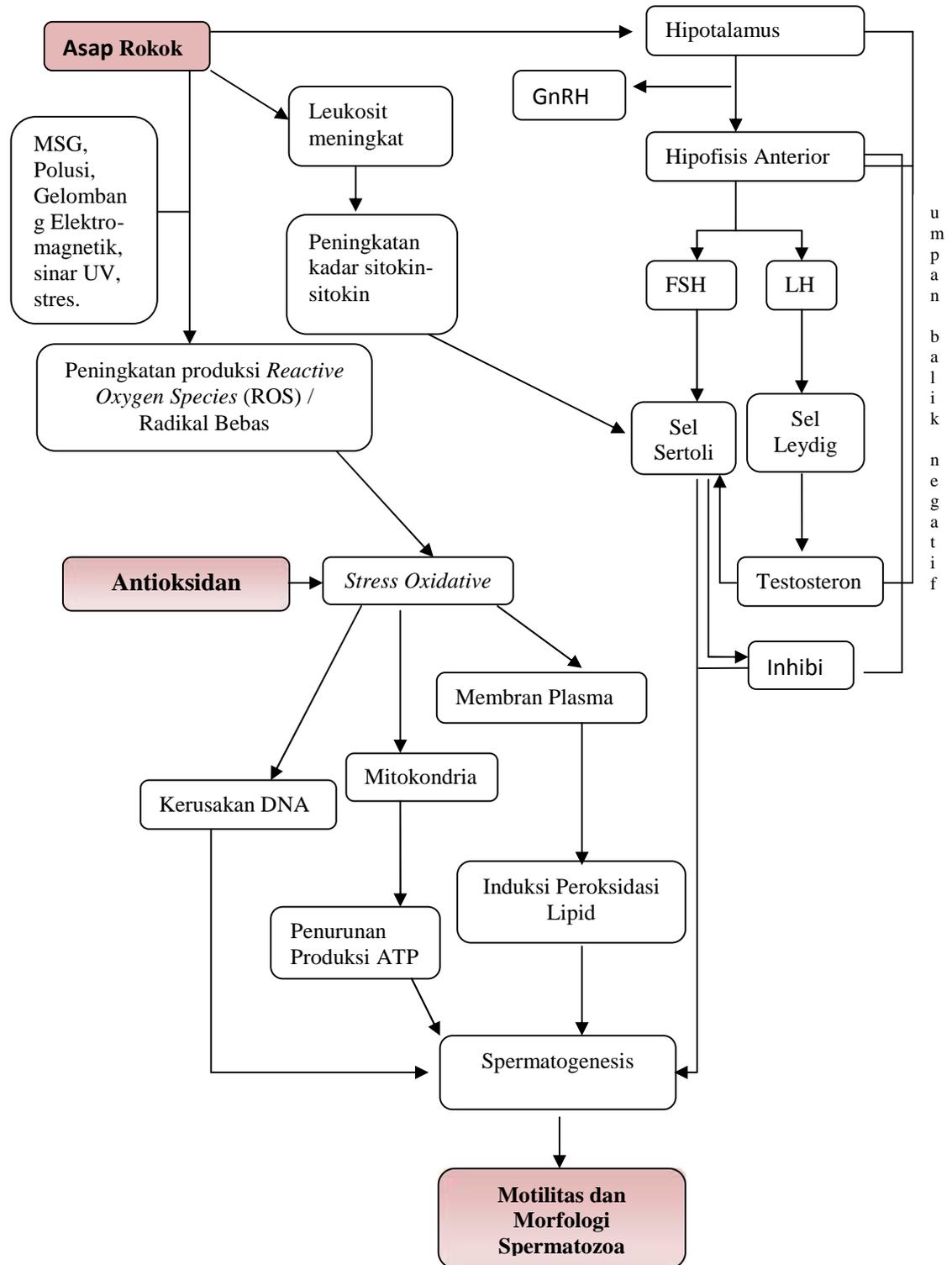


Gambar 11. Struktur tiga komponen *-oryzanol* (Patel dan Naik, 2004).

Menurut Rattanachitthawat *et al* (2010) pigmen merah pada beras merah atau antosianin dapat berperan dalam pencegahan stres oksidatif pada hewan percobaan. Adanya gugus hidroksil yang terikat pada cincin aromatis pada

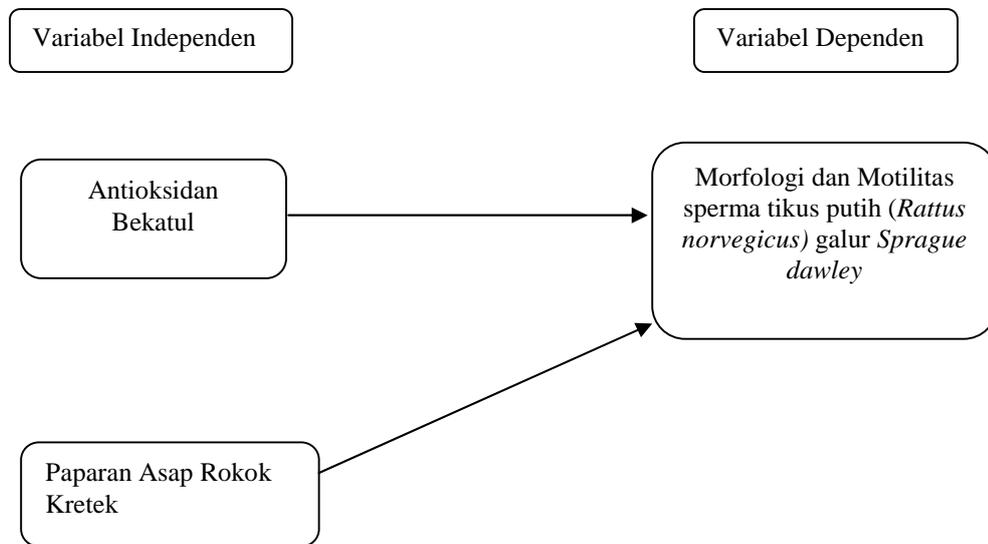
molekul senyawa fenolik dan antosianin memberikan kemampuan mendonorkan proton ke senyawa radikal sehingga dapat berperan sebagai antioksidan (Rattanachitthawat *et al.*, 2010).

## 2.7 Kerangka Teori



Gambar 12. Kerangka Teori. Pengaruh pemberian ekstrak bekatul terhadap motilitas dan morfologi spermatozoa pada tikus putih (*rattus norvegicus*) dewasa jantan galur *sprague dawley* yang diinduksi asap rokok (Agarwal et al., 2014; Apriora et al., 2015; Batubara et al., 2013; Mumpuni & Ayustaningwarno, 2013; Walczak-Jedrzejowska et al., 2013).

## 2.8 Kerangka Konsep



## 2.9 Hipotesis

Hipotesis dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol 96% bekatul beras merah dapat meningkatkan motilitas dan morfologi normal spermatozoa tikus jantan galur *Sprague dawley* yang dipaparkan asap rokok kretek.

## **BAB 3**

### **METODOLOGI PENELITIAN**

#### **3.1 Jenis dan Desain Penelitian**

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratorium dengan rancangan *Post Test Only Control Group Design*. Subjek pada penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague dawley*. Pengambilan sampel dilakukan dengan randomisasi, yaitu kelompok kontrol dan eksperimen dianggap sama sebelum dilakukannya perlakuan, sehingga pengelompokan kelompok kontrol dan eksperimen dilakukan secara acak. Pengambilan data dilakukan hanya pada akhir penelitian dengan membandingkan kelompok kontrol dan kelompok eksperimen.

#### **3.2 Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan kurang lebih selama 2 bulan (oktober-november 2017). Tempat pelaksanaan penelitian di Laboratorium *Animal House* Fakultas Kedokteran Universitas Lampung untuk tahap adaptasi dan pemberian paparan asap rokok. Terminasi, pembedahan serta pengambilan data berupa morfologi dan motilitas sperma putih (*Rattus norvegicus*) dewasa jantan galur *Sprague dawley* dilakukan di Laboratorium Biokimia dan Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Universitas Lampung.

### 3.3 Populasi dan Sampel

#### 3.3.1 Populasi

Populasi yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) dewasa jantan galur *Sprague dawley*. Usia tikus sekitar 2,5-3,5 bulan dengan berat badan kurang lebih 200-350 gram yang didapatkan dari Institut Pertanian Bogor.

#### 3.3.2 Sampel

Sampel penelitian dipilih secara acak atau *simple random sampling* dengan kriteria inklusi dan eksklusi. Sampel penelitian menggunakan tikus putih (*Rattus norvegicus*) dewasa jantan galur *Sprague dawley*. Perhitungan besar ulangan sampel menggunakan rumus Freederer, sebagai berikut :

$$(t-1) (r-1) \geq 15$$

Keterangan:

t = jumlah kelompok percobaan

r = jumlah sampel tiap kelompok

Pada penelitian ini sampel akan dibagi menjadi 5 kelompok, sehingga perhitungan ulangan sampel tiap kelompok adalah sebagai berikut:

$$(5-1) (r-1) \geq 15$$

$$4 (r-1) \geq 15$$

$$4r-4 \geq 15$$

$$4r \geq 15+4$$

$$4r \geq 19$$

$$r \geq 19/4$$

$$r = 4,75 \quad 5$$

Jadi, jumlah ulangan sampel yang digunakan di tiap kelompok sebanyak lima ekor tikus putih. Maka dibutuhkan total sampel sebanyak 25 ekor tikus. Untuk mengantisipasi adanya *drop out*, maka ditambahkan tikus dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$N = \frac{n}{1-f}$$

Keterangan:

N = besar sampel koreksi

n = jumlah sampel berdasarkan estimasi

f = perkiraan proporsi *drop out* sebesar 10%

$$N = \frac{5}{1-10\%}$$

$$N = \frac{5}{1-0,1}$$

$$N = \frac{5}{0,9}$$

$$N = 5,55 \quad 6$$

Jadi, jumlah besar sampel koreksi setiap kelompok adalah 6 ekor sehingga total seluruh tikus yang dibutuhkan pada penelitian ini untuk mengantisipasi terjadinya *drop out* sebanyak 30 ekor tikus.

### 3.3.3 Kelompok Perlakuan

Tikus sebanyak 30 ekor dibagi menjadi 5 kelompok yang masing-masing kelompok terdiri dari enam ekor tikus. Pembagian lima kelompok tikus putih sebagai berikut:

Tabel 1. Kelompok perlakuan hewan coba

| Kelompok    | Perlakuan  |
|-------------|--|
| Kelompok K1 | Tikus tidak diberikan perlakuan penelitian (paparan asap rokok dan bekatul)  |
| Kelompok K2 | Tikus diberikan paparan asap rokok sebanyak 2 batang rokok dalam 15 menit/hari selama 30 hari tanpa pemberian bekatul  |
| Kelompok P1 | Tikus diberikan paparan asap rokok sebanyak 2 batang rokok dalam 15 menit/hari selama 30 hari dan diberikan bekatul sebanyak 20 mg dalam 0,5 ml aquades per hari |
| Kelompok P2 | Tikus diberikan paparan asap rokok sebanyak 2 batang rokok dalam 15 menit/hari selama 30 hari dan diberikan bekatul sebanyak 40 mg dalam 0,5 ml aquades per hari |
| Kelompok P3 | Tikus diberikan paparan asap rokok sebanyak 2 batang rokok dalam 15 menit/hari selama 30 hari dan diberikan bekatul sebanyak 80 mg dalam 0,5 ml aquades per hari |

### 3.3.4 Kriteria Inklusi dan Eksklusi

#### 3.3.4.1 Kriteria Inklusi

- a. Tikus putih jantan galur *Sprague dawley*
- b. Berat badan 200-350 gram
- c. Umur 2,5-3,5 bulan

#### 3.3.4.2 Kriteria Eksklusi

- a. Tikus tampak sakit (tidak bergerak aktif, bulu kusam, dan rontok)
- b. Tikus mati dalam penelitian
- c. Terdapat penurunan berat badan lebih dari 10% setelah 1 minggu masa aklimatisasi

### **3.4 Variabel dan Definisi Operasional**

#### **3.4.1 Variabel Penelitian**

1. Variabel bebas (*Independent Variable*): Ekstrak bekatul dan rokok
2. Variabel Terikat (*Dependent Variable*): Morfologi dan Motilitas spermatozoa.

### 3.4.2 Definisi Operasional

| Variabel  | Definisi Operasional  | Cara Ukur  | Alat Ukur             | Hasil Ukur  | Skala Ukur |
|-----------|---|--|-----------------------|---|------------|
| Bekatul   | Bekatul yang dibuat ekstrak dengan pelarut ethanol  | K1: tidak diberi ekstrak bekatul dan paparan rokok<br>K2: tidak diberi ekstrak bekatul tetapi dipaparkan asap rokok 2 batang selama 30 hari<br>P1: diberikan ekstrak bekatul dosis 40 mg dalam 0,5 ml aquades per hari dan dipaparkan asap rokok 2 batang selama 30 hari<br>P2: diberikan ekstrak bekatul dosis 40 mg dalam 0,5 ml aquades per hari dan dipaparkan asap rokok 2 batang selama 30 hari<br>P3: diberikan ekstrak bekatul dosis 40 mg dalam 0,5 ml aquades per hari dan dipaparkan asap rokok 2 batang selama 30 hari | Sput                  | mg/ekor   | Ordinal    |
| Morfologi | Diamati bentuk spermatozoa dengan 5 lapang pandang mikroskop per 100 spermatozoa                                  | Menilai referensi normal morfologi   | Mikroskop             | Persentase spermatozoa bentuk normal  | Numerik    |
| Motilitas | Pergerakan spermatozoa yang terlihat bergerak maju ke depan yang diamati dibawah mikroskop dengan pembesaran 100x | Menilai kriteria klasifikasi motilitas spermatozoa   | Mikroskop, kalkulator | Persentase spermatozoa motil dibandingkan dengan total spermatozoa yang diamati | Numerik    |
| Rokok     | Asap rokok dipaparkan pada tiap kelompok perlakuan  | Dipaparkan sebanyak 2 batang rokok dalam 15 menit/hari selama 30 hari  | Sput,selang           | Asap rokok  | Numerik    |

### 3.5 Alat dan Bahan

#### 3.5.1 Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian adalah:

1. Neraca Elektronik
2. Kandang Tikus sebanyak 5 kandang
3. Tempat makan tikus
4. Botol minum tikus
5. Sonde lambung
6. Spuit 1 cc dan 10 cc
7. *Object* dan *cover glass*
8. Alat Bedah (pisau bedah, pinset, dan gunting bedah)
9. *Tissue*
10. *Handscoon*
11. Masker
12. Pot
13. Pipet

#### 3.5.2 Bahan

1. Rokok kretek
2. Tikus putih jantan galur *Sprague dawley*
3. Makanan tikus berupa pellet dan air minum
4. Sekam
5. Giemsa
6. NaCl 0,9%
7. Ethanol

8. Bahan-bahan untuk pengamatan pada mikroskop
9. Korek api
10. Ekstrak bekatul
11. Aquades

### **3.6 Prosedur Penelitian**

#### **3.6.1 Ethical Clearance**

Penelitian ini diajukan kepada Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Lampung dan mendapatkan *Ethical Clearance* dengan nomor: 4591/UN26.8/DL/2017 untuk melakukan penelitian menggunakan 30 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) dewasa jantan galur *sprague dawley*. Tikus akan diterminasi dengan cara *cervical dislocation*, setelah dilakukan penelitian tikus akan dimusnahkan dengan cara dikubur dalam tanah.

#### **3.6.2 Pengadaan Hewan Coba**

Hewan coba diperoleh dari Institut Pertanian Bogor (IPB) berupa tikus putih (*Rattus norvegicus*) dewasa jantan galur *sprague dawley* sebanyak 30 ekor.

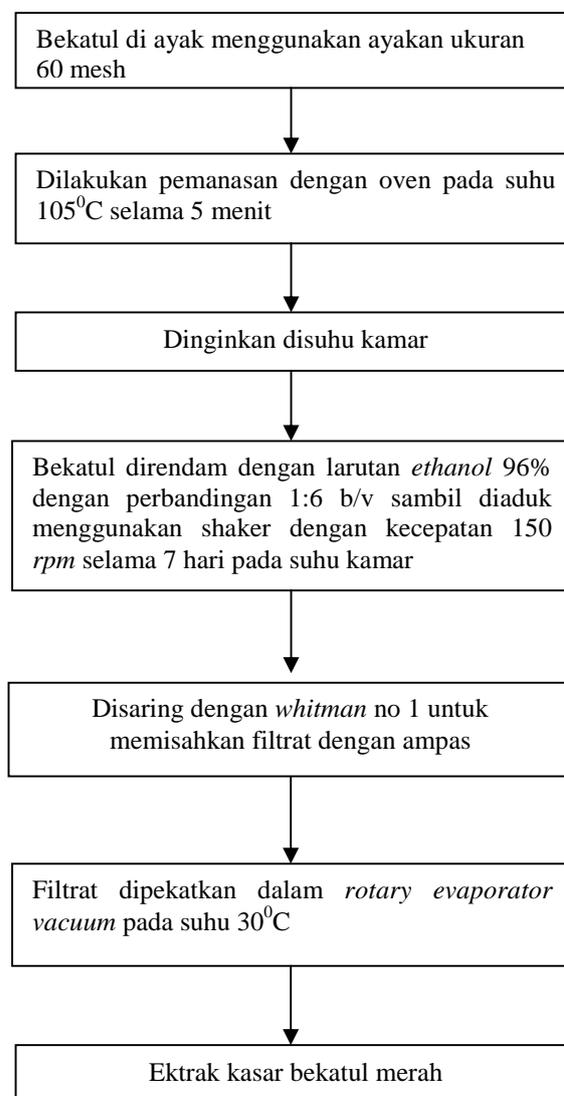
#### **3.6.3 Pemeliharaan Hewan Coba**

Hewan coba diaklimatisasi selama satu minggu untuk menyamakan cara hidup dan makanannya sebelum diberi perlakuan. Hewan coba ditempatkan dalam kandang yang terbuat dari atap kawat dan alas plastik ditutupi oleh sekam setebal 0,5-1cm dan diganti setiap 3 hari untuk mencegah terjadinya infeksi. Dalam satu kandang berisi 6 ekor

tikus putih. Suhu dijaga pada kurang lebih  $25^{\circ}\text{C}$ , lingkungan kandang dijaga agar tidak lembab dan diberikan pencahayaan yang cukup. Pemberian makanan berupa pellet dan minuman melalui *ad libitum*, diberikan secukupnya dengan wadah terpisah dan diganti setiap hari untuk menjaga kesehatan tikus agar tidak sakit atau mati (Mustofa *et al.*, 2014).

### 3.6.4 Pembuatan Ekstrak Bekatul

Proses ekstraksi sebagai berikut:



Gambar 13. Proses Ekstraksi Bekatul (I Wayan Rai Widarta, 2014)

Bekatul yang digunakan dalam penelitian ini adalah jenis beras merah yang didapatkan dari penggilingan padi di serang, Banten. Proses pembuatan ekstrak bekatul dilakukan di Fakultas Pertanian Program Studi Teknik Hasil Pertanian dengan cara maserasi. Ekstraksi bekatul menggunakan pelarut ethanol 96% yang dapat menghasilkan aktivitas antioksidan tinggi dan pelarut bersifat tidak toksik (I W.R Widarta *et al.*, 2013). Awal perlakuan dilakukam pemanasan pada suhu 105<sup>0</sup> selama 5 menit, hal ini bertujuan untuk menginaktivasi lipase yang dapat menyebabkan bekatul mudah tengik (I Wayan Rai Widarta & Arnata, 2014).

### 3.6.5 Pemberian dan Perhitungan Dosis Ekstrak Bekatul

Dosis penelitian ini mengacu pada penelitian oleh laili (2016). Hasil penelitian laili (2016) menunjukkan penggunaan ekstrak bekatul dosis 200 mg/kg BB paling berpengaruh meningkatkan TAS tikus jantan galur wistar yang diinduksi MSG (Laili, 2016). Maka penelitian ini menggunakan dosis ekstrak bekatul sebagai berikut:

Dosis perlakuan I (P1):  $\frac{1}{2}n$

$$\frac{1}{2} \times 200 \text{ mg/kgBB} = 100 \text{ mg/kgBB}$$

Maka dengan berat tikus 200 mg:  $100\text{mg/kgBB} \times 0,2 \text{ kg} = 20 \text{ mg}$

Dosis perlakuan II (P2): n

$$n = 200 \text{ mg/kgBB}$$

Maka dengan berat tikus 200 mg:  $200\text{mg/kgBB} \times 0,2 \text{ kg} = 40 \text{ mg}$

Dosis perlakuan III (P3): 2n

$$2n = 2 \times 200 \text{ mg/kgBB} = 400 \text{ mg/kgBB}$$

$$\text{Maka dengan berat tikus } 200 \text{ mg: } 400\text{mg/kgBB} \times 0,2 \text{ kg} = 80 \text{ mg}$$

Jadi total ekstrak bekatul selama penelitian untuk tikus dengan berat badan 200 gram adalah sebagai berikut:

$$\text{Dosis 1 ekstrak bekatul: } 20 \text{ mg} \times 6 \times 30 = 3600 \text{ mg}$$

$$\text{Dosis 2 ekstrak bekatul: } 40 \text{ mg} \times 6 \times 30 = 7200 \text{ mg}$$

$$\underline{\text{Dosis 3 ekstrak bekatul: } 80 \text{ mg} \times 6 \times 30 = 14400 \text{ mg}}$$

$$\text{Total} = 25200 \text{ mg}$$

Dalam 1kg bekatul didapatkan ekstrak bekatul sebesar 31,197 gram. (Laili, 2016). Dari total ekstrak bekatul yang dibutuhkan sebesar 25.200 mg atau 25,2 gram, maka dapat dihitung banyaknya bekatul yang akan diekstraksi yaitu:

$$\frac{1000}{X} = \frac{31,197}{25,2}$$

$$X = \frac{25,2 \times 1000}{31,197}$$

$$X = 807,76 \text{ gram}$$

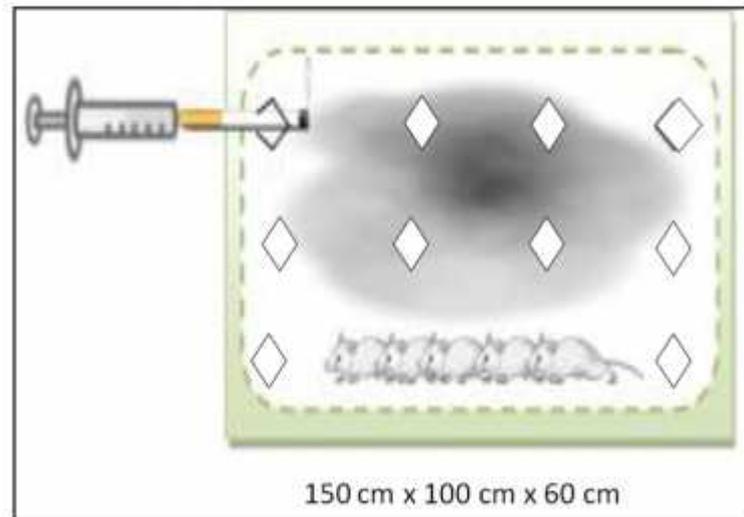
$$X = 807,76 \text{ gram}$$

$$X = 807,76 \text{ gram}$$

Sehingga dosis yang digunakan pada penelitian ini adalah 20 mg, 40 mg, dan 80 mg. Total ekstrak yang dibutuhkan adalah 25,2 gram yang didapat dari 807,76 gram bekatul. Ekstrak bekatul diberikan pada tikus dengan menggunakan sonde lambung. Diberikan setiap pagi hari setelah diberikan paparan asap rokok.

### 3.6.6 Pemaparan Asap Rokok

Rokok yang dipakai pada penelitian ini adalah rokok kretek. Pemaparan asap rokok dilakukan dalam *smoking chamber* didesain dengan dua lubang yaitu untuk dihubungkan dengan *air pump* disatu sisi dan disisi lain untuk sirkulasi udara. *Air pump* menggunakan spuit 10cc dan dihubungkan dengan selang karet sepanjang 4 cm yang akan dimasukkan ke lubang sebagai penghantar asap ke dalam *smoking chamber* (Fitriana *et al.*, 2014). Dari penelitian sebelumnya yang telah dilakukan oleh Kardi (2015) didapatkan bahwa pemaparan dengan 2 batang rokok/hari dapat menyebabkan kerusakan pada spermatosit (Kardi, 2015) dan pemaparan asap rokok selama kurang lebih 15 menit per hari selama 30 hari sudah membuat motilitas dan morfologi spermatozoa berkurang (Batubara *et al.*, 2013). Oleh sebab itu, penelitian ini akan menggunakan 2 batang rokok kretek per hari selama 30 hari. Pemaparan dilakukan dengan interval 15 menit pada semua kelompok perlakuan (P1, P2, P3). Pemaparan dilakukan hingga 2 batang rokok habis.



Gambar 14. Pemaparan Asap Rokok (Fitriana *et al.*, 2014).

### 3.6.7 Proses Pembedahan

Setelah 30 hari perlakuan, dilakukan pembedahan pada hewan coba. Sebelum dilakukan proses pembedahan, tikus diterminasi dahulu dengan cara dislokasi leher. Kemudian dibedah menggunakan alat bedah. Setelah dilakukan penelitian tikus akan dimusnahkan dengan cara dikubur dalam tanah.

### 3.6.8 Pengambilan dan Pengamatan Spermatozoa

Pada proses pembedahan diambil bagian testis beserta epididimis kemudian dimasukkan ke dalam petri dis berisi NaCl 0,9%, insisi pada bagian kauda epididimis dan dihomogenkan. Suspensi yang diperoleh dapat digunakan untuk pengamatan yang meliputi motilitas dan morfologi spermatozoa (Fibullah, Sutyarso, Busman, Rahmanisa, 2015).

### 1. Pengamatan Motilitas Spermatozoa

Diambil 0,05 ml cairan NaCl yang sudah tercampur semen lalu ditetaskan pada objek gelas yang ditutup oleh cover gelas kemudian diamati bentuk spermatozoa yang bergerak progresif secara objektif dibawah mikroskop pada 5 lapangan pandang dengan pembesaran mikroskop 40x, motilitas spermatozoa diukur dalam bentuk persen (%). Motilitas dihitung dengan membandingkan spermatozoa yang pergerakannya progresif ke depan (kriteria A) dengan seluruh yang teramati (bergerak dan tidak bergerak) kemudian dikalikan dengan 100%.

$$\% \text{ motilitas} = \frac{\text{Jumlah spermatozoa bergerak (n)}}{\text{Total spermatozoa yang diamati (N)}} \times 100\%$$

Tabel 2. Kriteria motilitas sperma

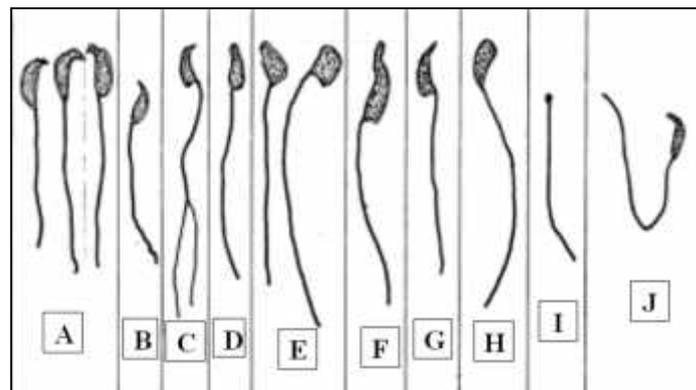
| Kriteria | Keterangan  |
|----------|---|
| A        | Maju lurus cepat seperti peluru                       |
| B        | Maju lurus lambat, maju melengkung, maju bergelombang |
| C        | Menggerakkan ekor tapi tetap ditempat                 |
| D        | Diam  |

### 2. Pengamatan Morfologi Spermatozoa

Terlebih dahulu membuat preparat hapusan sperma dengan meneteskan sperma pada objek gelas dan diratakan sehingga menjadi apusan tipis. Kemudian keringkan kira-kira 5 menit. Setelah kering, kemudian fiksasi menggunakan larutan eter alkohol (1:1) selama 5 menit. Kemudian diwarnai dengan larutan giemsa (yang telah diencerkan 1:50) selama 30 menit. Preparat dibilas dengan aquades dan dikeringkan. Selanjutnya

melihat di bawah mikroskop dengan pembesaran objectif 100x (menggunakan minyak emersi). Dihitung dalam 5 lapangan pandang, ditentukan presentase normal dan abnormal. dikatakan normal jika ditemukan 30% bentuk normal.

Ciri morfologi spermatozoa normal yaitu memiliki bentuk kepala seperti kait pancing dan ekor panjang. Morfologi abnormal diantaranya bentuk kepala tidak beraturan (amorphous), terlalu bengkok, bercabang, terlalu besar atau kecil, ekor tidak lurus bahkan tidak berekor atau hanya terdapat ekor tanpa kepala.



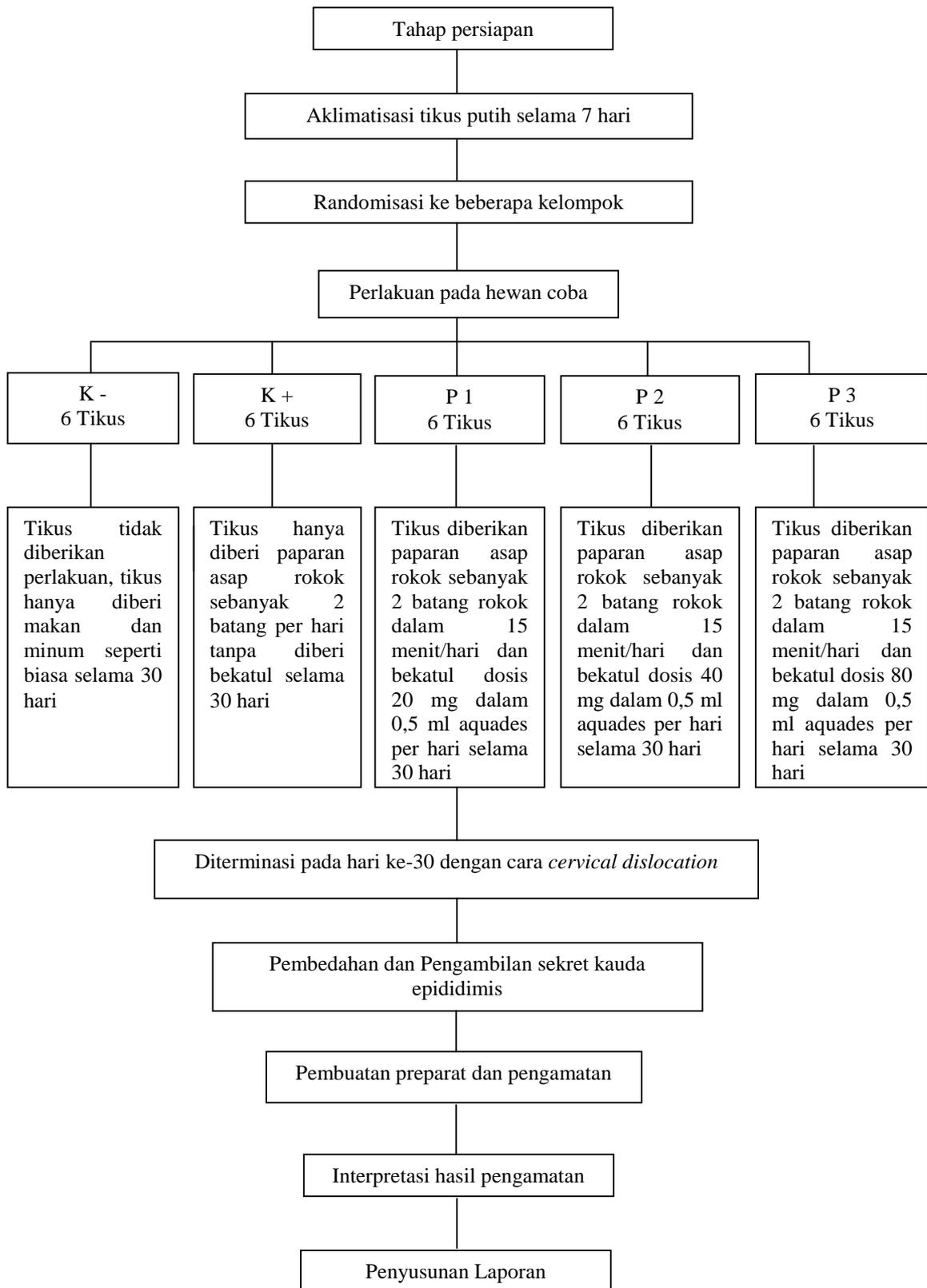
Gambar 15. Morfologi Spermatozoa Normal dan Abnormal. (A) Spermatozoa normal; (B – J) Sperma abnormal. (B) Tidak ada kait; (C) Ekor ganda; (D) kepala berbentuk pentul; (E) Kepala tidak beraturan; (F) dan (G) kait bengkok ke belakang; (H) Ekor melengkung ke belakang kepala; (I) Tidak ada kepala; (J) ekor terlalu bengkok (Kumar & A.B, 2011).

### 3.7 Analisis Data

Analisis data menggunakan program IBM SPSS. Data hasil penelitian diuji normalitasnya menggunakan uji normalitas *Shapiro-Wilk* (jumlah sampel kurang dari atau sama dengan 50) untuk melihat kenormalan distribusi data

(normal bila  $p$  lebih dari 0,05). Selanjutnya dilakukan uji homogenitas dengan *Levene's Test*, untuk mengetahui apakah variabel kehomogenan antar kelompok (Homogen jika  $p$  lebih dari 0,05). Untuk mengetahui efek pemberian ekstrak bekatul, maka dibandingkan morfologi dan rerata motilitas spermatozoa post-test antara kelompok kontrol dan perlakuan. Jika data berdistribusi normal dan homogen maka digunakan uji parametrik berupa uji *One Way Anova* atau jika data tidak berdistribusi normal memakai analisis *Kruskal-Wallis*. Hipotesis dianggap bermakna jika  $p$  kurang dari 0,05. Jika hasilnya bermakna ( $p$  kurang dari 0,05), uji *One Way Anova* akan dilanjutkan dengan uji *Post Hoc* dan uji *Kruskal-Wallis* akan dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney* untuk melihat perbedaan antar kelompok (Dahlan, 2015).

### 3.8 Alur Penelitian



Gambar 16. Diagram Alur Penelitian

## **BAB 5**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **5.1 Kesimpulan**

1. Pemberian ekstrak etanol 96% bekatul beras merah berpengaruh terhadap peningkatan motilitas spermatozoa tikus jantan galur *Sprague dawley* yang diinduksi asap rokok. Dosis 20 mg ekstrak bekatul sudah dapat meningkatkan motilitas spermatozoa.
2. Pemberian ekstrak etanol 96% bekatul beras merah berpengaruh terhadap peningkatan morfologi normal spermatozoa tikus jantan galur *Sprague dawley* yang diinduksi asap rokok. Dosis 20 mg ekstrak bekatul sudah dapat meningkatkan morfologi normal spermatozoa.

#### **5.2 Saran**

1. Bagi peneliti selanjutnya diharapkan dapat melanjutkan penelitian dengan menggunakan dosis ekstrak bekatul yang berbeda.
2. Bagi peneliti selanjutnya dapat melakukan induksi dengan paparan asap rokok dalam jumlah yang lebih sedikit atau durasi yang lebih singkat.

## DAFTAR PUSTAKA

- Agarwal A, Virk G, Ong C, Plessis SS. 2014. Effect of oxidative stress on male reproduction. *The World Journal of Men's Health*. 32(1): 1–17.
- Ahmad H, Restadiamawati. 2014. Pengaruh merokok terhadap frekuensi pembentukan mikronukleus pada mukosa mulut. *Medica Hospitalia*. 2(2):84–7.
- Akbar B. 2010. Tumbuhan dengan kandungan senyawa aktif yang berpotensi sebagai bahan antifertilitas. Edisi ke-1. Jakarta: Adabia Press.
- Aprioku JS. 2013. Pharmacology of free radicals and the impact of reactive oxygen species on the testis. *Journal of Reproduction and Infertility*. 14(4): 158–72.
- Apriora VD, Amir A, Khairisyaf O. 2015. Gambaran morfologi spermatozoa pada perokok sedang di lingkungan pe group yang datang ke bagian biologi fakultas kedokteran universitas andalas. *Jurnal Kesehatan Andalas*. 4(2): 425–9.
- Aryoseto L. 2009. Hubungan antara jumlah leukosit dengan morfologi spermatozoa pada pasien infertilitas di Rumah Sakit Dokter Kariadi [Skripsi]. Semarang: Universitas Diponegoro.
- Balasaheb S, Pal D. 2015. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Advances*. 5(35): 27986–92.
- Batubara IVD, Wantouw B, Tendean L. 2013. Pengaruh Paparan Asap Rokok Kretek Terhadap Kualitas Spermatozoa Mencit Jantan (Mus Mus. E-Biomedik. 1(1): 330–7.
- Dahlan MS. 2015. Statistik untuk kedokteran dan kesehatan. Edisi ke-6. Jakarta: Epidemiologi Indonesia.
- Fibullah RM, Sutyarso, Busman H, Rahmanisa S. 2015. Efek kuratif pemberian jus buah naga putih (*hylocereus undatus*) terhadap motilitas, jumlah, dan morfologi spermatozoa tikus putih (*rattus norvegicus*) jantan galur sprague dawley yang diinduksi siproteron asetat. *Majority Unila*. 9(4):40-6.

- Fitriana R, Sutyarso, Susantiningih T. 2014. The effect of red ginger ethanol extract (*zingiber officinale roxb var rubrum*) on sperm motility and morphology of cigarette smoke-induced male rats (*rattus norvegicus*) sprague dawley strains. *Majority*. 3(2):154–63.
- Flaherty CO. 2014. The enzymatic antioxidant system of human spermatozoa. *Advances in andrology*. 2014: 1-5
- Herdis, Kusuma I, D IWA. 2009. sperma domba: penambahan tokoferol pada pengencer tris sperma domba garut. *Jurnal Sains Dan Teknologi Indonesia*. 11(3): 175–80.
- HIFERI, PERFITRI, IAUI, POGI. 2013. *Konsensus Penanganan Infertilitas*. Jakarta: Himpunan Endokrinologi Reproduksi dan Fertilitas Indonesia, Perhimpunan Fertilitas In Vitro Indonesia, Ikatan Ahli Urologi Indonesia, Perkumpulan Obstetri dan Ginekologi Indonesia.
- Islam MS, Nagasaka R, Ohara K, Hosoya T, Ozaki H, Ushio H, Hori M. 2011. Biological abilities of rice bran-derived antioxidant phytochemicals for medical therapy. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 11(14):1847–53.
- Kardi. 2015. Pemberian glutathion pada mencit jantan dewasa yang terpapar asap rokok dapat meningkatkan motilitas progresif spermatozoa [Disertasi]. Bali: Universitas Udayana.
- Kemenkes RI. 2012. *Data dan informasi kesehatan penyakit tidak menular*. Jakarta: Kementerian Kesehatan Republik Indonesia.
- Kemenkes RI. 2013. *Riset kesehatan dasar*. Jakarta: Kementerian Kesehatan Republik Indonesia.
- Kemenkes RI. 2015. *Perilaku merokok masyarakat indonesia*. Jakarta: Kementerian Kesehatan Republik Indonesia.
- Kumar KABR. 2011. A review on male fertility. *Hygeia Journal For Drugs and Medicines*. 3(1): 20–8.
- Kusbiantoro B, Rakhmi AT. 2007. Review : gamma oryzanol potensi tersembunyi dalam produk samping padi. *Balai Besar Penelitian Tanaman Padi*. 1(1): 165–70.
- Kusumastuti. 2015. *Morfologi normal spermatozoa mencit (mus musculus L) jantan yang dipaparkan asap rokok setelah pemberian vitamin E [Skripsi]*. Lampung: Universitas Lampung.
- Laili HN. 2016. *Pengaruh ekstrak bekatul terhadap peningkatan total antioxidant status (TAS) pada tikus yang diinduksi MSG [Skripsi]*. Semarang: Universitas Sultan Agung.

- Mulyono A. 2015. Pembuatan biofilter berbahan kurma, zaitun, delima, tembakau, kopi, dan daun kelor sebagai penyerap radikal bebas asap rokok dan pengaruhnya terhadap organ hati, pari-paru, dan viskositas darah pada mencit [Skripsi]. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Mumpuni PD, Ayustaningwarno F. 2013. Analisis kadar tokoferol,  $\gamma$ -oryzanol, dan b-karoten serta aktivitas antioksidan minyak bekatul kasar. *Journal of Nutrition College*. 2(3): 350–7.
- Mustofa S, Anindito AA, Pratiwi A, Putri AA, Maulana M. 2014. The influence of piper retrofractum vahl (java's chili) extract towards lipid profile and histology of rats coronary artery with high-fat diet. *Juke unila*. 7(4):52-9.
- Patel M, Naik SN. 2004. Gamma-oryzanol from rice bran oil - areview. *Journal of Scientific and Industrial Research*. 63(7):569–78.
- Polyzos A, Schmid TEPG, Vega BQ, Marchetti F. 2009. Differential sensitivity of male germ cells to mainstream and sidestream tobacco smoke in the mouse. *Lawrence Berkeley National Laboratory*. 1(1): 1–34.
- Quratul'ainy S. 2006. Pengaruh pemberian vitamin E terhadap jumlah spermatozoa mencit jantan strain balb/c yang diberi paparan asap rokok [Skripsi]. Semarang: Universitas Diponegoro.
- Ramlau-Hansen CH, Thulstrup AM, Aggerholm AS, Jensen MS, Toft G, Bonde JP. 2007. Is smoking a risk factor for decreased semen quality? a cross-sectional analysis. *Human Reproduction*. 22(1): 188–96.
- Rattanachitthawat S, Suwannalert P, Riengrojpitak S, Chaiyasut C, Pantuwatana S. 2010. Phenolic content and antioxidant activities in red unpolished thai rice prevents oxidative stress in rats. *Journal of Medicinal Plants Research*. 4(9): 796–801.
- Sabeti P, Pourmasumi S, Rahiminia T, Akyash F, Talebi A. 2016. Etiologies of sperm oxidative stress. *Int J Reprod BioMed*. 14(4):231–40.
- Sayuti K, Yenrina R. 2015. Antioksidan alami dan sintetik. Edisi ke-1. Padang: Andalas University Press.
- Sherwood L. 2011. Fisiologi manusia dari sel ke sistem. edisi ke-6. Jakarta: EGC.
- Sukohar A, Sastramihardja HS. 2012. Antioksidan ekstrak air biji kopi robusta lampung dalam menghambat degenerasi sel hati tikus model hepatitis yang diinduksi ccl4. 44(3):127-32.
- Sunaryo T. 2013. Kretek pusaka nusantara. Edisi ke-1. Jakarta: SAKTI.

- Talevi R, Barbato V, Fiorentino I, Braun S, Longobardi S, Gualtieri R. 2013. Protective effects of in vitro treatment with zinc, d-aspartate and coenzyme q10 on human sperm motility, lipid peroxidation and DNA fragmentation. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 11(1): 1.
- Walczak-Jedrzejowska R, Wolski JK, Slowikowska-Hilczer J. 2013. The role of oxidative stress and antioxidants in male fertility. *Central European Journal of Urology*. 66(1):60–7.
- WHO. 2012. Global adult tobacco survey: Indonesia Report 2011. Jakarta: National Institute of Health Research and Development Ministry of Health.
- WHO. 2014. Global Youth Tobacco Survey 2014. Jakarta: National Institute of Health Research and Development Ministry of Health.
- Widarta IW, Nocianitri KA, Sari LPIP. 2013. Ekstraksi komponen bioaktif bekatul beras lokal dengan beberapa jenis pelarut. *Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan*. 2(2):75–9.
- Widarta IWR. 2014. Stabilitas aktivitas antioksidan ekstrak bekatul beras merah terhadap oksidator dan pemanasan pada berbagai pH. *Jurnal Teknologi Dan Industri Pangan*. 25(2):193–9.
- Widodo FT. 2006. Hubungan antara jumlah leukosit dengan motilitas sperma pada hasil analisa sperma pasien infertilitas di RSUP Dr Kariadi Semarang [Skripsi]. Semarang: Universitas Diponegoro.
- Wooten JB, Chouchane S, Mcgrath TE. 2006. Tobacco smoke constituents affecting oxidative stress. In Halliwell BB, Poulsen HE editors. *Cigarette smoke and oxidative stress*. Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.