

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL 96% BEKATUL BERAS
MERAH (*Oryza nivara*) TERHADAP JUMLAH RERATA SPERMATOSIT
PRIMER DAN KETEBALAN TUBULUS SEMINIFERUS TIKUS
PUTIH JANTAN GALUR *Sprague dawley* YANG
TERPAPAR ASAP ROKOK KRETEK**

(Skripsi)

Oleh
Nandya Dwizella



**UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2018**

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL 96% BEKATUL BERAS
MERAH (*Oryza nivara*) TERHADAP JUMLAH RERATA SPERMATOSIT
PRIMER DAN KETEBALAN TUBULUS SEMINIFERUS TIKUS
PUTIH JANTAN GALUR *Sprague dawley* YANG
TERPAPAR ASAP ROKOK KRETEK**

Oleh

Nandya Dwizella

Skripsi

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Lulus Sarjana Kedokteran

Pada

**Fakultas Kedokteran
Universitas Lampung**



**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2018**

ABSTRACT

THE EFFECT 96% ETHANOL EXTRACT OF RED RICE BRAN (*Oryza nivara*) TO MEAN PRIMARY SPERMATOCYTE COUNT AND SEMINIFEROUS TUBULE THICKNESS MALE WHITE RATS (*Sprague dawley*) EXPOSURE WITH KRETEK CIGARETTE SMOKE

BY

NANDYA DWIZELLA

Background: Smoking is a habit for adolescents and adults who can increase infertility. Cigarettes is one source of exogenous free radicals that cause oxidative stress in the body. Rice bran is an antioxidant that can inhibit the occurrence of oxidative stress.

Methods: The experimental study with 25 rats divided into 5 groups, there are K (-) not treated, K (+) exposure to cigarette smoke, P1 exposed to cigarette smoke and 96% ethanol extract of red rice bran dose 100 mg / KgBB, P2 exposure to cigarette smoke and 96% ethanol extract of red rice bran dose 200 mg / KgBB and P3 exposure to cigarette smoke and 96% ethanol extract of red rice bekatul dose 400 mg / KgBB. Treatment was carried out for 30 days. Data were analyzed by *One Way Anova* test.

Result: The result showed that there was an effect of 96% ethanol extract of red rice bran on the mean of primary spermatocyte amount and seminiferous tubule thickness. ($p=0,00$). The mean number of primary K(-), K(+), P1, P2 and P3 were $113,6\pm 47$; $50,7\pm 5,0$; $112,7\pm 9,4$; $107,3\pm 5,6$; $109,4\pm 5,3$. The thickness from seminiferous tubule K(-), K(+), P1, P2 and P3 were $249,9\pm 12,5$; $209,7\pm 6,3$; $244,8\pm 19,3$; $246,8\pm 11,2$; $239,5\pm 5,9$.

Conclusion : 96% ethanol extract of red rice bran has an effect to prevent decrease mean number of primary spermatocytes and prevent decrease tubule seminiferous thickness of white mouse exposed to cigarette smoke.

Key word: Free radicals, Cigarette, Rice bran extract, Testes

ABSTRAK

PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL 96% BEKATUL BERAS MERAH (*Oryza nivara*) TERHADAP JUMLAH RERATA SPERMATOSIT PRIMER DAN KETEBALAN TUBULUS SEMINIFERUS TIKUS PUTIH JANTAN GALUR *Sprague dawley* YANG TERPAPAR ASAP ROKOK KRETEK

Oleh

NANDYA DWIZELLA

Latar Belakang: Merokok menjadi kebiasaan bagi remaja maupun dewasa yang dapat meningkatkan infertilitas. Rokok merupakan salah satu sumber radikal bebas eksogen yang mengakibatkan stres oksidatif dalam tubuh. Bekatul beras merah merupakan antioksidan yang dapat menghambat terjadinya stres oksidatif.

Metode: Penelitian eksperimental dengan menggunakan 25 ekor tikus dibagi dalam 5 kelompok yaitu K(-) tidak diberi perlakuan, K(+) diberi paparan asap rokok, P1 diberi paparan asap rokok dan ekstrak etanol 96% bekatul beras merah dosis 100 mg/KgBB, P2 diberi paparan asap rokok dan ekstrak etanol 96% bekatul beras merah dosis 200 mg/KgBB dan P3 diberi paparan asap rokok dan ekstrak etanol 96% bekatul beras merah dosis 400 mg/KgBB. Perlakuan dilakukan selama 30 hari. Data dianalisis dengan uji *One Way* Anova.

Hasil: Hasil menunjukkan terdapat pengaruh pemberian ekstrak etanol 96% bekatul beras merah terhadap jumlah rerata spermatis primer dan ketebalan tubulus seminiferus ($p=0,00$). Jumlah rerata spermatis primer K(-), K(+), P1, P2 dan P3 adalah $113,6\pm 47$; $50,7\pm 5,0$; $112,7\pm 9,4$; $107,3\pm 5,6$; $109,4\pm 5,3$. Sedangkan ketebalan tubulus seminiferus pada K(-), K(+), P1, P2 dan P3 adalah $249,9\pm 12,5$; $209,7\pm 6,3$; $244,8\pm 19,3$; $246,8\pm 11,2$; $239,5\pm 5,9$.

Kesimpulan: Ekstrak etanol 96% bekatul beras merah berpengaruh dalam mencegah penurunan jumlah rerata spermatis primer dan mencegah penurunan ketebalan tubulus seminiferus tikus putih yang dipapar asap rokok.

Kata Kunci: Radikal bebas, Rokok, Ekstrak bekatul, Testis

Judul Skripsi : **PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL 96% BEKATUL BERAS MERAH (*Oryza nivara*) TERHADAP JUMLAH RERATA SPERMATOSIT PRIMER DAN KETEBALAN TUBULUS SEMINIFERUS TIKUS PUTIH JANTAN GALUR *Sprague dawley* YANG TERPAPAR ASAP ROKOK KRETEK**

Nama Mahasiswa : Nandya Dwizella

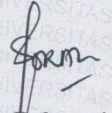
No. Pokok Mahasiswa : 1418011144

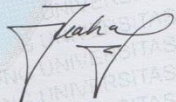
Program Studi : Pendidikan Dokter

Fakultas : Kedokteran



MENYETUJUI
1. Komisi Pembimbing


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


dr. Ratna Dewi Puspitasari Sp. OG
NIP 198004152014042001

MENGETAHUI

2. Dekan Fakultas Kedokteran

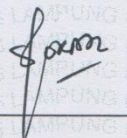


Dr. dr. Muhartono, S.Ked, M.Kes, Sp.PA
NIP. 19701208 200112 1 001

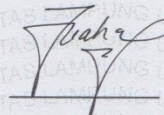
MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

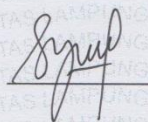
Ketua : Soraya Rahmanisa, S. Si, M.Sc



Sekretaris : dr. Ratna Dewi Puspitasari Sp. OG



**Penguji
Bukan Pembimbing** : dr. Syazili Mustafa S.Ked, M. Biomed



2. Dekan Fakultas Kedokteran



Dr. dr. Muhtarono, S.Ked, M.Kes, Sp.PA
NIP. 19701208 200112 1 001



Tanggal Lulus Ujian Skripsi : 25 Januari 2018

LEMBAR PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan dengan sebenarnya bahwa:

1. Skripsi dengan judul "PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL 96% BEKATUL BERAS MERAH (*Oryza nivara*) TERHADAP JUMLAH RERATA SPERMATOSIT PRIMER DAN KETEBALAN TUBULUS SEMINIFERUS TIKUS PUTIH JANTAN GALUR *Sprague dawley* YANG TERPAPAR ASAP ROKOK KRETEK" adalah hasil karya saya sendiri dan tidak melakukan penjiplakan atas karya penulis lain dengan cara tidak sesuai etika ilmiah yang berlaku dalam masyarakat akademik atau yang disebut plagiarisme.
2. Hak intelektualitas atas karya ilmiah ini diserahkan sepenuhnya kepada Universitas Lampung.

Atas Pernyataan ini, apabila dikemudian hari ditemukan adanya ketidakbenaran, saya bersedia menanggung akibat dan sanksi yang diberikan kepada saya.

Bandar Lampung, Januari 2018

Pembuat Pernyataan



Nandya Dwizella

RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan di Bandar Lampung pada tanggal 06 Maret 1996, sebagai anak kedua dari dua bersaudara. Penulis merupakan anak dari Bapak Nolly Djoddy S dan Ibu Melly Elistaria A .

Pendidikan Taman kanak-kanak ditempuh selama tiga tahun dan diselesaikan pada tahun 2002. Pendidikan Sekolah Dasar penulis dijalani di SD Xaverius Teluk Betung Bandar Lampung dan diselesaikan pada tahun 2008. Pendidikan dilanjutkan di Sekolah Menengah Pertama (SMP) Xaverius Teluk serta dapat diselesaikan pada tahun 2011. Sekolah Menengah Atas (SMA) diselesaikan di SMA Xaverius Bandar Lampung pada tahun 2014.

Pada tahun 2014, penulis terdaftar sebagai mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Lampung melalui jalur Seleksi Nasional Masuk Perguruan Tinggi Negeri (SNMPTN). Selama aktif menjadi mahasiswa, penulis mengikuti beberapa kegiatan organisasi yang terdapat di Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Penulis tercatat sebagai Anggota tetap PMPATD Pakis Rescue Team Fakultas Kedokteran Universitas Lampung pada tahun 2014 dst. Selain itu, penulis juga menjadi staf infokom Perhimpunan Tim Bantuan Medis Mahasiswa Kedokteran Indonesia (PTBMMKI) tahun 2015/2016 dan menjadi kastaf

infokom PTBMMKI tahun 2016/2017. Selain itu, penulis juga merupakan salah satu anggota tim Asisten Dosen Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung.

SANWACANA

Puji serta syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT yang telah memberikan rahmat serta karunia-Nya selama pelaksanaan penyusunan skripsi ini hingga skripsi dengan judul “Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol 96% Bekatul Beras Merah terhadap Jumlah Rerata Spermatisit Primer dan Ketebalan Tubulus Seminiferus Tikus Putih Galur *Sprague dawley* yang Terpapar Asap Rokok Kretek” dapat diselesaikan.

Selama proses penulisan skripsi ini, penulis mendapatkan banyak sekali bantuan, saran, bimbingan, masukan, serta kritikan dari berbagai pihak. Pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan rasa terima kasih yang mendalam kepada:

1. 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 Universitas Lampung;
3. Ibu Soraya Rahmanisa, S.Si, M. Sc selaku Pembimbing Utama yang telah meluangkan waktu, memberikan bimbingan, ilmu, nasihat, saran, motivasi, hingga kritik yang dapat membangun kami selama penyusunan skripsi ini;
4. dr. Ratna Dewi Puspitasari Sp. OG selaku Pembimbing Kedua yang telah bersedia meluangkan waktu, memberikan bimbingan, ilmu, nasihat, saran,

motivasi serta selalu memberikan catatan pengingat dalam penulisan skripsi ini;

5. dr. Syazili Mustofa S.Ked, M. Biomed selaku Penguji Utama (Pembahas) yang telah meluangkan waktu, memberikan saran, ilmu, nasihat serta kritik yang dapat membangun dalam penyusunan skripsi ini;
6. dr. A. Fauzi, M. Kes (Epid), Sp. OT., sebagai Pembimbing Akademik semester 1 hingga semester 6, yang telah memberikan bimbingan, saran serta ilmu yang telah bermanfaat selama ini;
7. dr. Syazili Mustofa S. Ked, M. Biomed, sebagai Pembimbing Akademik semester 7, yang telah memberikan bimbingan, saran serta ilmu yang telah bermanfaat selama ini;
8. Terima kasih kepada Ibu Nuriah dan Mbak Yani, atas seluruh bantuan dan bimbingan kepada saya dan tim selama di Laboratorium Biomol Fakultas Kedokteran Universitas Lampung;
9. Terima kasih kepada Mas Bayu atas seluruh bantuan dan bimbingan kepada saya dan tim selama di Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung;
10. Seluruh staf dosen dan civitas akademika Fakultas Kedokteran Universitas Lampung atas ilmu dan waktu yang telah diberikan selama perkuliahan;
11. Terima kasih untuk Mama (Melly Elistaria S.E) dan Papa (Nolly Djoddy S.E Bsc) yang telah memberikan segala kasih sayang, perhatian, dukungan, nasihat serta setiap doa yang telah diberikan untuk anak-anaknya. Terima kasih telah menjadi motivasi terbesar dan memberikan bekal berharga untukku, Semoga Allah SWT selalu memberikan kebahagiaan dunia dan

akhirat bagi Papa dan Mama.

12. Terima kasih kepada kakakku (dr. Nevristia Pratama) atas doa, dukungan, motivasi, konsultasi dan semangat yang telah diberikan selama ini;
13. Terima kasih kepada nenekku (Emalia) yang telah memberikan segala kasih sayang, perhatian, dukungan, nasihat serta setiap doa yang telah diberikan untuk cucu-cucu nya.
14. Terima kasih kepada sahabatku, teman seperjuangan, Ulima, Tassya, Elma, Itong, Dinah, Tiwi, Yoan, Kadina, Dirga, Rahman, Juju dan Fadlan atas segala doa, perhatian, dukungan, perjuangan dan semangat yang telah diberikan selama ini;
15. Terima kasih untuk Naufal Rafif Putranta atas segala motivasi, bantuan serta dukungan serta semangat dalam menempuh pendidikan di Fakultas Kedokteran ini;
16. Terima kasih untuk tim penelitianku terkasih, Ocsi, Leni dan Nana atas doa, dukungan, tenaga, kebersamaan, dan kerjasama selama ini;
17. Keluarga besar Asisten Dosen Histologi 2014-2016 atas dukungan, kerjasama dan kebersamaannya selama ini;
18. Teman-teman CRAN14L yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu. Terima kasih atas suka, duka, dan kebersamaan selama 3,5 tahun, semoga kita dapat menjadi dokter yang baik dan berguna bagi masyarakat;
19. Semua yang terlibat dalam penyusunan skripsi ini yang tidak bisa saya sebutkan satu per satu, terima kasih atas doa dan dukungan kalian.

Penulis menyadari jika masih banyak kekurangan dalam pembuatan skripsi ini. Namun penulis berharap, skripsi yang jauh dari kata sempurna ini tetapi dikerjakan dengan penuh semangat ini, dapat bermanfaat untuk kita semua. Terima kasih

Bandar Lampung, Januari 2018

Penulis,

Nandya Dwizella

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR ISI	i
DAFTAR TABEL	iv
DAFTAR GAMBAR	v
DAFTAR LAMPIRAN	vii

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian.....	5
1.4 Manfaat Penelitian.....	5
1.4.1 Manfaat Teoritis.....	5
1.4.2 Manfaat Praktis	5
1.4.3 Manfaat Agromedicine	6
1.4.4 Manfaat bagi Peneliti	6
1.4.5 Manfaat bagi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung.....	6
1.4.6 Manfaat bagi Peneliti Lain.....	6

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Infertilitas pada Pria.....	7
2.2 Rokok	10
2.2.1 Sejarah Rokok di Indonesia	10
2.2.2 Pengertian Rokok	11
2.2.3 Kandungan Rokok	11
2.2.4 Rokok Menimbulkan Stres Oksidatif.....	14
2.2.5 Efek Rokok secara Hormonal Terhadap Spermatogenesis.....	17
2.3 Organ Reproduksi Pria	18

2.4	Hormon dalam Spermatogenesis	22
2.5	Proses Spermatogenesis	23
2.6	Tikus putih galur <i>Sprague dawley</i>	26
2.7	Bekatul Beras Merah Sebagai Antioksidan	28
2.8	Kerangka Teori	34
2.9	Kerangka Konsep	35
2.10	Hipotesis	35

BAB III METODE PENELITIAN

3.1	Desain Penelitian	36
3.2	Waktu dan Tempat Penelitian	36
3.3	Populasi dan Sampel Penelitian	37
	3.3.1 Populasi Penelitian	37
	3.3.2 Sampel Penelitian	37
	3.3.3 Kriteria Inklusi dan Eksklusi	40
3.4	Alat dan Bahan Penelitian	40
	3.4.1 Alat Penelitian	40
	3.4.2 Bahan Penelitian	41
3.5	Variabel Penelitian	42
	3.5.1 Variabel Bebas (<i>Independent Variable</i>) :	42
	3.5.2 Variabel terikat (<i>Dependent Variable</i>) :	42
3.6	Definisi Operasional Variabel	43
3.7	Diagram Alur Penelitian	44
3.8	Prosedur Penelitian	45
	3.8.1 Aklamatisasi Hewan Coba	45
	3.8.2 Pembuatan Ekstrak Bekatul Beras Merah	45
	3.8.3 Pemaparan Radikal Bebas (Asap Rokok)	47
	3.8.4 Terminasi Hewan Coba	48
	3.8.5 Prosedur Pembuatan Preparat	49
	3.8.6 Pengumpulan Data	52
3.9	Analisis Statistika	53
3.10	Etika Penelitian	54

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1	Data Hasil Penelitian	55
-----	-----------------------------	----

4.1.1 Jumlah Rerata Spermatisit Primer.....	56
4.1.2 Ketebalan Tubulus Seminiferus.....	59
4.2 Pembahasan.....	61
4.2.1 Jumlah Rerata Spermatisit Primer.....	61
4.2.2 Ketebalan Tubulus Seminiferus.....	68

BAB V KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan.....	73
5.2 Saran.....	73

DAFTAR PUSTAKA.....	74
----------------------------	-----------

LAMPIRAN

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Zat dalam Rokok yang Ditemukan di Kehidupan Sehari-hari.....	12
2. Klasifikasi Tikus Putih.....	26
3. Definisi Operasional.....	43
4. Rerata Jumlah Spermatisit Primer dan Standar Deviasi Tiap Kelompok Perlakuan.....	56
5. Hasil Uji Normalitas <i>Saphiro Wilk</i> Jumlah Rerata Spermatisit Primer.....	58
6. Hasil Uji <i>One Way</i> Anova Jumlah Rerata Spermatisit Primer.....	58
7. Hasil Uji <i>Post Hoc Bonfferoni</i> pada Jumlah Rerata Spermatisit Primer.....	58
8. Ketebalan Tubulus Seminiferus dan Sandar Deviasi Setiap Kelompok Perlakuan.....	59
9. Hasil Uji Normalitas <i>Saphiro Wilk</i> Ketebalan Tubulus Seminiferus.....	60
10. Hasil Uji <i>One Way</i> Anova Ketebalan Tubulus Seminiferus.....	60
11. Hasil Uji <i>Post Hoc Bonfferoni</i> Ketebalan Tubulus Seminiferus.....	60

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Stres Oksidatif pada Sistem Reproduksi Pria.....	9
2. Bagian-bagian Rokok.....	13
3. Struktur Organ Reproduksi Pria.....	19
4. Histologi Testis.....	21
5. Proses Spermatogenesis.....	24
6. Tubulus Seminiferus Tikus.....	27
7. Ketebalan Tubulus Seminiferus.....	28
8. Bagian Bekatul.....	29
9. Struktur Kimia Tokoferol.....	30
10. Struktur metabolit γ -Oryzanol.....	32
11. Kerangka Teori.....	34
12. Kerangka Konsep.....	35
13. Diagram Alur Penelitian.....	44
14. Pemberian Paparan Asap Rokok.....	48
15. Diagram Batang Rerata Jumlah Spermatisit Primer Tiap Kelompok Perlakuan.....	56
16. Diagram Batang Ketebalan Tubulus Seminiferus Tiap Kelompok Perlakuan.....	59
17. Gambaran Tubulus Seminiferus pada Kelompok K(-) Tiap Pengulangan dengan Perbesaran 400x.....	62

18. Gambaran Tubulus Seminiferus pada Kelompok K(+) Tiap Pengulangan dengan perbesaran 400x.....	65
19. Gambaran Tubulus Seminiferus pada Kelompok P1 Tiap Pengulangan dengan Perbesaran 400x.....	66
20. Gambaran Tubulus Seminiferus pada Kelompok P2 Tiap Pengulangan dengan Perbesaran 400x.....	67
21. Gambaran Tubulus Seminiferus pada Kelompok P3 Tiap Pengulangan dengan Perbesaran 400x.....	68
22. Gambaran Ketebalan Tubulus Seminiferus pada Kelompok K(+)	69
23. Gambaran Ketebalan Tubulus Seminiferus pada Kelompok K(-)	70
24. Gambaran Ketebalan Tubulus Seminiferus pada Kelompok P1, P2 dan P3.....	71

DAFTAR LAMPIRAN

- Lampiran 1. Data Hasil Ketebalan Tubulus Seminiferus
- Lampiran 2. Foto Hasil Penelitian Ketebalan Tubulus Seminiferus
- Lampiran 3. Hasil Uji Statistik Jumlah Rerata Spermatisit Primer
- Lampiran 4. Hasil Uji Statistik Ketebalan Tubulus Seminiferus
- Lampiran 5. Foto Kegiatan Selama Penelitian
- Lampiran 6. Sertifikat Tikus Putih Galur Spragur dawley
- Lampiran 7. Surat Etik Penelitian
- Lampiran 8. Surat Peminjaman Alat Laboratorium
- Lampiran 9. Surat Peminjaman Laboratorium

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Merokok menjadi kebiasaan hidup bagi orang dewasa maupun remaja. Merokok sudah menjadi gaya hidup di masa kini meskipun mereka mengetahui dampak negatif dari mengonsumsi rokok (Nururrahmah, 2014). Penelitian terhadap jumlah konsumsi rokok pada tahun 1980-2012 di 187 negara, didapatkan bahwa terjadi peningkatan terhadap jumlah perokok dari 4,96 milyar pada tahun 1980 menjadi 6,25 milyar pada tahun 2012. Jumlah perokok pria dan wanita pada tahun 2012 terjadi peningkatan yang signifikan. Perokok pria khususnya yang berusia 15-24 tahun memiliki prevalensi tinggi pada negara maju dan negara berkembang, perokok pria yang berusia 30-34 tahun memiliki prevalensi tinggi pada negara maju, sedangkan perokok pria yang berusia 35-49 tahun memiliki prevalensi tinggi pada negara berkembang. Prevalensi perokok wanita dinegara maju hampir sama dengan pria, sedangkan pada negara berkembang prevalensi perokok wanita meningkat seiring bertambahnya usia (Marie *et al.*, 2014).

Indonesia merupakan negara ketiga dengan jumlah perokok terbanyak setelah China dan India, khususnya kepulauan Riau dengan proporsi

tertinggi perokok setiap harinya (27,2%) (Riskesdas, 2013). Menurut data WHO sekitar 15 milyar rokok terjual setiap harinya. Pada tahun 2015, lebih dari 1,1 milyar orang merokok. Di negara Asia, sekitar 80.000-100.000 anak-anak mulai merokok setiap harinya. WHO memperkirakan pada tahun 2025 di Indonesia terdapat 5.675.700 orang yang berusia mulai dari 15 tahun untuk merokok setiap harinya (WHO, 2015).

Rokok mengandung 4000 bahan kimia yang merugikan bagi kesehatan, sekitar 100 senyawa dalam rokok bersifat sangat toksik dan 70 bahan kimia yang terkandung dalam rokok dapat menyebabkan kanker seperti tar, nikotin, nitrosamin, karbonmonoksida, PAH (*Polynuclear Aromatic Hydrogen*), fenol, karbonil, klorindioksin dan furan (CDC,2010). Kandungan rokok meningkatkan produksi radikal bebas dalam tubuh, sehingga terjadi ketidakseimbangan produksi radikal bebas dan antioksidan dalam tubuh. Hal ini mengakibatkan terjadinya stres oksidatif dan berakhir pada kerusakan oksidatif dalam tubuh (Fitria *et al.*, 2013).

Dampak senyawa toksik yang terkandung dalam rokok terhadap sistem reproduksi pria dapat meningkatkan infertilitas dengan menurunkan jumlah sel-sel spermatogenik, sel leydig, sel sertoli dan menginduksi proses apoptosis dalam testis (Dai, Wang & Qiao, 2015). Senyawa nikotin dalam rokok memiliki peranan dalam hormonal yaitu menghambat sel leydig untuk memproduksi hormon testosteron. Paparan asap rokok dalam jangka waktu yang lama dapat menyebabkan penurunan berat testis dan

meningkatkan kerusakan oksidatif sehingga terjadi penurunan aktifitas testis berakhir pada infertilitas (US, 2010).

Penelitian yang dilakukan oleh Moein dkk (2007) menyatakan bahwa dalam kondisi normal, sistem reproduksi menghasilkan sedikit spesies oksigen reaktif (ROS) atau radikal bebas yang berfungsi untuk regulasi sperma, kapasitasi sperma dan reaksi akrosom. Paparan ROS dalam jumlah banyak dan terjadi secara terus menerus maka dapat menurunkan tingkat kesuburan dengan cara mengganggu proses spermatogenesis sehingga merusak membran sel sperma dan pada akhirnya menurunkan kualitas sperma. Paparan ROS ini juga menyebabkan peningkatan kematian sperma (apoptosis) dengan cara oksidasi.

Radikal bebas (ROS) yang diproduksi spermatozoa dalam jumlah sedikit dapat diatasi dengan pertahanan endogen tubuh sebagai zat antiradikal atau biasa dikenal dengan antioksidan. Apabila jumlah ROS meningkat melebihi ambang batas antioksidan tubuh maka akan timbul stres oksidatif (Agarwal & Sekhon, 2010).

Stres oksidatif adalah kondisi dimana kadar ROS melebihi ambang batas yang mengakibatkan terjadinya peroksidasi lipid membran sel, merusak organisasi membran sel dan akhirnya merusak sel. Untuk mencegah kerusakan sperma dan infertilitas, maka jumlah ROS harus dikurangi dengan menaikkan kadar antioksidan dalam tubuh (Saryono & Retnani,

2013). Saat ini, terdapat beragam jenis antioksidan, salah satunya adalah Bekatul beras merah. Bekatul merupakan limbah dari proses penggilingan padi. Dalam sebuah penelitian melaporkan bahwa bekatul diyakini banyak mengandung antioksidan. Bekatul beras merah memiliki aktivitas antioksidan lebih besar dibandingkan dengan bekatul beras hitam maupun bekatul beras putih (Wulandari *et al.*, 2011). Dalam bekatul beras merah terkandung senyawa bioaktif fenolik, antosianin, β -karoten, tokoferol dan oryzanol yang dapat menurunkan radikal bebas (ROS) (Damayanthi *et al.*, 2010). Dalam sebuah penelitian disebutkan bahwa senyawa aktif tokoferol berfungsi mencegah kerusakan dinding sel dan senyawa oryzanol berfungsi untuk membantu sirkulasi serta merangsang sekresi hormon (Rahmawati, 2012). Dari senyawa bioaktif dalam bekatul beras merah inilah yang akan mengurangi ROS yang terdapat dalam tubuh dan mencegah terjadinya infertilitas.

Berdasarkan dari efek negatif yang ditimbulkan oleh asap rokok dan antioksidan yang terkandung dalam bekatul beras merah maka peneliti ingin mengetahui efek dari kandungan antioksidan ekstrak bekatul beras merah terhadap jumlah spermatis primer dan ketebalan tubulus seminiferus pada hewan percobaan yang terpapar asap rokok kretek.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian dan masalah yang terdapat pada penjelasan diatas, maka rumusan permasalahan yang akan dibahas adalah :

Bagaimana pengaruh pemberian ekstrak etanol 96% bekatul beras merah (*Oryza nivara*) terhadap jumlah rerata spermatis primer dan ketebalan tubulus seminiferus tikus putih jantan galur *Sprague dawley* yang terpapar asap rokok kretek ?

1.3 Tujuan Penelitian

Adapun tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol 96% bekatul beras merah (*Oryza nivara*) terhadap jumlah rerata spermatis primer dan ketebalan tubulus seminiferus pada tikus putih jantan galur *Sprague dawley* yang terpapar asap rokok kretek.

1.4 Manfaat Penelitian

Adapun manfaat dari penelitian adalah :

1.4.1 Manfaat teoritis

Memberikan informasi ilmiah mengenai pengaruh pemberian ekstrak etanol 96% bekatul beras merah (*Oryza nivara*) terhadap jumlah rerata spermatis primer dan tubulus seminiferus tikus putih galur *Sprague dawley* yang terpapar asap rokok kretek.

1.4.2 Manfaat Praktis

1. Memberikan informasi kepada masyarakat khususnya perokok mengenai efek negatif rokok terhadap sistem reproduksi.

2. Memberikan informasi tentang manfaat ekstrak etanol 96% bekatul beras merah (*Oryza nivara*) sebagai antioksidan.

1.4.3 Manfaat Agromedicine

Memberikan informasi tentang manfaat bekatul beras merah (*Oryza nivara*) sebagai antioksidan yang berasal dari limbah padi.

1.4.4 Manfaat bagi Peneliti

Penelitian ini diharapkan agar peneliti dapat memanfaatkan dan mengaplikasikan ilmu yang didapat selama pendidikan dan menambah pengetahuan serta pengalaman dalam membuat penelitian ilmiah.

1.4.5 Manfaat bagi Institusi

Penelitian ini diharapkan menjadi dasar untuk meningkatkan pengetahuan dan promosi kesehatan tentang dampak negatif merokok bagi sistem reproduksi.

1.4.6 Manfaat bagi Peneliti Lain

Dapat menjadi acuan informasi ilmiah untuk bahan penelitian selanjutnya mengenai ekstrak bekatul beras merah (*Oryza nivara*) dengan dampak negatif dari merokok.

BAB II **TINJAUAN PUSTAKA**

2.1 Infertilitas pada Pria

Infertilitas merupakan gangguan terhadap sistem reproduksi yang ditandai dengan ketidakmampuan untuk mencapai kehamilan setelah 12 bulan atau lebih berhubungan seksual tanpa pengaman (Hochschild *et al.*, 2009). Infertilitas terjadi sekitar 15% pada pasangan usia produktif, 50% diantaranya disebabkan oleh abnormalitas pada pria. Infertilitas yang terjadi pada pria merupakan disfungsi dari hipotalamus-hipofisis-gonad : pre-testikular (kerusakan pada hipotalamus-hipofisis), testikular (disfungsi testis), post-testikular (terjadi inflamasi atau obstruksi yang menyebabkan inferilitas). Etiologi infertilitas pada pria sebagian besar idiopatik dan radikal bebas yang memicu stres oksidatif memainkan peranan utama dalam infertilitas pada pria (Agarwal *et al.*, 2014).

Radikal bebas terdapat pada sistem reproduksi dalam jumlah tertentu yang berfungsi untuk regulasi sperma, apabila jumlah radikal bebas ini meningkat melebihi antioksidan maka menyebabkan stres oksidatif. Radikal bebas yang ditemukan pada cairan semen berasal dari endogen dan eksogen.

1. Sumber radikal bebas endogen

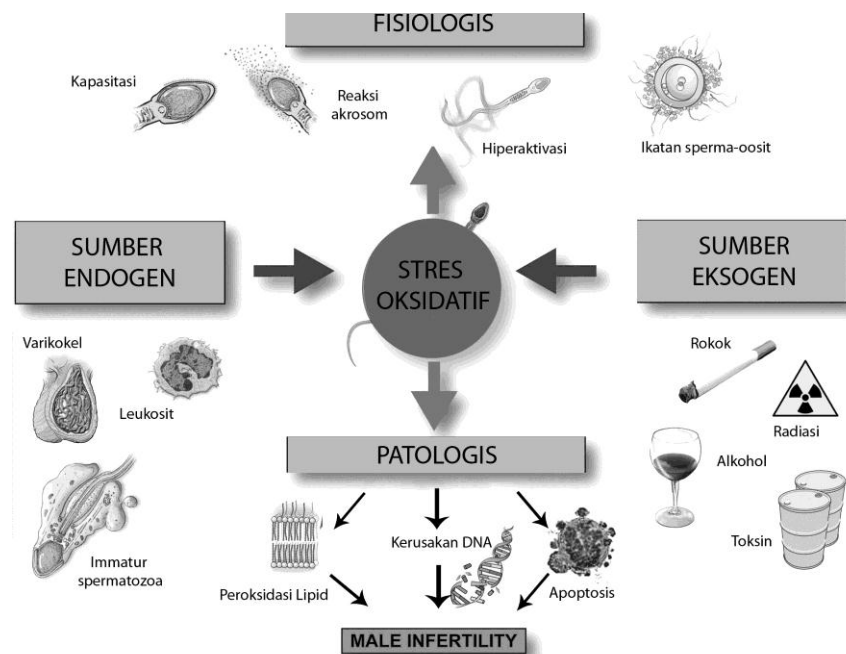
- a. Leukosit : leukosit akan meningkat saat terjadi infeksi dan inflamasi yang dapat meningkatkan jumlah radikal bebas 100 kali dibandingkan dengan keadaan normal. Peningkatan sitokin proinflamasi dan penurunan antioksidan akan meningkatkan radikal bebas yang menyebabkan stres oksidatif sehingga terjadi kerusakan pada sperma.
- b. Immatur spermatozoa : selama spermatogenesis, pembentukan spermatozoa melepaskan sitoplasma untuk fertilisasi. kerusakan spermatozoa menahan pelepasan sitoplasma selama proses spermiogenesis sehingga terjadi peningkatan residu sitoplasma. peningkatan residu sitoplasma ini mengaktivasi NADPH yang digunakan spermatozoa sebagai elektron untuk radikal bebas.
- c. Varikokel : penelitian menunjukkan bahwa peningkatan radikal bebas sejalan dengan peningkatan derajat varikokel.

2. Sumber radikal bebas eksogen :

- a. Radiasi : beberapa penelitian menyebutkan bahwa radiasi elektromagnetik dapat meningkatkan produksi radikal bebas dalam cairan semen dan merusak DNA pada spermatozoa.
- b. Toksin : toksin yang berasal dari produk industri akan terakumulasi dalam tubuh dan meningkatkan produksi radikal bebas pada testis yang memberikan efek negatif pada struktur dan fungsi sperma.
- c. Merokok : kandungan dalam rokok menyebabkan ketidakseimbangan radikal bebas dan antioksidan. merokok

meningkatkan 48% konsentrasi leukosit semen dan 107% radikal bebas dalam semen, menurunkan antioksidan pada cairan semen yang berakibat kerusakan oksidatif, kerusakan oksidatif ditandai dengan peningkatan 8-OHdG. beberapa penelitian menyebutkan bahwa paparan rokok dapat meningkatkan kerusakan DNA dan apoptosis sehingga terjadi infertilitas.

- d. Konsumsi alkohol : alkohol menurunkan mekanisme pertahanan antioksidan tubuh dan meningkatkan produksi radikal bebas. acetaldehid merupakan salah satu produk metabolisme alkohol yang bereaksi dengan protein dan lipid membentuk radikal bebas (Agarwal *et al.*, 2014).



Sumber : (Agarwal *et al.*, 2014).

Gambar 1. Stres Oksidatif pada Sistem Reproduksi Pria

2.2 Rokok

1. Sejarah Rokok di Indonesia

Rokok mulai meluas di Indonesia pada awal abad ke-19. Rokok pertama kali digunakan sebagai obat untuk mengobati penyakit dada oleh seorang warga Kudus, dari mulut ke mulut pengobatan dengan rokok telah menyebar ke masyarakat Kudus. Rokok juga memberikan kenikmatan bagi sebagian masyarakat, sehingga memaksa mereka untuk memproduksi rokok dalam jumlah besar.

Jenis rokok yang pertama kali diproduksi ini dikenal dengan rokok cengkeh. Rokok cengkeh yang dihisap ini memunculkan bunyi kretek-kretek sehingga banyak orang menyebutnya dengan rokok kretek. Rokok kretek merupakan rokok berbahan dasar tembakau yang langsung dikeringkan dan dibungkus dengan daun jagung kering atau selaput sayuran lain. Pada akhir abad ke-19, menghisap rokok menjadi kebiasaan masyarakat Indonesia baik dikalangan atas, menengah maupun kalangan bawah sehingga masyarakat dengan mudah menemukan rokok kretek diseluruh pelosok negeri (Purbasari, 2010).

2. Pengertian Rokok

Rokok merupakan salah satu hasil olahan tembakau yang dibungkus dengan kertas berbentuk silinder dengan panjang 20-120 mm dan diameter 10 mm. Dihasilkan dari tanaman *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana rustica* atau bahan sintesis lainnya yang mengandung nikotin dan tar dengan atau tanpa bahan tambahan. Rokok dibakar pada salah satu ujungnya, dibiarkan membara dan dihisap melalui mulut (Risksedas, 2013).

Asap yang ditimbulkan oleh rokok berasal dari 2 reaksi yaitu reaksi pembakaran dan reaksi pirolisa. Berdasarkan kedua reaksi ini, asap rokok dibedakan menjadi 2 bentuk yaitu asap utama (*mainstream smoke*) dan asap sampingan (*sidestream smoke*). Asap utama merupakan asap yang dihisap oleh perokok dan masuk ke dalam paru-paru perokok sedangkan asap sampingan merupakan asap yang keluar dari ujung rokok secara terus-menerus. (Batubara, Wantouw & Tendean, 2013).

3. Kandungan Rokok

Dalam satu batang rokok terdapat ribuan zat berbahaya bagi kesehatan, berikut ini beberapa zat berbahaya yang terkandung dalam rokok :

Tabel 1. Beberapa Zat dalam Rokok yang Ditemukan di Kehidupan Sehari-Hari.

Zat dalam Rokok	Sering Ditemukan
Karbonmonoksida (CO)	Asap kendaraan
Nikotin	Insektisida
Tar	Bahan membuat jalan
Arsenic	Racun tikus
Ammonia	Produk pembersih
Sianida	Senjata kimia
Toluene	Cat tiner
Formaldehida	Pengawet
Polonium 210	Radioaktif toksik
Cadmium	Isi ulang baterai
Benzene	Bahan bakar gas
Vinyl klorida	Bahan pembuat pipa

Sumber : (CDC,2010)

Tiga kandungan utama yang terdapat dalam asap rokok yaitu nikotin, tar dan karbonmonoksida.

1. Nikotin

Nikotin terdapat dalam asap yang dihasilkan dari rokok dan tembakau yang tidak dibakar. Nikotin merupakan racun yang bekerja cepat, membutuhkan waktu 10 detik untuk sampai ke otak. Kecanduan nikotin akan berdampak terhadap organ tubuh, kondisi psikologis, sistem saraf baik aktivitas dan fungsi otak. Bagi perokok aktif maupun pasif, nikotin menimbulkan gangguan fisiologis berupa kecemasan, sedih atau depresi, marah, gelisah, dan kecenderungan munculnya perilaku kompulsif. Hormon dopamin dan serotonin yang dihasilkan akibat masuknya nikotin dalam tubuh akan membuat perokok

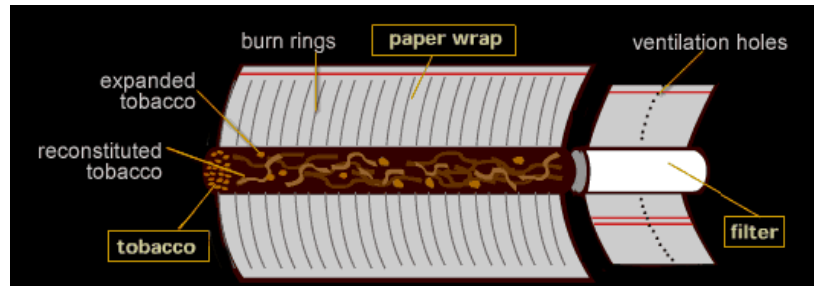
menjadi menahan rasa kantuk, sehingga mencetuskan gangguan tidur yang berefek terhadap emosi, konsentrasi serta daya ingat sehari-hari (Liem, 2010). Penelitian menyebutkan bahwa asap rokok arus samping mengandung kadar nikotin 4-6 kali lebih tinggi dibanding asap rokok arus utama (Nururrahmah, 2014).

2. Tar

Tar terdiri dari beberapa senyawa hidrokarbon yang bersifat karsinogenik. Didalam tubuh, penyimpanan tar sebagian besar didalam paru-paru, sehingga kanker paru-paru yang paling umum terjadi pada perokok (Nururrahmah, 2014).

3. Karbonmonoksida (CO)

Karbonmonoksida (CO) merupakan gas yang sangat beracun. Gas ini biasa dihasilkan dari kendaraan bermotor, asap rokok, asap pabrik, dan sebagainya. Apabila gas CO terhirup ke dalam tubuh, maka akan membentuk ikatan dengan hemoglobin membentuk karboksihemoglobin (COHb). Ikatan antara Hemoglobin dengan CO 200-250 kali lebih kuat dibanding ikatan hemoglobin dengan oksigen. Hal ini menyebabkan terganggunya pengangkutan oksigen dari paru-paru ke jaringan, sehingga jaringan tubuh akan mengalami hipoksia (Rivanda, 2015).



Sumber : (Wikana, 2011)

Gambar 2. Bagian-bagian rokok.

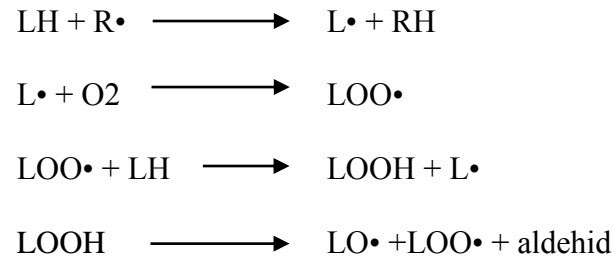
4. Rokok Menimbulkan Stres Oksidatif

Peningkatan radikal bebas yang memicu stres oksidatif telah ditemukan dalam paparan asap rokok (Vani, Ambarasi & Shyamaladeviv, 2015). Radikal bebas merupakan suatu atom atau molekul yang memiliki satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan sehingga memiliki sifat tidak stabil dan menyebabkan molekul menjadi suatu radikal. Sumber radikal bebas dikelompokkan menjadi 2 yaitu radikal bebas endogen yang berasal dari proses autoksidasi, oksidasi enzim dan *respiratory burst* serta radikal bebas eksogen yang berasal dari obat-obatan, bahan aditif, sinar ultraviolet dari matahari, polusi udara, asap rokok dan alkohol (Sayuti & Yenrina, 2015).

Cara terbentuknya radikal bebas dapat melalui pemecahan satu molekul normal secara homolitik menjadi dua, kehilangan satu elektron dari molekul normal dan penambahan elektron pada molekul normal. Berkaitan dengan reaktivitasnya yang tinggi,

senyawa radikal bebas apabila bertemu dengan molekul lain akan membentuk suatu radikal bebas baru dan akan menimbulkan reaksi berantai. Reaksi berantai ini akan berhenti apabila reaktivitasnya dipadamkan oleh senyawa yang bersifat antioksidan. Tipe radikal bebas turunan oksigen reaktif sangat signifikan dalam tubuh antara lain hidroksil (OH'), peroksil (ROO'), hidrogen peroksida (H₂O₂), singlet oksigen (O₂*), oksida nitrit (NO'), peroksinitrit (ONOO') dan asam hipoklorit (HOCl) (Sayuti & Yennina, 2015).

Radikal bebas menyerang biomakromolekul penting dalam tubuh seperti protein, asam nukleat, lipid dan polisakarida. target utama radikal bebas adalah protein, asam lemak tak jenuh dan DNA. kerusakan molekul ini diakibatkan karena kerentanannya terhadap radikal bebas. Kerusakan oksidatif terhadap asam lemak tak jenuh ganda dikenal dengan peroksidasi lipid. Peroksidasi lipid dimulai dimana LH sebagai target yang bereaksi dengan Radikal (R•) membentuk radikal asam lemak (L•), radikal asam lemak (L•) ini berikatan dengan oksigen (O₂) dan membentuk radikal peroksil asam lemak (LOO•). Radikal peroksil asam lemak (LOO•) mengoksidasi molekul LH dan membentuk reaksi berantai baru yang menimbulkan radikal bebas lebih banyak. Reaksi peroksida lipid ini selalu menghasilkan aldehid, dimana aldehid merupakan bahan aktif yang akan menimbulkan kerusakan pada sel lain (Nimse & Pal, 2015).



Beberapa penelitian mengkaitkan antara kerusakan oksidatif pada DNA dengan radikal peroksil ($\cdot\text{OH}$). Radikal peroksil ($\cdot\text{OH}$) bereaksi dengan susunan DNA dan menimbulkan kerusakan oksidatif. Kerusakan ini disebabkan oleh mutagenesis, karsinogenesis dan proses penuaan (Nimse & Pal, 2015).

Protein dan asam nukleat dalam DNA lebih tahan terhadap radikal bebas dibandingkan dengan asam lemak. Kerusakan protein terjadi bila radikal bebas berakumulasi atau kerusakan berfokus pada daerah tertentu dalam protein. Salah satu kerusakannya adalah apabila protein berikatan dengan ion logam transisi seperti Fe^{2+} dan Cu^{2+} (Sayuti & Yenrina, 2015).

Stress oksidatif merupakan gangguan keseimbangan radikal bebas dan antioksidan. Peningkatan radikal bebas yang melebihi antioksidan dalam tubuh akan menimbulkan kerusakan oksidatif.. Asap rokok menimbulkan stres oksidatif melalui 3 mekanisme kerusakan yaitu peroksidasi lipid dari membran sel, kerusakan DNA, modifikasi protein teroksidasi (Kardi 2015; Widhiantara, 2010).

Berdasarkan penelitian tentang Acute Cigarette Smoking, dijelaskan bahwa ACS menimbulkan kerusakan terhadap asam lemak yang terdapat dalam membran sel, sehingga meningkatkan peroksidasi lipid baik di manusia maupun hewan (Vaart *et al.*, 2004). Respon dari peroksidasi lipid yaitu sel akan melakukan pertahanan diri atau menginduksi apoptosis pada sel tersebut (Ayala, Mario & Sandro, 2014).

Penelitian yang dilakukan oleh Amarudin (2012) terhadap 100 orang responden yang merokok, didapatkan bahwa pada pria yang merokok 10-20 batang perhari memiliki odds ratio (OR) menderita kualitas sperma abnormal 8,6 kali lebih besar dari pria yang tidak merokok, sedangkan pada pria yang merokok ≥ 21 batang perhari memiliki odds ratio menderita kualitas sperma abnormal 39,4 kali lebih besar dari pria yang tidak merokok. Semakin banyak seseorang merokok maka kualitas sperma akan semakin berkurang. Hal ini disebabkan oleh radikal bebas didalam rokok yang dapat mengakibatkan stres oksidatif yang berakhir pada fragmentasi DNA dan apoptosis sel.

5. Efek Rokok secara Hormonal terhadap Spermatogenesis

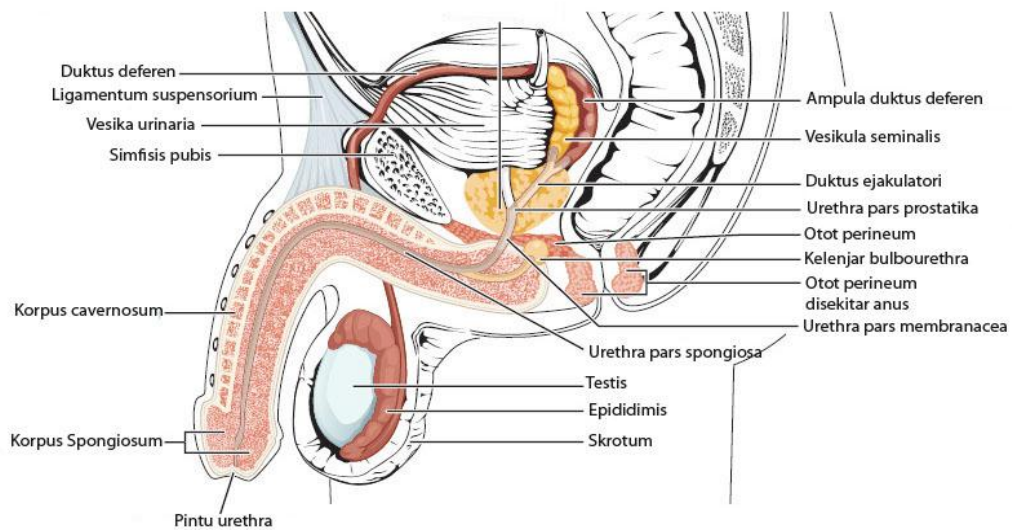
Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Adrien dkk pada tahun 2014 tentang perubahan kualitas spermatozoa dan jumlah sel sel spermatogenik tikus putih yang terpapar asap rokok mengalami

penurunan. Hal ini diakibatkan karena asap rokok mengandung nikotin yang bersifat toksik. Dampak nikotin bagi sistem reproduksi dapat melalui jalur hormonal. Nikotin yang bekerja pada *medial basal hipotalamus* akan menghambat sekresi GnRH yang berdampak pada penurunan sekresi LH sehingga berpengaruh terhadap sel leydig untuk menghasilkan testosteron dan penurunan sekresi FSH yang berdampak pada penurunan fungsi sel sertoli (Unitly *et al.*, 2014; Sukmaningsih, 2009). Pembentukan hormon testosteron dalam sel leydig (steroidogenesis) juga di hambat oleh nikotin dan kotinin yang terdapat dalam rokok, sehingga proses spermatogenesis pun terganggu (Widhiantara, 2010).

1.3 Organ Reproduksi Pria

Saat mudigah, pembentukan sistem reproduksi pria berasal dari 3 jaringan, yaitu intermediet mesoderm yang menghasilkan testikular stroma dan duktus wolfii, epitelium mesoderm yang menghasilkan sel sertoli dan duktus paramesonephric, primordial germ sel yang berasal dari yolk sac dan berubah menjadi spermatogonia. Pembentukan organ reproduksi pada pria terjadi pada minggu ke 7. Pada mudigah yang membawa kromosom Y akan mengaktifasi gen SRY untuk mensintesis faktor pembentuk testis dalam bentuk protein. Faktor inilah yang merangsang sel leydig pada seminiferus cord untuk memproduksi testosteron yang nantinya akan membentuk duktus wolfii. Testosteron ini akan meregresi *corpusculum renal* dan akan menghubungkan *tubulus mesonephricus* ke rete testis, hubungan ini akan

membentuk *ductus efferent*. *Tubulus mesonephricus* akan berhubungan dengan duktus wolfii untuk membentuk epididimis. Selain memproduksi sel leydig, seminiferus cord juga memproduksi sel sertoli yang mensekresikan *mullerian inhibiting factor* untuk meregresi *ductus paramesonephricus*. Seminiferus cord yang kaya akan proliferasi sel sertoli akan menghasilkan anti mullerian hormon (AMH). Hormon ini akan menghambat *ductus paramesonephricus* menghasilkan regresinya. Lumen yang terbentuk dalam seminiferus cord akan membentuk tubulus seminiferus (Varghese *et al.*, 2014).



Sumber : (Browne, 2015).

Gambar 3. Struktur Organ Reproduksi Pria

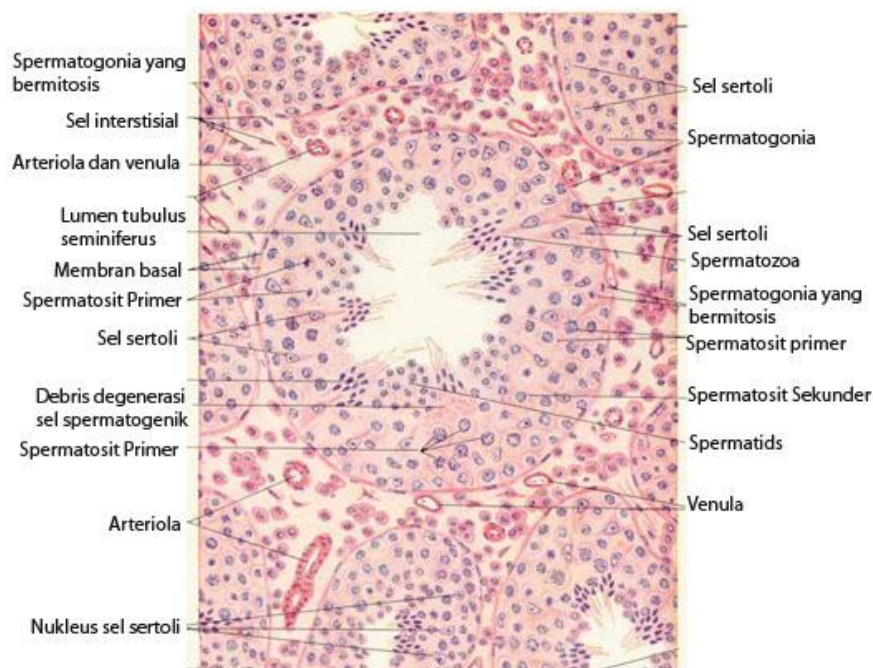
Testis merupakan organ seksual pada sistem reproduksi pria. Testis berjumlah sepasang, terdapat dalam skrotum dan diselimuti oleh jaringan ikat. Pada fase awal embrio, testis berada dalam ruang retroperitoneal yang terdapat dalam rongga abdomen. Menjelang kelahiran, testis dan spermatic

cord turun melalui kanal inguinalis menuju skrotum. Skrotum juga berfungsi untuk mengatur suhu testis agar 2-4°C lebih rendah dibandingkan suhu tubuh. Didalam testis terdapat septa yang membagi testis menjadi beberapa lobulus (Browne, 2015). Tiap lobulus terdapat tubulus seminiferus yang menghasilkan sperma melalui proses spermatogenesis (Mescher, 2014).

Secara histologis, Testis memiliki 250-1000 tubulus seminiferus pada lobulusnya. Tubulus seminiferus ini dikelilingi oleh jaringan ikat longgar interstisial dan sel leydig yang sedangkan dalam tubulus seminiferus sendiri dilapisi oleh epitel seminiferus yang terdiri dari sel sertoli atau sel penyokong dan sel-sel spermatogenik. Sel turunan spermatogenik membentuk 4-8 lapisan konsentris sel yang akan menjadi sperma (Mescher, 2014).

Sel Spermatogonia merupakan sel yang terletak dekat dengan membran basal, bentuknya bulat dengan nukleus bulat dan kromatin nukleusnya halus. Sel spermatosit primer berbentuk bulat besar dan letaknya mengarah ke lumen tubulus seminiferus, nukleusnya bulat dengan kromatin yang kasar padat. Sel spermatosit sekunder jarang terlihat karena berumur pendek. Spermatid merupakan sel berukuran kecil, bulat dan terletak lebih mengarah ke lumen tubulus seminiferus dengan inti sel hampir menutupi seluruh sitoplasmanya. Spermatozoa biasanya berkelompok dan memenuhi bagian tengah lumen tubulus seminiferus, memiliki flagel sebagai ekor. Sel sertoli

merupakan sel penyokong yang sering terlihat berada diantara spermatogonia, berbentuk mirip segitiga dengan sitoplasma jernih dan sulit dibedakan batas-batasnya. Sel sertoli menangkap sinyal untuk memulai spermatogenesis, regulasi kelenjar hipofisis sebagai umpan balik proses spermatogenesis (Wonodirekso, 2003). Sel leydig memiliki bentuk iregular, berada diantara tubulus seminiferus dan berfungsi untuk memproduksi hormon testosteron dengan stimulasi Luteinizing Hormone (LH) yang berasal dari kelenjar hipofisis anterior. (Varghese *et al.*, 2014).



Sumber : (Bloom & Fawcett, 2002).

Gambar 4. Histologi Testis.

Agar terjadi fertilisasi, sperma harus diejakulasikan agar dapat mencapai ovum. Dari tubulus seminiferus, sperma masuk ke dalam epididimis. Dalam epididimis membutuhkan waktu sekitar 12 hari agar sperma menjadi matur

dan mendapat kekuatan untuk membuahi ovum pada sistem reproduksi wanita. Setelah matur, sperma masuk ke dalam duktus deferens dan terus berjalan disepanjang duktus deferens hingga berakhir di belakang vesika urinaria yang disebut dengan ampula. Saat sperma melewati ampula menuju ke duktus ejakulatorius, sperma akan bercampur dengan cairan yang disekresikan oleh vesikula seminalis, cairan vesikula seminalis ini terdiri dari fruktosa yang akan digunakan sebagai energi bagi sperma. Terus berjalan melewati kelenjar prostat yang mensekresikan cairan alkali, disini cairan yang tercampur disebut dengan cairan semen. Komposisi cairan semen bertambah dengan disekresikannya cairan yang bersifat basa dari kelenjar bulbourethra. Komposisi cairan semen adalah 5% dari sperma, 60% dari cairan vesikula seminalis dan 20% dari kelenjar prostat. Bagian terbesar yang membentuk cairan semen berasal dari vesikula seminalis, kelenjar prostat dan kelenjar bulbourethra (Browne, 2015).

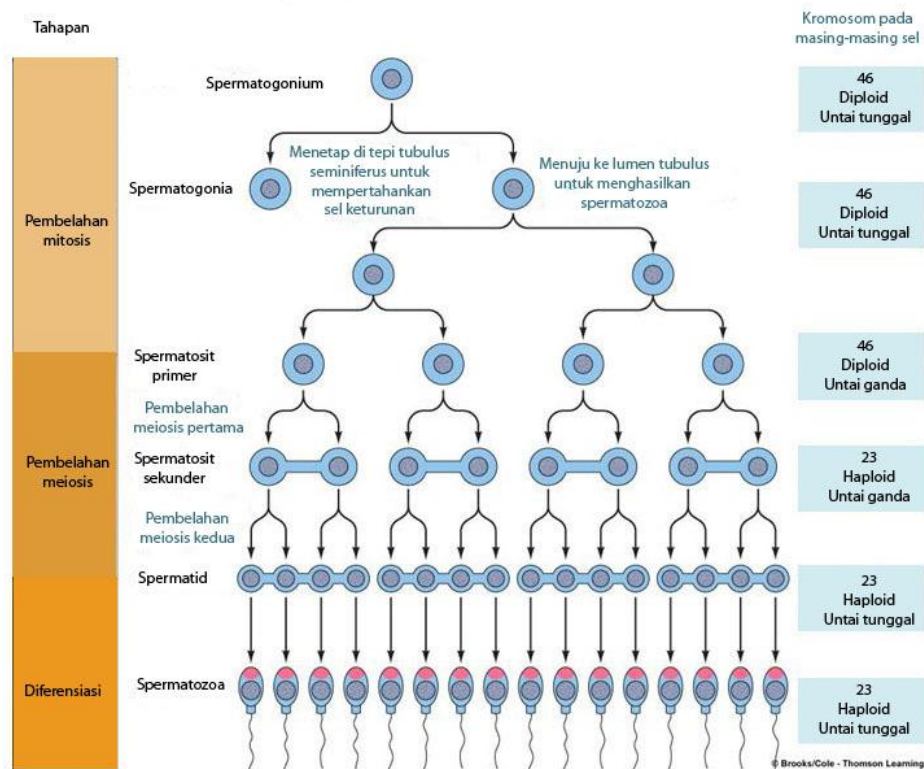
1.4 Hormon dalam Spermatogenesis

Proses spermatogenesis dikendalikan oleh sistem hormonal, dimana hipotalamus mensekresikan *Gonadotropic Releasing Hormone (GnRH)* yang akan merangsang hipofisis anterior mengeluarkan 2 hormon gonadotropin utama yang mempengaruhi testis yaitu *Luteinizing Hormone (LH)* dan *Follicle Stimulating Hormone (FSH)*. Selanjutnya sebagai respon dari LH dan FSH, maka testis akan mengeluarkan 2 hormon utama yaitu testosteron dan inhibin. LH akan merangsang sel Leydig untuk mensintesis testosteron (Rahmanisa, 2014). FSH merangsang sel Sertoli untuk

menghasilkan Androgen Binding Protein (ABP). ABP akan berikatan dengan testosteron dan meningkatkan konsentrasi testosteron dalam tubulus seminiferus. Hormon inhibin yang disekresikan oleh sel sertoli akibat rangsangan FSH merupakan hormon yang bekerja sebagai umpan balik negatif terhadap sekresi hormon FSH di hipofisis anterior (Ma *et al.*, 2015).

1.5 Proses Spermatogenesis

Proses spermatogenesis terjadi di tubulus seminiferus, proses ini melibatkan beberapa tahapan. Tahap pertama adalah spermasitogenesis yaitu perubahan spermatogonium menjadi spermatosit primer melalui pembelahan mitosis. Tahap kedua merupakan tahap meiosis yang akan menghasilkan spermatosit sekunder melalui meiosis I dan spermatid melalui meiosis II. Tahap ketiga merupakan tahapan terakhir dari spermatogenesis dimana terjadi spermiogenesis yaitu perubahan dari spermatid menjadi spermatozoa (Sherwood, 2012).



Gambar 5. Proses Spermatogenesis.

Tahap pertama pembentukan sperma yaitu spermasitogenesis. Dalam tahap ini dimulai dari sel spermatogonium yang terletak pada basal epitel. Sel spermatogonium mengalami mitosis menghasilkan satu sel anak yang tetap berada ditepi tubulus seminiferus untuk mempertahankan turunan sel germinativum, sedangkan satu sel anak bergerak ke arah lumen untuk diubah menjadi sperma. Sel anak ini mengalami mitosis sebanyak 2x untuk menghasilkan 4 spermatosit primer (Sherwood, 2012). DNA dalam spermatosit primer yang telah bermitosis menghasilkan sel diploid, Spermatosit primer memiliki 46 kromosom (44+XY) (Mescher, 2014).

Tahap kedua spermatogenesis adalah pembelahan meiosis. Spermatosit primer membelah dengan mereduksi setengah dari jumlah kromosom. Pada meiosis I, setiap spermatosit primer membelah menjadi 2 spermatosit sekunder yang berkromosom 23 (23+X) atau (23+Y) (Sherwood, 2012). Setiap spermatosit sekunder membelah secara meiosis (meiosis II) dan menghasilkan dua sel yang haploid disebut spermatid. Dalam sediaan testis, spermatosit sekunder jarang diamati karena spermatosit ini berumur pendek dan cepat mengalami meiosis II (Mescher, 2014).

Tahapan terakhir dari pembentukan sperma adalah spermiogenesis. Spermatid bertransformasi menjadi spermatozoa. Spermiogenesis terdiri dari 3 fase:

1. Fase golgi awal : pada fase ini terbentuk tudung akrosom. Sentriol bermigrasi ke posisi dekat dengan permukaan sel dan berhadapan dengan akrosom. Akrosom ini yang menyusun aksonema flagellum.
2. Fase akrosom : akrosom mengandung enzim hialurodinase dan suatu protease yang disebut akrosin. Enzim ini dilepaskan saat spermatozoa bertemu dengan oosit sehingga terjadi reaksi akrosom.
3. Fase maturasi : pada fase ini terbentuk badan residu hasil dari sitoplasma yang tidak diperlukan dan akan difagositosis oleh sel sertoli (Mescher, 2014).

1.6 Tikus putih galur *Sprague dawley*

Tikus putih merupakan hewan pengerat dan sering dijadikan sebagai hewan percobaan karena kelengkapan organ tubuh, kebutuhan nutrisi, metabolisme biokimianya, sistem reproduksi, sistem pernafasan, sistem peredaran darah dan ekskresinya menyerupai manusia (Simanjuntak, 2013).

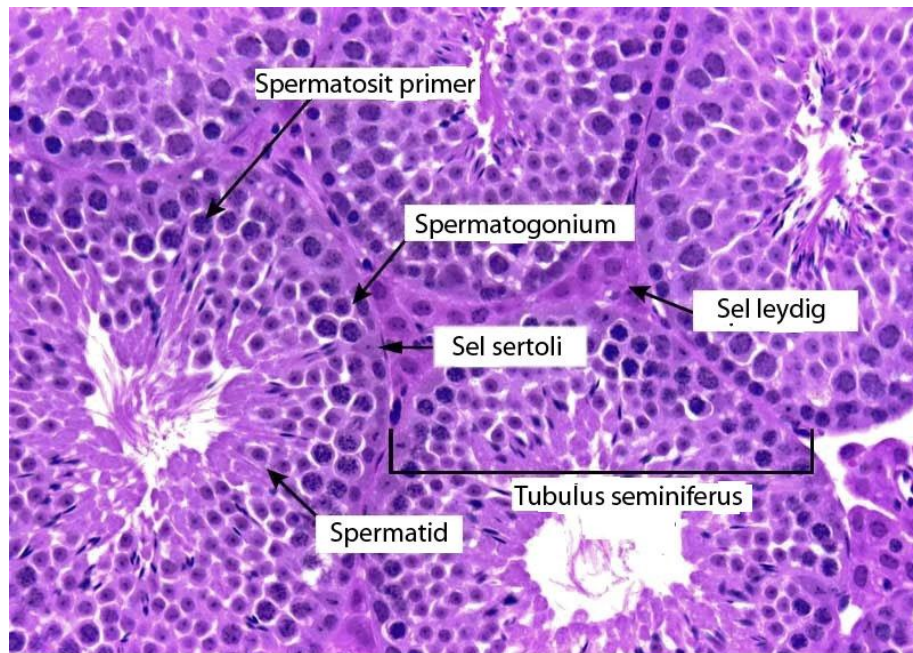
Tikus putih masuk ke dalam kingdom Animalia, adapun klasifikasi tikus putih yaitu :

Tabel 2. Klasifikasi Tikus Putih.

Kingdom	Animalia
Filum	Choedata
Kelas	Mamalia
Ordo	Rodentai
Family	Muridae
Genus	Rattus
Spesies	<i>Rattus norvegicus</i>

Sumber : (Simanjuntak, 2013)

Tikus jantan putih memiliki sistem reproduksi testis, skrotum, epididimis, vas deferens, dan kelenjar aksesorius (vesikula seminalis, kelenjar prostat dan kelenjar bulbourethra). Pembentukan sperma terjadi pada testis, khususnya di tubulus seminiferus. Tikus memproduksi sperma $35,4 \times 10^6$ untuk satu testisnya. Tubulus seminiferus tikus memiliki jumlah sel spermatogenik dua kali lebih banyak dibanding manusia (Larasaty, 2014)



Sumber : (Simanjuntak, 2013).

Gambar 6. Tubulus Seminiferus Tikus.

Tubulus seminiferus tikus lebih tebal dibanding manusia yakni 347 mikrometer, tetapi sekat antar tubulusnya sangat tipis. Ketebalan tubulus seminiferus dapat diukur dengan mengukur jarak terpanjang dan jarak terpendek dari tubulus seminiferus (Bustam, 2012) . Spermatogenesis pada tikus terdiri dari 14 tahap, membutuhkan waktu 12 hari untuk melewati 1 siklus. Sel spermatogonium memerlukan 4 kali siklus untuk berubah menjadi spermatozoa, kepala spermatozoa tikus berbentuk seperti kail. Berdasarkan siklus spermatogenesisnya, pembentukan spermatozoa memakan waktu 48 hari (Larasaty, 2014).



Sumber : (Bustam, 2012)

Gambar 7. Ketebalan tubulus seminiferus.

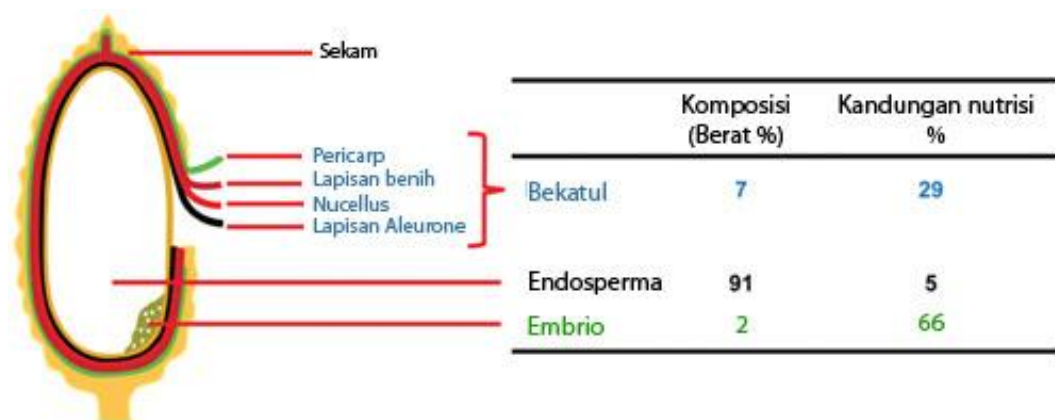
1.7 Bekatul Beras Merah Sebagai Antioksidan

Antioksidan merupakan suatu senyawa yang mengambat atau mencegah terjadinya reaksi oksidasi radikal bebas. Antioksidan bekerja dengan mendonorkan satu elektron kepada senyawa yang bersifat oksidan sehingga aktivitas senyawa oksidan tersebut dapat dihambat. Pada dasarnya, kerusakan oksidatif yang terjadi akibat radikal bebas dalam tubuh dapat diatasi oleh antioksidan enzimatik, tetapi apabila senyawa radikal bebas terdapat dalam jumlah berlebih maka dibutuhkan antioksidan tambahan dari luar.. Antioksidan dikelompokkan menjadi 2 yaitu antioksidan enzimatik dan antioksidan nonenzimatik.

1. Antioksidan enzimatik : enzim superoksida dismutase (SOD), katalase dan glutathion peroksidase
2. Antioksidan nonenzimatik dibagi 2 kelompok :

- a. Antioksidan larut lemak seperti tokoferol, karotenoid, flavonoid, quinon dan bilirubin.
- b. Antioksidan larut air seperti asam askorbat, protein pengikat logam (Sayuti & Yenrina, 2015)

Bekatul merupakan limbah atau hasil samping dari penggilingan padi (Widarta & Arnata, 2014). Bekatul diperoleh dari penggilingan padi yang kedua, dan sering digunakan untuk pakan hewan ternak. Bekatul terdapat diantara endosperm dan sekam. Bekatul sendiri merupakan bagian dari beras yang terdiri atas pericarp, lapisan aleurone, lapisan benih dan nucellus (Park *et al.*, 2017).



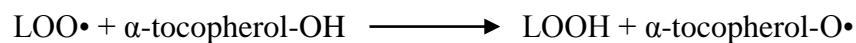
Sumber : (Park *et al.*, 2017)

Gambar 8. Bagian Bekatul.

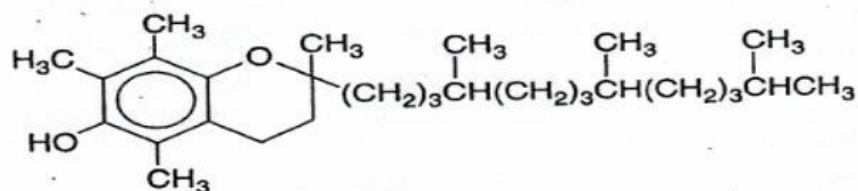
Menurut penelitian sebelumnya, bekatul sebagai sumber antioksidan banyak digunakan sebagai pangan fungsional. Menurut Prapsiwi (2013), bekatul memiliki kandungan bioaktif yang dapat mencegah kerusakan tubuh akibat radikal bebas. Kandungan bioaktif yang terdapat dalam bekatul antarlain

tokoferol, β - karoten, antosianin dan γ -oryzanol. Bahan bioaktif ini berfungsi untuk mencegah peroksidasi lemak dan stress oksidatif. Menurut Laili (2016), menyatakan ekstrak bekatul 200mg/kgBB dengan menggunakan pelarut etanol 96% dapat meningkatkan status antioksidan.

Kandungan bioaktif dari bekatul yang berperan sebagai antioksidan salah satunya yaitu tokoferol, dimana tokoferol adalah antioksidan yang larut lemak. Tokoferol yang terdapat dalam kandungan bekatul berfungsi mencegah terjadinya peroksidasi lipid dan memutus reaksi berantai.



Pemutusan reaksi berantai ini akan membentuk molekul yang stabil dan mengakhiri peroksidasi lipid (Cahyanine, Estiasih & Nisa, 2008; Nimse & Pal 2015).



Sumber : (Irawati, 2014).

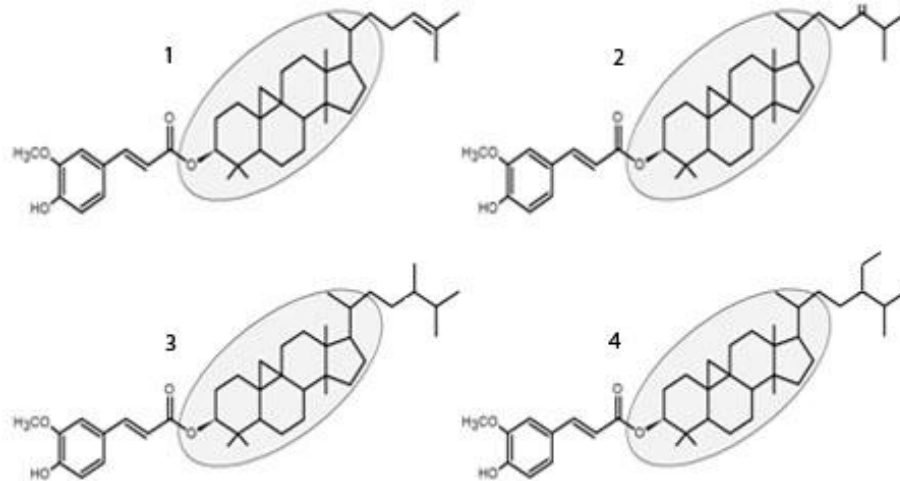
Gambar 9. Struktur Kimia Tokoferol.

Tokoferol stabil pada suhu tinggi, bioaktif ini juga melindungi integritas membran dengan mekanisme kerjanya sebagai *scavenger* radikal bebas oksigen, peroksida lipid dan *singlet* oksigen (Mumpuni, 2013). Radikal bebas yang berasal dari asap rokok akan menyerang struktur dan fungsi

membran sel, pertumbuhan sel, merusak DNA sel, dan peroksidasi asam lemak tak jenuh.

Penelitian sebelumnya, dikatakan bahwa γ -oryzanol merupakan bahan aktif utama dalam bekatul beras merah. Bahan aktif ini memiliki aktivitas antioksidan yang sangat penting bagi kesehatan (Mumpuni, 2013). Bergman dan Xu (2003) mengatakan bahwa kandungan γ -oryzanol dalam bekatul jumlahnya 10-20 kali lebih banyak dibandingkan tokoferol. γ -oryzanol dalam bekatul beras merah berfungsi menurunkan kadar kolestrol darah, memiliki aktivitas anti-inflamatory yang tinggi, menurunkan kadar gula darah, dan sebagai bahan untuk mencegah kanker (Sohail *et al.*, 2016).

γ -oryzanol memiliki aktivitas antioksidan 8-10 kali lebih besar dibandingkan dengan vitamin E. Tiga komponen utama metabolit γ -oryzanol (*cycloarthenyl*, *24-methylenecycloarthenyl*, *campesteryl ferulate*, *sitosteryl ferulate*) memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi terhadap peroksidasi lemak (Minatel *et al.*, 2016).

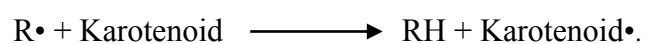


(Minatel *et al.*, 2016)

Gambar 10. Struktur metabolit γ -Oryzanol (1) cycloartenyl ferulate; (2) 24-methylenecycloartanyl ferulate; (3) campesteryl ferulate; (4) sitosteryl ferulate

Menurut Kaeoket dalam penelitiannya di tahun 2012, tentang pengaruh γ -oryzanol pada sperma babi dan sperma banteng dituliskan bahwa γ -oryzanol mencegah pembentukan peroksida dan meningkatkan aktivitas antioksidan dengan menstabilkan komponen lipid dalam membran sel sperma. Kaeoket juga menambahkan bahwa γ -oryzanol mencegah terjadinya ketidakseimbangan radikal bebas pada sperma yang nantinya akan mengalami stress oksidatif.

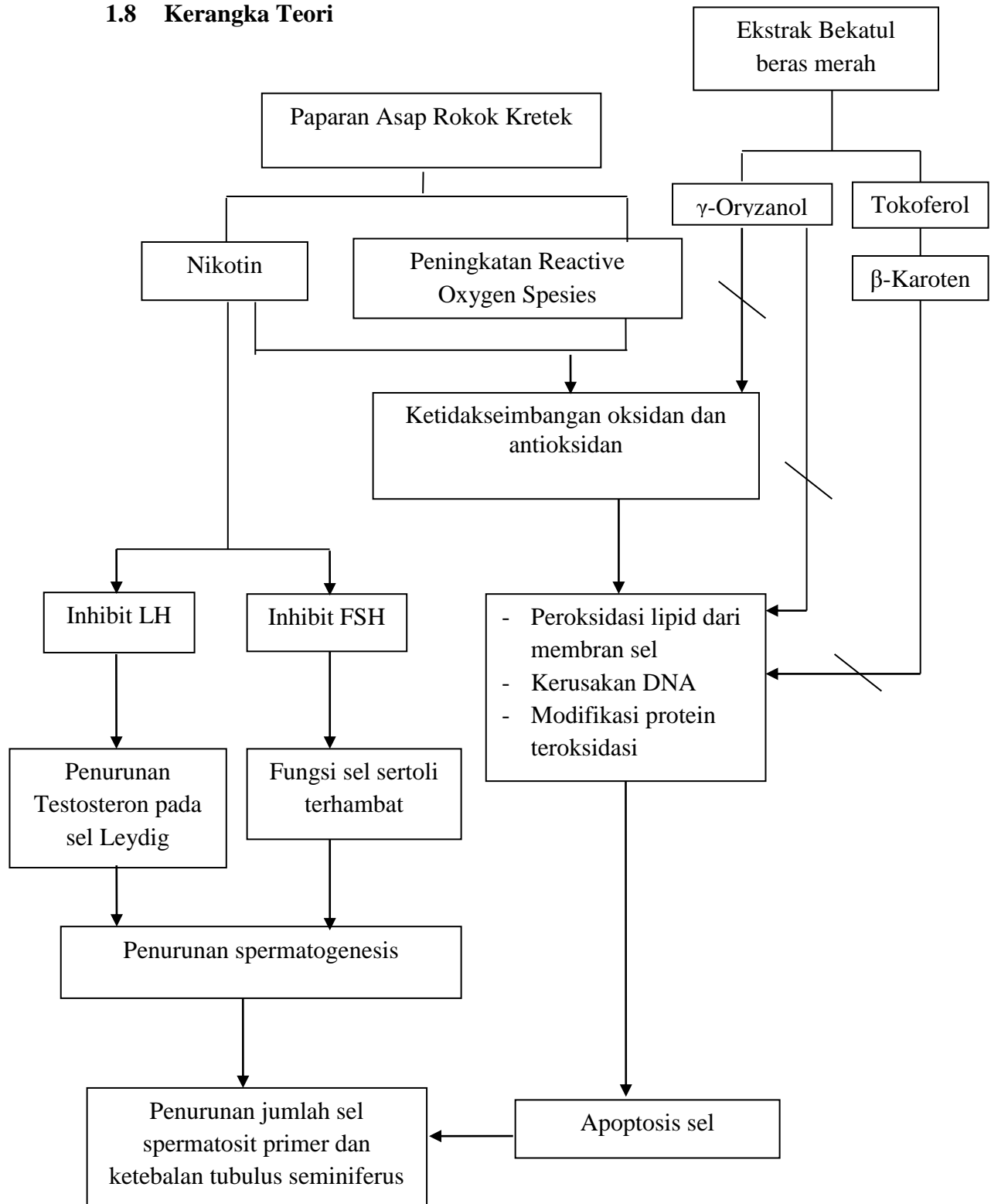
Karotenoid dapat diklasifikasikan menjadi 2 kelompok yaitu karoten dan xantofil. Karoten merupakan karotenoid hidrokarbon contohnya β -karoten dan likopen. Xantofil merupakan turunan teroksidasi yang umumnya berupa hidroksi, epoksi, metoksi dan ester. β -karoten hanya ditemukan pada bekatul dari beras berpigmen.



Kandungan β -karoten yang terdapat dalam bekatul menghambat reaksi peroksidasi radikal dengan cara deaktivator radikal bebas melalui transfer elektron (Mumpuni, 2013; Sayuti & Yenrina 2015) .

Penelitian yang membandingkan antara aktivitas antioksidan pada ekstrak etanol bekatul beras berpigmen dan bekatul beras tidak berpigmen dengan uji DPPH didapatkan bahwa aktivitas antioksidan tertinggi diperoleh oleh ekstrak etanol bekatul beras berpigmen (beras merah) yaitu $88,29 \pm 5.62\%$. Pada ekstrak etanol bekatul beras tidak berpigmen (beras putih) didapatkan aktivitas antioksidan sebesar $73,81 \pm 2,32\%$ (Moko *et al.*, 2014).

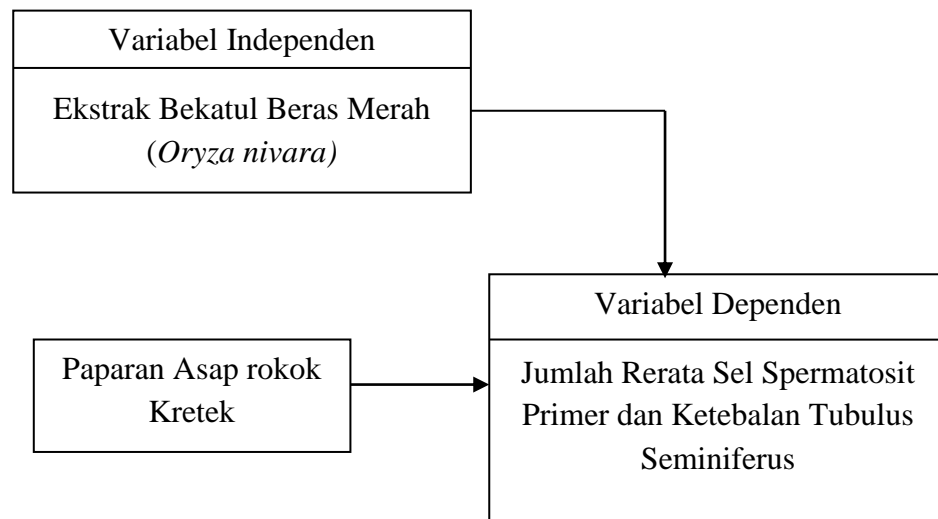
1.8 Kerangka Teori



Sumber : (Sukmaningsih, 2009; Agarwal *et al.*, 2014; Mumpuni, 2013)

Gambar 11. Kerangka Teori Penelitian.

1.9 Kerangka Konsep



Gambar 12. KerangkaKonsep Penelitian.

1.10 Hipotesis

Adapun hipotesis pada penelitian ini adalah:

Ha: Terdapat pengaruh pemberian ekstrak bekatul beras merah (*Oryza nivara*) terhadap jumlah rerata spermatisit primer dan ketebalan tubulus seminiferus pada tikus putih jantan galur *Sprague dawley* yang terpapar asap rokok kretek.

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain penelitian true eksperimental dengan metode *posttest only controlled group design* (Notoatmodjo, 2012). Pada penelitian ini dilakukan randomisasi pada subjek yang akan diberi perlakuan dan randomisasi pada subjek kontrol. Posttest dilakukan pada masing-masing kelompok di akhir perlakuan.

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di *Pet house* Fakultas Kedokteran Universitas Lampung, Laboratorium Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Universitas Lampung, dan Laboratorium Patologi Anatomi dan Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Hewan coba dipelihara di *Pet house* Fakultas Kedokteran Universitas Lampung dari masa adaptasi, diberi perlakuan hingga terminasi. Penelitian ini akan dilakukan kurang lebih 35 hari pada bulan September-Oktober 2017.

3.3 Populasi dan Sampel Penelitian

3.3.1 Populasi Penelitian

Populasi penelitian adalah tikus putih jantan galur *Sprague dawley* berumur 2-3 bulan dengan berat 200-350 gram yang didapat dari Institut Pertanian Bogor (IPB).

3.3.2 Sampel Penelitian

Sampel dalam penelitian ini adalah tikus putih jantan galur *Sprague dawley* yang memenuhi kriteria eksklusi dan inklusi. Sampel diambil menggunakan metode *simple random sampling*. Tikus putih jantan akan diambil organ testisnya setelah diberi perlakuan. Jumlah ulangan dalam perlakuan dihitung menggunakan rumus Frederer (1977) dengan perhitungan :

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

Keterangan :

t : Kelompok percobaan

r : Jumlah sampel untuk 1 kelompok percobaan

Penelitian ini akan menggunakan 5 kelompok percobaan. Dimana perhitungan besar sampel nya menggunakan rumus Frederer adalah :

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

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

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

$$4r-4 \geq 15$$

$$4r \geq 15+4$$

$$4r \geq 19$$

$$r \geq 19/4$$

$$r \geq 4,75$$

$$\mathbf{r \geq 5}$$

Jumlah sampel yang akan digunakan dalam 1 kelompok adalah 5 ekor tikus putih jantan galur Sprague dawley. Sehingga, 5ekor tikus dikalikan dengan 5 kelompok perlakuan, dan didapatkan 25 ekor tikus untuk diberi perlakuan. Adapun 5 kelompok perlakuan yaitu :

1. Kelompok 1 (K-) : Kelompok kontrol negatif, tikus putih diberi pangan standar, tanpa diberi perlakuan paparan asap rokok kretek maupun ekstrak bekatul beras merah.
2. Kelompok 2 (K+) : Kelompok kontrol positif, tikus putih diberi pangan standar dan perlakuan paparan asap 2 batang rokok kretek perhari selama 30 hari tanpa diberi ekstrak bekatul.
3. Kelompok P1 : kelompok perlakuan 1, tikus putih diberikan pangan ekstrak bekatul beras merah 100 mg/KgBB perhari dan diberi paparan asap 2 batang rokok kretek selama 30 hari.
4. Kelompok P2 : kelompok perlakuan 2, tikus putih diberikan pangan ekstrak bekatul beras merah 200 mg/KgBB perhari dan diberi paparan asap 2 batang rokok kretek selama 30 hari.

5. Kelompok P3 : kelompok perlakuan 3, tikus putih diberikan pangan ekstrak bekatul beras merah 400 mg/KgB perhari dan diberi paparan asap 2 batang rokok kretek selama 30 hari.

Untuk menghindari *dropout*, maka setiap kelompok sampel diberi tambahan tikus putih jantan dengan rumus (Sastroasmoro & Ismael, 2010) :

$$n' : \frac{5}{1-f}$$

Keterangan :

n' : jumlah sampel setelah dikoreksi

n : jumlah sampel berdasarkan estimasi sebelumnya

f : prediksi sampel yang *dropout* (10%)

$$n' : \frac{5}{1-f}$$

$$n' : \frac{5}{1-10\%}$$

$$n' : \frac{5}{0,9}$$

$$n : 5,55$$

$$n : 6$$

Jadi, 1 ekor tikus putih jantan ditambahkan pada masing masing kelompok perlakuan untuk menghindari terjadinya *drop out* sehingga total keseluruhan sampel yang dibutuhkan adalah 30 ekor .

3.3.3 Kriteria Inklusi dan Eksklusi

1. Kriteria inklusi :

- a. Tikus putih jantan galur *Sprague dawley*.
- b. Berumur 2-3 bulan.
- c. Memiliki berat badan 200-350 gram.
- d. Bergerak aktif.
- e. Makan dan minum normal.
- f. Tidak terdapat luka luar dan cacat.
- g. Diperoleh dari tempat yang sama.
- h. Dipelihara pada tempat yang sama.

2. Kriteria eksklusi :

- a. Tikus mati saat penelitian berlangsung.
- b. Terdapat penurunan BB tikus $>10\%$ setelah masa adaptasi.
- c. Tikus sakit saat penelitian (Rambut rontok, Kulit kusam, Patah kaki).

3.4 Alat dan Bahan Penelitian

3.4.1 Alat Penelitian

Adapun alat dalam penelitian ini adalah :

1. Neraca ukur dengan daya baca 300 gr/0,1gr
2. Kandang tikus putih ukuran 40 x 15 x 10 cm
3. Tempat makan dan minum tikus
4. Sarung tangan karet
5. Sonde lambung
6. Spuit
7. Glass object
8. Cover glass
9. Rokok kretek
10. *Embedding cassette*
11. Parafin cair
12. *Scalpel*
13. *Rotatory microtom*
14. Mikroskop cahaya

3.4.2 Bahan Penelitian

Adapun bahan dalam penelitian ini adalah :

1. Tikus jantan galur Sprague dawley
2. Pelet standar tikus
3. Air minum tikus
4. Sekam tikus
5. Etanol pelarut bekatul beras merah
6. Bekatul beras merah
7. Pewarna Hematoksilin eosin

8. Formaldehid 10%
9. Alkohol 70%
10. Alkohol 96%
11. Alkohol absolut
12. Xylol I dan II
13. Handschoen dan masker
14. Minyak emersi

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel Bebas (*Independent Variable*) :

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak bekatul beras merah yang diberikan dalam variasi dosis.

3.5.2 Variabel terikat (*Dependent Variable*) :

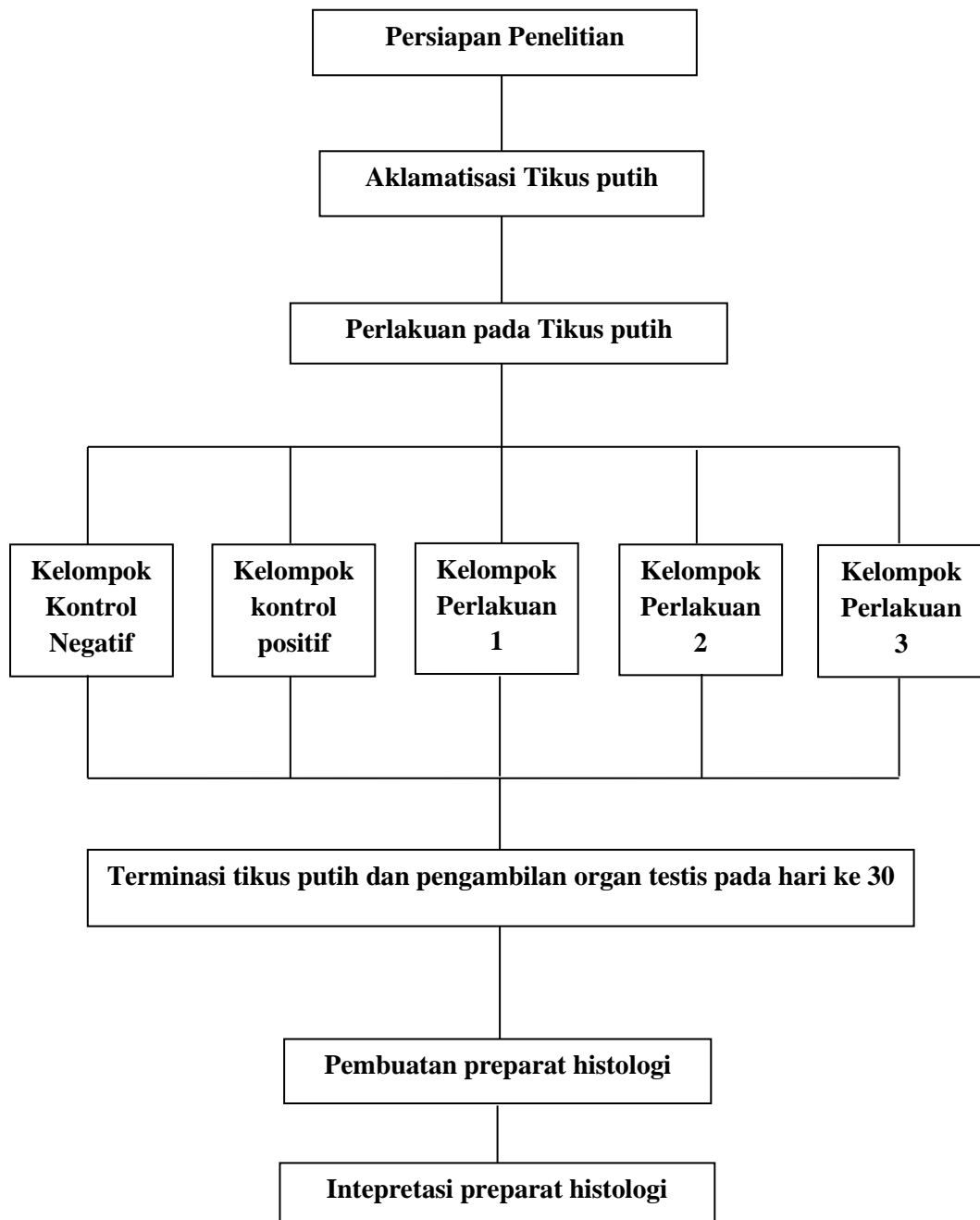
Variabel terikat dalam penelitian ini adalah jumlah spermatosit primer dan ketebalan tubulus seminiferus.

3.6 Definisi Operasional Variabel

Tabel 3. Definisi Operasional

Variabel	Definisi Operasional	Cara Ukur	Skala Ukur	Hasil Ukur
Dosis pemberian ekstrak bekatul beras merah	Pemberian ekstrak bekatul beras merah. Tikus dengan berat \pm 200 gram diberikan dengan ekstrak bekatul beras merah 100 mg/KgBB, 200 mg/KgBB dan 400 mg/KgBB	Memasukkan sonde ke lambung tikus dengan dosis ekstrak bekatul yang bervariasi	Ordinal	Dosis ekstrak bekatul beras merah
Jumlah rerata spermatisit primer	Perhitungan spermatisit primer yang bersel besar dengan inti yang besar, kromatin berbentuk benang-benang panjang	Perhitungan spermatisit primer dengan mikroskop cahaya perbesaran 200x lalu dibagi 4 lapang pandang, tiap lapang pandang dipilih tubulus yang sesuai dan dengan menggunakan mikroskop perbesaran 400x dihitung jumlah sel spermatisit primer	Numerik	Jumlah rerata spermatisit primer
Ketebalan tubulus seminiferus	Tubulus seminiferus dipilih yang berbentuk bulat	Diukur ketebalan tubulus seminiferus dengan mikroskop cahaya perbesaran 200x. tiap sampel dilakukn pada 10 tubulus lalu dihitung rata-ratanya.	Numerik	Ketebalan tubulus seminiferus

3.7 Diagram Alur Penelitian



Gambar 13 Diagram Alur Penelitian

3.8 Prosedur Penelitian

3.8.1 Aklamatisasi Hewan Coba

Hewan coba yang akan digunakan adalah tikus putih jantan. Aklamatisasi tikus putih jantan dilakukan di Pet House Fakultas Kedokteran Universitas Lampung selama 7 hari. Tikus putih jantan di tempatkan secara acak dalam 5 tempat dengan masing masing tempat berisi 6 ekor tikus putih jantan. Dilakukan penimbangan dan penandaan pada tikus putih. Ukuran kandang untuk 1 kelompok tikus minimal 35x35x17 cm, dengan atapnya ditutup dengan anyaman kawat, tikus diberi pangan pur 2x sehari (NRC, 2011).

3.8.2 Pembuatan Ekstrak Bekatul Beras Merah

Bekatul beras merah didapatkan dari daerah Serang. Proses pembuatan ekstrak bekatul dilakukan di Fakultas Pertanian Program studi Teknik Hasil Pertanian dengan cara ekstraksi maserasi. Ekstraksi merupakan pemisahan bagian padat dan cair suatu bahan. Persiapan bahan, pemilihan pelarut, proses ekstraksi dan pengambilan larutan harus diperhatikan dalam proses ekstraksi (Wulandari *et al.*, 2011).

Untuk mendapatkan aktivitas antioksidan bekatul beras merah yang tinggi, dilakukan ekstraksi secara maserasi dengan pelarut etanol

96%. Perlakuan pendahuluan yaitu dengan memanaskan bekatul pada suhu 110°C selama 5 menit, hal ini bertujuan untuk mendeaktivasi enzim lipase yang menyebabkan bekatul mudah tengik (Purwanto, Astri & Dewi, 2014). 1 Kg bekatul beras merah direndam dalam pelarut etanol 96%, pelarut dipersiapkan sesuai dengan perbandingan 1gr: 6 ml selama 7 hari dan diaduk sesering mungkin. Hasilnya di peras dan disaring untuk diambil filtratnya. Filtrat hasil penyaringan dipekatkan dengan rotary evaporator pada suhu 50°C untuk mendapatkan ekstrak kental bekatul. Setiap 1 kg bekatul utuh menghasilkan ekstrak 31,197 gram (Mustofa *et al.*, 2014).

Menurut penelitian sebelumnya, didapatkan dosis ekstrak bekatul efektif yaitu 200 mg/KgBB (Laili, 2016). Oleh karena itu, peneliti menggunakan dosis 200 mg/KgBB. Dosis pertama diturunkan menjadi 100 mg/KgBB dan dosis ketiga dinaikkan menjadi 400 mg/KgBB. Perhitungan dosis ekstrak bekatul pada tikus yang memiliki BB 200 gram :

Dosis 1 ekstrak bekatul :

$$100 \frac{mg}{KgBB} \times 0,2 Kg = 20 mg$$

Dosis 2 ekstrak bekatul :

$$200 \frac{mg}{KgBB} \times 0,2 Kg = 40 mg$$

Dosis 3 ekstrak bekatul :

$$400 \frac{mg}{KgBB} \times 0,2 Kg = 80 mg$$

Jadi, total ekstrak bekatul selama penelitian untuk tikus dengan BB

200 gram :

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

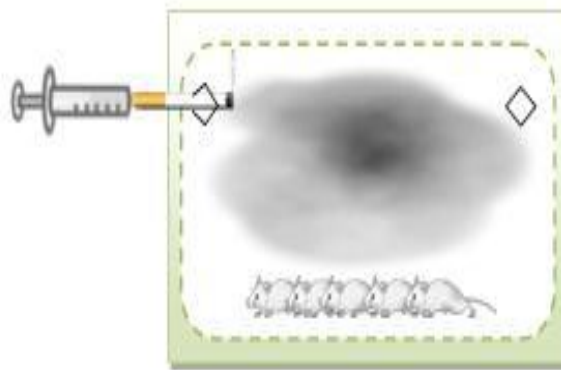
$$\text{Dosis 2 ekstrak bekatul : } 40 \text{ mg} \times 6 \times 30 = 7200 \text{ mg}$$

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

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

3.8.3 Pemaparan Radikal Bebas (Asap Rokok)

Pemaparan radikal bebas ke tikus putih jantan galur Sprague dawley menggunakan rokok kretek dengan satu batang rokok mengandung tar 39 mg dan nikotin 2,3 mg. Pemaparan dilakukan di kandang khusus pemaparan yang diberi 2 celah. Celah 1 untuk air pump dengan spuit 20cc dan dihubungkan oleh selang karet sepanjang 3 cm, celah 2 digunakan untuk ventilasi udara (Irawati, 2014). Pada penelitian yang dilakukan Syamsulina tahun 2005 menyatakan bahwa pemaparan asap rokok kretek dengan dosis 2 batang per hari selama 30 hari dapat menyebabkan terjadinya stress oksidatif.



Sumber : (Irawati, 2014).

Gambar 14. Pemberian Paparan Asap Rokok

3.8.4 Terminasi Hewan Coba

Proses terminasi dilakukan setelah 30 hari diberi perlakuan. Proses terminasi dilakukan dengan cara *cervical dislocation*. Terminasi cara ini merupakan euthanasia metode fisik yang dilakukan pada tikus yang memiliki berat badan ≤ 300 gram. Bila berat badan tikus melebihi 300 gram maka saat melakukan cervical dislocation akan mengalami kesulitan akibat adanya massa otot yang besar di daerah *cervical*.

Proses *cervical dislocation* dengan meletakkan ujung ibu jari dan jari telunjuk di setiap sisi leher untuk memberikan tekanan bagian posterior dasar tulang tengkorak ke sumsum tulang belakang, sementara bagian tangan lainnya memegang bagian ekor dan dengan cepat ditarik sehingga terjadi pemisahan vertebra servikal dari tulang tengkorak dan terjadi pemisahan sumsum tulang belakang dari otak

lalu diambil bagian testisnya. Organ testis tersebut dimasukkan ke dalam tabung penyimpanan organ dan dimasukkan ke dalam lemari es bersuhu -4°C selama 24 jam, setelah itu dimasukkan ke dalam lemari *upright freezer* pada suhu -80°C (Haqiqi, 2015).

3.8.5 Prosedur Pembuatan Preparat

1. Persyaratan Pengambilan Sampel
 - a. Pengambilan sampel dilakukan sesegera mungkin setelah dilakukan terminasi pada hewan coba.
 - b. Ukuran yang diambil berukuran 1 cm^3 . Jaringan harus segera difiksasi.
2. Fixation
 - a. Spesimen berupa potongan organ yang telah dipotong secara representatif kemudian segera difiksasi dengan formalin 10% selama 24 jam.
 - b. Dicuci dengan air mengalir sebanyak 3-5 kali.
3. Trimming
 - a. Organ dikecilkan hingga ukuran $\pm 3\text{ mm}$
 - b. Potongan organ tersebut lalu dimasukkan ke dalam *embedding cassette*.
4. Dehidrasi
 - a. Mengeringkan air dengan meletakkan *embedding cassette* pada kertas tisu.

- b. Berturut-turut organ direndam dalam alkohol 70% selama 2 jam sebanyak 2x, alkohol 96% selama 2 jam sebanyak 2x, alkohol absolut selama 1 jam sebanyak 2x

5. Clearing

Untuk membersihkan sisa alkohol, dilakukan clearing dengan xylol I dan II masing-masing selama 1 jam.

6. Impregnasi

Impregnasi dilakukan dengan menggunakan parafin selama 2 jam dalam oven suhu 65°C.

7. Embedding

- a. Parafin cair disiapkan dengan memasukkan parafin ke dalam cangkir organ dan dimasukkan dalam oven dengan suhu di atas 58°C.
- b. Parafin cair dituangkan ke dalam pan.
- c. Dipindahkan satu persatu dari embedding cassette ke dasar pan dengan mengatur jarak yang satu dengan yang lainnya.
- d. Pan dimasukkan ke dalam air.
- e. Parafin yang berisi potongan testis dilepaskan dari pan dengan dimasukkan ke dalam suhu 4-6°C beberapa saat.
- f. Parafin dipotong sesuai dengan letak jaringan yang ada dengan menggunakan *scalpel* atau pisau hangat.
- g. Potongan parafin diletakkan pada balok kayu, diratakan pinggirnya, dan dibuat ujungnya sedikit meruncing.
- h. Memblok parafin, siap dipotong dengan mikrotom.

8. Cutting

- a. Pemotongan dilakukan pada ruangan dingin.
- b. Sebelum memotong, blok didinginkan terlebih dahulu dilemari es.
- c. Dilakukan pemotongan kasar, lalu dilanjutkan dengan pemotongan halus dengan ketebalan 4-5 mikron. Pemotongan dilakukan dengan *rotary microtom* dengan *disposable knife*.
- d. Dipilih lembaran potongan yang paling baik, diapungkan pada air, dan dihilangkan kerutannya dengan cara menekan salah satu sisi lembaran jaringan tersebut dengan ujung jarum dan sisi yang lain ditarik menggunakan kuas runcing.
- e. Lembaran jaringan dipindahkan kedalam *water bed* suhu 60°C selama beberapa detik sampai mengembang sempurna.
- f. Dengan gerakan menyendok, lembaran jaringan tersebut diambil dengan slide bersih dan ditempatkan ditengah atau pada sepertiga atas atau bawah.
- g. Slide yang berisi jarigan ditempatkan pada inkubator (Suhu 37°C) selama 24 jam sampai jaringan melekat sempurna.

9. Staining (Pewarnaan) dengan HE

Setelah jaringan melekat sempurna pada slide, dipilih slide yang terbaik, selanjutnya dilakukan deparafinisasi dalam larutan xylol I selama 5 menit dan larutan xylol II selama 5 menit. Kemudian,

dihidrasi dalam etanol absolut selama 1 jam, alkohol 96% selama 2 menit, alkohol 70% selama 2 menit, dan air selama 10 menit. Lalu, dilakukan pulasan inti dengan HE selama 15 menit, dibilas dengan air mengalir, diwarnai dengan eosin selama maksimal 1 menit. Selanjutnya, dihidrasi dengan alkohol 70% selama 2 menit, alkohol 96% selama 2 menit, dan alkohol absolut selama 2 menit. Kemudian dilakukan penjernihan dengan xylol I selama 2 menit dan xylol II selama 2 menit.

10. Mounting dengan entelan dan tutup dengan *deck glass*

Setelah pewarnaan selesai, slide ditempatkan diatas kertas tisu pada tempat datar, ditetesi dengan bahan mounting yaitu entelah, dan ditutup dengan *deck glass*, cegah jangan sampai terbentuk gelembung udara.

11. Slide dibaca dengan mikroskop (Anonim, 2017).

3.8.6 Pengumpulan Data

Pengumpulan data dilakukan dengan membaca preparat histologi yang sudah dibuat di Laboratorium Histologi/ Patologi Anatomi Fakultas kedokteran Universitas Lampung.

1. Pengamatan Ketebalan tubulus seminiferus dilakukan dengan memilih tubulus seminiferus yang paling bulat dengan mikroskop cahaya perbesaran 200x. Ketebalan tubulus seminiferus di ukur dengan mikrometer cahaya dengan satuan mikronmeter (μm) (Ganes, 2010). Pengukuran dilakukan dengan

mengukur jarak terpanjang dan terpendek dari tubulus seminiferus. Setiap sampel diambil 10 Ketebalan tubulus yang telah dipilih dan dihitung rata-ratanya (Bustam, 2012).

2. Perhitungan jumlah rerata spermatosit primer dalam tubulus seminiferus yaitu dengan karakteristik sel bulat terbesar dengan kromatin berbentuk benang-benang panjang. Spermatogonium merupakan sel bulat kecil dengan kromatin padat, spermatogonium berada di bagian basal epitel tubulus seminiferus. Sel spermatosit sekunder jarang diamati dalam sediaan testis karena sel berumur pendek yang cepat memasuki tahap meiosis kedua (Mescher, 2014). Perhitungan spermatosit primer tiap sampel dilakukan dengan mikroskop cahaya perbesaran 200x lalu dibagi 4 lapang pandang, tiap lapang pandang dipilih tubulus yang sesuai dan dengan menggunakan mikroskop perbesaran 400x dihitung jumlah sel spermatosit primer lalu\dijumlah dan dirata-ratakan (Irawati,2014).

3.9 Analisis Statistika

Analisis untuk mengolah data akan menggunakan program SPSS komputer. Analisis statistika akan menggunakan analisa bivariat. Analisa bivariat adalah analisa yang digunakan untuk mengetahui hubungan antara variabel bebas dan variabel terikat dengan menggunakan uji statistika.

Analisis hasil penelitian apakah terdistribusi normal atau tidak menggunakan statistik uji normalitas *Shapiro-wilk* karena sampel berjumlah ≤ 50 . Apabila hasil uji normalitas terdistribusi normal dan variasi data homogen maka akan dilanjutkan dengan uji parametrik yaitu *Uji One Way Anova* dan bila hasilnya bermakna $p < \alpha$ ($\alpha = 0,05$) akan dilanjutkan dengan *Uji Post-Hoc*. Apabila syarat uji parametrik tidak terpenuhi, maka akan dilanjutkan dengan uji nonparametrik yaitu *Uji Kruskal-Wallis* yang akan dilanjutkan dengan *Uji Mann-Whitney* apabila memiliki hasil yang bermakna $p < \alpha$ ($\alpha = 0,05$).

3.10 Etika Penelitian

Ethical Clearance penelitian ini didapatkan dari Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Lampung dengan nomor surat 3921/UN26.8/DL/2017. Prinsip etika dalam menggunakan hewan coba untuk penelitian harus memenuhi prinsip 3R yaitu *replacement*, *reduction*, *refinement* dan prinsip 5F (*Freedom*).

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan dari penelitian ini adalah :

Pemberian ekstrak etanol 96% bekatul beras merah berpengaruh dalam mencegah penurunan jumlah rerata spermatis primer dan mencegah penurunan ketebalan tubulus seminiferus pada tikus putih galur *Sprague dawley* yang terpapar asap rokok kretek dimulai pada dosis 100 mg/KgBB.

5.2 Saran

Adapun saran yang dapat disampaikan dari penelitian ini adalah :

1. Penelitian selanjutnya disarankan untuk mencari efek samping jangka panjang dari pemberian ekstrak etanol 96% bekatul beras merah.
2. Penelitian selanjutnya disarankan untuk meneliti pengaruh ekstrak etanol 96% bekatul beras merah terhadap organ lain.
3. Bagi orang yang terpapar dengan asap rokok, dianjurkan banyak mengonsumsi makanan yang memiliki kandungan seperti bekatul antara lain ubi jalar, tomat, wortel, pepaya, melon dan lain-lain

DAFTAR PUSTAKA

Agarwal A, Virk G, Ong C, Plessis SSD. 2014. Effect of oxidative stress on male reproduction. *World J Mens Health*. 32(1); 1–17.

Agarwal A, Durairajanayagam D, Halabi J, Peng J, Levin MV. 2014. Proteomics , oxidative stress and male infertility. *Reproductive Biomedicine Online* [Online Journal][diunduh 10 September 2017]. Tersedia dari:: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rbmo.2014.02.013>.

Agarwal A, Sekhon LH. 2010. The role of antioxidant therapy in the treatment of male infertility. *Human Fertility*. 13(4); 217–25.

Ahmadnia H, Ghanbari M, Moradi MR, Dalouse MK. 2007. Effect of cigarette smoke on spermatogenesis in rats. *Urology Journal*. 4(3); 159-163.

Amarudin. 2012. Pengaruh merokok terhadap kualitas sperma pada pria dengan masalah infertilitas studi kasus kontrol di jakarta tahun 2011 [thesis]. Jakarta: Universitas Indonesia.

Ayala A, Mario FM, Sandro A. 2014. Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative medicine and cellular longevity*. Hlm. 2-3.

Arab F, Alemzadeh I, Maghsoudi V. 2011. Determination of antioxidant component and activity of rice bran extract. *Scientica Iranica*. 18(6): 1402-6

Batubara IVD, Wantouw B, Tendean L. 2013. Pengaruh paparan asap rokok kretek terhadap kualitas spermatozoa mencit jantan (*Mus musculus*). *e-Biomedik*, 1(1): 330–7.

Bustam KA. 2012. Pengaruh pemberian vitamin C terhadap berat testis, jumlah sel leydig dan diameter tubulus seminiferus mencit jantan dewasa yang diinduksi monosodium glutamat [skripsi]. Lampung: Universitas Lampung.

Browne D. 2015. Anatomy and Physiology of the Male Reproductive System. Openstax-CNX. 1(1): 1–11.

Cahyanine M, Estiasih T, Nisa FC. 2008. Fraksi kaya tokoferol dari bekatul beras (*Oryza sativa*) dengan teknik kristalisasi pelarut suhu rendah. *Jurnal Teknologi Pertanian*. 9(3): 165–72.

Dai JB, Wang ZX, Qiao ZD. 2015. The hazardous effects of tobacco smoking on male fertility. *Asian Journal of Andrology*. 17; 954–60.

Damayanthi E, Kustiyah L, Khalid M, Farizal H. 2010. Aktivitas antioksidan bekatul lebih tinggi daripada jus tomat dan penurunan aktivitas antioksidan serum setelah intervensi minuman kaya antioksidan. *Jurnal Gizi dan Pangan*. 5(3): 205–10.

Department of Health and Human Services. 2010. A Report of the Surgeon General: How Tobacco Smoke Causes Disease: What It Means to You. U.S: Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention.

Esakky P, Hansen DA, Drury AM, Cusumano A, Moley KH. 2015. Cigarette smoke-induced cell death of a spermatocyte cell line can be prevented by inactivating the aryl hydrocarbon receptor. *Cell Death Discovery* [Online Journal] [diunduh tanggal 25 Desember 2017]. Tersedia dari: 10.1038/cddiscovery.2015.50.

Fitria, Triandhini RINKR, Mangimbulude JC, Karwur FF. 2013. Merokok dan oksidasi DNA. *Sains Medika*. 5(2); 113–20.

Flaherty O. 2014. The enzymatic antioxidant system of human spermatozoa. *Advances in Andrology* [Online Journal][diunduh tanggal 12 Januari 2018]. Tersedia dari : <http://dx.doi.org/10.1155/2014/626374>.

Ganes D. 2010. Pengaruh pemberian ekstrak kulit buah delima merah (*Punica granatum*) terhadap jumlah sel spermatid dan diameter tubulus seminiferus tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang dipapar gelombang elektromagnetik ponsel [skripsi]. Surakarta: Universitas Sebelas Maret. Hlm. 39-40.

Haqiqi FN. 2015. Pengaruh madu bee pollen terhadap gambaran histopatologi gaster tikus putih jantan galur Sprague dawley yang diinduksi ibuprofen [skripsi]. Lampung: Universitas Lampung. Hlm. 33.

Heikal OA, Zikri MB, Helal AM, Askary HE, Fiebich BL, Goma IEO. Stabilized rice bran extract: Acute and 28-day repeated dose oral toxicity with in vitro mutagenicity and genotoxicity. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 9(44); 1037-50.

Hochschild FZ, Adamson GD, Mouzon JD, Ishihara O, Mansour R, et al. 2009. International committee for monitoring assisted reproductive technology (ICMART) and the world health organization (WHO) revised glossary of ART terminology, 2009. *Fertility and Sterility*. 92(5); 1520–4.

Irawati NAV. 2014. Pengaruh pemberian vitamin E terhadap jumlah sel spermatogenik dan diameter tubulus seminiferus mencit jantan (Mus musculus) yang dipaparkan asap rokok [skripsi]. Lampung: Universitas Lampung. Hlm. 38-9

Kaeoket K, Sarayut D, Pinatta N, Jutarat N, Panida C. 2012. Effect of gamma-oryzanol-enriched rice bran oil on quality of cryopreserved boar semen. *Theriogenology*. 74(9): 1149–53.

Kardi. 2015. Pemberian glutathion pada mencit jantan dewasa yang terpapar asap rokok dapat meningkatkan motilitas progresif spermatozoa [thesis]. Bali: Universitas Udayana.

Kemenkes RI. 2013 InfoDATIN : Perilaku merokok masyarakat indonesia 2007-2013. Jakarta: Indonesia.

Khammanit R, Lomarat P, Anantachoke N, Sato VH, Ungsurungsie M, & Mangmool S. 2017. Inhibition of oxidative stress through the inducton of antioxidant enzymes of pigmented rice bran in HEK-293 cells. *Natural Product Commnications*. 12(7); 1107-10.

Laili NH. 2016. Pengaruh ekstrak bekatul terhadap peningkatan total antioksidan status (TAS) pada tikus yang diinduksi MSG [skripsi]. Semarang: Universitas Islam Sultan Agung.

Larasaty W. 2014. Uji antifertilitas ekstrak n-heksana biji jarak pagar (*Jatropha curcas*) pada tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) galur sprague dawley Secara In Vivo [skripsi]. Jakarta: UIN Syarif Hidayatullah.

Liem A. 2010. Pengaruh nikotin terhadap aktivitas dan fungsi otak serta hubungannya dengan gangguan psikologis pada pecandu rokok. *Buletin Psikologi*. 18(2); 37–50.

Loegito M, Sargowo D, Hinting A, Widodo A. 2017. Effect of cigarette smokes density on histopathologis testis of rats. *IJDR*. 7(8); 14490-3.

Ma Y, Hao-Zheng Y, Long-Mei X, Yi-Ran H, Hui-Li D, Xiao-Nan K. 2015. Testosterone regulates the autophagic clearance of androgen binding protein in rat sertoli cells. 5(8894): 1-6.

Marie, Freeman MK, Fleming TD, Robinson M, Lindgrem DL, Thomson B, Wollum A. 2014. Smoking prevalence and cigarette consumption in 187 countries, 1980-2012. *Jama*. 311(2); 183.

Mescher AL. 2012. Terjemahan histologi dasar junqueira teks & atlas 12th ed [Buku]. Jakarta: EGC. Hlm. 362-70.

Minatel IO, Fabiane VF, Camila RC, Giuseppina PPL. 2016. Antioxidant activity of γ -oryzanol: A complex network of interactions. *International Journal of Molecular Sciences*. 17: 3-6.

Moein MR, Dehghani VO, Tabbnejad N, Vahidi S. 2007. Reactive oxygen species (ROS) level in seminal plasma of infertile men and healthy donors. *Irian Journal of Reproductive Medicine*. 5(2); 51–5.

Moko EM, Purnomo H, Kusnadi J, Ijong FG. 2014. Phytochemical content and antioxidant properties of colored and non colored varieties of rice bran from Minahasa, North Sulawesi, Indonesia. *IFRJ*. 21(3); 1053–9.

Mumpuni PD. 2013. Analisis kadar tokoferol, γ -oryzanol dan β -karoten serta aktivitas antioksidan minyak bekatul kasar. Hlm. 2–31.

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*. 4(7): 52-9.

Nimse SB, Pal D. 2015. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Adv*. 5(35); 27986–8006.

NRC. 2011. Guide for the care and use of laboratory animals 8th ed. Washington DC: National Academic Press.

Nururrahmah. 2014. Pengaruh rokok terhadap kesehatan dan pembentukan karakter manusia. *Prosiding Seminar Nasional Pendidikan Karakter*; 2014 Mei 03; Gedung SCC Palopo. Sulawesi Selatan. Universitas Cokroaminoto.

Omurtag K, Esakky P, Debosch BJ, Schoeller EL, Chi MM, Moley KH. 2015. Modeling effect of cigarette smoke on hexose utilization in spermatocyte. *Reproductive Science*. 22(1): 94-101

Park HY, Lee KW, Choi HD. 2017. Rice bran constituents: Immunomodulatory and therapeutic activities. *Food Function*. Hlm. 1–9.

Purwanto A, Astri NF, Dewi W. 2014. Pengaruh jenis pelarut terhadap rendemen dan aktivitas antioksidan dalam ekstrak minyak bekatul padi (rice bran oil). 13(1): 29–34.

Purbasari I. 2010. Perkembangan industri rokok kretek kudu (1908-1964)[skripsi]. Surakarta: Universitas Sebelas Maret. Hlm: 57-60.

Rahmanisa S. 2014. Steroid sex hormone and it's implementation to reproductive function. *Juke Unila*. 4(7): 97-105.

Rahmawati A. 2012. Efek ekstrak bekatul beras hitam (*Oryza sativa* L) terhadap perbaikan luka pada mukosa lambung mencit yang dipapar aspirin. Surakarta [skripsi]: Universitas Sebelas Maret. Hlm. 25..

Revianti S. 2005. Efek proteksi ekstrak buah merah (*Pandanus conoideus*) terhadap stres oksidatif di eritrosit *Rattus norvegicus* galur wistar yang terpapar asap rokok kretek [skripsi]. Surabaya: Universitas Airlangga.

Rivanda A. 2015. Pengaruh paparan karbon monoksida terhadap daya konduksi trakea. *Majority*. 4(8): 1–8.

Saryono, Retnani, Santoso. 2013. Seduhan biji kurma (*Phoenix Dactylifera*) memperkuat membran sel sperma untuk menurunkan kadar malondialdehid. *Jurnal Ners*. 10(2): 355–9.

Sastroasmoro S, Ismael S. 2010. Dasar-dasar metodologi penelitian klinis. Jakarta: Sagung Seto.

Sayuti K, Yenrina R. 2015. Antioksidan Alami dan Sintetik. Padang: Universitas Andalas Press

Simanjuntak LCH. 2013. Histomorfologi tubulus seminiferus dan kelenjar prostat tikus (*Rattus norvegicus*) serta konsentrasi hormon androgen pasca pemberian ekstrak purwoceng [skripsi]. Bogor: Institut Pertanian Bogor.

Sherwood L. 2012. Terjemahan fisiologi manusia 6th ed. Jakarta: EGC.

Sohail M, Allah R, Masood SB, Muhammad JI, Summer R. 2016. Rice bran nutraceuticals: A comprehensive review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 8398: 1–44.

Sukmaningsih A. 2009. Penurunan jumlah spermatisit pakiten dan spermatid tubulus seminiferus testis pada mencit (*Mus musculus*) yang dipaparkan asap rokok. *Jurnal Biologi*. 13(2):.31–35.

Triana IN. 2007. Potensi antibodi spermatozoa terhadap spermatogenesis dan fertilisasi pada tikus putih. *Penel Hayati*. 12; 189-9.

Unitly AJA, Nastiti K., Srihadi A, Aryani SS, Arief B. 2014. Perubahan kualitas spermatozoa dan jumlah sel-sel spermatogenik tikus yang terpapar asap rokok. *Jurnal Kedokteran Hewan*. 8(2): 8–11.

Vaart HVD, Postma DS, Timens W, Hacken NHTT. 2004. Acute effects of cigarette smoke on inflammation and oxidative stress: a review. *Thoraxjnl*. 59(8): 713–21.

Vani G, Anbarasi K, Shyamaladeviv CS. 2015. Bacoside : Role in cigarette smoking induced changes in brain. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*. Hlm. 1–16.

Varghese A, Fnu D, Angali C, Ang WJ, Furquan P, Ashok A. 2014. Anatomy and physiology of male gametogenesis. Dalam: *Male reproductive system-anatomy and physiology*. Hlm. 4–8.

WHO. 2015. *WHO Global Report on Trends in Prevalence of Tobacco Smoking*. Switzerland: WHO press.

Widarta IWR, Arnata IW. 2014. Stabilitas aktivitas antioksidan ekstrak bekatul beras merah terhadap oksidator dan pemanasan pada berbagai pH. 25(2): 193-4.

Widhiantara IG. 2010. Terapi testosteron dan LH (Luteinizing Hormone) meningkatkan jumlah sel leydig mencit (*Mus musculus*) yang menurun akibat paparan asap rokok [Skripsi]. Hlm. 2-4.

Wikana J. 2011. Pemberian kompleks buah berry menurunkan stres oksidatif dan meningkatkan pertahanan oksidatif pada perokok aktif [Skripsi]. Hlm. 38.

Wonodirekso S. 2003. *Penuntun praktikum histologi*. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Hlm. 132-3.

Wulandari PA, Suter IK, Putra NK, Widarta IWR. 2011. Bekatul beras merah sebagai salah satu alternatif sumber antioksidan. 1: 1–8.