

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL 95% KULIT BATANG
BAKAU MINYAK (*Rhizophora apiculata*) TERHADAP MOTILITAS,
MORFOLOGI DAN JUMLAH SPERMATOZOA TIKUS PUTIH (*Rattus
novergicus*) JANTAN GALUR *Sprague dawley* YANG TERPAPAR ASAP
ROKOK**

SKRIPSI

**Oleh
DESTY MARINI**



**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2018**

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL 95% KULIT BATANG
BAKAU MINYAK (*Rhizopora appiculata*) TERHADAP MOTILITAS,
MORFOLOGI DAN JUMLAH SPERMATOZOA TIKUS PUTIH (*Rattus
novergicus*) JANTAN GALUR *Sprague dawley* YANG TERPAPAR ASAP
ROKOK**

Oleh

DESTY MARINI

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 GIVING BARK (*Rhizophora apiculata*) EXTRACT ETHANOL 95% TOWARD MOTILITY, MORPHOLOGY AND THE NUMBER OF WHITE MICE SPERM (*Rattus novergicus*) STRAIN *Sprague dawley* IN THE OXPOSURE OF CIGARETTE SMOKE

By

DESTY MARINI

Background: Infertility is the inability of a person to have a child for a year or more. Lifestyle is known to affect the occurrence of infertility in men is smoking. Cigarette smoke is a free radical that can trigger oxidative stress. The antioxidant activity of bark mangrove tree extract (*Rhizophora apiculata*) is known to have the ability to inhibit the formation of free radicals.

Methods: The study design used a complete randomized design. The sampling technique was done randomly. The sample consisted of 30 male rats divided into 3 groups, ie the normal control group (K1) was not treated, the treatment group 1 (P1) given exposure to second cigarette smoke for one hour, treatment 2 (P2) bark of mangrove stems as much as 56,55 mg/kgBB and given exposure to cigarette smoke.

Results: The analysis using Kruskal Wallis and One-Way ANOVA showed $p < 0.05$ for motility, morphology and spermatozoa count. The dose of mangrove bark extract 56,55 mg/kg/BB effectively increase motility, morphology and the number of rat spermatozoa given exposure to cigarette smoke.

Conclusion: There is a protective effect of giving the mangrove skin stem extract motility, morphology and spermatozoa number of male rats exposed to cigarette smoke.

Keywords: Motility, morphology, the number sperm, oxidative stress, antioxidants, *Rhizophora apiculata*.

ABSTRAK

PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL 95% KULIT BATANG BAKAU MINYAK (*Rhizopora apiculata*) TERHADAP MOTILITAS, MORFOLOGI DAN JUMLAH SPERMATOZOA TIKUS PUTIH (*Rattus novergicus*) JANTAN GALUR *Sprague dawley* YANG TERPAPAR ASAP ROKOK

Oleh

DESTY MARINI

Latar Belakang: Infertilitas merupakan ketidakmampuan seseorang memiliki anak selama satu tahun atau lebih. Gaya hidup yang diketahui berpengaruh terhadap terjadinya infertilitas pada pria adalah merokok. Asap rokok merupakan radikal bebas yang dapat memicu stress oksidatif. Aktivitas antioksidan dari ekstrak kulit batang bakau minyak (*Rhizopora apiculata*) diketahui memiliki kemampuan dalam menghambat pembentukan radikal bebas.

Metode: Desain penelitian menggunakan rancangan acak lengkap. Teknik pengambilan sampel dilakukan secara randomisasi. Sampel terdiri dari 30 ekor tikus jantan yang dibagi dalam 3 kelompok, yaitu Kelompok kontrol normal (K1) tidak diberikan perlakuan, kelompok perlakuan 1 (P1) yang diberikan paparan asap rokok dua batang selama satu jam per hari, perlakuan 2 (P2) yang diberikan ekstrak kulit batang bakau sebanyak 56,55 mg/kgBB dan diberikan pemaparan asap rokok.

Hasil: Analisis menggunakan *Kruskal Wallis* dan *One-Way ANOVA* menunjukkan $p < 0,05$ untuk motilitas, morfologi dan jumlah spermatozoa. Dosis ekstrak kulit batang bakau 56,55 mg/kgBB efektif memperbaiki motilitas, morfologi dan jumlah spermatozoa tikus yang diberikan paparan asap rokok.

Simpulan: Terdapat efek protektif pemberian ekstrak kulit batang bakau terhadap motilitas, morfologi dan jumlah spermatozoa tikus jantan yang di paparkan asap rokok.

Kata Kunci: Motilitas, morfologi, jumlah, stress oksidatif, antioksidan, *Rhizopora apiculata*.

Judul Skripsi : Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol 95% Kulit Batang Bakau (*Rhizophora appiculata*) Terhadap Motilitas, Morfologi dan Jumlah Spermatozoa Tikus Putih *Rattus novergicus* Galur *Sprague dawley* yang Terpapar Asap Rokok

Nama Mahasiswa : Desty Marini

No. Induk Mahasiswa : 1418011053

Program Studi : Pendidikan Dokter

Fakultas : Kedokteran

MENYETUJUI

1. Komisi Pembimbing


dr. Syazili Musofa, S.ked, M. Biomed
NIP. 198307132008121003


dr. Hanna Mutiara, S.Ked, M. Kes
NIP. 198207152008122004

Dekan Fakultas Kedokteran


Dr. dr. Maharjono, S.ked, M. Kes., Sp.PA
NIP. 197012082001121001

MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

Ketua : dr. Syazili Mustofa, S.ked, M. Biomed

Sekretaris : dr. Hanna Mutiara, S.Ked, M. Kes

Penguji

Bukan pembimbing : dr. Evi Kurniawaty, S.ked, M. Sc

2. Dekan Fakultas Kedokteran


Dr. M. Muhartono, S.ked, M. Kes., Sp.PA
NIP-197612082001121001

Tanggal Lulus Ujian Skripsi : 1 Februari 2018

LEMBAR PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan dengan sebenarnya bahwa:

1. Skripsi dengan judul “Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol 95% Kulit Batang Bakau (*Rhizopora appiculata*) Terhadap Motilitas, Morfologi dan Jumlah Spermatozoa Tikus Putih *Rattus novergicus* Galur *Sprague dawley* yang Terpapar Asap Rokok” adalah hasil karya saya sendiri dan tidak melakukan penjiplakan atas karya penulis lain dengan cara tidak sesuai tata etika ilmiah yang berlaku dalam masyarakat akademik atau disebut plagiarism.
2. Hak intelektual atas karya ilmiah ini diserahkan sepenuhnya kepada Universitas Lampung.

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

Bandar Lampung, 20 Januari 2018



Desty Marini

RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan di Lembasung pada tanggal 04 Desember 1996, sebagai anak pertama dari 3 bersaudara dari Bapak Nasronsyah dan Ibu Diyan Novita.

Pendidikan Sekolah Dasar (SD) diselesaikan di SDN 01 Sunsang Kecamatan Negeri Agung Kabupaten Waykanan pada tahun 2008, Sekolah Menengah Pertama (SMP) diselesaikan pada SMP AL-kautsar Bandar Lampung pada tahun 2011, Sekolah Menengah Atas (SMA) diselesaikan di SMA AL-kautsar Bandar Lampung pada tahun 2014. Selama menjadi pelajar, penulis mengikuti organisasi Karya Ilmiah Remaja (KIR) dan PASKIBRAKA dan saat di bangku SMP dan SMA.

Penulis terdaftar sebagai mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Lampung pada tahun 2014 melalui jalur Seleksi Bersama Masuk Perguruan Tinggi Negeri (SBMPTN). Selama menjadi mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Lampung, penulis mengikuti organisasi Paduan Suara (2014-2015).

Kupersembahkan karya ini untuk kedua orangtuaku, Adik-adikku, serta keluarga besarku...

“Selalu ada harapan bagi mereka yang sering berdoa. Selalu ada jalan bagi mereka yang berusaha”

SANWACANA

Segala puji dan syukur penulis panjatkan kehadiran Allah SWT, Tuhan Yang Maha Pengasih dan Penyayang, yang telah melimpahkan nikmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini. Shalawat beserta salam semoga senantiasa tercurah kepada suri tauladan dan nabi akhir zaman Rasulullah Muhammad SAW beserta para keluarganya, para sahabatnya dan kita selaku umatnya sampai akhir zaman.

Skripsi berjudul **“Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol 95% Kulit Batang Bakau (*Rhizopora appiculata*) Terhadap Motilitas, Morfologi dan Jumlah Spermatozoa Tikus Putih *Rattus novergicus* Galur Sprague dawley yang Terpapar Asap Rokok”** ini disusun sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran di Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran, Universitas Lampung.

Penghargaan dan ucapan terima kasih yang tak terhingga penulis hanturkan kepada semua pihak yang telah berperan atas dorongan, bantuan, saran kritik dan bimbingan sehingga skripsi ini dapat terselesaikan antarlain kepada:

1. Terima kasih kepada kedua orangtua saya yang telah sabar membimbing saya sampai tahap ini. Ibu terhebat yang sangat aku cintai, ibu Diyan Novita. Terimakasih untuk semua cinta dan juga kasih sayang yang terus mengalir, dan doa yang tiada henti untuk ku, terima kasih banyak atas

semua dukungan, semangat yang selalu diberikan sehingga penyusunan skripsi ini bisa terselesaikan. Ayah terhebat yang sangat aku cinta, ayah Nasronsyah. Terimakasih banyak untuk semua cinta dan kasih sayang terus mengalir dan doa yang tiada henti untukku, terimakasih banyak atas semua dukungan, motivasi yang selalu diberikan sehingga penyusunan skripsi ini bisa terselesaikan.

2. Prof. Dr. Ir. Hasriadi Mat Akin, M.P, Selaku Rektor Universitas Lampung
3. Dr. dr. Muhartono, S.Ked., M. Kes., Sp. PA selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Lampung
4. dr. Syazili Mustofa, S.ked, M. Biomed selaku Pembimbing Pertama atas semua bantuan, saran, bimbingan, serta arahan yang luar biasa selalu diberikan untuk membantu dalam penyusunan skripsi ini.
5. dr. Hanna Mutiara, S.Ked, M. Kes selaku Pembimbing Kedua atas semua bantuan, saran, bimbingan, serta arahan yang luar biasa selalu diberikan untuk membantu dalam penyusunan skripsi ini.
6. dr. Evi Kurniawaty, S.ked, M. Sc selaku Pembahas sekaligus Pembimbing Akademik saya yang telah memberikan banyak saran dan masukan yang luar biasa untuk membantu dalam penyusunan skripsi ini.
7. Ibu Nuriah, A.Md dan Mba Suharyani, S,ST., terimakasih telah banyak membantu saya selama di laboratorium Biomol Fakultas Kedokteran Universitas Lampung.
8. Mas Bayu Putra DJ,A. Md., AK., terimakasih banyak telah membantu saya selama di Laboratorium Histologi Patologi Anatomi .

9. Bapak dan Ibu Staf TU, Administrasi dan seluruh civitas akademik Fakultas Kedokteran Universitas Lampung, terimakasih atas bantuan serta kerjasamanya selama ini.
10. Seluruh staf Dosen Fakultas Kedokteran Universitas Lampung atas ilmu yang telah diberikan kepada penulis untuk menambah wawasan yang menjadi landasan untuk menggapai cita-cita menjadi seorang dokter.
11. Tim penelitian saya, William dan Voni. Terimakasih banyak atas kerjasama dan kekompakan selama penelitian ini berlangsung. Telah sabar untuk mengajari, membantu dan memotivasi saya untuk melakukan penelitian skripsi ini.
12. Elina, ani , tika teman seperjuangan dari propti sampai saat ini. Terimakasih banyak atas dukungan dan bantuannya selama penelitian ini berlangsung. Yang selalu setia menjadi teman dalam belajar dan diskusi selama diperkuliahan. Terimakasih atas kebersamaan, keceriaan, kekompakan, kebahagiaan selama ini, semoga kita bisa menjadi dokter yang amanah dan sukses dikemudian hari.
13. Adik-adikku, Nafid dan Azza. Terimakasih banyak sudah menemani, membantu, mendukung saya selama penelitian.
14. Kepada keluarga besar, yang tidak bisa disebutkan satu persatu. Terimakasih atas dukungan, doa, dan motivasi yang telah diberikan kepada saya selama perkuliahan.
15. Terimakasih banyak kepada Algi atas doa yang selalu diberikan, dukungan, semangat, motivasi dan selalu sabar menemani dalam menulis dan menyelesaikan skripsi ini.

16. Teman-teman angkatan 2014 (CRAN14L) yang tidak bisa disebutkan satu persatu. Terimakasih telah memberikan makna atas kebersamaan yang terjalin dan memberikan motivasi belajar selama ini.

Akhir kata, penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan. Akan tetapi, semoga skripsi yang sederhana ini dapat berguna dan bermanfaat bagi kita semua. Aamiin.

Bandar Lampung, 20 Januari 2018

Penulis

Desty Marini

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR ISI.....	vi
DAFTAR TABEL.....	viii
DAFTAR GAMBAR	ix
 BAB 1 PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	5
1.3.1 Tujuan Umum.....	5
1.3.2 Tujuan Khusus	5
1.4 Manfaat	6
1.4.1 Manfaat Ilmu Pengetahuan	6
1.4.2 Mafaat Bagi Masyarakat	7
1.4.3 Manfaat Bagi Institusi Pendidikan.....	7
1.4.4 Manfaat Bagi Peneliti	7
 BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Infertilitas.....	7
2.1.1 Definisi Infertilitas	7
2.1.2 Tipe Infertilitas Laki-laki	7
2.1.3 Prevalensi	8
2.1.4 Faktor Risiko Infertilitas Laki-laki.....	8
2.2 Asap Rokok.....	10
2.2.1 Prevalensi Perokok di Indonesia.....	10
2.2.2 Pengaruh Paparan Asap Rokok Terhadap Spermatozoa .	11
2.3 Antioksidan	15
2.4 Rhizopora Apiculata	17
2.4.1 Morfologi	17
2.4.2 Toksonomi	19
2.4.3 Kandungan Kimia	19
2.4.4 Bakau Sebagai Antioksidan	19

2.5	Tikus Putih (<i>Rattus Novergicus</i>).....	22
2.5.1	Sistem Reproduksi Tikus	23
2.5.2	Spermatogenesis Pada Tikus	24
2.5.3	Produksi Spermatozoa Tikus	27
2.6	Motilitas Spermatozoa	28
2.7	Jumlah Spermatozoa	29
2.8	Morfologi Spermatozoa	30
2.9	Kerangka Teori	34
2.10	Kerangka Konsep	35
2.11	Hipotesis	35

BAB 3 METODE PENELITIAN

3.1	Desain Penelitian	36
3.2	Waktu dan Tempat	36
3.2.1	Waktu.....	36
3.2.2	Tempat	36
3.3	Populasi dan Sampel	37
3.3.1	Populasi.....	37
3.3.2	Sampel	37
3.3.3	Kelompok Perlakuan	39
3.3.4	Kriteria Inklusi	39
3.3.5	Kriteria Eksklusi	40
3.4	Alat dan Bahan	40
3.4.1	Alat Penelitian	40
3.4.2	Bahan	41
3.5	Identifikasi Variabel dan Definisi Oprasional	42
3.5.1	Identifikasi Variabel	42
3.5.2	Definisi Oprasional	42
3.6	Prosedur dan Alur Penelitian	43
3.6.1	Prosedur Penelitian	43
3.6.2	Alur Penelitian	50
3.7	Analisis Data	51
3.8	Etik Penelitian	52

BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1	Hasil Penelitian	54
4.1.1	Gambaran Spermatozoa	54
4.1.2	Analisis Spermatozoa	59
4.2	Pembahasan.....	68
4.2.1	Motilitas Spermatozoa	68
4.2.2	Morfologi Spermatozoa	70
4.2.3	Jumlah Spermatozoa	73

BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan	77
5.2 Saran	78

DAFTAR PUSTAKA

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Faktor-faktor yang Berhubungan dengan Infertilitas Laki-Laki dan Distribusi Persentase Pada Pasien	9
Tabel 2. Kelompok Perlakuan	39
Tabel 3. Definisi Operasional Variabel	42
Tabel 4. Hasil Nilai Tengah dan Nilai Minimum-Maksimum Motilitas Spermatozoa	60
Tabel 5. Hasil Uji Normalitas Data Motilitas Spermatozoa	60
Tabel 6. Hasil Uji Kruskal-Wallis Motilitas Spermatozoa	61
Tabel 7. Hasil Uji Post Hoc Mann-Whitney Motilias Spermatozoa	61
Tabel 8. Hasil Nilai Tengah dan Nilai Minimum-Maksimum Morfologi Spermatozoa	62
Tabel 9. Hasil Uji Normalitas Data Morfologi Spermatozoa	63
Tabel 10. Hasil Uji Kruskal-Wallis Morfologi Spermatozoa	63
Tabel 11. Hasil Uji Post Hoc Mann-Whitney Morfologi Spermatozoa	64
Tabel 12. Hasil Rata-rata dan Atanar Deviasi Jumlah Spermatozoa	65
Tabel 13. Hasil Uji Normalitas Data Jumlah Spermatozoa	66
Tabel 14. Hasil Uji One-Way ANOVA Jumlah Spermatozoa	66
Tabel 15. Hasil Uji Post Hoc <i>Tamhane</i> Jumlah Spermatozoa	67

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Faktor-faktor yang Berkontribusi Terhadap Stres Oksidatif yang Menyebabkan Infertilitas Pada Laki-Laki.....	14
Gambar 2. Tanaman <i>Rhizopora Apiculata</i>	18
Gambar 3. Struktur Senyawa Tanin	20
Gambar 4. Tikus <i>Rattus novergicus</i> galur Sprague Dawley	23
Gambar 5. Anatomi Sistem Reproduksi Tikus Jantan.....	24
Gambar 6. Spermatogenesis Pada Tikus	26
Gambar 7. Perbandingan Jumlah, Motilitas, dan Bentuk Spermatozoa Normal dan Abnormal.....	30
Gambar 8. Struktur Morfologi Spermatozoa Normal	30
Gambar 9. Morfologi Spermatozoa Abnormal. Pada Pembesaran 400X	33
Gambar 10. Kerangka Teori.....	34
Gambar 11. Kerangka Konsep	35
Gambar 12. Alur Penelitian	50
Gambar 13. Gambaran Motilitas Spermatozoa Pada Kelompok (K1): Didapatkan nilai rata-rata motilitas spermatozoa 67,30%. Pembesaran 40X.....	55
Gambar 14. Gambaran Motilitas Spermatozoa Pada Kelompok (P1): Didapatkan nilai rata-rata motilitas spermatozoa 22,10%. Pembesaran 40X.....	55
Gambar 15. Gambaran Motilitas Spermatozoa Pada Kelompok (P2): Didapatkan nilai rata-rata motilitas spermatozoa 70,11%. Pembesaran 40X.....	56
Gambar 16. Gambaran Morfologi Spermatozoa Pada Kelompok (K1): Didapatkan nilai rata-rata morfologi spermatozoa 69,40%. Pembesaran 100X.....	56
Gambar 17. Gambaran Morfologi Spermatozoa Pada Kelompok (P1): Didapatkan nilai rata-rata morfologi spermatozoa 18,80%. Pembesaran 100X.....	57
Gambar 18. Gambaran Morfologi Spermatozoa Pada Kelompok (P2): Didapatkan nilai rata-rata morfologi spermatozoa 64,56%. Pembesaran 100X.....	57
Gambar 19. Gambaran Jumlah Spermatozoa Pada Kelompok (K1): Didapatkan nilai rata-rata Jumlah spermatozoa 219,580 Pembesaran 40X.....	58

- Gambar 20. Gambaran Jumlah Spermatozoa Pada Kelompok (P1):
Didapatkan nilai rata-rata Jumlah spermatozoa 30,500/mL
Pembesaran 40X.....58
- Gambar 21. Gambaran Jumlah Spermatozoa Pada Kelompok (P2):
Didapatkan nilai rata-rata Jumlah spermatozoa 50,689/mL
Pembesaran 40X.....59

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Infertilitas merupakan ketidakmampuan seseorang memiliki anak selama satu tahun atau lebih. Infertilitas terbagi menjadi infertilitas primer dan sekunder. Menurut *World Health Organization* (WHO) infertilitas primer adalah penyakit sistem reproduksi yang didefinisikan oleh suatu kegagalan mencapai kehamilan setelah 12 bulan atau lebih berhubungan seksual secara teratur tanpa alat kontrasepsi (Poel, 2012). Infertilitas sekunder adalah suatu keadaan dimana laki-laki pernah menghamili wanita (istri) tetapi kemudian tidak mampu menghamili lagi wanita (istri) meskipun telah melakukan hubungan seksual secara teratur selama >12 bulan secara teratur tanpa kontrasepsi (Alhassan, 2014).

Infertilitas menjadi masalah umum yang terjadi di dunia. Diperkirakan 8-12% atau sekitar 60-80 juta pasangan mengalami masalah infertilitas selama masa reproduksinya (Saragih, 2013). Prevalensi infertilitas di Asia yaitu 30,8% di Kamboja, 10% di Kazakhtan, 43,7% di Turkmenistan, dan 21,3% di Indonesia (Konsensus Penanganan Infertilitas, 2013).

Infertilitas bukan hanya disebabkan oleh faktor wanita saja, melainkan juga berpengaruh pada faktor laki-laki. Infertilitas yang disebabkan oleh gangguan pada faktor laki-laki mencapai persentase yang cukup besar yaitu, 40-60% (Rahmanisa, 2013). Fertilitas pada laki-laki dapat menurun akibat kelainan urogenital, kongenital atau didapat, infeksi saluran urogenital, suhu skrotum meningkat, kelainan endokrin, kelainan genetik dan faktor imunologis (Konsensus Penanganan Infertilitas, 2013).

Gaya hidup yang jelek seperti konsumsi alkohol, berat badan, olahraga, stress, dan pola tidur, pekerjaan dan merokok sangat berperan terhadap terjadinya infertilitas pada pria. Gaya hidup yang diketahui berpengaruh terhadap terjadinya infertilitas pada pria adalah merokok (Konsensus Penanganan Infertilitas, 2013).

Angka kejadian merokok masih sangat tinggi. Diperkirakan sekitar 1,3 milyar penduduk dunia adalah perokok, 80% diantaranya berada di Negara berkembang (Apriora, Amir, & Khairisyaf, 2015). Berdasarkan data WHO Indonesia merupakan negara ketiga yang memiliki jumlah perokok aktif terbanyak di dunia yaitu 61,4 juta perokok dan meningkat setiap tahunnya (Adyitia, 2014).

Asap rokok dapat menimbulkan gangguan hormonal, spermatogenesis, merusak vabilitas sperma, dan menyebabkan adanya bahan toksik pada spermatozoa (Apriora *et al.*, 2015). Asap rokok merupakan radikal bebas.

Radikal bebas yang terlalu banyak dapat memicu stress oksidatif. Beberapa cara asap rokok mempengaruhi spermatozoa adalah melalui peningkatan radikal bebas yaitu ROS (*Reactive Oxygen Species*) sehingga menyebabkan peroksidasi lipid sehingga menyebabkan kerusakan pada DNA spermatozoa dan diikuti peningkatan *apoptosis* spermatozoa sehingga akan terjadi penurunan motilitas sperma, abnormalitas morfologi dan jumlah sperma menurun (Ishlahiyah, 2006).

Antioksidan alami banyak terdapat di tanaman. Ekosistem tanaman bakau di Indonesia merupakan ekosistem yang terbanyak di dunia dengan jumlah kuantitas area lebih dari 42.550 km² dan jumlah spesies lebih dari 45 spesies. Salah satu penyusun ekosistem *mangrove* yaitu bakau (*Rhizophora sp.*). Spesies bakau yang sering ditemukan antara lain *Rhizophora apiculata*, *Rhizophora mucronata*, dan *Rhizophora mangle*. Sebagian besar bagian dari tumbuhan bakau (*Rhizophora apiculata*) digunakan sebagai obat oleh masyarakat pesisir di Indonesia karena mengandung bahan aktif yang bermanfaat (Purnobasuki, 2001).

Tumbuhan ini banyak mengandung antioksidan. *Rhizophora Apiculata* mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, triterpenoid, steroid, saponin dan tanin (Darlian *et all.*, 2011). Bahwa aktivitas antioksidan dari ekstrak kulit batang bakau minyak (*Rhizophora apiculata*) memiliki kemampuan dalam menghambat pembentukan radikal bebas. Hal ini disebabkan karena terdapat senyawa tanin dalam kulit batang tersebut. Tanin adalah senyawa antioksidan

tertinggi di kulit batang bakau minyak (*Rhizopoda apiculata*). Tanin dapat menekan radikal bebas yang dibentuk oleh rokok (Abdullah, 2011).

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Cita Islahiyana pada tahun 2006, rokok dapat menurunkan jumlah spermatozoa. Dengan pemberian vitamin C sebagai antioksidan dapat meningkatkan jumlah spermatozoa. Penelitian yang telah dilakukan oleh Apriora pada tahun 2015 terbukti bahwa rokok dapat mengakibatkan abnormalitas morfologi spermatozoa. Abnormalitas terbanyak terdapat di bagian kepala. Selain kepala terjadi abnormalitas di ekor dan leher spermatozoa. Penelitian lain yang telah dilakukan rokok juga berpengaruh terhadap motilitas spermatozoa dan setelah pemberian antioksidan berupa zink dan vitamin C terdapat perbaikan (Priatna, 2014)

1.2 Rumusan Masalah

Asap rokok mempengaruhi spermatozoa melalui peningkatan radikal bebas yaitu ROS (*Reactive Oxygen Species*). Peningkatan radikal bebas akan menyebabkan stres oksidatif sehingga menyebabkan penurunan motilitas, abnormalitas morfologi dan penurunan jumlah spermatozoa. Kulit batang bakau minyak (*Rhizopoda apiculata*) diketahui memiliki kandungan antioksidan. Tanaman ini mudah ditemui di Indonesia dan belum banyak dimanfaatkan sebagai sumber obat herbal. Berdasarkan uraian diatas, maka peneliti tertarik untuk melakukan penelitian dan didapatkan rumusan masalah yaitu apakah terdapat pengaruh pemberian ekstrak kulit batang bakau minyak (*Rhizopora apiculata*) terhadap perbaikan morfologi, motilitas dan jumlah

spermatozoa pada tikus putih (*Rattus novergicus*) jantan galur *sprague dawley* yang terpapar asap rokok?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak kulit batang bakau minyak (*Rhizophora apiculata*) terhadap morfologi, motilitas dan jumlah spermatozoa pada tikus putih (*Rattus novergicus*) jantan galur *sprague dawley* yang terpapar asap rokok

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol 95% kulit batang bakau minyak (*Rhizophora apiculata*) terhadap morfologi spermatozoa pada tikus putih (*Rattus novergicus*) jantan galur *sprague dawley* yang terpapar asap rokok.
2. Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak kulit batang bakau minyak (*Rhizophora apiculata*) terhadap motilitas spermatozoa pada tikus putih (*Rattus novergicus*) jantan galur *sprague dawley* yang terpapar asap rokok.
3. Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak kulit batang bakau minyak (*Rhizophora apiculata*) terhadap jumlah spermatozoa pada tikus putih (*Rattus novergicus*) jantan galur *sprague dawley* yang terpapar asap rokok.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Ilmu Pengetahuan

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah mengenai pengaruh pemberian ekstrak kulit batang bakau (*Rhizopora apiculata*) terhadap morfologi, motilitas dan jumlah spermatozoa tikus putih (*Rattus novergicus*) jantan galur *sprague dawley* yang terpapar asap rokok.

1.4.2 Bagi Masyarakat

Penelitian ini diharapkan dapat menambah pengetahuan masyarakat mengenai pengaruh pemberian ekstrak kulit batang bakau (*Rhizopora apiculata*) terhadap morfologi, motilitas dan jumlah spermatozoa tikus putih (*Rattus novergicus*) jantan galur *sprague dawley* yang terpapar asap rokok.

1.4.3 Bagi institusi pendidikan

Penelitian ini diharapkan dapat mewujudkan visi dan misi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung pada penelitian dibidang *agromedicine* yaitu peran kulit batang bakau sebagai antioksidan.

1.4.4 Bagi Peneliti

Penelitian ini untuk menambah pengetahuan dan pengalaman belajar meneliti terkait pengaruh pemberian ekstrak kulit batang bakau (*Rhizopora Apiculata*) terhadap perbaikan pada morfologi, motilitas dan jumlah spermatozoa tikus putih (*Rattus novergicus*) jantan galur *sprague dawley* yang terpapar asap rokok.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Infertilitas

2.1.1 Definisi Infertilitas

Infertilitas menurut *World Health Organization* (WHO) adalah ketidakmampuan pasangan yang aktif secara seksual tanpa kontrasepsi untuk mendapatkan kehamilan dalam satu tahun (Kusuma *et al.*, 2015).

2.1.2 Tipe Infertilitas Laki-laki

Infertilitas laki-laki dapat dibagi menjadi dua yaitu (Al-Haija, 2011)

1. Infertilitas primer: merupakan suatu keadaan dimana laki-laki (suami) tidak pernah menghamili wanita (istri) meskipun telah melakukan hubungan seksual secara teratur selama >12 bulan secara teratur tanpa kontrasepsi.
2. Infertilitas sekunder: merupakan suatu keadaan dimana laki-laki (suami) pernah menghamili wanita (istri) tetapi kemudian tidak mampu menghamili lagi wanita (istri) meskipun telah melakukan hubungan seksual secara teratur selama >12 bulan secara teratur tanpa kontrasepsi.

2.1.3 Prevalensi

Menurut *World Health Organization* (WHO) sekitar 50-80 juta atau 1 dari 7 pasangan suami-istri pasangan memiliki masalah infertilitas, dan sekitar 2 juta pasangan infertil muncul setiap tahunnya (Saraswati, 2015). Prevalensi infertilitas di Asia yaitu 30,8% di Kamboja, 10% di Kazakhtan, 43,7% di Turkmenistan, dan 21,3% di Indonesia. Perempuan di Indonesia yang mengalami infertilitas umur 25 tahun keatas sebesar 16,8%, perempuan umur 30 tahun keatas 4,9%. Angka kejadian tertinggi terdapat pada usia 20-24 tahun. Faktor penyebab infertilitas berasal dari suami, istri, atau keduanya. Menurut penelitian yang dilakukan Lim dan Ratnam, faktor penyebab yang di sebabkan oleh laki-laki sebesar 33%. Sedangkan menurut WHO pada 1989 sebesar 40%. Menurut penelitian yang dilakukan Arsyad terhadap 246 pasangan infertil di Palembang menunjukkan infertilitas yang disebabkan oleh faktor laki-laki sebesar 48,4% (Khaidir, 2006). Menurut konsensus infertilitas, infertilitas yang disebabkan oleh faktor laki-laki sebesar 30-40% (Konsensus Penanganan Infertilitas, 2013).

2.1.4 Faktor Risiko Infertilitas Laki-laki

Fertilitas laki-laki dapat menurun akibat dari:

- a. Kelainan urogenital kongenital atau didapat
- b. Infeksi saluran urogenital
- c. Suhu skrotum yang meningkat (contohnya akibat dari varikokel)
- d. Kelainan endokrin

- e. Kelainan genetik
- f. Faktor imunologi

Tabel 1. Faktor-faktor yang Berhubungan dengan Infertilitas Laki-laki dan Distribusi Persentase Pada Pasien (Konsensus Penanganan Infertilitas,2013)

Diagnosa	Seluruh Pasien	Azoos permi a
Total	100%	11,2%
Infertilitas dengan penyebab yang diketahui	42,6%	42,6%
p Kelainan penurunan testis	8,4	17,2
Varikokel	14,8	10,9
a Autoantibodi sperma	3,9	-
Tumor testis	1,2	2,8
d Lain-lain	5,0	1,2
Infertilitas idiopatik	30,0	13,3
Hipogonadism	10,1	16,4
a Sindrom klinefelter	2,6	13,7
XX Male	0,1	0,6
Hipogonadism primer tanpa penyebab yang diketahui	2,3	0,8
Hipogonadism sekunder (hipogonadotropik)	1,6	1,9
Sindrom kallmann	0,3	0,5
t Hipogonadism hipogonadotropik idiopatik	0,4	0,4
Residual pasca pembedahan hipofisis	<0,1	0,3
a Lain-lain	0,8	0,8
Hipogonadism late-onset (LOH)	2,2	-
b Keterlambatan pubertas	1,4	-
Penyakit sistemik	2,2	0,5
Krlopreservasi karena keganasan	7,8	12,5
e Tumor testis	5,0	4,3
Limfoma	1,5	4,6
l Leukemia	0,7	2,2
Sarkoma	0,6	0,9
Gangguan ereksi/ejakulasi	2,4	-
Obstruksi	2,2	10,3
Vasektomi	0,9	5,3
l CBAVD (Fibrosis Kistik)	0,5	3,1
Lain-lain	0,8	1,9

Pada tabel 1 diatas, di dapatkan bahwa faktor risiko infertilitas tertinggi pada pria yaitu dapat diketahui penyebabnya yaitu 42,6%. Penyebab yang diketahui faktor risiko yang paling tinggi yaitu disebabkan oleh varikokel 14,8%. Selain itu dapat disebabkan oleh autoantibodi testis, tumor testis. Infertilitas dapat disebabkan oleh

idiopatik, hipogonadisme, penyakit sistemik, keganasan, gangguan ereksi atau ejakulasi. Kualitas semen yang terganggu, azoospermia dan cara senggama yang salah, merupakan faktor yang berkontribusi pada 50% pasangan infertilitas. Infertilitas dapat juga terjadi idiopatik pada laki-laki karena beberapa faktor, termasuk disrupsi endokrin yang diakibatkan karena polusi lingkungan, radikal bebas, atau kelainan genetik (Konsensus Penanganan Infertilitas, 2013).

Faktor risiko infertilitas pada laki-laki ada yang membagi menjadi dua yaitu, faktor endogen dan faktor eksogen. Faktor endogen yaitu, varikokel, spermatozoa *immature*, idiopatik. Faktor eksogen yaitu, konsumsi alkohol, rokok, kafein, radiasi, gangguan tidur, pemakaian laptop dan pemakaian handphone seluler (Agarwal *et al.*, 2014). Usia, obesitas, pekerjaan, olahraga, diketahui berpengaruh terhadap kejadian infertilitas (Al-Haija, 2011).

2.2 Asap Rokok

2.2.1 Prevalensi Perokok di Indonesia

Diperkirakan sekitar 1,3 milyar penduduk dunia adalah perokok, 80% diantaranya berada di Negara berkembang (Apriora *et al.*, 2015). Menurut data WHO 2013 pada tahun 2007 34,2% dan pada tahun 2013 meningkat menjadi 36,3% (Adyttia *et al.*, 2014). Berdasarkan data WHO Indonesia merupakan negara ketiga yang memiliki jumlah perokok aktif terbanyak di dunia yaitu 61,4 juta

perokok dan terus meningkat setiap tahunnya (Adyttia *et al.*, 2014). Proporsi perokok di Indonesia saat ini terbanyak di Kepulauan Riau dengan perokok setiap hari 27,2% dan kadang-kadang merokok 3,5%. Proporsi perokok di provinsi Lampung dengan perokok setiap hari sebanyak 26,5% dan kadang-kadang merokok 4,8% (Kementrian Kesehatan RI, 2013).

2.2.2 Pengaruh Paparan Asap Rokok Terhadap Spermatozoa

Rokok adalah hasil olahan tembakau terbungkus termasuk cerutu atau bentuk lainnya yang dihasilkan dari tanaman *Nicotiana tobacum*, *Nicotiana rustica* dan spesies lain. Asap rokok yang dihirup seorang perokok aktif mengandung komponen gas dan partikel. Komponen gas yang sangat rentan menimbulkan radikal bebas terdiri dari karbon monoksida, karbondioksida, oksida dari nitrogen dan senyawa hidrokarbon. Sedangkan komponen partikel terdiri dari tar, nikotin, benzopiren, fenol, dan cadmium (Amarudin, 2012).

Dalam sebatang rokok banyak kandungan senyawa yang dapat menyebabkan berbagai penyakit bagi tubuh. Di dalam sebatang rokok terkandung 4000 jenis senyawa kimia, dengan tiga komponen utama rokok yang berbahaya yaitu nikotin, tar, karbon monoksida (Apriora *et al.*, 2015). Sebanyak 400 jenis diantaranya adalah termasuk zat berbahaya dan 43 jenis yang tergolong karsinogenik

bagi tubuh (Ys & Medison, 2016). Penyakit yang dapat di sebabkan oleh rokok diantaranya adalah kanker mulut, esophagus, faring, laring, paru, pancreas, kandung kemih, penyakit pembuluh darah, dan penyakit paru obstruktif kronik (PPOK) (Nururrahmah, 2014).

Nikotin dalam asap rokok dapat menstimulasi medula adrenal untuk melepaskan katekolamin yang dapat mempengaruhi sistem saraf pusat, sehingga mekanisme umpan balik antara hipotalamus, hipofise anterior dan testis menjadi terganggu (Putra, 2014). Nikotin mempengaruhi kerja sistem saraf pusat dengan cara menghambat kerja GnRH sehingga pembentukan FSH dan LH terhambat. Dengan terhambatnya pembentukan FSH dan LH, maka spermatogenesis berjalan tidak normal (Wahyuni *et al.*, 2015).

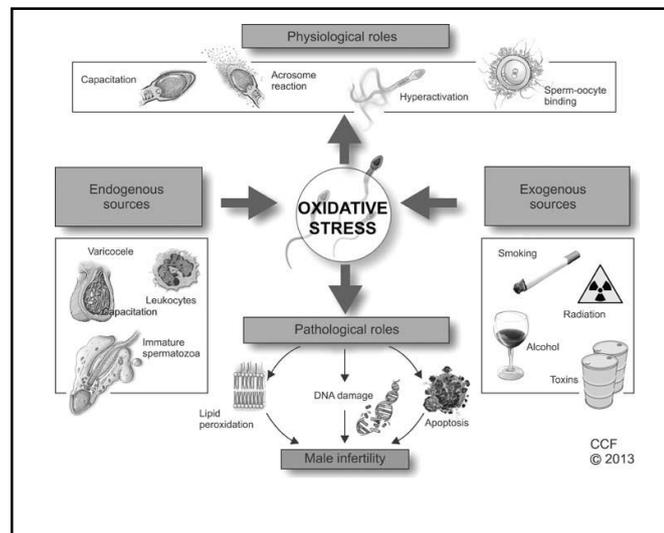
Karbon monoksida merupakan gas beracun yang dapat mengakibatkan berkurangnya kemampuan darah membawa oksigen sehingga berakibat pada kematian sel karena kekurangan oksigen (Putra, 2014). Tar dalam asap rokok memiliki sedikitnya 4 jenis radikal bebas yang berbeda. Salah satu tipe radikal yang menonjol adalah semiquinon (Putra, 2014). Radikal bebas adalah molekul yang mempunyai atom dengan elektron yang tidak berpasangan. Radikal bebas mempunyai reaktivasi yang tinggi, reaktivasinya dapat merusak karbohidrat, lipid, protein, dan asam nukleat (Putra, 2014).

Produksi radikal bebas yang berlebih akan menyebabkan stres oksidatif. Stres oksidatif merupakan hasil dari ketidakseimbangan antara produksi ROS (*Reactive Oxygen Species*) dan efek perlindungan dari sistem antioksidan yang bertanggung jawab untuk menetralkan ROS. Peningkatan ROS (*Reactive Oxygen Species*) yang melebihi dari sistem pertahanan antioksidan tubuh akan terjadi stress oksidatif (Amarudin, 2012).

Kelebihan ROS (*Reactive Oxygen Species*) dapat menyebabkan reaksi patologis yang mempengaruhi struktur DNA, mempercepat apoptosis, menghambat motilitas, menyebabkan abnormalitas morfologi, sehingga bisa menurunkan jumlah sperma. Mekanisme utama produksi ROS yang tinggi dapat mempengaruhi kualitas dan fungsi spermatozoa yaitu melalui induksi peroksidasi lipid dan kerusakan DNA. Peroksidasi lipid adalah reaksi berantai yang sangat berpotensi terjadi kerusakan membran dan organel sel. Maka dari itu, untuk mengontrol dan mengurangi peroksidasi lipid, digunakan senyawa yang bersifat antioksidan. Sistem antioksidan terdiri dari enzim dan zat non enzimatis yang berinteraksi satu sama lain untuk memastikan perlindungan yang optimal terhadap ROS (Jedrzejowska, Wolski, & Hilczer, 2012).

Stres pada pria dapat memicu interaksi antara aksis hipotalamus-hipofisis-adrenal dengan hipotalamus-hipofisis-testis. Pengeluaran

corticotrophin releasing hormone (CRH) oleh hipotalamus ke dalam sistem porta hipofisis sehingga akan menstimulasi pengeluaran *adenocorticotropion releasing hormone* (ACTH) yang akan merangsang korteks adrenal mengeluarkan glukokortikoid. Aksis hipotalamus-hipofisis-testis ini berjalan paralel dengan aksis hipotalamus-hipofisis-adrenal. Peningkatan aksi inhibisi GnIH pada sekresi GnRH dapat menimbulkan penurunan LH yang akhirnya menekan produksi testosteron oleh sel Leydig dan spermatozoa oleh sel Sertoli. Akibatnya berpengaruh pada kualitas sperma yang meliputi jumlah sperma, motilitas atau daya gerak sperma, morfologi (Wahyuni *et al.*, 2015).



Gambar 6. Faktor-faktor yang Berkontribusi Terhadap Stres Oksidatif yang Menyebabkan Infertilitas Pada Laki-Laki (Agarwal *et al.*, 2014).

2.3 Antioksidan

Antioksidan adalah senyawa kimia yang dapat mendonorkan satu elektronnya sebagai upaya pertahanan terhadap dampak negatif stres oksidatif akibat radikal bebas. Antioksidan dapat digolongkan berdasarkan asalnya, sumber, fungsi atau mekanismenya. Antioksidan dapat menurunkan resiko terkena penyakit degeneratif seperti kardiovaskuler, anti kanker, aterosklerosis, osteoporosis dan penyakit degeneratif lainnya. Konsumsi makanan yang mengandung antioksidan dapat meningkatkan status imunologi dan sebagai *anti aging* (Winarsi, 2007).

Berdasarkan asalnya, antioksidan dibagi menjadi antioksidan endogen dan eksogen. Antioksidan endogen, yaitu enzim-enzim yang bersifat antioksidan, seperti: katalase (Cat), *Superoksida Dismutase* (SOD), dan glutathione peroksidase(Gpx); serta antioksidan eksogen, yaitu yang didapat dari luar tubuh/makanan. Berbagai bahan alam asli Indonesia banyak mengandung antioksidan dengan berbagai bahan aktifnya, antara lain vitamin C, E, pro vitamin A, organosulfur, *a-tocopherol*, *flavonoid*, *thymoquinone*, statin, niasin, *phycocyanin* (Werdhasari, 2014).

Antioksidan berdasarkan sumber dapat diperoleh dari bahan sintetik dan alami. Contoh antioksidan sintetik adalah Butil Hidroxil Toluen (BHT) dan Butil Hidroxil Anisol (BHA). Namun, penggunaan antioksidan sintetik dikhawatirkan dapat bersifat karsinogenik dan toksik dalam dosis yang tinggi.

Hal ini yang membuat antioksidan alami mulai banyak digunakan (Praditasari, 2016)

Manfaat antioksidan mampu menghambat reaksi oksidasi dengan cara mengikat radikal bebas dan molekul yang sangat reaktif sehingga kerusakan sel dapat dicegah. Reaksi oksidasi dengan radikal bebas sering terjadi pada molekul protein, asam nukleat, lipid dan polisakarida. Antioksidan tersebut berfungsi sebagai sistem pertahanan terhadap radikal bebas yang disebabkan oleh peningkatan produksi radikal bebas yang terbentuk akibat faktor stres, radiasi UV, polusi udara dan lingkungan (Muchtadi, 2013).

Fungsi dan mekanisme kerja antioksidan digolongkan menjadi tiga antara lain antioksidan primer, antioksidan sekunder dan antioksidan tersier. Antioksidan primer adalah antioksidan yang berperan sebagai pemutus berantai (*chain-breaking antioxidant*) yang beraksi dengan radikal lipid dan mengubahnya ke dalam bentuk yang lebih stabil. Contoh antioksidan primer antara lain Superoksida dismutase (SOD), Glutathion Peroksidase, katalase dan protein pengikat logam.

Antioksidan sekunder adalah antioksidan yang berperan sebagai pengikat ion logam yang bertindak sebagai prooksidan, menangkap radikal dan mencegah reaksi berantai. Antioksidan sekunder memiliki mekanisme yaitu mengikat ion-ion logam, menangkap oksigen, mengurai hidropersida menjadi senyawa non radikal, penyerap radiasi UV atau deaktivasi oksigen. Contoh

antioksidan sekunder antara lain vitamin C, vitamin E, beta-karoten, isoflavon, bilirubin dan albumin.

Antioksidan tersier adalah antioksidan yang berperan sebagai senyawa yang memperbaiki kerusakan biomolekul yang disebabkan radikal bebas. Contoh antioksidan tersier antara lain *butylated hydroxyanisole* (BHA) dan metionin sulfida reduktase (Sayuti & Yenrina, 2015).

2.4 Rhizophora Apiculata

Rhizophora apiculata merupakan salah satu tumbuhan bakau yang paling banyak ditemukan pada daerah pesisir pantai. Bakau *Rhizophora apiculata*, atau dikenal dengan nama bakau minyak, ialah nama sekelompok tumbuhan di hutan mangrove dari genus *Rhizophora* dan famili *Rhizophoraceae*. Spesies ini merupakan tanaman tropis yang bersifat *halophytic* atau toleran terhadap garam (Hadi, Irawati, & Suhadi, 2016).

2.4.1 Morfologi

Tumbuhan ini dapat tumbuh di hampir seluruh daerah pasang surut. Mangrove jenis ini merupakan tanaman yang dapat tumbuh pada daerah dengan lumpur agak keras dan dangkal, tergenang air pasang harian serta dapat membentuk tegakan murni (Hadi *et al.*, 2016).

Tinggi tumbuhan bakau ini tingginya bisa mencapai 30 m dengan diameter batang mencapai 50 cm, dan memiliki perakaran yang khas

hingga mencapai 5 m, kulit kayu berwarna abu-abu dan ranting daunnya berwarna hijau tua dengan hijau muda pada bagian tengah dan kemerahan di bagian bawah. Bentuk buahnya membulat telur atau berbentuk seperti buah pir terbalik, berwarna coklat, panjang 2,0–3,5 cm (Purnobasuki, 2005).

Panjang tangkai daun berkisar 10-50 cm berwarna coklat keputihan. Memiliki daun dengan bentuk memanjang lonjong. Pangkal helaian daun tidak bertoreh, tepi daun rata, serta ujung daun meruncing memiliki duri. Permukaan bawah tulang daun berwarna kemerahan dengan tangkai yang pendek. Panjang daun berkisar 3-13 cm dengan lebar berkisar 1-6 cm (Hadi *et al.*, 2016).



Gambar 2. Tanaman *Rhizophora Apiculata* (Hadi *et al.*, 2016)

2.4.2 Toksonomi

Regneum : *Plantae*

Devisi : *Magnoliophyta*

Kelas: *Magnolipsida*

Ordo : *Myrtales*

Famili : *Rhizophoraceae*

Genus : *Rhizopora*

Spesies : *Rhizopora Apiculata*

2.4.3 Kandungan Kimia

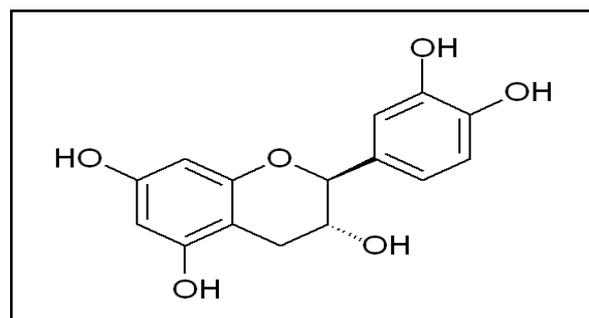
Potensi tumbuhan bakau sebagai bahan obat sangat besar, pada saat ini kandungan metabolit sekunder tumbuhan bakau mulai banyak terungkap. Tumbuhan ini kaya akan kandungan senyawa alkaloid, flavonoid, triterpenoid, steroid, saponin dan tanin (Darlian *et al.*, 2011). Hampir semua bagian tanaman *Rhizophora* sp. mengandung senyawa alkaloid, saponin, flavonoid dan tannin (Hadi *et al.*, 2016).

2.4.4 Bakau sebagai Antioksidan

Banyak sumber yang dapat kita pakai mulai dari batang, akar, dan kulit batang *Rhizophora apiculata* semuanya mengandung antioksidan alami. Pada bagian kulit batang *Rhizophora Apiculata* menghasilkan tanin yang digunakan sebagai sumber antioksidan alami (Rahim *et al.*, 2008). Aktivitas antioksidan dari ekstrak kulit batang bakau minyak *Rhizophora*

apiculata memiliki kemampuan yang tinggi dalam menghambat pembentukan radikal bebas (Abdullah, 2011). Penelitian yang telah dilakukan oleh Abdullah pada tahun 2011 didapatkan bahwa aktivitas antioksidan tertinggi pada kulit batang *Rhizopoda Apiculata* dapat menangkap radikal bebas. Dan senyawa yang paling tertinggi adalah senyawa tanin (Abdullah, 2011).

Tanin merupakan senyawa aktif metabolit sekunder yang diketahui mempunyai beberapa khasiat yaitu sebagai astringen, anti diare, anti bakteri dan antioksidan. Tanin merupakan senyawa polifenol dengan berat molekul yang tinggi ($M_r > 500$). Strukturnya terdiri dari gugus *flavan-3-ol* yang terhubung bersama melalui ikatan karbon C4-C6 atau C4-C8 (Rahim *et al.*, 2008). Tanin dibagi menjadi dua kelompok yaitu tanin terhidrolisis dan tanin terkondensasi (Malangngi *et al.*, 2012).



Gambar 3. Struktur Senyawa Tanin (Marburoh, 2015).

Sifat utama tanin pada tanaman tergantung pada gugus fenolik-OH yang terkandung dalam tanin. Secara garis besar sifat tanin dapat dijabarkan sebagai berikut:

1. Tanin secara umum memiliki gugus fenol dan bersifat koloid.
2. Semua jenis tanin dapat larut dalam air, kelarutannya besar dan akan bertambah besar apabila dilarutkan dalam air panas. Begitu pula dalam pelarut organik seperti metanol, etanol, aseton dan pelarut organik lainnya.
3. Reaksi warna terjadi bila disatukan dengan garam besi. Reaksi ini digunakan untuk menguji klasifikasi tanin. Reaksi tanin dengan garam besi akan memberikan warna hijau dan biru kehitaman, tetapi uji ini kurang baik karena selain tanin yang dapat memberikan reaksi warna, zat-zat lain juga dapat memberikan reaksi warna yang sama.
4. Tanin mulai terurai pada suhu 98,8 °C
5. Tanin dapat dihidrolisis oleh asam, basa, dan enzim.
6. Ikatan kimia yang terjadi antara tanin-protein atau polimer lainnya terdiri dari ikatan hidrogen, ikatan ionik, dan ikatan kovalen.
7. Tanin mempunyai berat molekul tinggi dan cenderung mudah dioksidasi menjadi suatu polimer, sebagian besar tanin amorf (tidak berbentuk) dan tidak mempunyai titik leleh.
8. Warna tanin akan menjadi gelap apabila terkena cahaya atau dibiarkan di udara terbuka.

9. Tanin mempunyai sifat bakteristatik dan fungistatik (Sujarnoko, 2012).

2.5 Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Galur Sprague Dawley

Tikus merupakan hewan mamalia yang digunakan secara luas untuk penelitian di laboratorium. Tikus pada penelitian ini menggunakan jenis tikus putih dengan nama latin *Rattus norvegicus* galur *Sprague dawley*. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague dawley* termasuk ke dalam hewan mamalia yang memiliki ekor panjang.

Ciri-ciri galur ini yaitu bertubuh panjang dengan kepala lebih sempit. Telinga tikus tebal dan pendek dengan rambut halus, dan mata berwarna merah. Ciri yang paling terlihat adalah ekornya yang panjang (lebih panjang dibandingkan tubuh). Bobot badan tikus putih pada umur dua belas minggu mencapai 240 gram sedangkan betinanya mencapai 200 gram. Tikus memiliki lama hidup berkisar antara 4 – 5 tahun dengan berat badan umum tikus putih berkisar antara 267 – 500 gram dan betina 225 – 325 gram (Sirois, 2005).

Tikus ini memiliki keunggulan sebagai hewan percobaan karena dapat berkembang biak dengan cepat, jenis hewan ini berukuran kecil sehingga pemeliharaannya relatif mudah, relatif sehat dan cocok untuk berbagai macam penelitian (Sirois, 2005).

Adapun taksonomi tikus penelitian ini sebagai berikut:

Kingdom	: Animal
Filum	: Chordata
Subfilum	: Vertebrata (Craniata)
Kelas	: Mamalia
Subkelas	: Theria
Infrakelas	: Eutharia
Ordo	: Rodentia
Subordo	: Myomorpha
Superfamili	: Muroidea
Famili	: Muridae
Subfamili	: Murinae
Genus	: <i>Rattus</i>
Spesies	: <i>Rattus norvegicus</i> (Dewi, 2008).

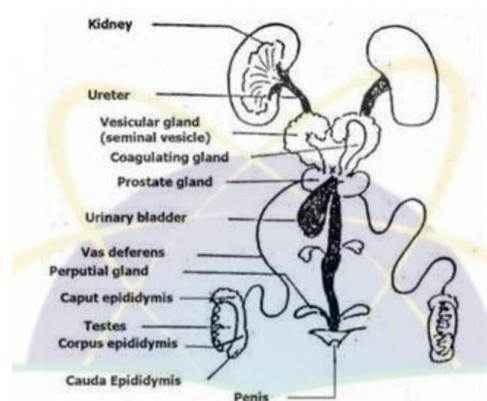


Gambar 4. Tikus *Rattus norvegicus* galur *Sprague dawley* (Akbar, 2010)

2.5.1 Sistem Reproduksi Tikus

Sistem reproduksi tikus jantan terdiri dari testis dan skrotum, epididimis, duktus deferens, kelenjar aksesorius diantaranya (kelenjar

vesikulosa, prostat dan bulbouretralis), uretra dan penis. Dari epididimis tempat tempat penyimpanan spermatozoa yang telah matang, akan diteruskan ke duktus deferens yang akan naik melalui kanalis inguinalis masuk ke dalam pelvis, lalu berlanjut ke duktus ejakulatorius yang merupakan segmen terminal yang membuka ke arah uretra prostatic. (Maula, 2014).



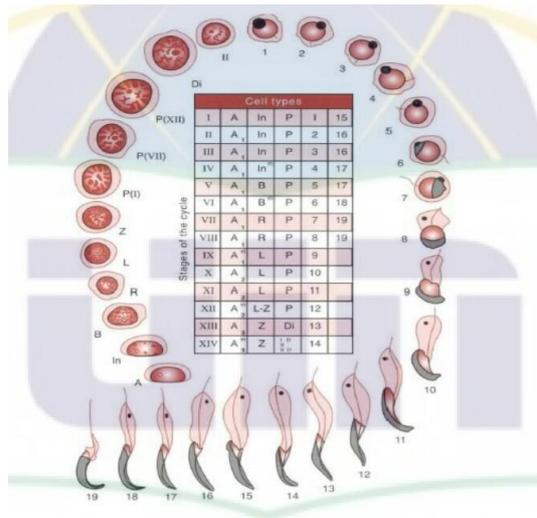
Gambar 5. Anatomi Sistem Reproduksi Tikus Jantan (Larasaty, 2013)

Terdapat tiga kelenjar pada system duktus yaitu kelenjar asesorius, vesikula seminalis, prostat, dan kelenjar bulbouretra. Spermatozoa yang telah matang dari epididimis bersama dengan hasil sekretorius, yang akan keluar melalui uretra penis. Kelenjar asesorius berfungsi mensekresikan zat makanan bagi spermatozoa. Kelenjar cowper (kelenjar bulbouretra) merupakan kelenjar yang menghasilkan getah yang bersifat alkali (basa) yang berfungsi untuk menetralkan keasaman vagina. Kelejar prostat berfungsi untuk menghasilkan kolesterol, garam, dan fosfolipid yang merupakan komponen utama dari semen yang bersifat basa (Maula, 2014).

Spermatogenesis terjadi didalam tubulus seminiferous. Tubulus ini berbentuk lekuk-lekuk dalam lobulus yang kemudian akan meninggalkan testis dan masuk kedalam epididimis. Didalam tubulus seminiferus terdapat sel-sel penunjang yang disebut sel Sertoli. Sel Sertoli terdapat di dalam dinding yang dilapisi oleh epitelium bertingkat yang mengandung sel spermatogenik. Sel Sertoli berfungsi pada proses androgen menjadi estrogen. Produksi androgen terjadi di dalam kantong dari sel Leydig yang terdapat di daerah interstitial antara tubulus-tubulus seminiferus (Maula, 2014).

2.5.2 Spermatogenesis Pada Tikus

Pada gambar terdapat tiga jenis spermatogonium secara garis besar yaitu tipe A, tipe intermediet, tipe B. Spermatogenesis tikus A1 kemudian memiliki enam pembelahan mitosis, dan kemudian menjadi spermatosit prelepton. Spermatosis dalam fase meiosis akan berubah menjadi lepton, zygoten dan pakiten untuk menjadi spermatosit sekunder. Selama fase meiosis masing-masing spermatosit membelah menjadi satu dari empat spermatid haploid, yang kemudian memasuki fase akrosom, selama akrosom berkembang (Maula, 2014).



Gambar 6. Spermatogenesis Pada Tikus (Larasaty, 2013)

Tahapan spermatogenesis pada tikus dimulai dari A, tipe spermatogonium A. In atau spermatogonium tipe intermediet. B, tipe spermatogonium B. R, atau spermatosit primer resting. L, spermatosit leptotene. Z, spermatosit zygotene. P (I), P (VII), P (XII), awal, pertengahan dan akhir spermatosit pachytene. Di atau diplotene, II, spermatosit sekunder, 1-19 merupakan tahap spermatogenesis (Larasaty, 2013)

Sel kelamin jantan tetap tidak aktif sampai sebelum masa pubertas, yaitu dimana sekitar 50 hari setelah kelahiran. Pada tahap itu mereka mulai membelah dan menjadi spermatogonium, dan kemudian terus membelah. Spermatogenesis pada tikus dibutuhkan 12 hari yang terdiri dari 14 tahap untuk menyelesaikan satu siklus. Spermatogonium tikus membutuhkan empat siklus sampai akhirnya membentuk spermatozoa,

sehingga diperlukan 48 hari untuk menyelesaikan seluruh tahap spermatogenesis (Maula, 2014).

Proses spermatogenesis dipengaruhi oleh beberapa hormon diantaranya testosteron, FSH, LH. Hormon FSH dan LH dihasilkan oleh hipofisis anterior. Sedangkan testosteron dihasilkan oleh hormon androgen di testis. Fungsi testosteron adalah merangsang pertumbuhan kelenjar-kelenjar asesorius dan merangsang pertumbuhan sifat jantan. Hormon ini sebagian disekresikan ke dalam darah dan sebagian mengalir ke lumen tubulus semeniferus yang berperan penting untuk pertumbuhan dan pembagian sel-sel germinativum dalam membentuk sperma. Sel-sel yang menghasilkan testosteron yaitu sel Leydig atau sel interstisial yang terletak antara jaringan ikat pada tubulus semeniferus (Guyton & Hall, 2007). *Folicle stimulating hormone* (FSH) disekresi oleh sel-sel kelenjar hipofisis anterior, untuk merangsang sel-sel Sertoli. *Hormone lutenizing* (LH) yang juga disekresi oleh kelenjar hipofisis anterior, merangsang sel-sel Leydig untuk menyekresi testosteron (Ganong, 2008).

2.5.3 Produksi Spermatozoa Tikus

Tidak berbeda dengan manusia, produksi spermatozoa tiap hari per testis pada tikus adalah $35,4 \times 10^6/\text{mL}$ dan pada manusia yakni sebesar $45,5 \times 10^6/\text{mL}$. Tubulus seminiferus tikus lebih tebal dari pada manusia yakni $347 \pm 5 \mu\text{m}$ pada tikus dan $262 \pm 9 \mu\text{m}$ pada manusia, tetapi pembatas tubulus pada tikus lebih jauh tipis dibanding manusia ($1,4 \pm 1$

μm vs $15,9 \pm 3,4 \mu\text{m}$). Epitel seminiferus tikus mengandung 40% lebih sel spermatogenik dari volumenya, dua kali lebih banyak dari epitel seminiferus manusia. Spermatozoa pada tikus lebih panjang dibandingkan dengan spesies mamalia lainnya, termasuk manusia dan hewan lainnya dan biasanya panjangnya sekitar 150-2000 μm . Kepala sperma pada tikus berbentuk kail hal ini sama seperti hewan pengerat lainnya (Maula, 2014).

2.6 Motilitas Spermatozoa

Motilitas dikenali sebagai prediktor yang terpenting dalam aspek fungsional spermatozoa. Motilitas sperma merupakan refleksi perkembangan normal dan kematangan spermatozoa dalam epididimis. Spermatozoa yang normal memiliki kepala, ekor, leher. Gerakan maju-mundur ekor (gerakan flagella) memberikan motilitas sperma. Gerakan ini disebabkan oleh gerakan meluncur longitudinal secara ritmis di antara tubulus posterior dan anterior yang membentuk aksonema. Sperma yang normal bergerak dalam medium cair dengan kecepatan 1-4 mm/menit. Proses selanjutnya setelah pembentukan sperma adalah pematangan sperma di epididimis. Setelah terbentuk di tubulus seminiferus, sperma membutuhkan waktu beberapa hari untuk melewati tubulus epididimis yang panjangnya 6 meter. Sperma yang bergerak dari tubulus seminiferus dan dari bagian awal epididimis adalah sperma yang belum motil, dan tidak dapat membuahi ovum. Akan tetapi, setelah sperma berada dalam

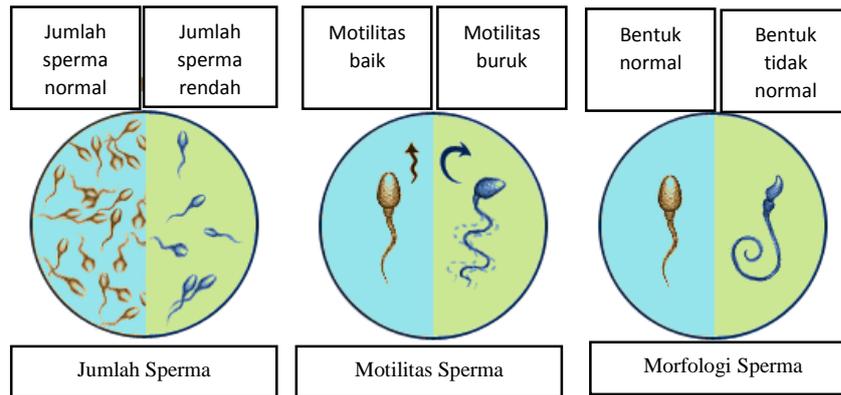
epididimis selama 18-24 jam, sperma akan memiliki kemampuan motilitas (Guyton & Hall, 2007).

Akibat aktivasi suatu protein unik yang disebut *Cat Sper* sperma dapat bergerak maju (motilitas progresif) melibatkan yang berada di bagian utama ekor sperma. Protein ini adalah suatu kanal Ca^{2+} yang memungkinkan influx Ca^{2+} generalisata *c-AMP*. Bukti-bukti terkini mengisyaratkan bahwa berbagai molekul ini dan reseptornya saling berinteraksi, yang memperkuat gerakan spermatozoa ke arah ovarium (Ganong, 2008).

Motilitas spermatozoa pada manusia dikatakan normal apabila pergerakan aktif di dapatkan $>50\%$, pergerakan lemah didapatkan $<30\%$, dan tidak bergerak didapatkan $<20\%$ (WHO, 2010).

2.7 Jumlah Spermatozoa

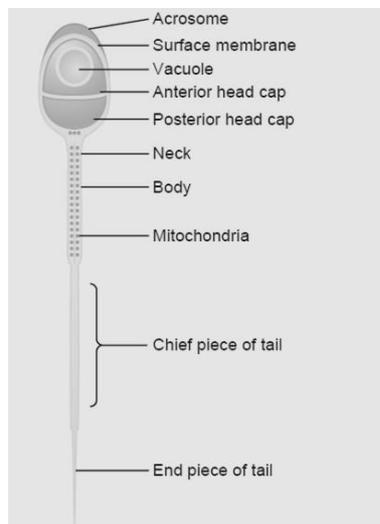
Pemeriksaan ini dilakukan setelah terjadi pengenceran cairan semen. Pengenceran cairan sperma dapat digunakan aquades. Laboratorium WHO menetapkan batas toleransi jumlah sperma terendah yang masih dikatakan normal adalah ≥ 20 juta sperma/mL. Bila jumlahnya < 20 juta sperma/mL maka disebut sebagai oligospermia. Azoospermia (ketiadaan sperma) dapat disebabkan karena adanya gangguan saat spermatogenesis, disfungsi ejakulasi ataupun karena adanya obstruksi. (WHO, 2010).



Gambar 7. Perbandingan Jumlah, Motilitas, dan Bentuk Spermatozoa Normal dan Abnormal (Dr. Joanna Ellington, CEO of INGfertility and inventor of Pre~Seed)

2.8 Morfologi Spermatozoa

Spermatozoa manusia normal terdiri atas tiga bagian yaitu: kepala, leher/badan dan ekor, dengan panjang kurang lebih 50-70 mikron.



Gambar 8. Struktur Morfologi Spermatozoa Normal (Guyton & Hall, 2007)

a. Kepala

Bagia kepala meiliki panjang 4,5 mikron, lebar 3 mikron dan tebal 1,5 mikron. Pada bagian anterior kepala spermatozoa

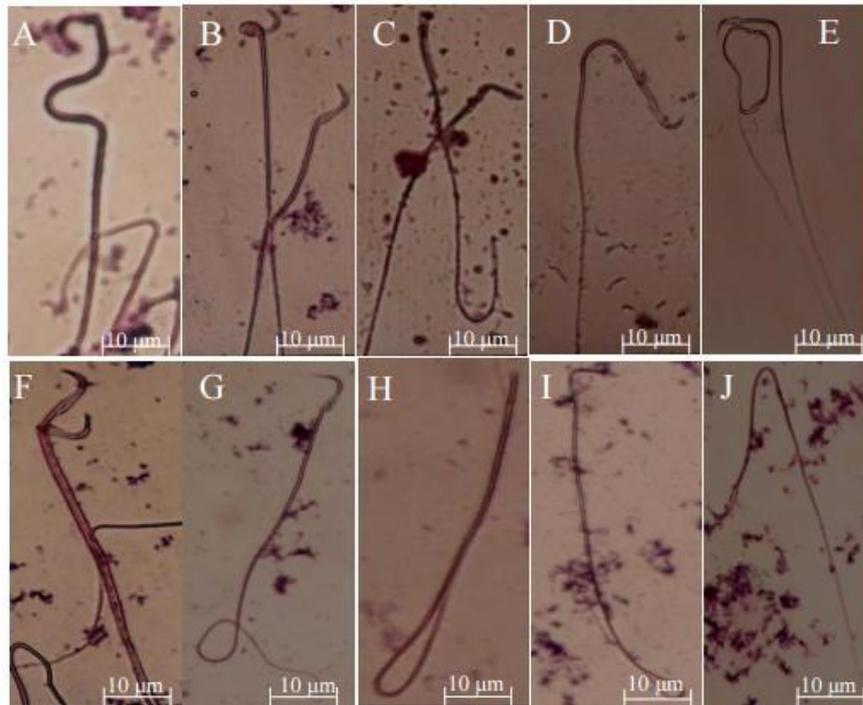
terdapat selubung yang disebut akrosom dan pada bagian posterior terdapat selubung yang disebut postakrosom. Akrosom berguna untuk penetrasi spermatozoa kepada ovum. Akrosom banyak mengandung enzim hidrolitik dan proteolitik yang penting untuk penetrasi ovum saat fertilisasi. Diantaranya terdapat enzim hialuronidase, neuroamidase, corona penetrating enzim (CPE). Hialuronidase yang dapat melarutkan matrik kumulus oofus pada saat terjadi fertilisasi. CPE berfungsi untuk menghancurkan korona radiata dan akrosin yang berfungsi menghancurkan zona pelusida. Neuroamidase yang berfungsi untuk menginduksi reaksi zona pelusida untuk menghalangi terjadinya polisperma (Mortimer, 2005).

b. Leher

Leher adalah bagian yang menghubungkan antara kepala dan ekor. Bagian kepala mengandung sentriol dan berkas fibril halus. Sentriol sel pada bagian proksimal membentuk kapitulum berupa serabut aksial yang dikelilingi oleh mitokondria pada bagian tengah. Tiap serabut aksial terdiri dari sebelas serat fibril. Fibril aksial ini terdiri dari aktin dan miosin. Fibril aksial terdapat di bagian tengah ekor (middle piece) dan ekor (principle piece). Sistem fibril ini merupakan basis motilitas pergerakan spermatozoa (Mortimer, 2005).

c. Ekor

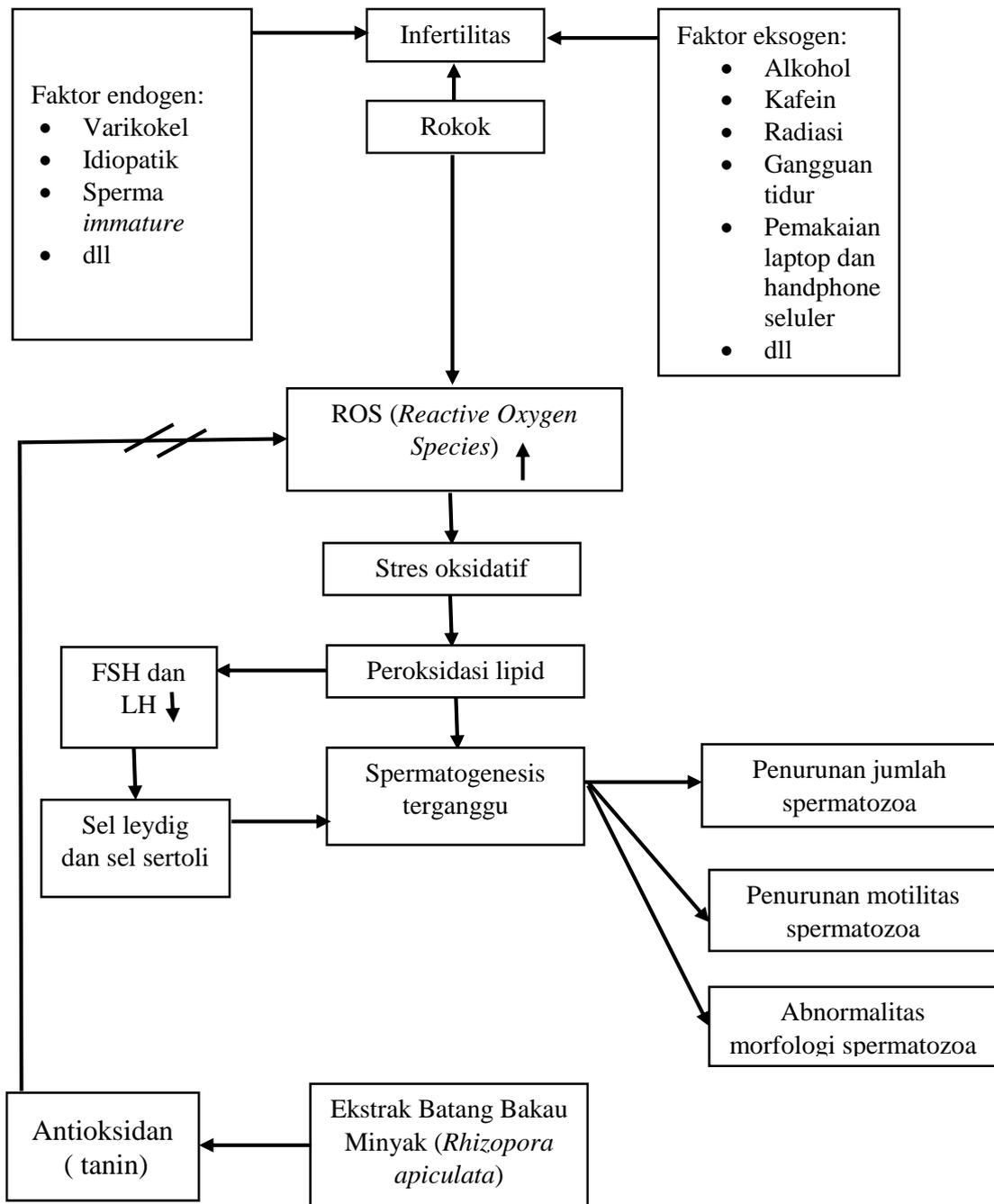
Pada bagian bagian utama ekor panjangnya dapat mencapai 45 mikron, bagian tengah ekor panjangnya 5-7 mikron. Bagian ekor dibagi menjadi tiga bagian utama yaitu bagian tengah badan (middle piece), bagian utama ekor (principle piece), bagian ujung ekor (end piece). Bagian utama ekor panjangnya dapat mencapai. Pada bagian tengah terdapat 10-15 mitokondria yang berbentuk spirial. Pada bagian ini berfungsi sebagai tempat pembentuk enzim, transfer energi yaitu hasil metabolisme karbohidrat dan protein. Energi yang terbentuk berguna untuk membantu menggerakkan ekor spermatozoa. Bagian ekor spermatozoa mempunyai susunan hampir menyerupai flagel yaitu terdiri dari dari dua flamen sentral yang dikelilingi oleh sembilan pasang filamen perifer. Pada bagian tengah dan dekar kepala terdapat sembilan pasang filamen yang lebih kasar dimana jumlah dan besarnya tidak sama. Yang berfungsi sebagai flager adalah bagian tengah utama dan ujung ekor. Flagel dibungkus oleh membran tipis yang terdiri dari serabut-serabut elastin (Mortimer, 2005).



Gambar 9. Morfologi Spermatozoa Abnormal. Pada Pembesaran 400X (Harlis, 2011).

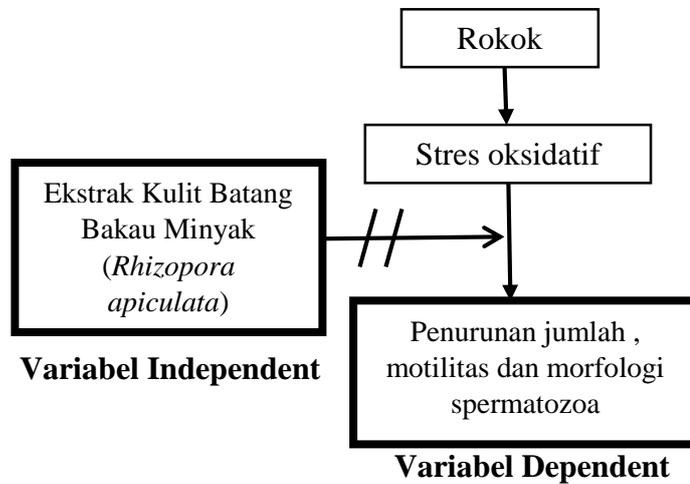
Pada gambar 5. di atas di dapatkan bentuk spermatozoa abnormal yang telah dilakukan penelitian sebelumnya oleh Harlis dkk. Pada gambar A. Bagian tengah tebal dan melekok; B. Kepala patah; C. Kepala dan bagian tengah yang mengandung sisa sitoplasma; D. Bagian tengah menebal; E. Ujung ekor dan kepala bertemu; F. Kepala ganda; G. Ekor melingkar; H. Kepala putus dan ekor melipat; I. Ujung ekor membentuk loop; J. Ekor bersudut (Harlis, 2011).

2.9 Kerangka Teori



Gambar 10. Kerangka Teori Pengaruh Antioksidan Tanin pada Ekstrak Kulit Batang Bakau (*Rhizophora apiculata*) terhadap peningkatan motilitas spermatozoa, perbaikan morfologi spermatozoa, dan peningkatan jumlah spermatozoa (Jedrzejowska *et al.*, 2012) (Abdullah, 2011) (Apriora *et al.*, 2015).

2.10 Kerangka Konsep



Gambar 11. Kerangka Konsep

2.11 Hipotesis

Berdasarkan tinjauan pustaka yang telah diuraikan maka hipotesis penelitian ini sebagai berikut:

H0 = Tidak terdapat pengaruh ekstrak kulit batang bakau minyak (*Rhizophora apiculata*) terhadap motilitas, morfologi, jumlah spermatozoa tikus jantan (*Rattus novergicus*) galur *Sparague dawley* yang terpapar asap rokok.

H1 = Terdapat pengaruh ekstrak kulit batang bakau minyak (*Rhizophora apiculata*) terhadap motilitas, morfologi, jumlah spermatozoa tikus jantan (*Rattus novergicus*) galur *sparue dawley* yang terpapar asap rokok.

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental dengan menggunakan desain *post test only randomized control group design*. Menggunakan 30 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Sprague dawley* berumur 8-12 minggu yang dipilih secara acak yang dibagi menjadi 3 kelompok, sebagai subyek penelitian.

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

3.2.1 Waktu

Penelitian ini dilakukan pada bulan November 2017 sampai bulan Desember 2017. Selama 30 hari (Batubara *et al.*, 2013).

3.2.2 Tempat

Tempat penelitian ini meliputi wilayah tempat tinggal sampel di *pet house* Fakultas Kedokteran Universitas Lampung, pembuatan preparat di Laboratorium Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Unila dan ekstraksi di Laboratorium Kimia Organik Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.

3.3 Populasi dan Sampel

3.3.1 Populasi

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Sprague dawley* berumur 2,5-3 bulan dengan berat badan 200-250 gram yang diperoleh dari Institut Pertanian Bogor (IPB).

3.3.2 Sampel

Besar sampel dihitung dengan metode rancangan acak lengkap dapat menggunakan rumus Freederer.

Rumus Freederer:

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

Keterangan:

t = jumlah kelompok perlakuan

n = jumlah pengulangan atau jumlah sampel tiap kelompok.

Berdasarkan rumus diatas maka dapat diperoleh estimasi besar sampel sebanyak

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

$$(3-1)(n-1) \geq 15$$

$$2(n-1) \geq 15$$

$$2n \geq 17$$

$$n \geq 8,5$$

$$n \geq 9$$

Dengan demikian terdapat 3 kelompok penelitian dengan sampel tiap kelompok yaitu sembilan ekor tikus ($n \geq 9$). Koreksi dilakukan pada subjek penelitian sebagai antisipasi terjadi *drop out* eksperimen.

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

Keterangan :

N = besar sampel koreksi

n = besar sampel awal

f = perkiraan proporsi drop out sebesar 10%

Berdasarkan rumus diatas maka dapat diperoleh estimasi besar sampel sebanyak :

$$N = \frac{n}{1 - f}$$
$$N = \frac{9}{1 - 10\%}$$
$$N = \frac{9}{1 - 0,1}$$
$$N = \frac{9}{0,9}$$
$$N = 10$$

Jadi, berdasarkan rumus sampel diatas, jumlah sampel dari tiga kelompok adalah 10 ekor tikus. Sehingga jumlah tikus yang digunakan adalah 30.

3.3.3 Kelompok Perlakuan

Tabel 2. Kelompok Perlakuan

No.	Kelompok	Perlakuan
1.	Kelompok Kontrol 1 (K1)	Kelompok tikus yang tidak diberi paparan asap rokok dan tidak diberi ekstrak kulit batang bakau (<i>Rhizophora apiculata</i>) (Kelompok Kontrol 1).
2.	Kelompok perlakuan 1(P1)	Kelompok tikus yang diberi rokok dua batang selama 30 hari dan tidak diberi ekstrak kulit batang bakau (<i>Rhizophora apiculata</i>) (Kelompok Perlakuan 1).
3.	Kelompok Perlakuan 2(P2)	Kelompok tikus yang diberi paparan asap rokok dua batang selama 30 hari dengan pemberian dosis 56,55 mg/kgbb ekstrak kulit batang bakau (<i>Rhizophora apiculata</i>) (Kelompok Perlakuan 2).

3.3.3 Kriteria Inklusi

- a. Sehat (tikus dengan bulu tidak rontok dan tidak kusam, aktivitas aktif)
- b. Berjenis kelamin jantan
- c. Berusia 2,5-3 bulan
- d. Berat badan 200–350 gram

3.3.4 Kriteria Eksklusi

- a. Terdapat penurunan berat badan $>10\%$ setelah masa adaptasi (satu minggu) di laboratorium.
- b. Mati selama masa perlakuan.

3.4 Alat dan Bahan

3.4.1 Alat Penelitian

3.4.1.1 Alat dalam Pembuatan Ekstrak

- a. Kertas saring
- b. Mesin penggiling
- c. *Rotatory evaporator*

3.4.1.2 Alat selama Perlakuan

- a. Kandang tikus
- b. Tempat makan dan minum tikus
- c. Neraca elektronik
- d. *Sonde* tikus
- e. *Sputit oral* 1 cc
- f. Alat bedah minor
- g. Sputit 10 cc
- h. Kotak pemaparan asap rokok
- i. Mikroskop cahaya
- j. Kamera digital
- k. *Handscoon* dan masker
- l. Gelas ukur dan pengaduk

3.4.1.3 Alat dalam Pembuatan Preparat Spermatozoa

- a. *Cover glass*
- b. *Object glass*
- c. *Tissue cassette*
- d. Kertas saring
- e. *Improved neubauver*
- f. Minyak emersi
- g. *Mikropipet*

3.4.2 Bahan Penelitian

3.4.2.1 Bahan dalam Pembuatan Ekstrak

- a. Kulit batang bakau minyak (*Rhizophora apiculata*)
- b. Etanol 95%

3.4.2.2 Bahan selama Perlakuan

- a. Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) dewasa jantan galur *Sprague dawley*
- b. Pakan tikus
- c. Air minum tikus
- d. Sekam untuk kandang tikus

3.4.2.3 Bahan dalam Pembuatan Preparat Spermatozoa

- a. Nacl 0,9%
- b. Pewarnaan giemsa
- c. Aquades
- d. Methanol

3.5 Identifikasi Variabel dan Definisi Oprasional

3.5.1 Identifikasi Variabel

- a. Variabel *Independent*: ekstrak kulit batang bakau minyak (*Rhizophora apiculata*)
- b. Variabel *Dependent*: motilitas, morfologi dan jumlah spermatozoa.

3.5.2 Definisi Oprasional

Untuk memudahkan penjelasan dan memperlihatkan variabel-variabel yang terlibat dalam penelitian ini, maka diberikan definisi operasional sebagai berikut :

Tabel 3. Definisi Oprasional Variabel

Variabel	Definisi	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala
Ekstrak kulit batang bakau minyak	Pemberian ekstrak kulit batang bakau (<i>Rhizophora apiculata</i>). Diberikan dengan dosis 56,55 mg/kgBB	Neraca	Larutan dengan dosis (mg)	Kategorik (nominal)
Paparan asap rokok	Paparan asap rokok dengan 2 batang rokok selama 1 jam per hari selama 30 hari	Stopwatch	Jam	Nominal
Motilitas Spermatozoa	Pergerakan spermatozoa yang terlihat bergerak atau tidak bergerak diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 100x.	Mikroskop	Presentase spermatozoa motil dibandingkan dengan total spermatozoa yang diamati	Numerik
Morfologi Spermatozoa	Diamati bentuk spermatozoa dengan 5 lapang pandang mikroskop dalam jumlah 100 spermatozoa	Mikroskop	Presentase spermatozoa bentuk normal	Numerik
Jumlah spermatozoa	Konsentrasi spermatozoa yang ada dalam pengamatan	Improved Neubauer	Juta/ sel	Numerik

3.6 Prosedur dan Alur Penelitian

3.6.1 Prosedur Penelitian

3.6.1.1 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 3 tempat dengan masing masing tempat berisi 10 ekor tikus putih jantan. Dilakukan penimbangan dan penandaan pada tikus putih. Tikus ditempatkan pada kandang dengan ukuran 40 x 30 x 20 cm yang terbuat dari bahan plastik dan tutup berupa kawat besi. Tikus diberi makan sesuai 10% berat badan, yaitu sekitar 20-25 gram/ekor/hari. Pakan diberikan pada pagi hari pukul 07.00 dan sore hari pukul 16.00. Pemberian Air minum diberikan secara *adlibitum*. Kebersihan kandang dilakukan dengan cara penggantian sekam setiap 3 hari (Widiartini *et al.*, 2013) (Mustofa, 2013).

3.6.1.2 Pembuatan Ekstrak Kulit Batang Bakau

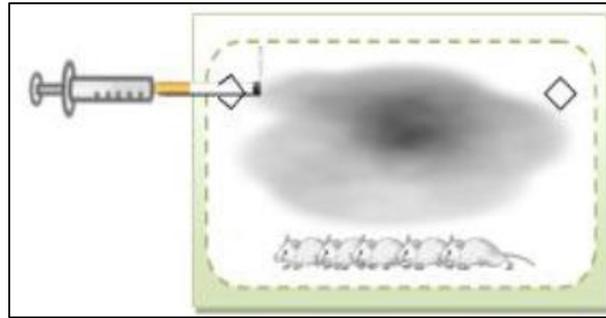
Batang Bakau minyak didapatkan dari kota Lampung Timur. Bagian tanaman dipisahkan antara bagian batang, kulit batang, dan akar. Kulit batang bakau dicuci dengan air mengalir lalu dikeringkan dengan penganginan alami. Kulit batang lalu dihaluskan dengan mesin penghalus dan ditimbang didapatkan

berat 600 gram serbuk kulit batang bakau. Serbuk simplisia kulit batang bakau minyak (*Rhizopora apiculata*) dicampur dengan pelarut etanol 95% sebanyak 1,5 L selama jam pertama sambil di aduk-aduk, kemudian didiamkan selama 18 jam. Hasil campuran kemudian di saring dengan kertas saring untuk mendapatkan filtrat. Filtrat yang diperoleh kemudian dipekatkan dengan *rotatory evaporator* pada suhu 50 °C. (Istiqomah, 2013)

Ekstrak kulit batang bakau minyak diambil 1 ml lalu dibiarkan hingga kering selama 24 jam dalam suhu ruangan. Bila hasil sudah mengering lalu ditimbang dan didapatkan berat jenis dan volume 0,0872gram/ml dan 52 ml. Dosis ekstrak kulit batang bakau minyak yang digunakan adalah 56,55 mg/kgBB. Dengan demikian ekstrak kulit batang bakau minyak yang diberikan pada tikus dengan berat 200 g adalah 11,31 mg (Vijayavel *et al.*, 2006).

3.6.1.3 Pemaparan Radikal Bebas (Asap Rokok)

Pemaparan asap rokok dilakukan dengan menggunakan *smoking chamber* yang dilengkapi dengan beberapa lubang, diantaranya lubang untuk dihubungkan dengan *air pump* dan sisanya untuk sirkulasi udara. *Air pump* menggunakan spuit 20 cc dan dihubungkan dengan selang karet sepanjang 3cm yang dimasukkan ke dalam lubang *smoking chamber* (Irawati, 2014).



Gambar 11. Pemaparan Asap Rokok (Irawati, 2014).

Pemaparan asap rokok terhadap tikus putih jantan galur *Sparague dawley* menggunakan dua batang rokok per hari selama 30 hari dan dilakukan \pm 1 jam. Perlakuan ini dilakukan karena pada penelitian sebelumnya pemaparan asap rokok 2 batang/hari terbukti dapat merusak spermatogenesis (Hargono *et al.*, 2013).

3.6.1.4 Terminasi Hewan Coba

Setelah 30 hari diberi perlakuan, masing-masing hewan coba diterminasi dengan cara diberi ether untuk membuat tidak sadar. Ether dimasukkan dalam toples yang telah di lapisi kapas lalu ditutup rapat. Setelah dipastikan tikus sudah tidak bergerak lalu dilakukan pembedahan (Leary *et al.*, 2013).

3.6.1.5 Pembedahan dan Pengambilan Spermatozoa

1. Pembedahan

Setelah 30 hari perlakuan, masing-masing hewan coba diterminasi. Setelah diterminasi dilakukan pembedahan dengan mempersiapkan alat bedah yang akan digunakan.

Setelah selesai proses pembedahan, pengambilan bagian testis dengan menggunakan pinset. Kemudian meletakkan testis tikus pada gelas ukur berisi NaCl 0,9% agar dapat dengan mudah memisahkan testis dengan lemak.

3.6.1.6 Pengamatan Motilitas, Morfologi dan Jumlah Spermatozoa

1. Pengambilan Sekresi Kauda Epididimis

Untuk mendapatkan spermatozoa di dalam sekresi kauda epididimis dilakukan pembedahan. Kemudian organ testis dan epididimis diambil dan diletakkan ke dalam cawan petri yang berisi NaCl 0,9%. Di bawah mikroskop bedah dengan pembesaran 400 kali kauda epididimis dipisahkan dengan cara memotong bagian proksimal korpus epididimis dan bagian distal vas deferens. Selanjutnya kauda epididimis dimasukkan ke dalam gelas arloji yang berisi 1 ml NaCl 0,9%, kemudian bagian proksimal kauda dipotong sedikit dengan gunting lalu kauda ditekan dengan perlahan hingga cairan sekresi epididimis keluar dan tersuspensi dengan NaCl 0,9%. Suspensi spermatozoa dari cauda epididimis yang telah diperoleh dapat digunakan untuk pengamatan yang meliputi jumlah, motilitas, dan morfologi spermatozoa.

2. Motilitas spermatozoa

Untuk menentukan motilitas spermatozoa diambil spermatozoa dari kauda epididimis seperti penjelasan di atas kurang lebih 10-15 μ l ke atas *gelas objek* lalu ditutup dengan *cover glass*.

Kategori perhitungan motilitas spermatozoa dilakukan dengan menghitung persentase spermatozoa dibawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 40x. Berdasarkan motilitas bergerak atau tidaknya spermatozoa tikus. Biasanya empat sampai enam lapangan pandang yang diperiksa untuk memperoleh seratus spermatozoa secara berurutan yang kemudian diklasifikasi sehingga menghasilkan persentase setiap kategori motilitas (Rahmanisa, 2013).

$$\% \text{ motilitas} = \frac{\text{jumlah spermatozoa progresif (n)}}{\text{total spermatozoa yang diamati (N)}} \times 100\%$$

Pengamatan dilakukan empat sampai enam lapang pandang dengan kriteria motilitas sebagai berikut :

A : Berjalan cepat dan lurus

B : Berjalan lambat

C : Bergerak ditempat

D : Tidak bergerak sama sekali

Data yang diambil adalah spermatozoa yang kualitasnya bagus yaitu dengan kriteria bergerak dan tidak bergerak.

3. Morfologi spermatozoa

Untuk menentukan morfologi spermatozoa diambil spermatozoa dari kauda epididimis seperti penjelasan di atas, kemudian dibuat apusan menggunakan kaca objek, lalu dikeringkan. Kemudian fiksasi dengan diberikan *methil alkohol* selama 5 menit dikeringkan kemudian diberi pewarna *giemsa* selama 5 menit. Setelah itu dibilas dengan aquades lalu dikeringkan. Kemudian di bawah mikroskop cahaya diamati dan dihitung dalam satu lapang pandang dengan pembesaran 100x (Rahmanisa, 2013). Interpretasi normal morfologi spermatozoa adalah didapatkan bila >30% (WHO, 2010).

$$\% \text{ morfologi} = \frac{\text{jumlah spermatozoa normal (n)}}{\text{total spermatozoa yang diamati (N)}} \times 100\%$$

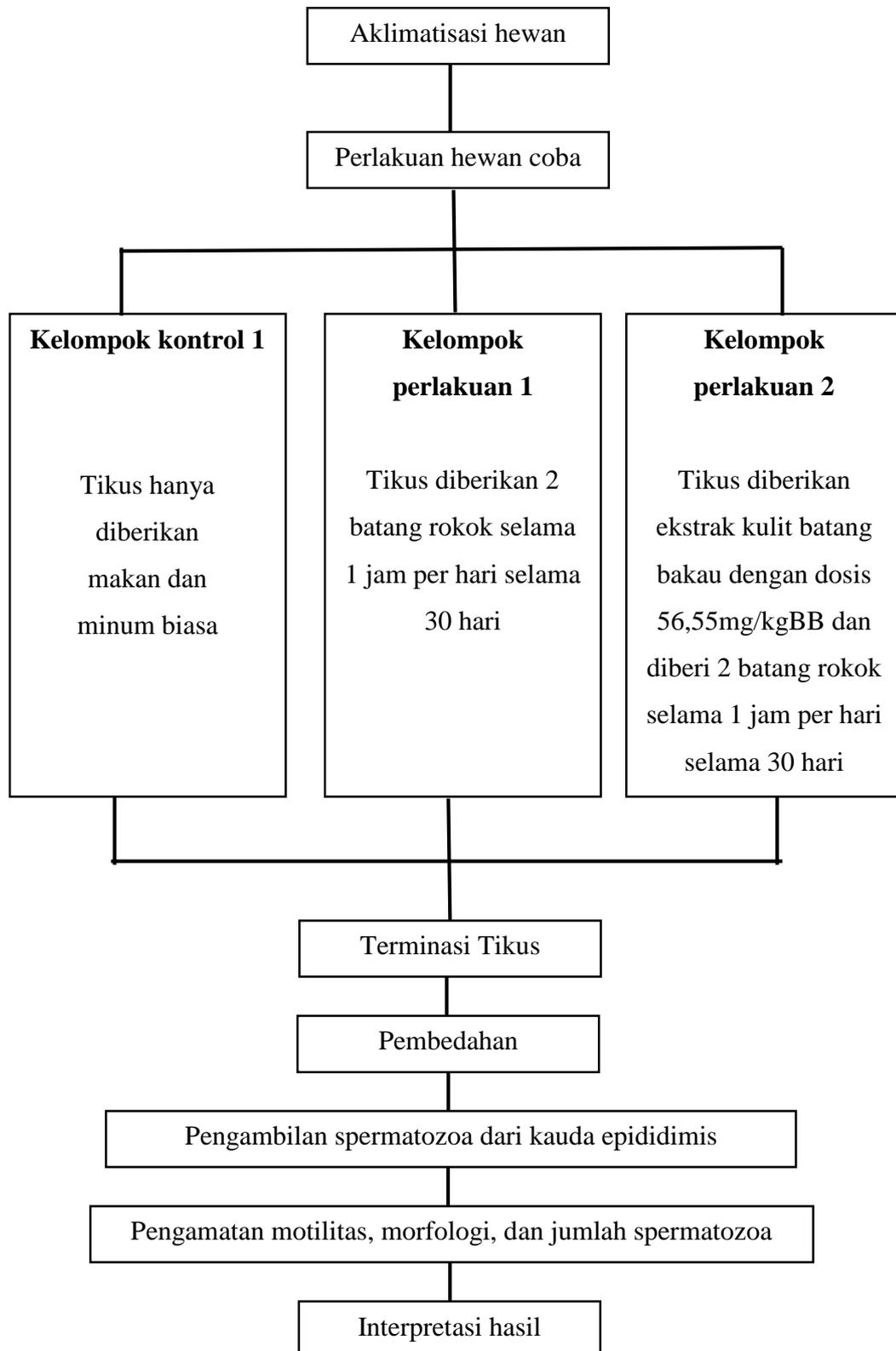
4. Perhitungan Jumlah Spermatozoa

Suspensi spermatozoa yang telah diperoleh terlebih dahulu dihomogenkan. Menghitung jumlah spermatozoa dapat dilakukan pengenceran dengan NaCl 0,9%. Selanjutnya diambil sebanyak 10 µl sampel dan dimasukkan ke dalam

kotak-kotak *hemositometer improved Neubauer* serta ditutup dengan kaca penutup. Di bawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 40x, *hemositometer* diletakkan dan dihitung jumlah spermatozoa pada kotak kamar hitung. Hasil perhitungan jumlah spermatozoa kemudian dimasukkan ke dalam rumus penentuan jumlah spermatozoa ml suspensi sekresi kauda epididimis sebagai berikut (Gandasoebrata R, 1984).

$$\text{Jumlah spermatozoa} = n \times \text{pengenceran} \times 200.000(\text{juta/ml})$$

3.6.2 Alur Penelitian



Gambar 12. Alur Penelitian

3.7 Analisis data

Analisis statistik untuk mengolah data yang diperoleh akan menggunakan program komputer. Uji statistik yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

3.7.1 Uji Normalitas Data

Uji normalitas data menggunakan *Shapiro-Wilk* test untuk mengetahui data berdistribusi normal atau tidak normal karena populasi <50 . Hasil dari uji normalitas ini untuk menentukan analisis data berikutnya, yaitu analisis parametrik digunakan untuk variabel jumlah spermatozoa karena data terdistribusi normal dan analisis non parametrik pada variabel motilitas dan morfologi spermatozoa karena data tidak berdistribusi normal.

3.7.2 Analisis Bivariat

Dilakukan untuk menguji perbedaan rerata kelompok kontrol (K1), kelompok kontrol 2 yang diberi paparan asap rokok (P1), dan kelompok perlakuan (P2) yang diberikan ekstrak kulit batang bakau minyak dan paparan asap rokok. Pada variabel jumlah spermatozoa digunakan uji parametrik *one-way Anova* karena data terdistribusi normal. Jika uji *One way-Anova* menghasilkan nilai $p < 0,05$, maka dilanjutkan dengan melakukan analisis *Post-Hoc*. Dilanjutkan dengan uji *Levene test* untuk melihat varian data. Setelah didapatkan varian data, bila varian data tidak sama maka dilanjutkan dengan uji *Post-Hoc Tamhane*. Pada variabel motilitas dan morfologi didapatkan data tidak terdistribusi normal maka

tidak memenuhi syarat uji parametrik digunakan uji non parametrik yaitu *Kruskal-Wallis*. Apabila didapatkan hasil *Kruskal Wallis* $p < 0,05$, maka dilanjutkan dengan *Mann-Whitney* untuk melihat perbedaan antar kelompok.

3.8 Etik Penelitian

Penelitian ini telah diajukan ke Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Lampung, dengan menerapkan prinsip 3R dalam protokol penelitian, yaitu:

1. *Replacement*, adalah keperluan memanfaatkan hewan percobaan sudah diperhitungkan secara seksama, baik dari pengalaman terdahulu maupun literatur untuk menjawab pertanyaan penelitian dan tidak dapat digantikan oleh makhluk hidup lain seperti sel atau biakan jaringan.
2. *Reduction*, adalah pemanfaatan hewan dalam penelitian sesedikit mungkin, tetapi tetap dapat mendapatkan hasil yang optimal. Dalam penelitian ini sample dihitung berdasarkan rumus federer yaitu $t(n-1) \geq 15$ dengan n adalah jumlah hewan yang diperlukan dan t adalah jumlah kelompok perlakuan.
3. *Refinement* adalah memperlakukan hewan percobaan secara manusiawi dengan prinsip dasar membebaskan hewan coba dalam beberapa kondisi seperti:
 - a. Bebas dari rasa lapar dan haus, pada penelitian ini hewan coba diberikan pakan standar dan minum secara *ad libitum*.

- b. Bebas dari ketidak-nyamanan, pada penelitian hewan coba ditempatkan di *animal house* dengan suhu terjaga 27-30°C, kemudian hewan coba terbagi menjadi 10 ekor tiap kandang. *Animal house* berada jauh dari gangguan bising dan aktivitas manusia serta kandang dijaga kebersihannya sehingga, mengurangi stress pada hewan coba.
- c. Bebas dari nyeri dan penyakit dengan menjalankan program kesehatan, pencegahan, dan pemantauan, serta pengobatan terhadap hewan percobaan jika diperlukan. Prosedur pengambilan sampel pada akhir penelitian telah dijelaskan dengan mempertimbangkan tindakan manusiawi dan *anesthesia* serta *euthanasia* dengan metode yang manusiawi yang didampingi oleh orang yang berkompeten seperti dokter untuk meminimalisasi atau bahkan meniadakan penderitaan hewan coba (Ridwan, 2013).

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

1. Pemberian ekstrak etanol 95% kulit batang bakau minyak (*Rhizophora apiculata*) mampu memperbaiki motilitas spermatozoa pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Sprague dawley* yang disebabkan paparan asap rokok.
2. Pemberian ekstrak etanol 95% kulit batang bakau minyak (*Rhizophora apiculata*) mampu memperbaiki morfologi spermatozoa pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Sprague dawley* yang disebabkan paparan asap rokok.
3. Pemberian ekstrak etanol 95% kulit batang bakau minyak (*Rhizophora apiculata*) mampu memperbaiki jumlah spermatozoa pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Sprague dawley* yang disebabkan paparan asap rokok.

5.2 Saran

1. Peneliti lain disarankan untuk meneliti lebih lanjut pengaruh pemberian ekstrak kulit batang bakau minyak (*Rhizophora apiculata*) dengan gambaran histopatologi testis pada tikus.
2. Peneliti lain disarankan dapat meneliti untuk menguji lebih lanjut dosis toksisitas dari ekstrak kulit batang minyak (*Rhizophora apiculata*).

DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah. 2011. Potensi bakau *Rhizophora apiculata* sebagai inhibitor tirosinase dan antioksidan [Skripsi]. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Adyttia A, Untari EK, Wahdaningsih S. 2014. Efek ekstrak etanol daun *prema cordifolia* terhadap malondialdehida tikus yang dipapar asap rokok. *Pharm Sci Res.* 1(2):104–115.
- Agarwal A, Virk G, Ong C, Plessis SS. 2014. Effect of oxidative stress on male reproduction. *World J Mens Health.* 32(1):1–17.
- Akbar B. 2010. Tumbuhan dengan kandungan senyawa aktif yang berpotensi sebagai bahan antifertilitas (1st ed.). Jakarta: Adabia Press.
- Al-Haija RWMA. 2011. Main causes of infertility among men treated at razan centers in west bank [Thesis]. Palestine: An-Najah National University.
- Alhassan A, Ziblim AR, Muntaka S. 2014. A survey on depression among infertile women in Ghana. *BMC Women's Health.* 14(1):1–6.
- Amarudin. 2012. Pengaruh merokok terhadap kualitas sperma pada pria dengan masalah infertilitas studi kasus kontrol di Jakarta tahun 2011 [Thesis]. Depok: Universitas Indonesia.
- Anggi AR, Herlina EK. 2016. Pengaruh pemberian Dark chocolate terhadap jumlah spermatozoa mencit Balb/C jantan yang dipapar asap rokok. *JKD.* 5(4):475-484

- 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. *Andalas Journal of Health*. 4(2):425–429.
- AVMA. 2013 *Guidelines for the Euthanasia of Animals*. Schaumburg: American Veterinary Medical Association.
- Batubara IVD, Wantouw B, Tendean L. 2013. Pengaruh paparan asap rokok kretek terhadap kualitas spermatozoa mencit jantan (*Mus Musculus*). *Jurnal e-Biomedik*. 1(1):330–337.
- Darlian L, Imran G, Fachrudin. 2011. Skrining bioaktivitas ekstrak kulit akar bakau merah (*Rhizophora apiculata* bl) terhadap daya hambat pertumbuhan koloni bakteri streptococcus sp. *Prog.Kim. Si*. 1(2)73–82.
- Dewi NWS. 2008. Kajian pemberian tepung buah pare (*Momordica Charantia* l.) terhadap konsumsi, pencernaan bahan kering dan performa tikus (*Rattus norvegicus*) [Skripsi]. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Gandasoebrata R. 1984. *Penuntun Laboratorium Klinik*. Jakarta: Dian Rakyat.
- Ganong WF. 2008. *Fisiologi Kedokteran*. Jakarta: EGC.
- Guyton AC, Hall JE. 2007. *Fisiologi edokteran* (11th ed.). Jakarta: EGC.
- Hadi A M, Irawati M H, Suhadi. 2016. Karakteristik morfo-anatomi struktur vegetatis spesies *Rhizophora spiculata* (Rhizoporaciae). *Jurnal Pendidikan*. 1(9):1688–1692.
- Hargono FR, Lintong PM, Kairupan CF. 2013. Gambaran histopatologi testis mencit Swiss (*Mus musculus*) yang diberi kedelai (*Glycine max*) dan paparan dengan asap rokok. *Jurnal E-Biomedik*. 1(2):824–829.
- Harlis WO. 2011. Morfologi spermatozoa epididimis tikus (*Rattus Novergicus*, L.) setelah diperlakukan ekstrak herba meniran (*Phyllanthus niruri*, L.). *Paradigma*. 15(1):39–44.

- Indrayani D. 2011. Konseling infertilitas. *The Indonesian Journal of Health Science*. 1(2):83-94.
- Irawati NAV. 2014. Pengaruh pemberian vitamin E terhadap jumlah sel spermatogenik dan diameter tubulus semeniferus mencit jantan (*Mus musculus L*) yang dipaparkan asap rokok [Skripsi]. Lampung: Universitas Lampung.
- Ishlahiyah C. 2006. Pengaruh pemberian vitamin C terhadap jumlah spermatozoa mencit jantan strain Balb/C yang diberi paparan asap rokok [Skripsi]. Semarang: Universitas Diponegoro.
- Istiqomah. 2013. Perbandingan metode ekstraksi maserasi dan sokletasi terhadap kadar piperin buah cabe jawa (*Piperis Retrofracti Fructus*) [Skripsi]. Jakarta: Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah.
- Jedrzejowska RW, Wolski JK, Hilczer JS. 2012. The role of oxidative stress and antioxidants in male fertility. *Cent European J Urol*. 66(1):60–67.
- Himpunan Endokrinologi Reproduksi dan Infertilitas Indonesia (HIFERI), Himpunan Fertilitas In Vitro Indonesia (PERFIRTI), Ikatan Ahli Urologi Indonesia (IAUI), Perkumpulan Obstetri dan Ginekologi Indonesia (POGI). 2013. Konsensus penanganan infertilitas edisi revisi 9.1.
- Khaidir M. 2006. Penilaian tingkat infertilitas dan penatalaksanaannya pada pria. *Jurnal Kesehatan Masyarakat*. 1(1):30-34
- Kusuma *et al.* (2015). Panduan penanganan infertilitas pria (Guidelines on male infertility). Jakarta:Ikatan Ahli Urologi Indonesia.
- Larasaty W. (2013). Uji antifertilitas ekstrak etil asetat biji jarak pagar (*Jatropha Curcas L.*) pada tikus putih jantan (*Rattus novergicus*) galur Sprague dawley secara *in vivo* [Skripsi]. Jakarta: Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah.
- Leary S, Underwood W, Anthony R, Cartner S. 2013. AVMA Guidelines for the euthanasia of animals. Schaumburg: American Veterinary Medical Association.

- Malangngi LP, Sangi MS, Paendong JJE. 2012. Penentuan kandungan tanin dan uji aktivitas antioksidan ekstrak biji buah alpukat (*Persea americana* Mill). Jurnal Kimia. 1(1):5–10.
- Marburoh AI. 2015. Uji aktivitas antioksidan ekstrak tanin dari daun rumput Bambu (*Lophatherum Gracile* Brongn) dan indentifikasinya [Skripsi]. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Maula IF. 2014. Uji antifertilitas ekstrak N-heksana biji jarak pagar (*Jatropha curcas* L.) pada tikus putih jantan (*Rattus novergicus*) galur Sprague dawley secara in vivo [Skripsi]. Malang:Universitas UIN Syarif Hidayatullah.
- Muchtadi D. 2013. Antioksidan dan Kiat Sehat Usia Produktif. Jakarta:Alfabeta.
- Mustofa S, Anindito AA, Pratiwi A, Putri AA, Maulana M. 2013. The influence of piper retrofractum Vahl (Java's chili) extract towards lipid profile and histology of 1 rats coronary artery with high-fat diet. Juke. 4(7):52-59.
- Negoro RA. 2016. Perbandingan efek asap rokok konvensional dan rokok herbal terhadap motilitas spermatozoa mencit [Skripsi]. Surakarta: Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Nururrahmah. 2014. Pengaruh rokok terhadap kesehatan dan pembentukan karakter manusia. Prosiding Seminar Nasional. 1(1):79-214.
- Poel SVD. 2012. Prevalence of Infertility. WHO Development and Research Training in Human Reproduction.
- Praditasari A. 2016. Metode uji aktivitas antioksidan secara in vitro pada ekstrak tanaman. Pharm. 1(1):1-11.
- Priatna E. 2014. Pengaruh pemberian vitamin c dan zink terhadap motilitas spermatozoa mencit strain Balb/C yang diberi paparan asap rokok [Skripsi]. Surakarta: Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Purnobasuki H. 2001. Potensi mangrove sebagai tanaman obat prospect of

mangrove as herbal medicine daftar pustaka. JMIPA Unair.

Putra Y. 2015. Pengaruh rokok terhadap jumlah sel spermatozoa mencit jantan (*Mus Musculus* , Strain Jepang). Jurnal Saintek. 4(1):30–42.

Putri AP. 2015. Efek vitamin c terhadap kualitas spermatozoa yang diberi paparan asap rokok. Majority. 4(1):1-4.

Rahim AA, Rocca E, Steinmetz J, Kassim MJ, Ibrahim MS, Osman H. 2008. Antioxidant activity of mangrove *Rhizophora apiculata* bark extracts. Food Chemistry. 107:200-207.

Rahmanisa S, RA Maisuri. 2013. pengaruh ekstrak jahe merah (*Zingiber officinale* roxb. var rubrum) dan zinc (zn) terhadap uumlah, motilitas an morfologi spermatozoa pada tikus putih (*Rattus novergicus*) jantan dewasa strain Sprague dawley. Juke Unila. 3(2):33-7.

Kemenkes RI. 2013. Riset Kesehatan Dasar 2013. Jakarta.

Ridwan E. 2013. Etika pemanfaatan hewan percobaan dalam penelitian kesehatan. J Indo Med Assoc. 63:112-116

Saragih CF. 2013. Analisa faktor-faktor penyebab infertilitas di RS Jejaring departemen Obgin FK USU periode Januari 2012-Desember 2013. [Thesis]. Sumatra Utara:Universitas Sumatra Utara

Saraswati A. 2015. Infertility. Majority Unila. 4(5):5–9.

Sayuti K, Yenrina R. 2015. Antioksidan alami dan sintetik. Padang. Andalas University Press.

Sherwood L. 2011. Fifiologi manusia dari sel ke sistem. (6thed). Jakarta:EGC

Sirois M. 2005. Laboratory animal and exotic pet medicine (2nd ed.). USA. Medicine and Health Science Books.

- Sujarnoko TUP. 2012. Studi meta-analisis efek senyawa metabolit sekunder tanin terhadap kualitas silase [Skripsi]. Bogor:Institut Pertanian Bogor.
- Vijayavel K, Anbuselvam C, Balasubramanian MP. 2006. Free radical scavenging activity of the marine mangrove *Rhizophora apiculata* bark extract with reference to naphthalene induced mitochondrial dysfunction. *Chemico-Biological Interactions*. 163(1-2):170-175.
- Wahyuni LT, Nurdin AE, Anas E. 2015. Pengaruh gangguan tidur terhadap kadar hormon testosteron dan jumlah spermatozoa pada tikus jantan wistar. *Andalas Journal of Health*. 4(3):5-6.
- Werddhasari A. 2014. Peran antioksidan bagi kesehatan. *Kemenkes RI*. 3(2):59-68
- WHO. 2010. Laboratory manual for the examination and processing of human semen (5th ed). Geneva: World Health Organization.
- Widiartini W, Siswati E, Setiawan A, Rohmah IM, Prasetyo E. 2013. Pengembangan usaha produksi tikus putih (*Rattus norvegicus*) tersertifikasi dalam upaya memenuhi kebutuhan hewan laboratorium. Semarang: Universitas Diponegoro
- Winarsi H. 2007. Antioksidan alami dan radikal bebas. Yogyakarta: Kanisius.
- Ys R, Medison I. 2016. Hubungan paparan asap rokok lingkungan dengan kejadian dismenorea primer. *Andalas Journal of Health*. 5(3):590-594.