

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

Skripsi

**Oleh
NATASYA HAYATILLAH**



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

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

Oleh
NATASYA HAYATILLAH

Skripsi

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

Pada

Fakultas Kedokteran Universitas Lampung



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

ABSTRACT

EFFECT OF 96% ETHANOL EXTRACT OF RED RICE BRAN TOWARD SPERMATOOZA NUMBER AND VIABILITY IN KRETEK CIGARETTE'S SMOKES-INDUCED Sprague dawley RATS

By

NATASYA HAYATILLAH

Background: Indonesia has the greatest number of smokers in Southeast Asia dominated by male consume kretek cigarette. Cigarette's smoke is source of free radicals that can cause oxidative stress to sperm and lead to infertility. Red rice bran extract has lot of potential antioxidants to stop oxidatif stress.

Methods: This study was experimental within 30 days. The 25 *Sprague dawley* male rats divided into 5 groups: K1 wasn't treated, K2,P1,P2, and P3 exposed to smoke of 2 kretek cigarettes, given 96% ethanol extract of red rice bran dosage 100 mg/Kg (P1), 200 mg/Kg (P2) and 400 mg/Kg (P3). Spermatozoa number and viability was observed. Data tested with One Way Anova.

Results: There was significant effect from red rice bran extract toward sperm number and viability ($p=0,00$). Average spermatozoa number was $91,90\pm 7,72$ (K1), $39,68\pm 7,51$ (K2), $79,88\pm 8,63$ (P1), $86,40\pm 10,5$ (P2), $86,00\pm 5,78$ (P3). Average viability was $65,00\pm 6,85$ (K1), $29,6\pm 5,85$ (K2), $51,4\pm 3,50$ (P1), $60,00\pm 6,67$ (P2), $61,00\pm 2,91$ (P3). Posthoc test between P1,P2, and P3 didn't show significant differences.

Conclusions: The 96% ethanol extract of red rice bran can prevent the decreasing number and viability of rat spermatozoa exposed by kretek cigarette.

Keywords: kretek cigarette, rice bran extract, spermatozoa

ABSTRAK

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

Oleh

NATASYA HAYATILLAH

Latar Belakang: Indonesia memiliki jumlah perokok terbanyak di Asia Tenggara yang didominasi pria pengonsumsi rokok kretek. Asap rokok merupakan sumber radikal bebas yang dapat menimbulkan stres oksidatif pada sperma dan menyebabkan infertilitas. Ekstrak bekatul beras merah memiliki banyak antioksidan yang berpotensi menghentikan kerusakan oksidatif tersebut.

Metode: Penelitian bersifat eksperimental selama 30 hari. Sampel 25 tikus putih jantan galur *Sprague dawley* dibagi kedalam 5 kelompok yaitu K1 yang tidak diberi perlakuan, K2, P1, P2 dan P3 dipaparkan asap 2 batang rokok kretek, kemudian diberi ekstrak etanol 96% bekatul beras merah dosis 100 mg/KgBB (P1), 200 mg/KgBB (P2), dan 400 mg/KgBB (P3). Parameter yang diamati adalah jumlah dan viabilitas spermatozoa. Data diuji dengan One Way Anova.

Hasil: Terdapat pengaruh pemberian ekstrak etanol 96% bekatul beras merah terhadap jumlah dan viabilitas spermatozoa ($p=0,00$). Jumlah rerata spermatozoa adalah $91,90\pm 7,72$ (K1), $39,68\pm 7,51$ (K2), $79,88\pm 8,63$ (P1), $86,40\pm 10,5$ (P2), $86,00\pm 5,78$ (P3). Rerata viabilitas spermatozoa adalah $65,00\pm 6,85$ (K1), $29,6\pm 5,85$ (K2), $51,4\pm 3,50$ (P1), $60,00\pm 6,67$ (P2), $61,00\pm 2,91$ (P3). Hasil uji *Post Hoc* antar kelompok P1, P2 dan P3 tidak menunjukkan perbedaan bermakna ($p>0,05$).

Simpulan: Ekstrak etanol 96% bekatul beras merah dapat mencegah penurunan jumlah dan viabilitas spermatozoa tikus putih yang terpapar asap rokok kretek.

Kata Kunci: ekstrak bekatul, spermatozoa, rokok kretek

Judul Proposal Penelitian : **PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL 96% BEKATUL BERAS MERAH TERHADAP JUMLAH DAN VIABILITAS SPERMATOZOA TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*) GALUR *Sprague dawley* YANG DIINDUKSI ASAP ROKOK KRETEK**

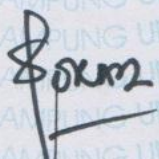
Nama Mahasiswa : Natasya Hayatillah


No. Pokok Mahasiswa : 1418011146

Program Studi : Pendidikan Dokter

Fakultas : Kedokteran




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


dr. Evi Kurniawaty, S.Ked., M.Sc
NIP . 1976012022003122001

2. Dekan Fakultas Kedokteran


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

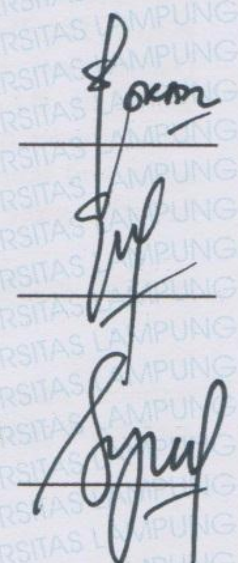
MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

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

Sekretaris : dr.Evi Kurniawaty, S.Ked., M.Sc

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



2. Dekan Fakultas Kedokteran



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

Tanggal Lulus Ujian Skripsi : 7 Mei 2018

LEMBAR PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan dengan sebenarnya bahwa:

1. Skripsi dengan judul “PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL 96% BEKATUL BERAS MERAH TERHADAP JUMLAH DAN VIABILITAS SPERMATOZOA TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*) GALUR *SPRAGUE DAWLEY* YANG DIINDUKSI ASAP ROKOK KRETEK” adalah hasil karya sendiri dan tidak melakukan penjiplakan atau pengutipan atas karya penulis lain dengan cara tidak sesuai tata etika ilmiah yang berlaku dalam masyarakat akademik atau yang disebut plagiarisme.
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, 7 Mei 2018
Pembuat Pernyataan,



Natasya Hayatillah
NPM. 1418011146

RIWAYAT HIDUP

Penulis merupakan anak perempuan dari Bapak Yahya Saleh dan Ibu Emah Rohimah yang dilahirkan di Kabupaten Serang pada tanggal 28 Desember 1995. Penulis adalah adik dari Yacob Hermawan, Alik Maulana, Amran Amarullah dan kakak dari Farhan Hidayat.

Sekolah Dasar (SD) penulis selesaikan di SD Negeri 1 Ciruas Kabupaten Serang pada tahun 2008, Sekolah Menengah Pertama (SMP) diselesaikan di SMP Negeri 1 Kota Serang pada tahun 2011, dan Sekolah Menengah Atas (SMA) penulis selesaikan di SMA Negeri Cahaya Madani Banten *Boarding School* Kabupaten Pandeglang pada tahun 2014. Selama menjadi pelajar, penulis mengikuti organisasi Palang Merah Remaja (PMR) dan English Club (EC).

Penulis terdaftar di Fakultas Kedokteran Universitas Lampung pada tahun 2014 melalui jalur Seleksi Nasional Mahasiswa Perguruan Tinggi Negeri (SNPMTN). Selama menjadi mahasiswa, penulis mengikuti organisasi Lunar (2014), Forum Studi Islam (FSI) Ibnu Sina FK Unila (2014-2016), dan Perhimpunan Mahasiswa Pecinta Alam dan Tanggap Darurat (PMPATD) Pakis Rescue Team FK Unila (2014-2017).

Untuk semua do'a yang menembus Arsy Allah tanpa penghalang,
Untuk semua rasa percaya dan mengizinkan saya belajar di rantau,
Untuk kata-kata penenang dan penyemangat,
Untuk telpon singkat dan tawa didalamnya,
Dan diatas segalanya, telah menjadikan saya seorang muslim.

Untuk kedua orangtua yang paling sempurna,
yang belum pernah menunjukkan rasa kecewa pada anaknya,

Umi dan Babeh tersayang

Terimakasih, semoga karya dan gelar sarjana ini menjadi salah satu sumber
kebahagiaan di hari tua umi dan babeh.

Maha baik Allah, dan hamba-hamba baik yang terlibat di dalamnya.

-SAMI' ALLAHU LIMAN HAMIDA-
Allah mendengar hamba yang memujiNya

ALHAMDULILLAH, LA ILLAHA ILLA ANTA, SUBHANAKA,

INNI KUNTU MINADZOLIMIN.

SANWACANA

Terpujilah Allah SWT, yang telah menganugerahkan setiap pelajar akal, ilmu, serta nikmat yang tidak terhitung, yang memberikan pertolongan sehingga skripsi ini dapat diselesaikan. Sholawat dan salam, semoga selalu tercurah pada Rosul penutup risalah langit yang indah kisah perjuangannya, Muhammad SAW.

Skripsi penulis dengan judul “Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol 96% Bekatul Beras Merah terhadap Jumlah dan Viabilitas Spermatozoa Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Galur *Sprague Dawley* yang Diinduksi Asap Rokok Kretek” ini, merupakan salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana kedokteran di Fakultas Kedokteran Universitas Lampung.

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

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

3. Ibu Soraya Rahmanisa, S.Si., M.Sc., selaku Pembimbing I yang dengan baik dan sabar bersedia memberikan bimbingan, ilmu, kritik, saran, nasehat, motivasi dan bantuan untuk penulis menyelesaikan skripsi ini;
4. dr.Evi Kurniawaty, S.Ked., M.Sc., selaku Pembimbing II yang dengan baik dan sabar bersedia memberikan bimbingan, ilmu, kritik, saran, nasehat, motivasi dan bantuan untuk penulis menyelesaikan skripsi ini;
5. dr.Syazili Mustofa, S.Ked., M.Biomed., selaku Pembahas atas kesediaan dan kesabarannya dalam memberikan koreksi, kritik, saran, nasehat, motivasi dan bantuan untuk perbaikan skripsi penulis;
6. dr.Ahmad Fauzi, S.Ked., M.Epid., Sp.OT., dan dr.Roro Rukmi Windi Perdani, S.Ked., M.Kes., Sp.A., selaku Pembimbing Akademik penulis, atas bimbingan dan saran yang diberikan selama penulis menjalani proses perkuliahan;
7. Orangtua tercinta, Drs.H.Yahya, M.Pd., dan Hj.Emah Rohimah, M.Pd., yang tidak henti-hentinya mendo'akan, mendukung, memberi semangat dan motivasi selama penulis menyelesaikan skripsi dan belajar di fakultas ini;
8. Abang terbaik, Yacob Hermawan, S.T., Alik Maulana, S.T., Amran Amarullah S.Hum dan keluarganya, serta adik terbaik Farhan Hidayat, yang telah mendo'akan skripsi penulis, selalu bisa diandalkan, membuat semangat dan memberi banyak solusi;
9. Seluruh laboran FK Unila, terutama Ibu Nuriah, Mba Suharyani, Ibu Romiani, dan Mas Bayu yang telah membimbing dengan sabar selama di laboratorium.
10. Tim pelitian bekatul, Nandya Dwizella, Ocsi Zara Z, dan Leni Amelia, untuk kerja sama dan selalu kebersamai dalam suka-duka selama dua bulan penelitian;

11. Sahabat terbaik, Vermitia, Leni Amelia, Lulu Wilda N, Ratu Faradhila J, Osy Lu'lu A, Vika Annisa P, yang selalu ada tenaga, waktu dan do'anya kapanpun penulis butuhkan terutama dimasa-masa skripsi;
 12. Keluarga Kampus Hijau Residen, Fistana Bella V, Aulia Raydian, Habibi D, Achmad Agus P, Dzulfiqar, M Yogi Maryadi, Ilham Putra S dan M Iz Zuddin Adha, untuk semua do'a, semangat dan bantuannya;
 13. Semua murabbi dan teman-teman liqo seribu murrabbi, yang kebersamai dalam do'a dan selalu menguatkan setiap bertemu;
 14. Keluarga besar FSI Ibnu Sina dan PMPATD PAKIS Rescue Team terutama SC09 yang selalu bisa jadi rumah selama di rantau;
 15. Angkatan terbaik, Cranial FK Unila 2014 untuk semua kebaikan dan pembelajaran dari masing-masing individunya;
 16. Keluarga besar Cahaya Madani Banten *Boarding School*, Al akh arif, Ulfi, Eci, Nabilla, Ayu, Nurma, Acha, Dwiki dan teman-teman Ashabul Kahfi yang selalu menyemangati dari jauh;
 17. Seluruh civitas akademika FK Unila, yang selalu baik hati membantu penulis selama perkuliahan dan calon teman sejawat terbaik 2012, Cere13ellum, Endom15ium, Tr16eminus, dan V17reous yang selalu siap berbagi pengalaman dan pengetahuan;
- Semoga skripsi ini bermanfaat untuk pembacanya.

Bandar Lampung, Mei 2018
Penulis,

Natasya Hayatillah

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR ISI	i
DAFTAR TABEL	iii
DAFTAR GAMBAR	iv
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah	5
1.3 Tujuan Penelitian.....	5
1.4 Manfaat Penelitian.....	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Spermatogenesis	8
2.2 Kualitas Sperma dan Infertilitas	10
2.3 Radikal Bebas dan Stres Oksidatif	10
2.3.1 Stres Oksidatif pada Spermatozoa	11
2.3.2 Jumlah Spermatozoa	13
2.3.3 Viabilitas Spermatozoa	14
2.4 Rokok Kretek.....	15
2.4.1 Komponen Kimia Asap Rokok Kretek	15
2.5 Radikal Bebas dalam Asap Rokok	16
2.6 Mekanisme Rokok Menimbulkan Stress Oksidatif pada Spermatozoa	18
2.7 Bekatul Beras Merah	22
2.7.1 Komponen Fitokimia Bekatul Beras Merah	23
2.8 Antioksidan.....	25
2.8.1 Mekanisme Antioksidan Bekatul Beras Merah.....	26
2.9 Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>)	30
2.10 Kerangka Teori	32
2.11 Kerangka Konsep.....	33
2.12 Hipotesis Penelitian.....	33
BAB III METODE PENELITIAN	
3.1 Desain Penelitian	34
3.2 Waktu dan Tempat Penelitian	34
3.3 Subyek Penelitian	35

3.3.1	Populasi.....	35
3.3.2	Sampel Penelitian.....	35
3.3.3	Kriteria Inklusi dan Eklusi.....	37
3.4	Identifikasi Variabel Penelitian	37
3.4.1	Variabel Independen	37
3.4.2	Variabel Dependen.....	38
3.4.3	Perlakuan.....	38
3.5	Alat dan Bahan	38
3.5.1	Alat.....	38
3.5.2	Bahan.....	39
3.6	Definisi Operasional	40
3.8	Prosedur Penelitian	40
3.8.4	Etika Penelitian	40
3.8.5	Pengadaan Hewan Coba.....	41
3.8.6	Pemeliharaan Hewan Coba	41
3.8.7	Pembuatan Ekstrak Bekatul	41
3.8.8	Perhitungan Dosis Bekatul Beras Merah	42
3.8.9	Induksi Paparan Asap Rokok Kretek	44
3.8.10	Terminasi Hewan Coba	45
3.8.11	Prosedur Pengamatan Jumlah dan Viabilitas Spermatozoa.....	45
3.7	Rancangan Analisis Data.....	47
3.8	<i>Dummy Table</i>	47
3.9	Alur Penelitian.....	49

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1	Hasil.....	50
4.1.1	Jumlah Spermatozoa	51
4.1.2	Viabilitas Spermatozoa	55
4.2	Pembahasan	58
4.2.1	Jumlah Spermatozoa	58
4.2.2	Viabilitas Spermatozoa	67

BAB V KESIMPULAN

5.1	Kesimpulan.....	73
5.2	Saran	73

DAFTAR PUSTAKA 75

LAMPIRAN

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Hasil Analisis Komponen Kimia Asap Rokok Kretek Indonesia.	16
2. Komponen Fitokimia Bekatul Beras Merah.	24
3. Taksonomi Tikus <i>Rattus norvegicus</i>	31
4. Kelompok Perlakuan.	38
5. Definisi Operasional.	40
6. <i>Dummy Table</i> Rerata Jumlah Spermatozoa.	48
7. <i>Dummy Table</i> Rerata Viabilitas Spermatozoa.	48
8. Hasil Rerata Jumlah Spermatozoa (%).	51
9. Hasil Uji Normalitas Data Jumlah Spermatozoa.	53
10. Hasil Uji <i>Post Hoc Bonferroni</i> Jumlah Spermatozoa.	54
11. Hasil Rerata Viabilitas Sperma.	55
12. Hasil Uji Normalitas Spermatozoa.	57
13. Hasil Uji <i>Post Hoc Bonferroni</i> Viabilitas Sperma.	58

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Proses Spermatogenesis.	9
2. Persebaran Antioksidan Enzimatis pada Spermatozoa Manusia.	13
3. Pewarnaan Sperma dengan Eosin.	15
4. Mekanisme Rokok Menyebabkan Peroksidasi Lipid.	19
5. Mekanisme Kerusakan DNA oleh Rokok.	21
6. Struktur Bekatul Beras.	23
7. Mekanisme Donor Hidrogen Antioksidan dan Donor Elektron Antioksidan .	26
8. Struktur Kimia α - tokoferol dan γ - tokoferol.	27
9. Reaksi Kimia α - tokoferol Menghentikan Peroksidasi Lipid.	27
10. Struktur kimia γ -oryzanol.	28
11. Struktur Kimia Antosianin.	29
12. Struktur Kimia Antosianidin dan Proantosianidin	30
13. Kerangka Teori.	32
14. Kerangka Konsep.	33
15. Ilustrasi Pemaparan Asap Rokok dalam <i>Smoking Chamber</i>	44
16. Alur Penelitian.	49
17. Gambaran Mikroskopis Jumlah Spermatozoa.	52
18. Viabilitas Spermatozoa dengan Pewarnaan Eosin.	56

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Surat Izin Kaji Etik Penelitian

Lampiran 2 Sertifikat Tikus

Lampiran 3 Proses Pembuatan Ekstrak Bekatul Beras Merah

Lampiran 4 Proses Perlakuan Tikus

Lampiran 5 Proses Perhitungan Jumlah dan Viabilitas Sperma

Lampiran 6 Jumlah Spermatozoa Setiap Kelompok

Lampiran 7 Viabilitas Spermatozoa Setiap Kelompok

Lampiran 8 Hasil Analisis Data Penelitian Jumlah Spermatozoa

Lampiran 9 Hasil Analisis Data Viabilitas Sperma

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Angka konsumsi rokok secara global terus meningkat setiap tahunnya. Kondisi tersebut membuat *World Health Organization* (WHO) memperkirakan rokok akan dikonsumsi oleh 2 miliar orang di dunia pada tahun 2030. Untuk saat ini, Asia dan Australia masih menjadi wilayah dengan jumlah perokok terbanyak. Sebagai bagian dari Asia, rokok juga banyak dikonsumsi di Indonesia dengan presentase sebesar 46,16% (Kemenkes RI, 2015).

Tingginya angka konsumsi rokok di Indonesia disebabkan oleh banyaknya jumlah perokok. Indonesia merupakan negara ke-4 di dunia dengan jumlah perokok terbanyak setelah Cina, Rusia, dan Amerika Serikat (Eriksen *et al.*, 2015). Di wilayah Asia Tenggara, Indonesia menempati urutan pertama dengan jumlah presentase perokok sebesar 67,4% (Dorotheo dan Lian, 2014). Lebih parahnya, *Global Youth Tobacco Survey* tahun 2014 menyatakan sebanyak 80% perokok di Indonesia mulai merokok pada usia kurang dari 19 tahun, hal ini juga menempatkan Indonesia sebagai negara dengan jumlah perokok remaja terbanyak di dunia (WHO, 2014). Dalam

skala nasional, provinsi yang menyumbang angka perokok remaja terbanyak adalah Provinsi Lampung, dengan jumlah perokok remaja mencapai 60,9% di tahun 2013. Baik dewasa maupun remaja, banyak perokok tersebut didominasi oleh perokok pria yang jumlahnya 16 kali lebih banyak dibandingkan perokok wanita (Kemenkes RI, 2013). Karena banyaknya jumlah perokok, menjadikan perilaku tersebut sebuah kebiasaan yang tidak asing dalam kehidupan masyarakat Indonesia.

Kebiasaan merokok di Indonesia disebut telah sampai ketahap yang sangat memperhatikan (Kemenkes RI, 2016). Setiap harinya, perokok aktif di Indonesia rata-rata mampu mengisap 11,8 batang rokok jenis kretek. Rokok kretek merupakan rokok yang paling banyak dikonsumsi yaitu sebesar 80,4% (WHO, 2011). Merokok tetap menjadi kebiasaan meskipun perilaku tersebut jelas berakibat buruk bagi kesehatan masyarakat Indonesia (Kemenkes RI, 2016).

Penyakit akibat rokok dapat terjadi pada semua sistem organ manusia. Hal tersebut dapat terjadi karena sebatang rokok mengandung 7000 komponen kimia, dan ratusan diantaranya merupakan zat toksik untuk tubuh. Pada paru-paru, rokok dapat menyebabkan penyakit paru obstruktif kronik, emfisema, dan kanker paru. Pada jantung rokok meningkatkan faktor risiko dari arterosklerosis, rokok bahkan mempengaruhi organ reproduksi dan dapat menimbulkan kerugian berupa infertilitas pada pria (Eriksen *et al.*, 2015).

Infertilitas adalah ketidakmampuan pasangan yang telah menikah lebih dari satu tahun untuk hamil. Terdapat kurang lebih 15% pasangan di dunia yang mengalami masalah sulit hamil setelah satu tahun pernikahan dan 50% faktor penyebabnya adalah infertilitas yang terjadi pada pasangan pria (Jungwirth *et al.*, 2015). Di Indonesia, infertilitas juga masih menjadi masalah karena kejadiannya mengalami peningkatan setiap tahun (Rahmanisa dan Maisuri, 2013). Selain kelainan struktur anatomi seperti varikokel dan obstruksi duktus, 40-90% kasus infertilitas pada pria adalah idiopatik. Umumnya pada sperma pria dengan infertilitas idiopatik ditemukan penurunan jumlah antioksidan dan peningkatan jumlah radikal bebas (Ghareeb dan Sarhan, 2014). Radikal tersebut dapat terbentuk dari proses fisiologi tubuh ataupun berasal dari luar tubuh seperti radikal yang terbentuk ketika merokok (Mangimbulude dan Karwur, 2013).

Asap rokok mengandung gas dan partikel yang dapat menjadi sumber pembentukan radikal bebas. Karbon monoksida (CO) dan nitrogen monoksida (NO) merupakan komponen yang secara langsung dapat menjadi radikal bebas pada asap rokok. Tar, nikotin, kadmium (Cd), dan senyawa *benzo(a)pyrine* merupakan unsur yang secara tidak langsung menimbulkan radikal bebas selama proses merokok (Wooten *et al.*, 2006). Radikal bebas yang banyak terbentuk melebihi kapasitas antioksidan untuk menanggulangnya akan menyebabkan stres oksidatif (Bender, 2012).

Stres oksidatif merupakan kerusakan yang terjadi akibat penumpukan dari radikal bebas. Pada sperma pria, kerusakan oksidatif akibat radikal bebas disebut mampu meningkatkan peroksidasi lipid, membuat fragmentasi DNA, menyebabkan apoptosis imatur, dan mengganggu sistem hormonal, sehingga mampu membuat penurunan kualitas sperma diantaranya adalah jumlah dan viabilitas spermatozoa (Agarwal *et al.*, 2014; Harlev *et al.*, 2015). Penelitian yang dilakukan oleh Wulandari *et al.*, pada tahun 2012 menunjukkan terdapat penurunan viabilitas sperma sebesar 50,3% pada kelompok tikus yang dipaparkan asap rokok selama 15 menit dibandingkan dengan kelompok tikus yang tidak terpapar asap rokok. Penelitian lain yang dilakukan oleh Cui *et al.*, pada tahun 2016 juga membuktikan terdapat penurunan jumlah dan viabilitas sperma pada pria yang merokok dibandingkan dengan pria yang tidak merokok. Untuk mencegah dampak buruk stres oksidatif maka diperlukan antioksidan yang dapat berasal dari luar tubuh (Mustofa, 2013).

Bekatul beras merah adalah salah satu sumber antioksidan yang berasal dari luar tubuh. Bekatul merupakan hasil dari proses penggilingan padi yang kaya akan komponen fitokimia. Komponen fitokimia didalamnya seperti polifenol, antosianin, antosinidin, γ -tokoferol, α -tokoferol, dan γ -oryzanol merupakan senyawa yang dapat bekerja sebagai antioksidan (Friedman, 2013). Penelitian ekstraksi etanol 96% bekatul beras merah oleh Widarta *et al.*, pada tahun 2013 menunjukkan bekatul beras merah memiliki aktivitas antioksidan yang cukup baik yaitu 62,41%. Penelitian lain oleh Laili pada

tahun 2016 membuktikan pemberian ekstrak bekatul dengan dosis 200 mg/kg berat badan tikus merupakan dosis terbaik untuk kenaikan total antioksidan status pada tikus yang terpapar Monosodium Glutamat (MSG).

Berdasarkan uraian diatas, peneliti ingin mengetahui pengaruh dari pemberian ekstrak etanol 96% bekatul beras merah yang berperan sebagai antioksidan terhadap jumlah dan viabilitas spermatozoa pada tikus jantan galur *Sprague dawley* yang diinduksi asap rokok kretek.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang diatas, didapatkan rumusan masalah sebagai berikut:

1. Apakah terdapat pengaruh pemberian ekstrak etanol 96% bekatul beras merah terhadap jumlah spermatozoa tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague dawley* yang diinduksi asap rokok kretek?
2. Apakah terdapat pengaruh pemberian ekstrak etanol 96% bekatul beras merah terhadap viabilitas spermatozoa tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague dawley* yang diinduksi asap rokok kretek?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol 96% bekatul beras merah terhadap jumlah spermatozoa tikus putih jantan (*Rattus*

norvegicus) galur *Sprague dawley* yang diinduksi oleh asap rokok kretek.

2. Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol 96% bekatul beras merah terhadap viabilitas spermatozoa tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague dawley* yang diinduksi oleh asap rokok kretek.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Bagi peneliti

Penelitian ini bermanfaat untuk memperkaya pengetahuan dan pengalaman belajar meneliti terutama tentang kesehatan reproduksi dengan melihat pengaruh pemberian ekstrak etanol 96% bekatul beras merah terhadap jumlah dan viabilitas sperma tikus putih galur *Sprague dawley* yang diinduksi asap rokok. Bagi peneliti lain, diharapkan penelitian ini dapat digunakan sebagai bahan pertimbangan untuk penelitian selanjutnya.

2. Bagi pembaca

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menambah pengetahuan dan kewaspadaan terhadap bahaya infertilitas akibat paparan asap rokok, serta pengaruh pemberian ekstrak bekatul beras merah terhadap tingkat kualitas sperma khususnya jumlah dan viabilitas. Penelitian ini juga diharapkan menambah pengetahuan tentang pemanfaatan limbah bekatul beras merah untuk kesehatan reproduksi.

3. Bagi Institusi

Bagi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung, penelitian ini dibuat sebagai perwujudan dukungan visi dan misi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung untuk menjadi fakultas kedokteran dengan kekhususan dibidang *agromedicine*, karena penelitian ini memanfaatkan bekatul yang merupakan limbah pertanian untuk kesehatan.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

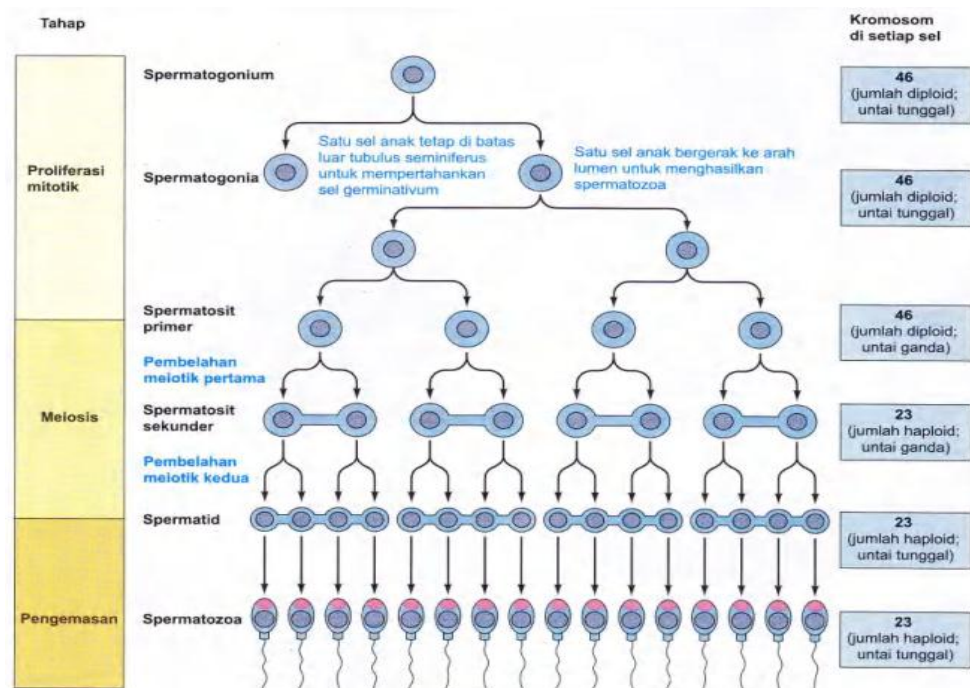
2.1 Spermatogenesis

Spermatogenesis adalah suatu proses kompleks pembentukan sperma, dimana spermatogonia (sel germinativum premordial) berproliferasi menjadi spermatozoa (sperma). Proses spermatogenesis membutuhkan waktu 64 hari dan terjadi di dalam testis. Beberapa ratus juta sperma matang dihasilkan setiap harinya setelah melewati tiga tahap utama yaitu proliferasi mitotik, meiosis dan pengemasan (Sherwood, 2012).

Proliferasi mitotik dimulai dengan bermitosisnya sel spermatogonia yang menghasilkan sel anak berkromosom lengkap (46 kromosom) identik dengan sel induk. Satu sel anak hasil mitosis akan tetap berada di tepi luar tubulus seminiferus sebagai spermatogonium yang tidak berdiferensiasi sementara sel anak lain bergerak ke lumen dan mengalami pembelahan mitosis sebanyak dua kali sehingga menghasilkan 4 spermatosit primer identik (Sherwood, 2012).

Setiap spermatosit primer dengan jumlah diploid 46 kromosom rangkap, akan membentuk spermatosit sekunder (haploid 23 kromosom rangkap)

pada fase meiosis pertama. Setelah fase meiosis kedua akan terbentuk empat spermatid (23 kromosom tunggal). Spermatid akan mengalami proses *remodeling* atau pengemasan yang dikenal sebagai spermiogenesis, pada proses ini sebagian besar sitosol dan semua organel sperma yang tidak dibutuhkan untuk menyampaikan informasi genetik ke ovum akan disingkirkan, sehingga sperma dapat bergerak cepat karena membawa sedikit beban. Spermiogenesis akan merubah spermatid menjadi spermatozoa. Pada akhirnya rangkaian spermatogenik pada manusia akan menghasilkan 16 spermatozoa (Sherwood, 2012). Proses spermatogenesis pada manusia dapat dilihat pada gambar 1.



Sumber: (Sherwood, 2012)

Gambar 1. Proses Spermatogenesis.

2.2 Kualitas Sperma dan Infertilitas

Analisis kualitas sperma menurut WHO mencakup analisis jumlah, motilitas, morfologi, serta vitalitas atau viabilitas yang telah ditentukan standar pengukurannya. Analisis kualitas sperma harus dilakukan minimal dua kali dengan jarak satu minggu. Melalui pengukuran pada masing-masing analisis, dapat diketahui apakah sperma seorang pria berkualitas untuk membuahi ovum atau memiliki risiko untuk menjadi penyebab infertilitas (WHO, 2010).

Infertilitas adalah ketidakmampuan pasangan yang telah menikah lebih dari satu tahun untuk hamil. Penyebab 40–90% kasus infertilitas pada pria masih tidak jelas, sehingga disebut dengan infertilitas idiopatik. Pada sperma pria yang infertil ditemukan peningkatan 25–40% *Reactive Oxygent Species* (ROS) (Ghareeb dan Sarhan, 2014).

2.3 Radikal Bebas dan Stres Oksidatif

Radikal bebas adalah molekul yang memiliki satu atau lebih elektron tidak berpasangan pada kulit terluarnya. Molekul tersebut bersifat sangat reaktif sehingga dapat menyebabkan kematian sel (Mustofa, 2013). Untuk mencapai stabilitas, radikal bebas akan mengambil atau mendonasikan elektronnya pada molekul lain. Reaktivitas ini berlangsung dalam waktu sangat cepat yaitu antara 10^{-9} – 10^{-12} detik. Seperti rantai yang terus-menerus terjadi, molekul yang kehilangan elektron selanjutnya juga akan menjadi radikal baru (Bansal dan Bilaspuri, 2011; Bender, 2012).

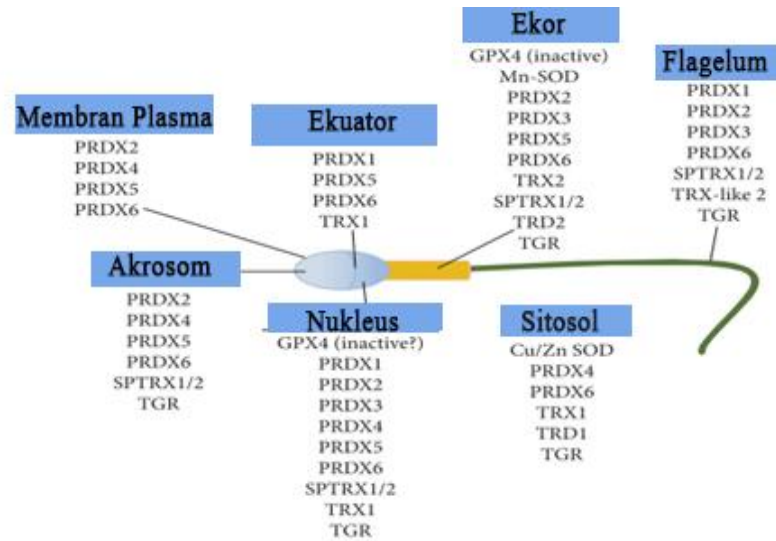
Radikal bebas dalam tubuh manusia dapat bersumber dari dalam tubuh (endogen) atau dari luar tubuh (eksogen). Radikal bebas endogen dapat terbentuk secara normal, contohnya radikal oksigen dan halogen yang bekerja sebagai agen sitotoksik untuk membunuh mikroorganisme yang difagositosis oleh makrofag (Bender, 2012). Radikal bebas eksogen dapat bersumber dari beberapa hal seperti paparan sinar rontgen, polutan, konsumsi alkohol dan konsumsi rokok. Didalam tubuh, apabila rantai radikal bebas terus-menerus terbentuk tanpa bisa diputuskan, maka radikal bebas dapat menimbulkan kerusakan (Widyawati, 2012). Radikal bebas dapat menimbulkan kerusakan pada asam nukleat, protein, lipoprotein dan lipid di membran plasma. Hal ini terjadi karena terdapat perubahan komponen struktur molekul akibat reaksi rantai radikal bebas. Radikal bebas yang paling merusak dalam sistem biologis adalah radikal oksigen seperti superoksida ($\bullet\text{O}_2^-$), hidroksil ($\text{OH}\bullet$), dan perihidroksil ($\text{O}_2\text{H}\bullet$), yang disebut sebagai ROS (Bender, 2012). Keberadaan ROS yang lebih banyak dibandingkan antioksidannya dalam tubuh dapat menyebabkan terjadinya stres oksidatif (Utami *et al.*, 2017). Stres oksidatif menyebabkan kondisi kerusakan jaringan. Kerusakan ini dapat dicegah apabila jumlah radikal bebas dan faktor yang melindunginya seimbang dalam tubuh. Faktor-faktor pelindung kerusakan oksidatif dikenal sebagai antioksidan (Bender, 2012).

2.3.1 Stres Oksidatif pada Spermatozoa

Stres oksidatif pada spermatozoa merupakan sebuah kebutuhan namun juga kerugian dalam situasi tertentu. Pada level yang rendah

spermatozoa membutuhkan ROS untuk mencapai kemampuan menjadi sperma yang fertil. Diketahui spermatozoa dapat memproduksi ROS superoksida ($\bullet\text{O}_2^-$), hidrogen peroksida (H_2O_2), dan nitrit oksida ($\text{NO}\bullet$). Adanya ROS tersebut dibutuhkan untuk memicu fosforilasi pada proses kapasitasi sehingga mempermudah reaksi pemecahan akrosom. Kerugian akibat ROS muncul ketika ROS menimbulkan stres oksidatif yang tidak tertanggulangi oleh sperma (Flaherty, 2014; Bansal dan Bilaspuri, 2011).

Spermatozoa merupakan tipe sel yang pertama kali dilaporkan menunjukkan potensi kerentanan terhadap stres oksidatif meskipun dilindungi oleh antioksidan enzimatis. Dapat dilihat pada gambar 2, terdapat berbagai macam antioksidan enzimatis seperti *Superoxide Dismutase* (SOD), *Glutathione Peroxidases* (GPX), *Glutathione Transferases* (GSH), *Peroxiredoxin* (PRDX), dan *Thioredoxins* (TRX) di sepanjang tubuh spermatozoa. Namun kerusakan akibat stres oksidatif akan tetap terjadi apabila jumlah ROS yang dihasilkan berlebih. Hal tersebut terjadi karena antioksidan enzimatis pada spermatozoa bersifat sangat sensitif dan rentan terinaktivasi. Apabila jumlah ROS berlebih, spermatozoa juga tidak bisa mensintesis lebih banyak enzim antioksidan tersebut (Flaherty, 2014).



Sumber: (Flaherty, 2014)

Gambar 2. Persebaran Antioksidan Enzimatis pada Spermatozoa Manusia.

2.3.2 Jumlah Spermatozoa

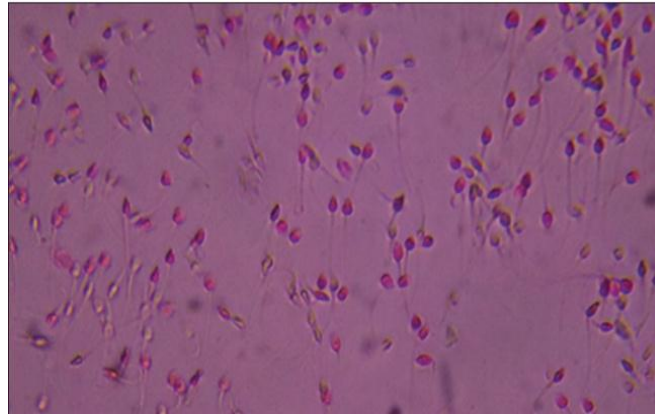
Menurut WHO tahun 2010, jumlah spermatozoa seorang pria amat berpengaruh terhadap kemungkinan hamil pasangannya. Jumlah spermatozoa pada saat ejakulasi dihitung dari konsentrasi spermatozoa per mililiter (ml) semen. Nilai terendah dari jumlah sperma adalah $\geq 15 \times 10^6$ spermatozoa permiliter semen. Apabila kurang dari nilai tersebut maka seorang pria dikatakan memiliki oligospermia, bila sama sekali tidak ditemukan spermatozoa didalam semen seorang pria maka pria tersebut dikatakan memiliki azospermia. Oligospermia merupakan salah satu faktor penting yang menjadi penyebab dari infertilitas. Sementara itu *American Society of Reproductive Medicine* (ARSM) tahun 2015 menyebutkan untuk dikatakan fertil dibutuhkan jumlah spermatozoa $\geq 48 \times 10^6$ /ml.

2.3.3 Viabilitas Spermatozoa

Viabilitas atau vitalitas sperma adalah ukuran ketahanan hidup sperma yang dapat diperkirakan dengan menilai integritas atau keutuhan membran sel sperma. Pemeriksaan viabilitas dapat dilakukan sebagai pemeriksaan rutin dan menjadi pemeriksaan yang penting untuk dilakukan pada pria dengan motilitas sperma kurang dari 40%. Hal ini bertujuan untuk membedakan permasalahan imotilitas sperma dan vitalitas sperma. Pemeriksaan viabilitas sperma harus dilakukan sesegera mungkin, 30 menit sampai satu jam setelah proses pengenceran sampel semen dilakukan. Hal ini bertujuan untuk menghindari efek perubahan temperatur dan dehidrasi yang dapat merusak vitalitas sperma. Pemeriksaan viabilitas sperma dapat dilakukan dengan dua metode, salah satunya adalah metode *dye exclusion* (WHO, 2010).

Sperma yang telah mati atau tidak viabel akan memiliki membran plasma yang tidak intak. Metode *dye exclusion* didasari oleh prinsip kerusakan tersebut akan membuat masuknya zat warna untuk mewarnai membran plasma sperma yang telah mati. Zat warna yang biasa digunakan adalah eosin. Eosin akan membuat sperma yang hidup memiliki kepala yang putih atau *light pink* karena membran plasmanya intak dan tidak menyerap warna. Sementara kepala sperma yang mati akan berwarna merah atau *dark pink*, karena membran plasmanya menyerap zat warna eosin seperti yang dapat

dilihat pada gambar 3. Sperma yang baik akan memiliki kualitas viabilitas $\geq 58\%$ setelah pengamatan menggunakan mikroskop (WHO, 2010; Talwar, 2015).



Sumber: (Talwar, 2015)

Gambar 3. Pewarnaan Sperma dengan Eosin.

2.4 Rokok Kretek

Rokok kretek merupakan rokok asli yang berasal dari Indonesia. Sampai sekarang rokok kretek masih menjadi jenis rokok yang paling banyak dikonsumsi dan beredar dipasaran. Rokok tersebut dikonsumsi oleh 80,4% perokok di Indonesia (WHO, 2011). Jenis rokok kretek ditandai dengan adanya penambahan sejumlah cengkeh bersama bahan bakunya yaitu tembakau (Roemer *et al.*, 2014).

2.4.1 Komponen Kimia Asap Rokok Kretek

Analisis komponen kimia asap rokok telah dilakukan dengan menggunakan *smoking machine* yang dilengkapi *filter cambridge*.

Asap yang tersaring pada filter, selanjutnya dikatakan sebagai kondensat asap atau yang lebih dikenal dengan *Total Particulate Matter* (TPM). Dari hasil analisis didapatkan komponen utama TPM pada asap rokok adalah air, nikotin, dan tar. Sementara itu, asap rokok yang lolos dari *filter cambridge* pada saat rokok diisap dan asap yang keluar pada saat rokok tidak diisap mengandung beberapa senyawa kimia seperti karbon monoksida (CO), dan *benzo-a-pyrine* (Tirtosastro dan Murdiyati, 2010). Asap rokok juga mengandung residu pupuk dan pestisida seperti *cadmium* (Cd) yang diserap tanaman tembakau dan ikut terisap pada saat merokok (Dai *et al.*, 2015). Secara *in vitro*, terdapat 3 jenis rokok kretek Indonesia yang diteliti komponen kimia asapnya oleh Piadé *et al.* pada tahun 2014. Hasil analisisnya dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Hasil Analisis Komponen Kimia Asap Rokok Kretek Indonesia.

Komponen kimia	Kretek A	Kretek B	Kretek C
Nikotin (mg/cig)	1,72	1,78	0,74
Tar (mg/cig)	29,0	39,9	14,4
Karbon monoksida (mg/cig)	18,7	17,8	8,98
Nitrogen oksida (μ g/cig)	157	189	97,0
<i>Benzo-a-pyrine</i> (ng/cig)	26,3	28,3	10,6
<i>Cadmium</i> (ng/cig)	111	48,1	8,79

Sumber: (Piadé *et al.*, 2014)

2.5 Radikal Bebas dalam Asap Rokok

Radikal bebas dalam asap rokok dapat digolongkan menjadi dua kategori. Radikal bebas yang terbentuk secara langsung selama proses pembakaran tembakau dan radikal bebas yang awalnya tidak terdapat dalam asap rokok

namun kemudian terbentuk saat TPM teroksidasi atau terlarut dalam cairan tubuh, juga bisa terbentuk saat terjadi interaksi senyawa-senyawa kimia dalam fase gas. Radikal bebas yang masuk dalam kelompok pertama adalah komponen TPM yaitu radikal yang terbentuk dari tar dan nikotin, juga radikal gas yang terbentuk saat merokok yaitu CO dan NO (Wooten *et al.*, 2006).

Senyawa NO merupakan radikal bebas yang bersifat nonreaktif dan nontoksik, namun kombinasi NO dengan molekul oksigen di udara dapat menyebabkan terbentuknya nitrogen dioksida (NO₂) yang bersifat toksik. Senyawa NO juga dapat berubah menjadi senyawa yang lebih reaktif yang disebut dengan *Reactive Nitrogen Species* (RNS), contohnya adalah NO₂, dinitrogen trioksida (N₂O₃), dinitrogen tetraoksida (N₂O₄) dan peroksinitrat (ONOO⁻). Peroksinitrat terbentuk saat berinteraksi dengan superoksida (Wooten *et al.*, 2006).

Radikal bebas yang masuk kedalam kelompok kedua adalah ROS, RNS dan radikal semiquinon. Radikal semiquinon merupakan radikal yang terbentuk akibat autooksidasi dari senyawa hidroquinon yang terdapat dalam asap rokok pada fase partikulatnya terutama tar. Autooksidasi tersebut selain menghasilkan radikal semiquinon juga menghasilkan radikal superoksida ($\bullet\text{O}_2^-$), yang merupakan bagian dari ROS (Wooten *et al.*, 2006). Senyawa *benzo(a)pyrene* dan Cd merupakan senyawa lain yang juga dapat menimbulkan radikal bebas secara tidak langsung (Dai *et al.*, 2015).

2.6 Mekanisme Rokok Menimbulkan Stress Oksidatif pada Spermatozoa

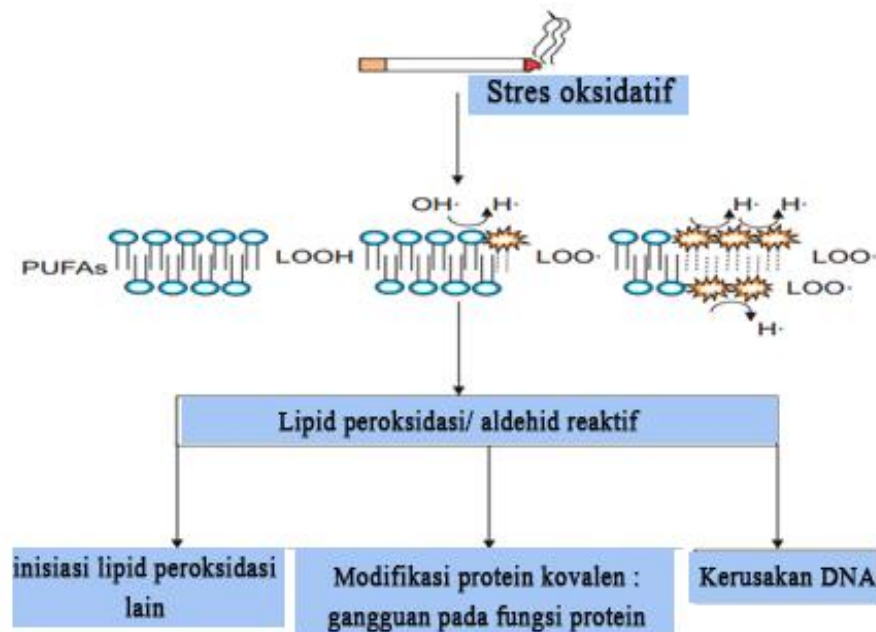
Mekanisme kerusakan oksidatif akibat ROS telah banyak dibahas dengan bukti yang mendukung berupa penelitian. Beberapa mekanisme stres oksidatif yang diakibatkan oleh rokok pada sperma yaitu:

1. Peroksidasi lipid

Membran sel spermatozoa merupakan membran yang kaya akan komponen lipid dalam bentuk *polyunsaturated fatty acid* (PUFAs) atau asam lemak tidak jenuh. Kerusakan akibat radikal bebas pada asam lemak tidak jenuh pada membran sel akan menyebabkan pembentukan *lipid peroxidation* (LPO) atau peroksidasi lipid. Pembentukan LPO dapat mempengaruhi perubahan struktur, integritas, permeabilitas dan hilangnya fungsi dari membran sel. Produk sekunder dari LPO juga dapat merusak beberapa molekul penting seperti protein dan basa DNA (Agarwal *et al.* 2014; El-beltagi, 2017; Chung dan Adcock, 2008). Asap rokok merupakan salah satu produk yang dapat menginduksi LPO pada sperma.

Asap rokok mengandung beberapa komponen yang dapat mengakibatkan LPO lewat jalur stres oksidatif. Senyawa ROS dan RNS pada asap rokok yang dapat menyebabkan pembentukan rantai radikal bebas yang menginduksi LPO. Secara tidak langsung asap rokok juga mengandung Cd yang juga dapat menyebabkan LPO. Unsur Cd adalah unsur alami kerak bumi yang biasanya ditemukan sebagai mineral. Unsur Cd banyak ditemukan pada tanah yang

digunakan untuk menanam tembakau, dan ikut terserap oleh tembakau. Sehingga merokok menjadi sumber masuknya Cd dalam tubuh manusia. Kadmium menginduksi stres oksidatif melalui mekanisme akumulasi ROS terutama superoksida ($O_2\cdot$), hidrogen peroksida (H_2O_2) dan radikal hidroksil ($\cdot OH$) (Dai *et al.*, 2015; Oliveira *et al.*, 2009). Mekanisme rokok dapat menyebabkan LPO dapat dilihat pada gambar 4.



Sumber: (Chung dan Adcock, 2008).

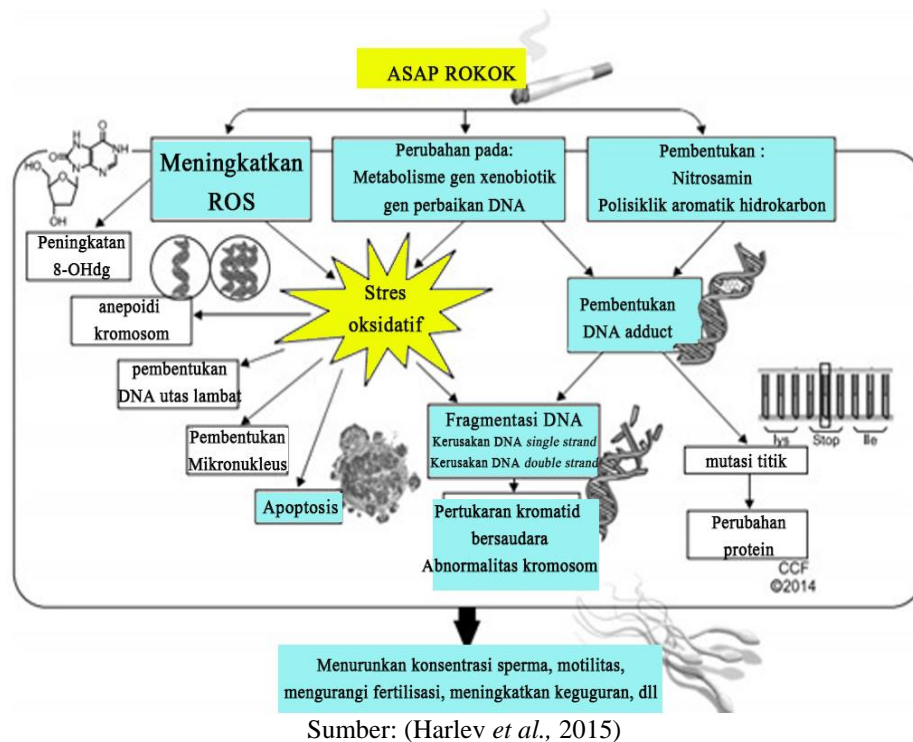
Gambar 4. Mekanisme Rokok Menyebabkan Peroksidasi Lipid.

Penelitian tentang peningkatan kadar lipid peroksidase pada spermatozoa pria perokok dibandingkan dengan pria tidak merokok telah dilakukan oleh Ghaffari dan Rostami pada tahun 2012. Pada penelitian tersebut aktivitas lipid peroksidase diukur dengan kadar

Malondialdehyde (MDA) pada sperma. Hasil penelitian menyatakan bahwa kadar MDA pada sperma pria yang merokok adalah 27 nmol/10⁶ sperma, sedangkan pada pria tidak merokok kadarnya hanya 0,14 nmol/10⁶ sperma. Hasil lainnya adalah terjadi penurunan jumlah spermatozoa pada pria yang merokok yaitu 52,80 (10⁶/ml) bila dibandingkan dengan pria tidak merokok yaitu 65,50 (10⁶/ml).

2. Kerusakan *Deoxyribonucleic Acid* (DNA)

Beberapa komponen dalam tembakau dan asap rokok dapat menyebabkan kerusakan DNA. Asap rokok mengandung ROS dan RNS yang dapat menyebabkan stres oksidatif, yang kemudian dapat merusak secara langsung ataupun tidak langsung susunan dari basa DNA, menyebabkan mutasi, abnormalitas kromosom, dan pembentukan mikronukleus. Asap rokok juga mengandung senyawa *polycyclic aromatic hydrocarbon* (PAHs) yaitu *benzo(a)pyrene* dan *benzo(a)pyrene diol epoxide*. Kedua senyawa tersebut dapat berikatan secara kovalent dengan rantai DNA dan menghasilkan DNA *adduct* yang disebut dengan *benzo(a)pyrene diol epoxide-DNA* selain itu DNA *adduct* lain yang merupakan biomarker penanda kerusakan DNA yang terdeteksi pada spermatozoa perokok adalah *8-oxo-2'-deoxyguanosine* yang dapat menyebabkan DNA mutagenik (Harlev *et al.*, 2015; Dai *et al.*, 2015). Mekanisme kerusakan DNA dapat dilihat pada gambar 5. Kerusakan DNA dapat menyebabkan penurunan viabilitas dan jumlah spermatozoa pada pria yang merokok.



Gambar 5. Mekanisme Kerusakan DNA oleh Rokok.

Hubungan viabilitas dan fragmentasi DNA telah diteliti oleh Samplaski *et al.*, pada tahun 2015, menggunakan studi yang dilangsungkan dari tahun 2008–2013 dengan melibatkan 2695 pria. Didapatkan hasil pria dengan fragmentasi DNA sperma $<30\%$ memiliki viabilitas $\geq 75\%$, sedangkan pria dengan fragmentasi DNA $\geq 30\%$ memiliki viabilitas sperma $<50\%$. Dalam penelitian lain, yang dilakukan oleh Wulandari *et al.* pada tahun 2012 didapatkan penurunan viabilitas sperma sebesar 50,3% pada kelompok tikus yang dipaparkan asap rokok dibandingkan dengan kelompok tikus yang tidak terpapar asap rokok.

3. Apoptosis

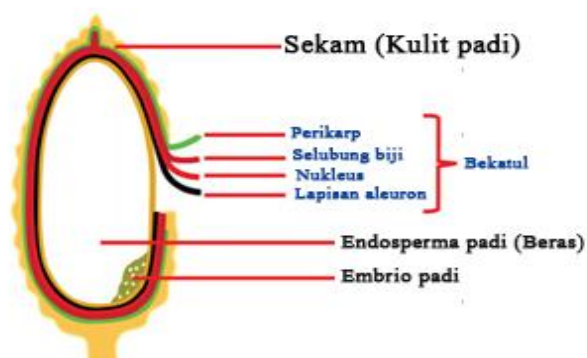
Apoptosis atau kematian sel yang terprogram adalah respon noninflamasi dari kerusakan jaringan. Ditandai dengan perubahan biokimia sel yang akan berujung pada perubahan struktur morfologi seluler dan kematian. Apoptosis normal terjadi pada sperma untuk mengatur banyaknya jumlah sperma yang diproduksi. Namun, peningkatan ROS yang tidak tertanggulangi dapat menyebabkan *abortive* apoptosis atau apoptosis sel sebelum waktunya. Kerusakan DNA disebutkan berhubungan sebagai salah satu faktor yang menyebabkan *abortive* apoptosis akibat ROS (Agarwal dan Majzoub, 2017).

Penelitian secara *invitro* tentang apoptosis sperma akibat ROS telah dilakukan oleh Mahfouz *et al.*, pada tahun 2010. Penelitian ini membuktikan setelah penambahan 100 mmol ROS yaitu hidrogen peroksida (H_2O_2) pada 12 sampel sperma terjadi peningkatan jumlah apoptosis. Apoptosis pada sperma yang tidak terinduksi H_2O_2 adalah 0,25% sementara yang terinduksi 0,73%. Pada penelitian ini juga terjadi penurunan viabilitas dan peningkatan fragmentasi DNA pada sperma pria yang terinduksi ROS.

2.7 Bekatul Beras Merah

Bekatul merupakan salah satu limbah pertanian yang dihasilkan dari proses penggilingan padi. Pada saat proses penggilingan padi, akan dihasilkan 70%

endosperma padi (beras), 20% sekam (kulit padi), 2% embrio padi dan 8% bekatul (kulit ari padi). Secara keseluruhan seperti pada gambar 6, bekatul adalah sebutan untuk struktur multilayer yang terdiri dari perikarp, nukleus, kulit biji dan aleuron padi (Sharma *et al.*, 2015; Park *et al.*, 2017).



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

Gambar 6. Struktur Bekatul Beras.

2.7.1 Komponen Fitokimia Bekatul Beras Merah

Bekatul mengandung beberapa komponen endosperma, embrio dan lapisan aleurone, karena letaknya menyelubungi endosperma padi. Hal ini membuat bekatul kaya akan protein, vitamin, karbohidrat, mineral dan beberapa komponen senyawa kimia, yang pada tumbuhan disebut sebagai senyawa fitokimia (Sharma *et al.*, 2015; Friedman, 2013; Goufo dan Trindade, 2014). Komponen fitokimia dalam bekatul bergantung kepada jenis berasnya. Bekatul dari beras yang mengandung pigmen warna seperti beras merah dan beras hitam memiliki komponen fitokimia yang lebih banyak dibandingkan dengan bekatul beras putih (Friedman, 2013).

Penelitian tentang komponen fitokimia bekatul beras merah telah dilakukan oleh Widarta *et al.*, pada tahun 2013. Bekatul beras merah diekstraksi dengan menggunakan beberapa pelarut salah satunya adalah etanol 96%. Dalam penelitian tersebut komponen bioaktif yang diteliti adalah kandungan fenol, total antosianin dan aktivitas antioksidan yang diukur dengan menilai kemampuan menangkap senyawa radikal menggunakan *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl* (DPPH). Komponen fitokimia lain dari bekatul beras merah diukur menggunakan metode analisis *Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography* (RP-HPLC) oleh Moongngarm *et al.*, pada tahun 2012. Hasil analisis memperlihatkan bekatul beras merah mengandung senyawa antara lain γ -oryzanol, γ -tokoferol dan α -tokoferol. Bekatul beras merah yang diekstrak dengan etanol 70% juga mengandung senyawa proantosianidin berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Thitipramote *et al.*, pada tahun 2016. Hasil penelitian Widarta *et al.*, Moongngarm *et al.*, dan Thitipramote *et al.*, dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Komponen Fitokimia Bekatul Beras Merah.

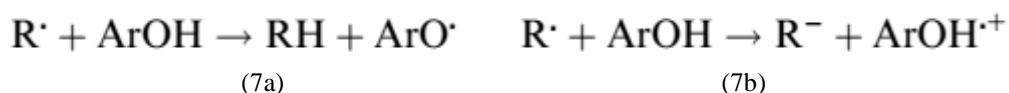
Komponen Fitokimia	Kadar
Total antosianin	2,46 mg/100g
Total fenol	3,01 mg/100g
Proantosianidin	3,168 \pm 0,078 mgCE/mg ekstrak
γ -tokoferol	25 \pm 0,17 μ g/g
α -tokoferol	44 \pm 1,05 μ g/g
γ -oryzanol	8,58 \pm 0,02 mg/g
Aktivitas antioksidan	62,42%

Sumber: (Widarta *et al.*, 2013; Moongngarm *et al.*, 2012; Thitipramote *et al.*, 2016).

2.8 Antioksidan

Antioksidan adalah molekul yang dapat menghambat atau memutuskan reaksi rantai radikal bebas sehingga kerusakan seluler dapat dicegah. Berdasarkan aktivitasnya, antioksidan dapat digolongkan menjadi golongan enzimatik dan nonenzimatik. Antioksidan enzimatik merupakan antioksidan yang diproduksi oleh tubuh, bekerja dengan memecah dan mengabsorpsi radikal bebas kemudian menghilangkannya. Antioksidan nonenzimatik berasal dari luar tubuh, bekerja dengan cara menginterupsi reaksi rantai radikal bebas dan menjadi *scavenger* untuk ROS dan menetralkannya dengan dua mekanisme kerja utama (Nimse dan Pal, 2015; Bendary *et al.*, 2013).

Antioksidan nonenzimatik memiliki 2 mekanisme utama untuk melindungi sel dari kerusakan oksidatif. Mekanisme pertama adalah *Hydrogen Atom Abstraction* (HAT) yaitu mekanisme donor atom hidrogen dari senyawa antioksidan (ArOH) yang menghasilkan radikal antioksidan. Mekanisme kedua adalah *Single Electron Transfer* (SET) yaitu mekanisme donor satu elektron milik antioksidan pada radikal bebas yang menghasilkan radikal kation antioksidan. Kedua mekanisme kerja antioksidan tersebut dapat dilihat pada gambar 7 (Bendary *et al.*, 2013; Liang dan Kitts, 2014). Beberapa senyawa yang masuk kedalam antioksidan nonenzimatik adalah vitamin C, vitamin E, senyawa *polyphenol* tumbuhan, karotenoid dan *glutathione* (Nimse dan Pal, 2015).



Sumber: (Bendary et al. 2013)

Gambar 7. Mekanisme Donor Hidrogen Antioksidan (7a) dan Donor Elektron Antioksidan (7b).

2.8.1 Mekanisme Antioksidan Bekatul Beras Merah

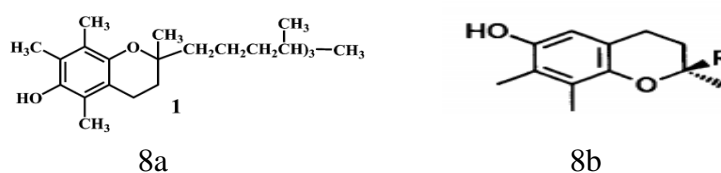
Bekatul beras merah memiliki komponen fitokimia seperti yang telah dituliskan dalam tabel 2. Komponen fitokimia tersebut berkerja sebagai antioksidan dengan beberapa mekanisme, yaitu:

1. α -tokoferol dan γ -tokoferol

α -tokoferol dan γ -tokoferol merupakan bagian dari dari vitamin E dengan struktur kimia seperti pada gambar 8. Keduanya merupakan molekul antioksidan yang larut lemak sehingga efektif bekerja untuk menghentikan peroksidasi lipid akibat radikal bebas pada membran sel dengan cara donor hidrogen (H). γ -tokoferol diketahui dapat secara spesifik menjadi *scavanger* untuk RNS. Namun dalam tubuh manusia selain α -tokoferol, jenis vitamin E lain sulit untuk dikenali oleh enzim *hepatic α -tochoperol transfer protein* (α -TTP) sehingga efikasi α -tokoferol yang paling baik. (Traber dan Atkinson, 2008).

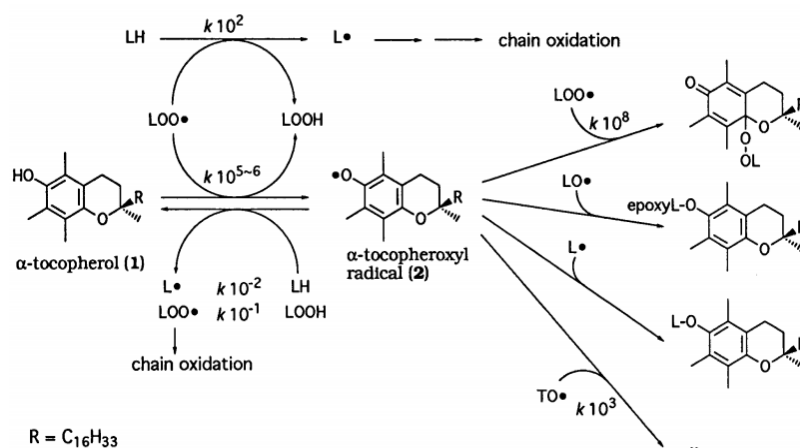
Setiap satu molekul α -tokoferol akan bereaksi dengan dua rantai radikal bebas pada LPO. Pada reaksi pertama, α -tokoferol akan mendonorkan atom H dari ikatan lemah OH pada radikal bebas

LPO seperti radikal lipid ($L\bullet$), radikal lipid alkoksi ($LO\bullet$), atau radikal lipid peroksil ($LOO\bullet$). Ikatan dengan salah satu radikal tersebut akan menghasilkan lipid stabil dan radikal α -tokoferoksil ($TO\bullet$). Pada reaksi kedua, untuk menjadikan radikal $TO\bullet$ stabil maka radikal tersebut akan bereaksi kembali dengan radikal lipid, sehingga satu molekul α -tokoferol akan menghentikan dua rantai radikal bebas pada LPO (Nimse dan Pal, 2015; Yamauchi, 1997). Reaksi penghentian LPO oleh α -tokoferol dapat dilihat pada gambar 9.



Sumber: (Nimse & Pal 2015a; Yamauchi 1997)

Gambar 8. Struktur Kimia α -tokoferol (8a) dan γ -tokoferol (8b).

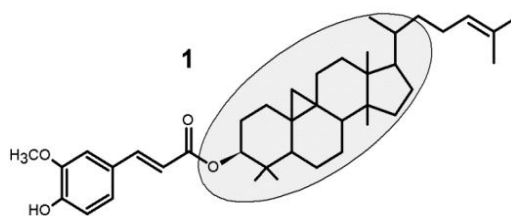


Sumber: (Yamauchi,1997)

Gambar 9. Reaksi Kimia α -tokoferol Menghentikan Peroksidasi Lipid.

2. γ -oryzanol

γ -oryzanol merupakan senyawa kimia yang terdiri dari campuran ester asam ferulat dan fitosterol (sterol dan alkohol triterpenoid). Dalam tubuh manusia, oryzanol akan dimetabolisme menjadi asam ferulat, *steryl ferulates* dan kolesterol. γ -oryzanol dan metabolitnya bekerja sebagai antioksidan dengan mekanisme kerja mirip dengan vitamin E, keduanya mendonorkan atom H untuk menetralisasi radikal bebas dengan cara menangkap ROS pada reaksi peroksidasi lipid. Penghambatan peroksidasi lipid akan mencegah disfungsi dari mitokondria, dan menghentikan reaksi rantai radikal bebas (Minatel *et al.*, 2016). Struktur kimianya dapat dilihat pada gambar 10.



Sumber: (Minatel *et al.*, 2016).

Gambar 10. Struktur kimia γ -oryzanol.

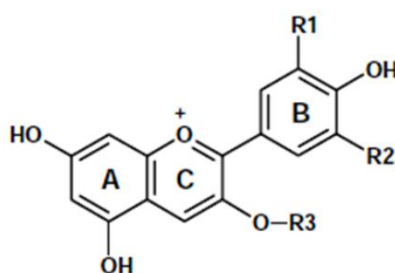
3. Fenol

Fenol merupakan senyawa metabolit sekunder dari tumbuhan yang memiliki minimal satu cincin aromatik (C_6) yang mengikat satu atau lebih gugus hidroksil (-OH). Fenol dapat dibagi kedalam beberapa kelompok berdasarkan jumlah atom karbon yang diikat

oleh struktur cincin aromatiknya, beberapa kelompok fenol adalah flavonoid, tanin, *hyrdoxycinnamate ester*, dan lignin. Polifenol merupakan senyawa kimia yang ideal menjadi *scavenger* dari radikal bebas. (El-beltagi, 2017).

4. Antosianin dan Antosianidin

Antosianin merupakan senyawa yang berperan untuk menghasilkan pigmen warna biru, ungu, dan merah pada tumbuhan dan sayur. Senyawa ini termasuk dalam golongan flavonoid. Struktur utamanya ditandai dengan adanya dua cincin aromatik benzena (C_6H_6) yang dihubungkan dengan tiga atom karbon yang membentuk cincin. Antosianin merupakan aglikosida dari senyawa antosianidin (Goufo dan Trindade, 2014; Andarwulan dan Faradilla, 2012). Struktur kimianya dapat dilihat pada gambar 11.

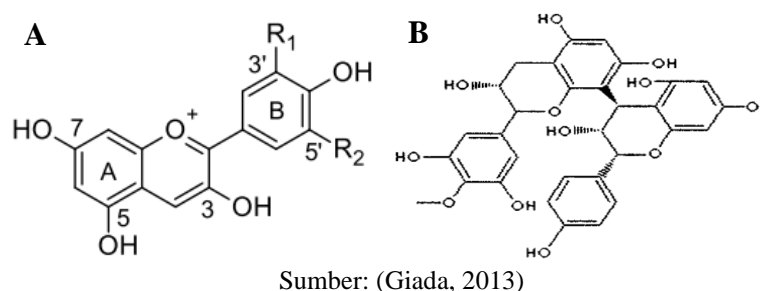


Sumber : (Andarwulan dan Faradilla, 2012).

Gambar 11. Struktur Kimia Antosianin.

Antosianidin memiliki efek antioksidan dengan cara menghambat peroksidasi lipid. Proksidasi lipid dihambat melalui mekanisme

aktivitas *scavanger* radikal bebas. Antosianidin dapat menyumbangkan satu elektron (disertai dengan inti hidrogen) kepada senyawa radikal bebas kelompok -OH yang melekat pada cincin fenolik. Elektron ini menstabilkan dan menonaktifkan rantai radikal bebas yang terbentuk (Nimse dan Pal, 2015). Struktur kimia antosianidin dan proantosianidin dapat dilihat pada gambar 12.



Sumber: (Giada, 2013)

Gambar 12. Struktur Kimia Antosianidin (12 A) dan Proantosianidin (12 B).

2.9 Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

Tikus laboratorium atau Tikus Norwegia (*Rattus norvegicus*) adalah jenis hewan coba penelitian yang paling banyak digunakan pada penelitian biologi dan kedokteran dengan taksonomi yang dapat dilihat pada tabel 3. Tikus ini banyak digunakan karena fisiologisnya mirip dengan manusia. Hewan coba tikus juga lebih baik dari mencit karena ukurannya lebih besar sehingga memudahkan untuk pengambilan sampel penelitian (Hedrich, 2006).

Tabel 3. Taksonomi Tikus *Rattus norvegicus*.

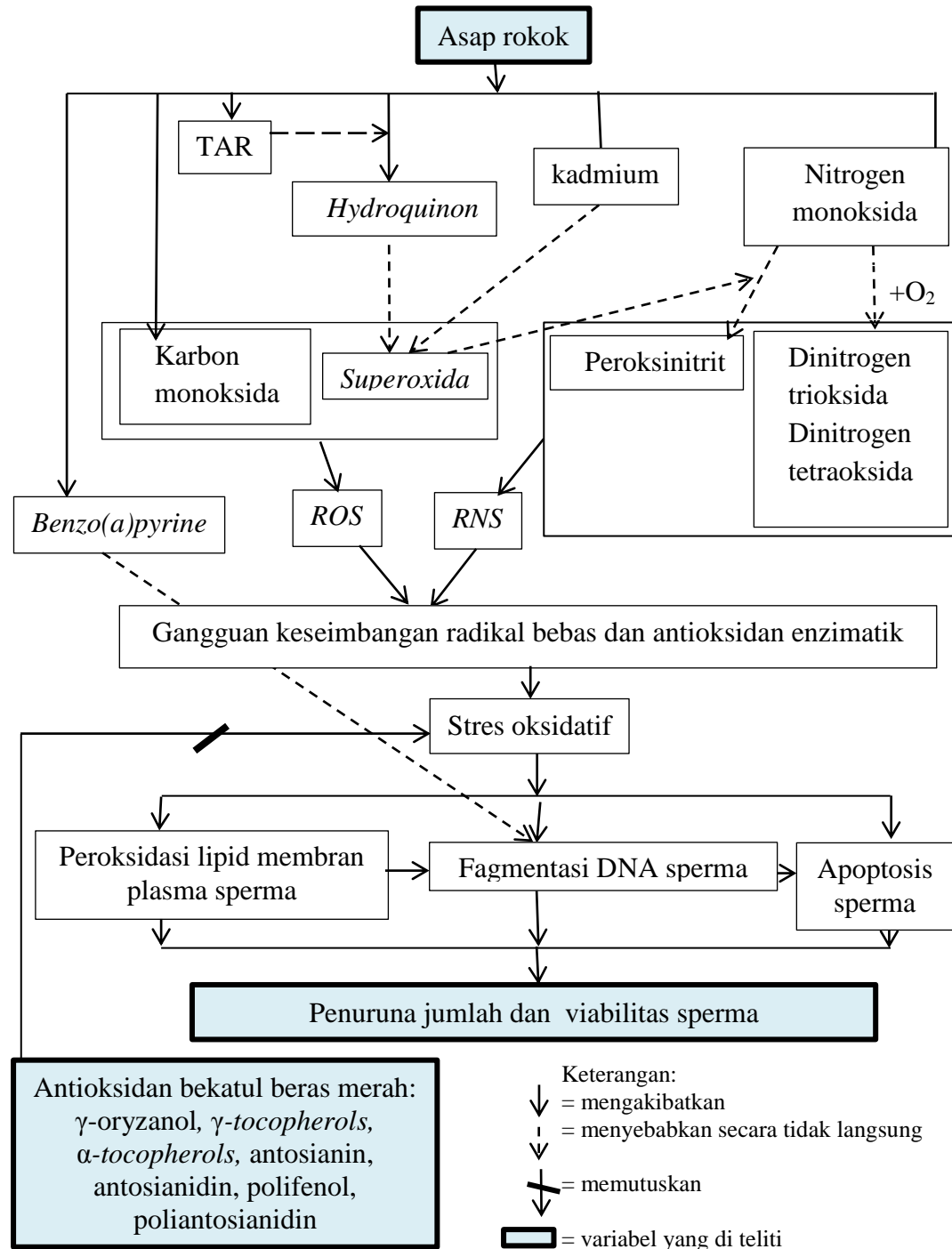
Taksonomi	Keterangan
Kingdom	: <i>Animalia</i>
Filum	: <i>Chordata</i>
Subfilum	: <i>Vertebrata</i>
Kelas	: <i>Mamalia</i>
Subkelas	: <i>Theria</i>
Ordo	: <i>Rodentia</i>
Subordo	: <i>Myophora</i>
Famili	: <i>Muridae</i>
Superfamili	: <i>Muroidea</i>
Subfamili	: <i>Murinae</i>
Genus	: <i>Rattus</i>
Spesies	: <i>Rattus norvegicus</i>

Sumber: (Hedrich, 2006)

Tikus banyak digunakan untuk penelitian tentang sistem reproduksi, baik secara fisiologis ataupun penilaian toksikologi pada sistem tersebut. Hewan ini memiliki dua testis yang masing-masing berada didalam kantung skrotum. Epididimis tikus terdiri dari tiga bagian yaitu bagian terbesar yang merupakan kaput epididimis berada pada bagian proksimal testis, bagian ini dikelilingi oleh lemak disekitarnya. Bagian kedua adalah korpus epididimis dan yang terakhir adalah kauda epididimis yang berada di bagian distal (Hofstetter *et al.*, 2006). Sperma tikus pertamakali dihasilkan saat tikus berusia 45 hari, namun baru akan optimal produksinya saat tikus berusa 75 hari (Lohmiller dan Swing, 2006).

2.10 Kerangka Teori

Kerangka teori pada penelitian ini dapat dilihat pada gambar 13.

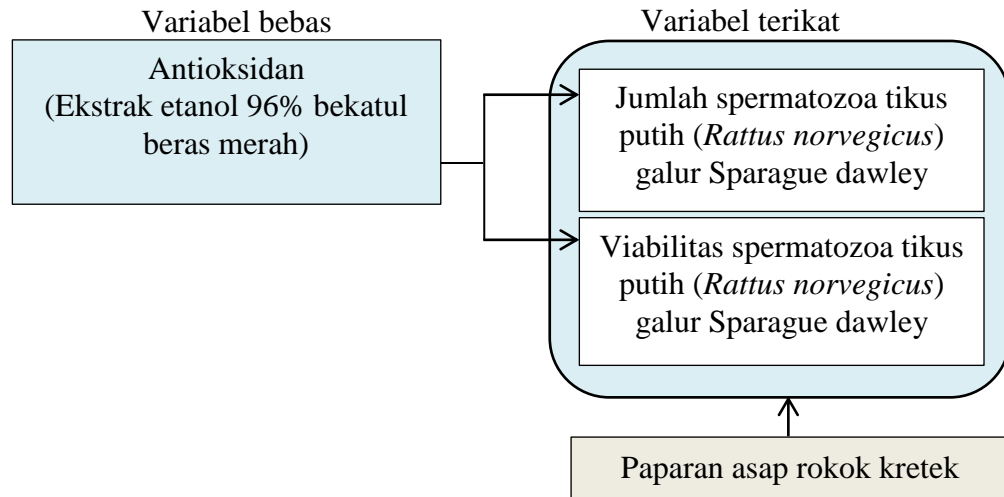


Sumber: (Dai *et al.*, 2015; Oliveira *et al.*, 2009; Harlev *et al.* 2015; Agarwal dan Majzoub 2017; Wooten *et al.*, 2006)

Gambar 13. Kerangka Teori.

2.11 Kerangka Konsep

Kerangka konsep untuk penelitian ini dapat dilihat pada gambar 14.



Gambar 14. Kerangka Konsep.

2.12 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah yang telah dipaparkan sebelumnya, hipotesis dalam penelitian adalah:

- Terdapat pengaruh pemberian ekstrak etanol 96% bekatul beras merah terhadap jumlah spermatozoa tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague dawley* yang diinduksi asap rokok kretek.
- Terdapat pengaruh pemberian ekstrak etanol 96% bekatul beras merah terhadap viabilitas spermatozoa tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague dawley* yang diinduksi asap rokok kretek.

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental murni dengan desain *post test only control group design*. Dalam penelitian ini dilakukan randomisasi, artinya sebelum diberikan perlakuan semua kelompok kontrol dan eksperimen dianggap sama sehingga pengelompokan kelompok kontrol dan eksperimen dilakukan secara acak. Pengambilan data dilakukan setelah akhir penelitian dengan membandingkan hasil pada kelompok tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague dawley* yang diberi perlakuan dengan kelompok yang tidak diberi perlakuan kemudian melihat apakah ada pengaruh variabel independen terhadap variabel dependen.

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di *Animal House* Fakultas Kedokteran Universitas Lampung (FK Unila) dan Laboratorium Biologi Molekuler FK Unila selama 30 hari pada bulan November–Desember 2017. Hewan coba diadaptasi, menerima perlakuan hingga terminasi di *Animal House* FK Unila, kemudian pemeriksaan viabilitas dan jumlah spermatozoa dilakukan di Laboratorium

Biologi Molekuler FK Unila. Pembuatan ekstrak bekatul beras merah dilakukan di Laboraturium Analisis Hasil Pangan Fakultas Pertanian Unila.

3.3 Subyek Penelitian

3.3.1 Populasi

Populasi penelitian yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) dewasa jantan galur *Sprague dawley*, berumur 10–12 minggu dengan berat 200 gram yang diperoleh dari Fakultas Peternakan Institut Pertanian Bogor.

3.3.2 Sampel Penelitian

Sampel pada penelitian ini adalah tikus putih dewasa jantan galur *Sprague dawley* yang dipilih secara randomisasi atau acak lengkap dan dibagi kedalam 5 perlakuan yang berbeda. Ulangan setiap kelompok percobaan dihitung dengan menggunakan rumus Frederer tahun 1977.

Rumus:

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

Keterangan:

t= jumlah kelompok percobaan.

n= jumlah sampel tiap kelompok.

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

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

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 4,75$$

$$n \geq 5 \text{ (pembulatan)}$$

Berdasarkan perhitungan banyaknya ulangan setiap kelompok percobaan adalah lima ekor, sehingga pada penelitian ini dibutuhkan 25 ekor tikus dari populasi yang ada. Selanjutnya untuk mengantisipasi *drop out* atau hilangnya unit eksperimen, maka rumus diolah kembali dengan rumusan:

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

Keterangan:

N= besar sampel koreksi

n= besar sampel awal

F= perkiraan proporsi *drop out* 10% (Sastroasmoro dan Ismael, 2010).

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

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

$$N = 5,55$$

$$N = 6 \text{ (pembulatan)}$$

Jadi, pada penelitian ini digunakan 25 ekor tikus yang dibagi menjadi lima kelompok perlakuan dengan lima ekor tikus sebagai cadangan yang dibagi kedalam masing-masing kelompok, sehingga terdapat enam tikus dalam satu kelompok perlakuan.

3.3.3 Kriteria Inklusi dan Eksklusi

1. Kriteria Inklusi

- a) Tikus galur *Sparague dawley*
- b) Berjenis kelamin jantan
- c) Berat tikus 200 gram
- d) Berusia sekitar 10–12 minggu

2. Kriteria Eksklusi

- a) Terdapat penurunan berat badan lebih dari 10% setelah masa adaptasi
- b) Sakit (tikus dengan rambut kusam, rontok dan aktivitas kurang atau tidak aktif)
- c) Mati selama perlakuan

3.4 Identifikasi Variabel Penelitian

3.4.1 Variabel Independen

Variabel independen atau bebas pada penelitian ini adalah ekstrak etanol 96% bekatul beras merah yang diberikan pada tikus putih (*Rattus novergicus*) jantan galur *Sprague dawley* setelah pemaparan asap rokok.

3.4.2 Variabel Dependen

Variabel dependen atau terikat pada penelitian ini adalah jumlah spermatozoa dan viabilitas spermatozoa tikus putih (*Rattus novergicus*) jantan galur *Sprague dawley*.

3.4.3 Perlakuan

Hewan coba tikus putih dalam penelitian ini dibagi dalam 5 kelompok, selama 30 hari diberikan perlakuan seperti yang dapat dilihat pada tabel 4.

Tabel 4. Kelompok Perlakuan.

Kelompok	Perlakuan
Kontrol 1 (K1)	Kelompok kontrol negatif, diberikan pakan standar <i>ad libitum</i> , tidak dipaparkan asap rokok kretek dan tidak diberi ekstrak etanol 96% bekatul beras merah.
Kontrol 2 (K2)	Kelompok kontrol positif, diberi pakan standar <i>ad libitum</i> , dipaparkan asap 2 batang rokok kretek namun tidak diberi ekstrak etanol 96% bekatul beras merah.
Perlakuan 1 (P1)	Diberi pakan standar <i>ad libitum</i> , dipaparkan asap 2 batang rokok kretek dan diberi ekstrak etanol 96% bekatul beras merah dosis 100 mg/kgBB
Perlakuan 2 (P2)	Diberi pakan standar <i>ad libitum</i> , dipaparkan asap 2 batang rokok kretek dan diberi ekstrak etanol 96% bekatul beras merah dosis 200 mg/kgBB
Perlakuan 3 (P3)	Diberi pakan standar <i>ad libitum</i> , dipaparkan asap 2 batang rokok kretek dan diberi ekstrak etanol 96% bekatul beras merah dosis 400 mg/kgBB

3.5 Alat dan Bahan

3.5.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

- a) Kandang tikus

- b) Tempat makan dan minum tikus
- c) *Improved Neubauer*
- d) *Object glass*
- e) *Cover glass*
- f) Mikroskop
- g) *Handschoen*
- h) Masker
- i) Mikropipet
- j) Sonde lambung
- k) Sput
- l) *Logbook* dan alat tulis

3.5.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

- a) Tikus putih usia 10–12 minggu
- b) Ekstrak etanol 96% bekatul beras merah
- c) Sekam
- d) Pakan tikus
- e) Air minum tikus
- f) Eosin 10 %
- g) NaCl 0,9%

3.6 Definisi Operasional

Definisi operasional pada penelitian ini dapat dilihat pada tabel 5.

Tabel 5. Definisi Operasional.

Variabel	Definisi	Alat Ukur	Cara Ukur	Hasil Ukur	Skala
Ekstrak Bekatul	Hasil ekstraksi bekatul beras merah dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96% dengan perbandingan (1 gr:6 ml) dalam bentuk ekstrak kental bekatul beras merah	Sonde	K1: tidak diberi Ekstrak Bekatul K2: tidak diberi Ekstrak Bekatul P1: Diberi ekstrak bekatul dosis 100 mg/kgBB P2: Diberi ekstrak bekatul dosis 200 mg/kgBB P3: Diberi ekstrak bekatul dosis 400 mg/kgBB	mg/kg BB/hari	Ordinal
Jumlah Spermatozoa	Jumlah atau konsentrasi spermatozoa per ml	<i>Improved Neubauer</i> , Mikroskop	Jumlah dihitung di <i>Improved Neubauer</i>	Juta/ml	Numerik
Viabilitas Spermatozoa	Daya tahan hidup spermatozoa di luar testis	Mikroskop	Sel Sperma transparan = Hidup Sel sperma merah/keunguan = Mati	Persen (%)	Numerik

3.8. Prosedur Penelitian

3.8.4. Etika Penelitian

Penelitian ini telah lolos kaji etik dan mendapatkan surat kelayakan etik untuk melakukan penelitian dari Komite Etik Fakultas Kedokteran Universitas Lampung dengan nomor surat 679/UN26.8/DL/2018.

3.8.5. Pengadaan Hewan Coba

Hewan coba pada penelitian ini adalah tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague dawley* yang berjumlah 30 ekor dan diperoleh dari Fakultas Peternakan Institut Pertanian Bogor.

3.8.6. Pemeliharaan Hewan Coba

Tikus putih jantan galur *Sprague dawley* menjalani masa adaptasi selama 7 hari di kandang pemeliharaan *Animal House* FK Unila untuk menyeragamkan cara hidup sebelum diberi perlakuan. Proses pemeliharaan mengacu kepada tuntunan penggunaan dan penanganan hewan coba untuk penelitian dari Pusat Penelitian dan Pengembangan Ternak tahun 2008, dimana luas kandang untuk tikus dengan berat 250–300 gram adalah 1500 cm² dengan tinggi 22–24 cm. Kandang dibuat dari plastik dengan bagian atasnya berupa kawat. Satu kandang diisi satu kelompok perlakuan tikus, dengan jumlah enam ekor tikus perkandang. Suhu dijaga pada 20–26⁰C dan lingkungan kandang dijaga agar tidak lembab dengan pencahayaan cukup. Pemberian makanan dan minuman diberikan secukupnya dengan wadah terpisah dan diganti setiap hari untuk menjaga kesehatan tikus agar tidak sakit atau mati. Makanan tikus berupa pelet diberikan secara *ad libitum*, begitupun minumannya.

3.8.7. Pembuatan Ekstrak Bekatul

1. Bekatul beras merah disaring dengan saringan 60 mesh untuk mendapatkan ukuran yang kecil dan sama.

2. Bekatul beras merah dioven dengan suhu 105°C selama 5 menit untuk menghilangkan enzim lipase sehingga tidak tengik.
3. Bekatul beras merah diekstraksi dengan metode maserasi. Metode maserasi digunakan untuk mendapatkan redemen yang banyak dan mencegah terjadinya kerusakan kandungan antioksidan sehingga mendapatkan minyak kasar bekatul beras merah dalam kadar maksimal dan kualitas baik. Maserasi dilakukan dengan cara merendam bekatul beras merah dengan pelarut etanol 96% dengan perbandingan 1gr:6ml etanol selama tujuh hari dan terus menerus diaduk menggunakan alat *shaker*.
4. Ekstrak bekatul dibuat kental dengan memekatkan filtrat hasil penyaringan dengan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 50°C.

3.8.8. Perhitungan Dosis Bekatul Beras Merah

Penelitian oleh Heikal *et al.*, tahun 2015 menyebutkan bahwa ekstrak bekatul dengan pelarut etanol 96% dosis 100 mg/kgBB tikus merupakan dosis aman yang dapat digunakan dalam jangka panjang, sementara dosis 500 mg/kgBB tikus akan menimbulkan efek toksik. Penelitian lain oleh Laili tahun 2016 menunjukkan dosis bekatul 200 mg/kgbb tikus efektif meningkatkan TAS. Oleh karena itu, peneliti menggunakan dosis 200 mg/kgBB sebagai acuan. Dosis pertama

diturunkan setengah sehingga menjadi 100 mg/kgBB dan dosis ketiga dinaikkan dua kali lipat menjadi 400 mg/kgBB. Perhitungan dosis ekstrak bekatul pada tikus yang memiliki BB 200 gram adalah:

Berat badan tikus = 200 gram = 0,2 kg

Dosis 1 ekstrak bekatul:

$$100 \frac{\text{mg}}{\text{kgBB}} \times 0,2 \text{ kg} = 20 \text{ mg}$$

Dosis 2 ekstrak bekatul:

$$200 \frac{\text{mg}}{\text{kgBB}} \times 0,2 \text{ kg} = 40 \text{ mg}$$

Dosis 3 ekstrak bekatul:

$$400 \frac{\text{mg}}{\text{kgBB}} \times 0,2 \text{ kg} = 80 \text{ mg}$$

Jadi, total ekstrak bekatul yang dibutuhkan dalam penelitian ini untuk tikus dengan berat badan 200 gram, selama 30 hari masing-masing kelompok tikus berjumlah 6 adalah:

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

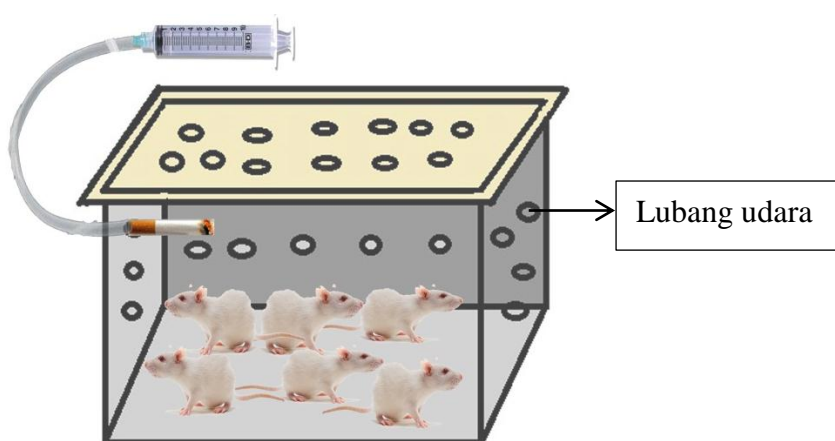
$$\text{Dosis 2 ekstrak bekatul: } 40 \text{ mg} \times 6 \times 30 = 7200 \text{ mg}$$

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

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

3.8.9. Induksi Paparan Asap Rokok Kretek

Tikus kelompok K2, P1, P2 dan P3 mendapatkan paparan asap 2 batang rokok kretek setiap hari, selama 30 hari. Hal tersebut mengacu kepada penelitian Batubara *et al.*, tahun 2013 bahwa pemaparan asap 2 batang rokok kretek selama 30 hari mampu menurunkan kualitas spermatozoa. Rokok yang dipakai adalah rokok kretek dengan kandungan nikotin 2,2 mg dan tar 38 mg. Rokok dibakar dan dikeluarkan asapnya dengan bantuan *air pump* hasil modifikasi dengan spuit dan selang. Perkelompok tikus yang mendapat perlakuan paparan asap rokok dimasukkan kedalam kamar rokok atau *smoking chamber* seperti yang telah dilakukan oleh Irawati tahun 2015 dengan modifikasi lebih banyak lubang untuk mencegah terjadinya hipoksia. Ilustrasi pemaparan asap rokok pada tikus dapat dilihat pada gambar 15.



Gambar 15. Ilustrasi Pemaparan Asap Rokok dalam *Smoking Chamber*.

3.8.10. Terminasi Hewan Coba

Tikus diterminasi setelah diberi perlakuan terakhir dengan cara *cervical dislocation*. Cara *cervical dislocation* ini dilakukan dengan meletakkan ibu jari dan jari telunjuk pada sisi leher dasar tengkorak untuk memberi tekanan ke bagian posterior dasar tulang tengkorak dan sumsum tulang belakang, sementara tangan lainnya pada bagian ekor atau kaki belakang lalu ditarik dengan cepat sehingga terjadi pemisahan vertebra servikal dari tengkorak dan terjadi pemisahan sumsum tulang belakang dari otak. Setelahnya tikus dibedah untuk diambil organ testisnya, kemudian testis tikus diletakkan pada gelas ukur berisi NaCl agar dapat dengan mudah memisahkan testis dengan lemak. Tikus yang telah diterminasi dan diambil testisnya dikuburkan dengan layak.

3.8.11. Prosedur Pengamatan Jumlah dan Viabilitas Spermatozoa

1. Jumlah sperma

Suspensi sperma yang diperoleh terlebih dahulu dihomogenkan dengan NaCl 0,9%, selanjutnya diambil 10 μ l sampel dan dimasukkan kedalam kotak-kotak hemositometer *improved neubauer* serta ditutup dengan kaca penutup. Diperiksa dibawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 400x, dihitung jumlah spermatozoa pada kotak atau bidang A, B, C, D dan E. Hasil perhitungan jumlah spermatozoa kemudian dimasukkan ke dalam

rumus penentuan jumlah spermatozoa per mililiter suspensi sperma sebagai berikut (Gandasoebrata, 2007).

$$\text{Jumlah spermatozoa} = n \times \text{pengenceran} \times 10^6 \text{ juta sperma/ml}$$

Keterangan:

n = jumlah sperma yang dihitung pada kotak A, B, C, dan D.

2. Viabilitas sperma

Perhitungan daya tahan hidup (viabilitas) sperma dilakukan dengan meneteskan satu tetes semen pada gelas objek dan ditambahkan satu tetes larutan eosin dengan konsentrasi 10%. Dilakukan *smear* dan ditutup dengan kaca penutup untuk kemudian diamati dengan menggunakan mikroskop perbesaran 400x. Diamati kurang lebih 200 spermatozoa dan dihitung spermatozoa yang hidup (tidak menyerap warna) dan spermatozoa yang mati (menyerap warna) kemudian dihitung persentasenya.

Persentase viabilitas spermatozoa dapat dilihat dari jumlah spermatozoa hidup dibandingkan dengan spermatozoa yang mati dari 200 spermatozoa. Spermatozoa hidup memiliki kepala spermatozoa yang berwarna putih sedangkan spermatozoa mati diketahui dengan melihat kepala spermatozoa berwarna ungu atau merah setelah diwarnai dengan eosin. Perhitungan viabilitas menggunakan rumus:

$$\% \text{ Viabilitas Spermatozoa} = \frac{\text{Jumlah spermatozoa hidup}}{\text{Total spermatozoa yang diamati}} \times 100\%$$

Normal jika 58% atau lebih spermatozoa hidup atau viabel (WHO, 2010).

3.7 Rancangan Analisis Data

Analisis statistik yang digunakan untuk mengolah data pada penelitian ini adalah analisis bivariat untuk mengetahui hubungan antara variabel bebas dan variabel terikat. Normalitas data diuji dengan uji *Shapiro-Wilk* karena jumlah sampel ≤ 50 . Selanjutnya homogenitas data diuji dengan uji *Levene* untuk mengetahui varians data. Bila data terdistribusi normal dan homogen maka digunakan uji parametrik, *One Way Anova*. Apabila tidak memenuhi syarat uji parametrik maka dilakukan uji nonparametrik *Kruskal Wallis*. Jika pada uji *One way Anova* menghasilkan nilai $p < 0,05$ maka dilanjutkan dengan melakukan analisis *Post Hoc Bonferroni* dan jika pada uji nonparametrik *Kruskal Wallis* menghasilkan nilai $p < 0,05$ maka akan dilanjutkan dengan melakukan analisis *Post Hoc Mann Whitney*.

3.8 Dummy Table

Berikut adalah *dummy table* untuk penelitian ini dapat dilihat pada tabel 6 dan 7.

Tabel 6. *Dummy Table* Rerata Jumlah Spermatozoa.

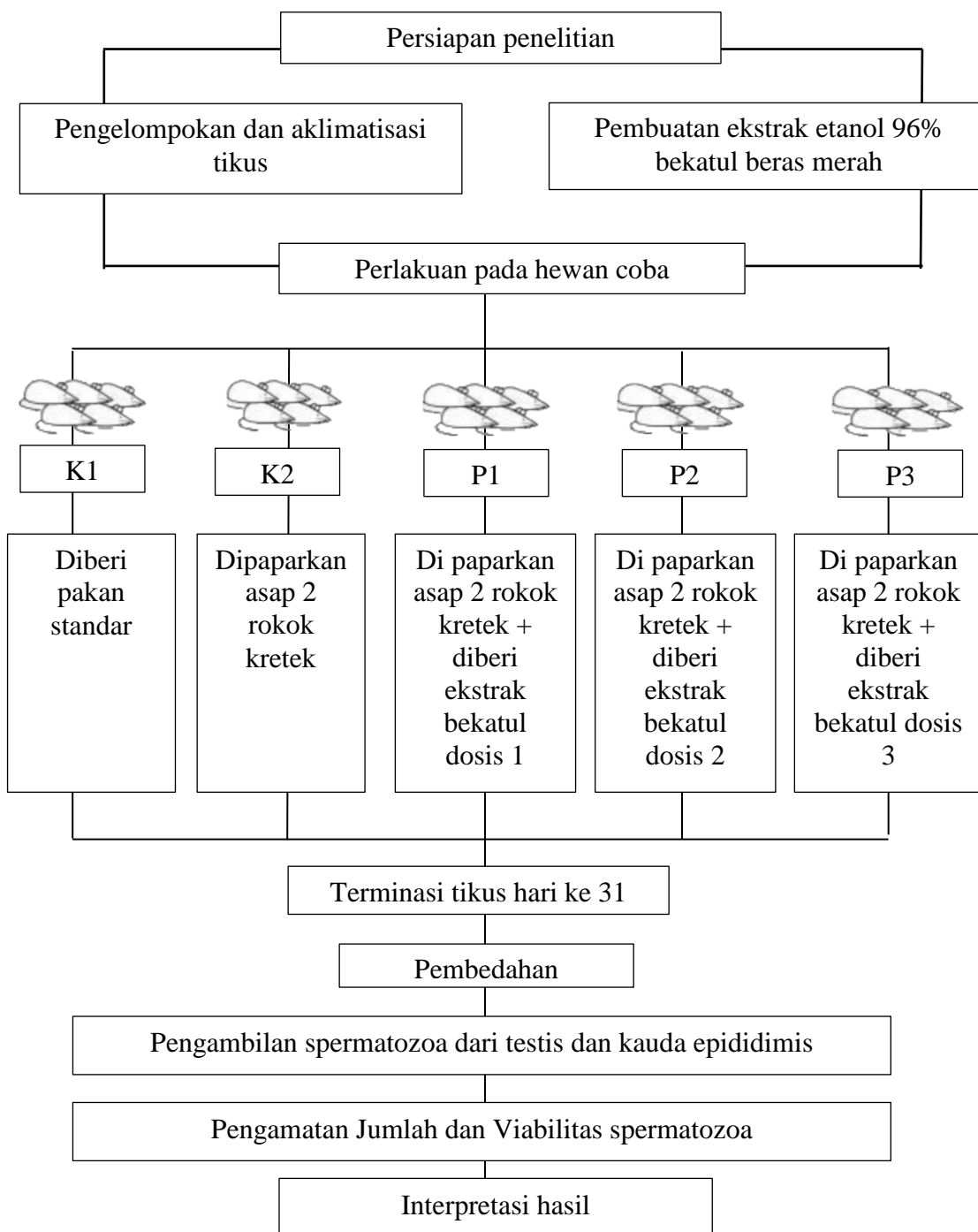
Ulangan Ke-	Kelompok Perlakuan				
	K1	K2	P1	P2	P3
1					
2					
3					
4					
5					
Rerata±SD					

Tabel 7. *Dummy Table* Rerata Viabilitas Spermatozoa.

Ulangan Ke-	Kelompok Perlakuan				
	K1	K2	P1	P2	P3
1					
2					
3					
4					
5					
Rerata±SD					

3.9 Alur Penelitian

Alur penelitian ini dapat dilihat pada gambar 16.



Gambar 16. Alur Penelitian.

BAB V KESIMPULAN

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan dari penelitian ini adalah:

1. Pemberian ekstrak etanol 96% bekatul beras merah berpengaruh terhadap peningkatan jumlah spermatozoa tikus putih jantan *Rattus norvegicus* galur *Sprague dawley* yang dipaparkan asap 2 batang rokok kretek selama 30 hari. Peningkatan jumlah spermatozoa sudah dapat ditemukan pada dosis 100 mg/kgBB namun penambahan dosis tidak meningkatkan efek.
2. Pemberian ekstrak etanol 96% bekatul beras merah berpengaruh terhadap peningkatan viabilitas spermatozoa tikus putih jantan *Rattus norvegicus* galur *Sprague dawley* yang dipaparkan asap 2 batang rokok kretek selama 30 hari. Peningkatan viabilitas spermatozoa sudah dapat ditemukan pada dosis 100 mg/kgBB namun penambahan dosis tidak meningkatkan efek.

5.2 Saran

1. Peneliti selanjutnya dapat mengurangi jumlah hari ataupun jumlah paparan batang rokok agar dapat membandingkan efeknya.

2. Peneliti selanjutnya dapat meneliti pengaruh ekstrak etanol 96% bekatul beras merah pada organ ataupun sel lain.

DAFTAR PUSTAKA

DAFTAR PUSTAKA

- Agarwal A, Virk G, Ong C, Plessis SS. 2014. Effect of oxidative stress on male reproduction. *World J Mens Health*. 32(1):1–17.
- Agarwal A, Majzoub A. 2017. Free radicals in andrology. Dalam: Jannini EA, Maggi M, Lenzi A, Foresta C, penyunting. *Antioxidants in andrology*. Switzerland: Springer International Publishing. hlm.8–14.
- Amelia L. 2018. Pengaruh pemberian ekstrak etanol 96% bekatul beras merah terhadap motilitas dan morfologi spermatozoa pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) dewasa jantan galur *Sprague dawley* yang diinduksi asap rokok kretek [skripsi]. Lampung: Universitas Lampung.
- Andarwulan N, Faradilla RF. 2012. Pewarna alami untuk pangan. Bogor: SEFEAST Center Institut Pertanian Bogor.
- ASRM. 2015. Diagnostic evaluation of the infertile male: a committee opinion. *J Fertility and Sterility*. 103(3): 1–8.
- Bansal AK, Bilaspuri GS. 2011. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. *Veterinary medicine international*. [Online Journal] [diunduh 28 September 2017]. Tersedia dari: [https://www.hindawi.com/journals/vmi/2011/686137/Barubata IVD, Benny W, Lydia T. 2013. Pengaruh paparan asap rokok kretek terhadap kualitas spermatozoa mencit jantan \(mus musculus\). *Jurnal ebiomedik*. 1\(1\):330–7.](https://www.hindawi.com/journals/vmi/2011/686137/Barubata%20IVD,%20Benny%20W,%20Lydia%20T.%202013.%20Pengaruh%20paparan%20asap%20rokok%20kretek%20terhadap%20kualitas%20spermatozoa%20mencit%20jantan%20(mus%20musculus).%20Jurnal%20ebiomedik.%201(1):330–7)
- Bendary E, Francis RR, Ali HMG, Sarwat MI, Hady SE. 2013. Antioxidant and structure– activity relationships (SARs) of some phenolic and anilines compounds. *J Annals of Agricultural Sciences*. 58(2): 173–81.

- Bender, DA. 2012. Radikal bebas dan nutrien antioksidan. Dalam Mrurray R, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Rodwell VW, Weil A, penyunting. Biokimia harper. Edisi 39. Jakarta: EGC
- Chung KF, Adcock IM. 2008. Multifaceted mechanisms in COPD: inflammation, immunity, and tissue repair and destruction. *Eur Respir J*. 31(1):1334–56.
- Cui X, Jing X, Wu X, Wang Z, Li Q. 2016. Potential effect of smoking on semen quality through DNA damage and the downregulation of Chk1 in sperm. *Molecular Medicine Report*. 14(1):753–61.
- Dai JB, Wang ZX, Qiao ZD. 2015. The hazardous effect of tobacco smoking on male fertility. *Asian Journal of Andrology*. 17(6):954–60.
- Dorotheo U, Lian TY. 2014. The asean tobacco atlas. Edisi ke-2. Thailand: Southeast asia tobacco control alliance.
- Dwizella N. 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 [skripsi]. Lampung: Universitas Lampung.
- El-beltagi H. 2017. Reactive oxygen species, lipid peroxidation and antioxidative defense mechanism. *Not Bot Horti Agrobi*. 41(1):44–57.
- Eriksen M, Mackay J, Schluger N, Gomeshtapeh FI, Drope J. 2015. The tobacco atlas. Edisi ke-5. USA: The american cancer society.
- Flaherty CO. 2014. The enzymatic antioxidant system of human spermatozoa. *Advances in andrology*. [Online Journal] [diunduh 28 september 2017]. Tersedia dari <https://www.hindawi.com/journals/aandrol/2014/626374/>.
- Federer WT. 1977. Experimental design theory and application. Edisi ke-3. Inggris: Oxford and IBH Publishing.
- Friedman M. 2013. Rice brans, rice bran oils, and rice hulls: composition, food and industrial uses, and bioactivities in humans, animals, and cells. *Journal of agricultural and food chemistry*. 61(45):10626–8.

- Ghaffari MA, Rostami M. 2012. Lipid peroxidation and nitric oxide levels in male smokers' spermatozoa and their relation with sperm motility. *J Reprod Infertil.* 13(3):81–7.
- Ghareeb DA, Sarhan EME. 2014. Role of oxidative stress in male fertility and idiopathic infertility: causes and treatment. *Journal of diagnostic technique & biomedical analysis.* 3(1):1–12.
- Giada MdLR. 2013. Food phenolic compounds: main classes, sources and their antioxidant power. Dalam Gonzales JAM, penyunting. *Oxidative stress and chronic degenerative diseases-a role for antioxidants.* Meksiko: InTech. hlm.90–3.
- Goufo P, Trindade H. 2014. Rice antioxidant: phenolic acids, flavonoids, anthocyanins, proanthocyanidins, tocopherols, tocotrienols, gamma-oryzanol, and phytic acid. *Food science & nutrition.* 2(2):75–104.
- Harlev A, Agarwal A, Gunes SO, Shetty A, Simon S. 2015. Smoking and male infertility: an evidence-based review. *World J Mens Health.* 33(3):143–60.
- Hedrich HJ. 2006. Taxonomy and stocks and strains. Dalam Mark AS, Steven HW, Craig LF, penyunting. *The laboratory rat.* Edisi ke-2. USA: American college of laboratory animal medicine.
- Heikal OA, Zickri MB, Helal AM, EL-Aksary H, Fiebich BL, Gomaa IEO. 2015. Stabilized rice bran extract: acute and 28-day repeated dose oral toxicity with in vitro mutagenicity and genotoxicity study. *Afr J Pharm Pharmacol.* 9(44):1037–50.
- Hofstetter J, Suckow MA, Hickman DL. 2006. Morphophysiology. Dalam Mark AS, Steven HW, Craig LF, penyunting. *The laboratory rat.* Edisi ke-2. USA: American college of laboratory animal medicine.
- Irawati NAV. 2015. Pengaruh pemberian vitamin e terhadap jumlah sel spermatogenik dan diameter tubulus seminiferus mencit jantan (*mus musculus*) yang dipaparkan asap rokok [skripsi]. Lampung: Universitas Lampung.
- Jungwirth A et al. 2015. Guidelines on male infertility. UK: European association of urology.

Kemenkes RI. 2016. Htts 2016: suarakan kebenaran, jangan bunuh dirimu dengan candu rokok. [Artikel Online] [diunduh 01 Oktober 2017]. Tersedia dari: www.depkes.go.id.

Kemenkes RI. 2015. Perilaku merokok masyarakat Indonesia. Jakarta: Infodatin.

Kemenkes RI. 2013. Riset kesehatan dasar. Jakarta: Badan penelitian dan pengembangan kesehatan Kemenkes RI.

Utami DK, Soleha TU, Kurniawaty E. 2017. Perbandingan pemberian dosis toksik amoksisilin generik berlogo dengan amoksisilin generik bermerek terhadap kadar malondialdehid (MDA) hepar rattus norvegicus galur sprague dawley. *Medula*. 7(4):129–34.

Laili HN. 2016. Pengaruh ekstrak bekatul terhadap peningkatan total antioksidan status (TAS) pada tikus yang diinduksi monosodium glutamat (MSG) studi eksperimental tikus jantan galur wistar dewasa [skripsi]. Semarang: Unisula.

Liang N, Kitts DD. 2014. Antioxidant property of coffee components: assessment of methods that define mechanisms of action. *J Molecules*. 19(11):19180–208.

Lohmiller JJ, Swing SP. 2006. Reproduction and breeding. Dalam Mark AS, Steven HW, Craig LF, penyunting. *The laboratory rat*. Edisi ke-2. USA: American college of laboratory animal medicine.

Mahfouz RZ, Stefan S, Nabil A, Rakesh S, Edmund S, Ashok A. 2010. Sperm viability, apoptosis, and intracellular reactive oxygen species levels in human spermatozoa before and after induction of oxidative stress. *Fertility and Sterility*, 93(3):814–21.

Mangimbulude JC, Karwur FF. 2013. Merokok dan oksidasi DNA. *Sains medika*. 5(2):113–20.

Minatel IO, Francisqueti FV, Corrêa CR, Pace G, Lima P. 2016. Antioxidant activity of γ -oryzanol: a complex network of interactions. *International journal of molecular sciences*. 17(1107):1–4.

- Moongngarm A, Daomukda N, Khumpika S. 2012. Chemical Compositions, Phytochemicals, and Antioxidant Capacity of Rice Bran, Rice Bran Layer, and Rice Germ. *APCBEE Procedia*. 2(14):73–9.
- Mustofa S. 2013. Pengaruh pemberian ekstrak tempe terhadap fungsi hati dan kerusakan sel hati tikus putih yang diinduksi parasetamol. *JuKe Unila*. 3(1):44–52.
- Nimse SB, Pal D. 2015. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Advances*. 1(1):1–36.
- Oliveira H, Spanò M, Lourdes MD. 2009. Adverse effects of cadmium exposure on mouse sperm. *Reproductive Toxicology*. 28(4):550–5.
- Park H, Lee K, Choi H. 2017. Rice bran constituents: immunomodulatory and therapeutic activities. *Royal society of chemistry*. 8(3):1-4.
- Piadé J et al. 2014. Toxicological assessment of kretek cigarettes part 2 : kretek and american-blended cigarettes, smoke chemistry and in vitro toxicity. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 70:23-24.
- Puslitbangnak. 2008. Penggunaan dan penanganan hewan coba rodensia dalam penelitian sesuai dengan kesejahteraan hewan. Jakarta: Puslitbangnak Kementerian Pertanian.
- Rahmanisa S, Maisuri R. 2013. Pengaruh pemberian ekstrak jahe merah (*zingiber officinale roxb.var rubrum*) dan zinc (zn) terhadap jumlah, motilitas dan morfologi spermatozoa pada tikus putih (*rattus norvegicus*) jantan dewasa strain spague dawley. *Juke Unila*. 3(2): 33–37.
- Rai IW, Arnata IW. 2014. Stabilitas aktivitas antioksidan ekstrak bekatul beras merah terhadap oksidaator dan pemanasan pada berbagai pH. *J Teknol dan industri pangan*. 25(2):193–9.
- Roemer E, Dempsey R, Schorp MK. 2014. Toxicological assessment of kretek cigarettes part 1: background, assessment approach, and summary of findings. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 70:2–4.

- Rula AG, Qazzaz MM, Dabdoub N, Abdul-Ghani A. 2014. Studies on cigarette smoke induced oxidative DNA damage and reduce spermatogenesis in rats. *J Environ Biol.* 35(5): 943–7.
- Samplaski MK et al. 2015. The relationship between sperm viability and DNA fragmentation rates. *Reproductive Biology and Endocrinology.* 13(42):4–9.
- Sastroasmoro S, Ismael S. 2010. *Dasar-dasar metodologi penelitian klinis.* Jakarta: Sagung Seto.
- Sharma R, Srivastava T, Saxena DC. 2015. Studies on rice bran and its benefits-a review. *International journal of engineering research and applications.* 5(5): 107–12.
- Sherwood LL. 2012. *Fisiologi manusia dari sel ke sistem.* Jakarta: EGC.
- Tafuri S, Ciani F, Iorio EL, Esposito L, Cocchia N. 2015. Reactive oxygen species (ROS) and male fertility. *Dalam Bin Wu. New discoveries in embryology.* UK: Intech.
- Talwar P. 2015. Sperm function test. *Journal of Human Reproductive Science.* 8(2):61-4.
- Thitipramote N, Pradmeeteekul P, Nimkamnerd J, Chaiwut P, Pintathong P, Thitilerdecha N. 2016. Bioactive compounds and antioxidant activities of red (brown red jasmine) and black (kam leum pua) native pigmented rice. *International food research journal.* 23(1):410–4.
- Tirtosastro S, Murdiyati AS. 2010. Kandungan kimia tembakau dan rokok. *Buletin tanaman tembakau,serat dan minyak industri.* 2(1):33–43.
- Traber MG, Atkinson J. 2008. Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radic Biol Med.* 43(1):4–15.
- WHO. 2011. *Global adult tobacco survey: Indonesia report 2011.* Indonesia: Badan Penelitian Dan Pengembangan Kesehatan, Kemenkes RI.

WHO. 2014. Global Youth Tobacco Survey: Indonesia Report 2014. India: Mahatma Gandhi Marg.

WHO. 2010. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen 5th edition. Switzerland: World health organization.

Widarta IWR, Nocianitri KA, Sari LPIP. 2013. Ekstraksi komponen bioaktif bekatul beras lokal dengan beberapa jenis pelarut. Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan. 2(2):75–9.

Wooten JB, Chouchane S, Mcgrath TE. 2006. Tobacco smoke constituents affecting oxidative stress. Dalam Halliwell BB, Poulsen HE, penyunting. Cigarette smoke and oxidative stress. Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Wulandari US, Aulanni'am, Wardhana W. 2012. Pengaruh pemberian ekstrak biji anggur (*Vitis vinifera*) terhadap viabilitas spermatozoa dan ekspresi tumor necrosis faktor alpha (TNF- α) testis pada hewan model tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang diberi paparan asap rokok [skripsi]. Malang: Universitas Brawijaya

Xu Z, Hua N, Godber JS. 2001. Antioxidant activity of tocopherols, tocotrienols, and γ -oryzanol components from rice bran against cholesterol oxidation accelerated by 2,2'-azobis (2-methylpropionamide) dihydrochloride. J Aric Food Chem. 49(4):2077–81.

Yamauchi R. 1997. Vitamin E: mechanism of its antioxidant activity. Food Sci Tech. 3(4):301–9.