

**PENGARUH EKSTRAK BAWANG PUTIH (*Allium sativum* L.) TERHADAP
MORFOLOGI DAN MOTILITAS SPERMATOZOA MENCIT JANTAN
DENGAN PEMAPARAN ASAP ROKOK**

(Skripsi)

Oleh

**ERIKA CLARISSA SIMAMORA
NPM 1717021022**



**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
2022**

**PENGARUH EKSTRAK BAWANG PUTIH (*Allium sativum* L.) TERHADAP
MORFOLOGI DAN MOTILITAS SPERMATOZOA MENCIT JANTAN
DENGAN PEMAPARAN ASAP ROKOK**

Oleh
ERIKA CLARISSA SIMAMORA

Skripsi

**Sebagai Salah Satu Syarat untuk Memperoleh Gelar
SARJANA SAINS**

Pada

**Jurusan Biologi
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung**



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2022**

ABSTRAK

PENGARUH EKSTRAK BAWANG PUTIH (*Allium sativum* L.) TERHADAP MORFOLOGI DAN MOTILITAS SPERMATOZOA MENCIT JANTAN DENGAN PEMAPARAN ASAP ROKOK

Oleh

ERIKA CLARISSA SIMAMORA

Rokok merupakan olahan tembakau yang mengandung berbagai komponen zat kimia berbahaya dalam asap rokok terutama radikal bebas yang dapat menyebabkan kerusakan sperma. Diketahui, bawang putih memiliki antioksidan alami yang memberikan efek pemulihan terhadap sperma dari radikal bebas. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh dari asap rokok terhadap kerusakan morfologi dan motilitas spermatozoa mencit jantan serta mengetahui pengaruh dari ekstrak bawang putih terhadap pemulihan kerusakan morfologi dan motilitas spermatozoa mencit jantan yang diberi pemaparan asap rokok. Penelitian ini adalah penelitian eksperimental dengan rancangan acak lengkap. Subyek penelitian ini menggunakan 30 ekor mencit jantan berumur 5 minggu dengan berat 20-40 g yang dibagi menjadi 3 kelompok yaitu: K0 (tidak diberikan perlakuan), K1 (diberikan paparan asap rokok dan akuades), P1 (diberikan paparan asap rokok dan larutan ekstrak bawang putih dosis 1000 mg/kgBB). Perlakuan pemaparan asap rokok pada mencit K1 dan P1 dipaparkan dengan waktu pemaparan 15 menit pada pagi hari dan pemberian larutan ekstrak bawang putih pada mencit P1 diberikan secara oral pada sore hari dimana lama waktu perlakuan yaitu 35 hari. Hasil yang diperoleh bahwa pengaruh asap rokok terhadap mencit K1 menimbulkan abnormalitas morfologi spermatozoa dan kerusakan motilitas spermatozoa sebesar 62,8%. Sedangkan pengaruh ekstrak bawang putih memperbaiki kualitas morfologi spermatozoa dan meningkatkan motilitas spermatozoa sebesar 77,1% dari pemaparan asap rokok.

Kata kunci: Asap Rokok, Ekstrak Bawang Putih, Mencit Jantan, Motilitas dan Morfologi Spermatozoa

ABSTRACT

EFFECT OF GARLIC EXTRACT (*Allium sativum* L.) ON THE MORPHOLOGY AND MOTILITY SPERMATOZOA OF MALE MICE WITH EXPOSURE TO CIGARETTE SMOKE

By

ERIKA CLARISSA SIMAMORA

Cigarette are processed tobacco that contain various components of harmful chemical substances in cigarette smoke, especially free radicals which can cause damage to spermatozoa. It's known, garlic has natural antioxidants that provide a recovery effect on spermatozoa from free radicals. The aim of this research is to determine the effect of exposure to cigarette smoke on the morphology and motility damage of male mice spermatozoa and to determine the effect of giving garlic extract on the restoration of damage to the morphology and the motility of male mice spermatozoa exposed to cigarette smoke. The research is an experimental research with a completely randomized design. The subject of this research used 30 male mice aged 5 weeks weighing 20-40 g which were divided into 3 groups, namely: K0 (not given treatment), K1 (given exposure to cigarette smoke and aquadest), P1 (given exposure to cigarette smoke and garlic extract dose 1000 mg/kgBW). The treatment of exposure to cigarette smoke in K1 and P1 mice was exposed to an exposure time of 15 minutes in the morning and the administration of garlic extract solution in P1 mice was given orally in the afternoon where the length of treatment time was 35 days. The results shows that effect of cigarette smoke on K1 mice caused abnormalities in spermatozoa morphology and damage to spermatozoa motility by 62,8%. Meanwhile, the effect of garlic extract improved the quality of spermatozoa morphology and increased spermatozoa motility by 77,1% from exposure to cigarette smoke.

Key words: Cigarette Smoke, Garlic Extract, Male Mice, Motility and Morphology Spermatozoa

Judul Skripsi : Pengaruh Ekstrak Bawang Putih (*Allium sativum* L.)
Terhadap Morfologi Dan Motilitas Spermatozoa Mencit
Jantan Dengan Pemaparan Asap Rokok

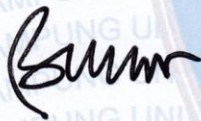
Nama Mahasiswa : *Erika Clarissa Simamora*
Nomor Pokok Mahasiswa : 1717021022
Program Studi : S1 Biologi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Bandar Lampung, 28 Oktober 2022

MENYETUJUI

Pembimbing I

Pembimbing II



Dr. Hendri Busman, M.Biomed.
NIP. 195901011987031001



Drs. M. Kanedi, M.Si.
NIP. 19610112991031002

Mengetahui
Ketua Jurusan Biologi FMIPA

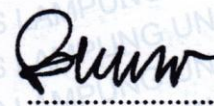


Dr. Jani Master, S.Si., M.Si
NIP. 198301312008121001

MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

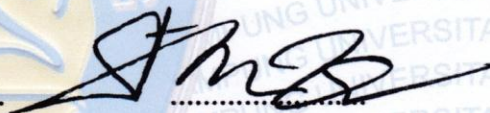
Ketua : Dr. Hendri Busman, M.Biomed.



Sekretaris : Drs. M. Kanedi, M.Si.



Anggota : Prof. Dr. Sutyarso, M.Biomed.



**2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Lampung**



**Dr. Eng. Heri Satria, S.Si., M.Si.
NIP. 197110012005011002**



Tanggal Lulus Ujian Skripsi : 28 Oktober 2022

SURAT PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Erika Clarissa Simamora
Nomor Pokok Mahasiswa : 1717021022
Jurusan : Biologi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Perguruan Tinggi : Universitas Lampung

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah saya yang berjudul:

“Pengaruh Ekstrak Bawang Putih (*Allium Sativum* L.) Terhadap Morfologi Dan Motilitas Spermatozoa Mencit Jantan Dengan Pemaparan Asap Rokok”

Adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi manapun dan bukan karya ilmiah ciptaan orang lain.

Semua sumber data dan informasi yang diperoleh telah dinyatakan dengan jelas benar apa adanya dan apabila di kemudian hari pernyataan ini tidak benar saya bersedia menerima sanksi yang ditetapkan oleh universitas.

Bandar Lampung, 7 Maret 2023



Menyatakan

Erika Clarissa Simamora

NPM. 1717021022

RIWAYAT HIDUP



Penulis dilahirkan di Merak Belantung, Kabupaten Lampung Selatan, pada tanggal 12 September 1999, sebagai anak pertama dari empat bersaudara, dari Bapak Jontinus Simamora (Alm) dan Ibu Patar Vera Siska Hutabarat.

Penulis menempuh pendidikan pertama di TK Xaverius Kalianda dan menyelesaikan pada tahun 2005, selanjutnya penulis menempuh pendidikan dasar di SDN 3 Way Urang dan selesai pada tahun 2011, lalu penulis menempuh pendidikan menengah pertama di SMPN 1 Kalianda sampai dengan tahun 2014, kemudian melanjutkan pendidikan menengah atas di SMAN 1 Kalianda dan lulus pada tahun 2017.

Pada tahun 2017, penulis diterima sebagai mahasiswi Universitas Lampung Program Studi S1 Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung melalui jalur SNMPTN. Selama menempuh pendidikan di kampus, penulis pernah menjadi anggota SAINTEK pada Himpunan Mahasiswa Biologi (HIMBIO) pada periode 2017-2018. Pada bulan Januari sampai dengan Februari 2020, penulis melakukan Kerja Praktik (KP) di Balai Karantina Ikan, Pengendalian Mutu dan Hasil Perikanan (BKIPM) Lampung

dan telah menyelesaikan Laporan Kerja Praktik dengan judul “**Pengujian Cemaran *Escherichia Coli* Pada Produk Ikan Kod Pasifik Beku (*Frozen Pacific Cod*) di Laboratorium Penguji Balai Karantina Ikan, Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan Lampung**”. Pada bulan Juli sampai dengan Agustus 2020, penulis melaksanakan Kuliah Kerja Nyata (KKN) di Desa Bumi Daya, Kecamatan Palas, Kabupaten Lampung Selatan. Terakhir, penulis melakukan kegiatan penelitian di Laboratorium Zoologi, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung pada bulan April hingga Juni 2021. Dengan segala rasa syukur dan penuh perjuangan dalam proses pembelajaran yang ditempuh, akhirnya penulis dapat menyelesaikan Pendidikan Strata 1 (S1) di Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.

PERSEMBAHAN

Karya kecil ini sebagai pencapaian terbesar penuh untuk kedua orang tua, Bapak Jontinus Simamora (Alm) dan Ibu Patar Vera Siska Hutabarat serta adikku Elisa, Alfredrian, dan Eflycta.

Motto

Hendaklah kamu selalu rendah hati, lemah lembut, dan sabar. Tunjukkanlah kasihmu dalam hal saling membantu.
(Efesus 4:2)

Sebagai seorang wanita, kita memiliki kecantikan dari hati seperti seberapa kita bisa berempati, bukan dengan membandingkan diri terhadap orang lain. Tapi bandingkanlah dengan diri sendiri, apakah kita bisa lebih baik dari kemarin.
-Sireethron Leearamwat

Memaafkan adalah upaya berkesadaran dan tanggung jawab mutlak manusia memenuhi dirinya yang telah membebaskan diri menjadi manusia dewasa seutuhnya.
-Erika Clarissa, 'Solilokui Alnayris'

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur kepada Tuhan Yang Maha Esa yang telah memberikan karunia serta kasih-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang merupakan salah satu syarat akademis menempuh pendidikan di Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Skripsi dengan judul “Pengaruh Ekstrak Bawang Putih (*Allium sativum* L.) Terhadap Morfologi dan Motilitas Spermatozoa Mencit Jantan Dengan Pemaparan Asap Rokok”.

Penulis menyadari masih banyak kekurangan dalam penulisan skripsi ini. Namun berkat bantuan, bimbingan dan kerja sama dari semua pihak, akhirnya penulisan skripsi ini dapat terselesaikan. Untuk itu penulis menyampaikan terima kasih kepada:

1. Bapak Dr. Eng. Suripto Dwi Yuwono, M.T., selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung;
2. Bapak Drs. M. Kanedi, M.Si., selaku Ketua Jurusan Biologi FMIPA Universitas Lampung;
3. Bapak Dr. Hendri Busman, M.Biomed., selaku Dosen Pembimbing I atas kesediaannya dalam membimbing penulis dan memberikan arahan, saran, dan kritik yang membangun dalam proses penyelesaian skripsi ini;
4. Bapak Drs. M. Kanedi, M.Si., selaku Dosen Pembimbing II atas kesediaannya membimbing penulis dan memberikan arahan, saran, dan kritik yang membangun dalam proses penyelesaian skripsi ini;
5. Bapak Prof. Dr. Sutyarso, M.Biomed., selaku Pembahas dan Penguji Utama dalam ujian skripsi. Terima kasih telah membimbing penulis dan

memberikan arahan, saran, dan kritik yang membangun dalam proses penyelesaian skripsi ini;

6. Ibu Endang L. Widyastuti, Ph.D., selaku Dosen Pembimbing Akademik;
7. Bapak dan Ibu Dosen Jurusan Biologi FMIPA Universitas Lampung yang telah memberikan ilmu dan pengalamannya yang sangat berharga selama masa perkuliahan;
8. Kedua orang tua saya tercinta, Bapak Jontinus Simamora (Alm) dan Ibu Patar Vera Siska Hutabarat yang dengan segenap hati senantiasa memberikan doa, dukungan, dan semangat;
9. Adik Elisa, Adik Alfedrian, Adik Eflycta yang selalu setia menyemangati dan memberikan doa;
10. Maryeta Handayani Sitepu dan Kak Helmi Aris sebagai partner penelitian yang memberikan kerja samanya, semangat, dan berbagi pengetahuan selama penelitian skripsi;
11. Bapak Moh. Fahrudin M.Pd., selaku guru Biologi SMA yang telah berjasa memberikan ilmu, guru yang sangat menginspirasi, memberikan dukungan, semangat, dan doa kepada penulis. Terima kasih untuk penyertaannya selama ini;
12. Dwi Ajeng Febiola, Kristin Natalia Surbakti, Maryeta Handayani Sitepu, Ria Novitasari, dan Shella Wijaya yang merupakan sahabat terbaik (Rebahan Squad) yang menemani penulis selama perkuliahan, selalu memberikan dukungan, perhatian, semangat, serta doa;
13. Teman-teman pemerhati baik Mba Aniswati Melindafia, Asmiatun Hasanah, Endang Purwanti, Digna Azkia Cinta Dinnisa, Affandy Asyirof, dll yang telah memberikan penyertaan dalam dukungan, doa, dan semangat bagi penulis selama perkuliahan;
14. Kak Delta Ozzora dan Kak Yosi Dwi Saputra yang sangat menginspirasi penulis selama kuliah, memberikan semangat dan doa kepada penulis selama proses penelitian skripsi ini;

15. Kak Ratri Mauluti Larasati yang sangat menginspirasi penulis selama kuliah, serta memberikan perhatian dan dukungannya;
16. Komang Uning Sari Devi sahabat sejak SMA yang selalu memberikan semangat dan doa kepada penulis;
17. Teman-teman Angkatan 2017 yang telah memberikan bantuan dan dukungan selama penulis mengikuti proses perkuliahan;
18. Seluruh pihak yang tidak dapat disebutkan oleh penulis satu persatu yang telah membantu dan memberikan dukungannya;
19. Diri sendiri yang telah berjuang keras serta tidak menyerah;
20. Serta almamater tercinta Universitas Lampung.

Akhir kata, penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari kata sempurna. Semoga Tuhan membalas segala kebaikan pihak-pihak yang telah terlibat dalam menyelesaikan skripsi ini. Dan semoga skripsi ini bisa berguna dan memberi manfaat bagi pembacanya.

Bandar Lampung, 7 Maret 2023

Penulis

Erika Clarissa Simamora

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN JUDUL DALAM.....	ii
ABSTRAK	iii
HALAMAN PERSETUJUAN.....	v
HALAMAN PENGESAHAN.....	vi
RIWAYAT HIDUP.....	viii
HALAMAN PERSEMBAHAN	x
UCAPAN TERIMA KASIH.....	xi
DAFTAR ISI.....	xiv
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR TABEL.....	xix
I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Manfaat Penelitian	5
1.5 Kerangka Pemikiran.....	5
1.6 Hipotesis Penelitian	6
II. TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1 Reproduksi Mencit Jantan	7
2.2 Spermatogenesis	9
2.3 Bawang Putih.....	11
2.3.1 Taksonomi Tanaman Bawang Putih	11
2.3.2 Sifat-sifat Botani Bawang Putih.....	11
2.3.3 Konstituen Kimia Bawang Putih	13
2.4 Asap Rokok.....	16
2.5 Hubungan Asap Rokok Dengan Spermatozoa.....	18

III. METODE PENELITIAN.....	21
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	21
3.2 Populasi dan Sampel	21
3.3 Jenis Penelitian.....	22
3.4 Desain Penelitian	22
3.5 Kriteria Inklusi dan Eksklusi.....	24
3.5.1 Kriteria Inklusi	24
3.5.2 Kriteria Eksklusi.....	24
3.6 Identifikasi Variabel.....	24
3.6.1 Variabel Bebas	24
3.6.2 Variabel Terikat	24
3.7 Definisi Operasional	25
3.8 Prosedur Penelitian	26
3.8.1 Tahap Pra-Perlakuan	26
3.8.2 Tahap Perlakuan.....	31
3.9 Rancangan Analisis Data	35
3.10 Alur Penelitian	36
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	38
4.1 Hasil Penelitian	38
4.1.1 Morfologi Spermatozoa	38
4.1.2 Motilitas Spermatozoa	42
4.2 Pembahasan.....	43
V. KESIMPULAN DAN SARAN.....	56
5.1 Kesimpulan	56
5.2 Saran	56

DAFTAR PUSTAKA 58

LAMPIRAN 64-80

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Struktur testis	8
2. Proses spermatogenesis.....	10
3. Morfologi <i>Allium sativum</i> L.	12
4. Senyawa organosulfur utama dalam olahan bawang putih.....	15
5. Diagram alir pembuatan larutan ekstrak bawang putih.....	36
6. Diagram alir penelitian.....	37
7. <i>Nicotinic Acetylcholine Reseptors</i>	52
8. Kandang mencit dan ram kawat.....	66
9. Wadah pakan dan botol minum.....	66
10. Mencit jantan.....	66
11. Pakan.....	66
12. Sekam padi	66
13. Timbangan digital	66
14. Blender	67
15. Beaker glass	67
16. Sendok pengaduk	67
17. Kertas saring.....	67
18. <i>Rotary evaporator</i>	67
19. Oven	67
20. Plastik cor.....	67
21. <i>Smoking chamber</i>	67

22. S spuit dan selang	67
23. Bawang putih	68
24. Etanol 96%	68
25. Na-CMC	68
26. Corong buchner	68
27. Sonde dan syringe	68
28. Akuades	68
29. Rokok	68
30. Korek gas	68
31. <i>Hot plate</i>	68
32. Formalin dan kloroform	69
33. Cawan petri dan gelas objek	69
34. NaCl 0,9%, giemsa, dan metanol	69
35. Mikroskop	69
36. Bawang putih yang telah dicuci bersih dipotong dan dihaluskan dengan blender	70
37. Bawang putih hasil blender ditimbang kemudian dimasukkan ke dalam <i>beaker glass</i> untuk dilakukan proses maserasi	70
38. Beaker glass ditutup menggunakan plastik selama 3 x 24 jam dan diletakkan di tempat yang terhindar dari cahaya matahari langsung (maserasi I).	71
39. Campuran simplisia bawang putih-etanol disaring menggunakan kain saring dan diperoleh maserat (1)	71
40. Ampas bawang putih hasil penyaringan maserasi I dilakukan maserasi II dan disaring menggunakan corong buchner untuk mendapatkan maserat (2).	72
41. Maserat (1) dan (2) dilakukan pemekatan maserat dengan <i>rotary evaporator</i> dan dioven selama 24 jam untuk memperoleh ekstrak kental.	72

42. Ekstrak kental bawang putih dipanaskan di hot plate dan ditambahkan Na-CMC dan diencerkan dengan akuades	73
43. Aklimatisasi	73
44. Pemberian pakan	73
45. Pemaparan asap rokok.....	74
46. Penanganan mencit.....	74
47. Pencekakan larutan bawang putih.....	74
48. Pembedahan mencit	74
49. Suspensi spermatozoa pada haemositometer	75
50. Motilitas spermatozoa	75
51. Preparat apusan yang diwarnai dengan giemsa.....	75
52. Morfologi spermatozoa	75

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Komponen Sulfur dari Bawang Putih	14
2. Definisi Operasional.....	25
3. Hasil pemeriksaan morfologi spermatozoa mencit	41
4. Hasil pemeriksaan motilitas spermatozoa mencit	42
5. Hasil penimbangan berat badan mencit	65
6. Analisis statistik data motilitas spermatozoa mencit	79

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Spermatogenesis merupakan proses dimana sel kelamin jantan diproduksi. Kesuburan pada mencit jantan dipengaruhi oleh jumlah, kualitas (motilitas dan morfologi), dan gangguan yang mengarah pada infertilitas spermatozoa (Roosbeh *et al.*, 2016). Salah satu faktor yang mempengaruhi kualitas sperma mencit adalah radikal bebas. Menurut studi Otomoso *et al.* (2010) bawang putih diketahui memiliki aktivitas antioksidan yang mengumpulkan spesies oksigen reaktif (ROS) dengan meningkatkan enzim antioksidan seluler sehingga dapat melindungi sel spermatozoa dari kerusakan oksidatif.

Bawang putih (*Allium sativum*) merupakan salah satu tanaman yang paling banyak diteliti sepanjang sejarah penggunaan obat (Block, 1985). Komponen penting bawang putih ditemukan pada bawang putih yang telah dihancurkan yaitu allicin yang diproduksi melalui alliin dengan interaksinya oleh enzim alliinase. Ekstrak bawang putih cair hasil ekstraksi dari bawang putih mentah merupakan bentuk homogenat (Aqel *et al.*, 1991) yang mengandung allicin (diallyl-thiosulfinate). Allicin adalah salah satu senyawa organosulfur utama

yang paling aktif secara biologis sebagai antioksidan yang efisien.

Antioksidan memiliki peranan penting dalam mencegah efek merusak dari radikal bebas pada manusia maupun hewan (Noori, 2012). Bahan-bahan alami yang mengandung antioksidan seperti bawang putih memiliki efek terhadap pengobatan yang dipicu toksisitas secara kimiawi (Baiomy and Mansour, 2015). Allicin diketahui memberikan perlindungan terhadap kanker yang disebabkan oleh zat karsinogen seperti nitrosamin yang terkandung pada rokok. Berdasarkan penelitian terhadap efek bawang putih, tikus yang diberi ekstrak bawang putih cair selama 3 bulan menunjukkan peningkatan produksi spermatozoa di epididimis (Challa *et al.*, 1997). Sementara itu, dalam penelitian Oi *et al.* (2001) ditemukan adanya peningkatan hormon testosteron dengan suplementasi bawang putih.

Asap rokok mengandung sejumlah besar zat yang bersifat toksik diantaranya nikotin, tar, karbonmonoksida, senyawa PAH, nitrosamin, fenol, karbonil, klorin dioksin, furan, karsinogen, dan mutagen (Fowles and Bates, 2000). *Polycyclic Aromatic Hydrocarbon* (PAH) diketahui dapat menghambat spermatogenesis, menyebabkan atrofi testis, dan merusak morfologi spermatozoa (Revel *et al.*, 2001). Selain itu, nikotin juga berbahaya karena dapat menyebabkan penurunan kadar testosteron dan menghambat sel Leydig dalam mensekresikan hormon testosteron (Pacifici *et al.*, 1993).

Menurut Sengupta (2013), pemilihan umur hewan percobaan sangat penting dalam menentukan arah penelitian. Penentuan umur reproduktif pada mencit

dilakukan dengan cara mempelajari fase-fase kehidupan dan perilakunya. Beberapa fase tersebut antara lain: mencit mulai disapih saat umur 3 minggu (21 hari), fase kematangan seksual atau pubertas mulai umur 6 minggu (40–60 hari), fase pradewasa saat umur 63–70 hari, fase kematangan sosial saat umur 5–6 bulan (160–180 hari), dan fase penuaan saat umur 15–24 bulan. Oleh karena itu, penentuan umur biologis mencit jantan dalam penelitian ini dipilih pada umur 5 minggu karena mencit telah disapih dari induknya (dapat diberi makan pakan dan minum) dan perlakuan diamati selama fase kematangan seksual yang dimulai saat mencit mengalami daur spermatogenesis yang memerlukan waktu selama 35,5 hari setelah menempuh 4 kali daur epitel seminiferus (Johnson and Everitt, 1990).

Berdasarkan hal tersebut dilakukan penelitian untuk mengamati morfologi dan motilitas spermatozoa terhadap pengaruh pemberian ekstrak bawang putih dan pemaparan asap rokok. Sehingga penulis mempertimbangkan untuk melakukan penelitian mengenai **“Pengaruh Ekstrak Bawang Putih (*Allium sativum* L.) Terhadap Morfologi dan Motilitas Spermatozoa Mencit Jantan Dengan Pemaparan Asap Rokok”**.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka rumusan masalah dari penelitian ini adalah:

1. Apakah asap rokok berpengaruh terhadap kerusakan motilitas dan morfologi spermatozoa mencit jantan?
2. Apakah ekstrak bawang putih berpengaruh terhadap pemulihan kerusakan motilitas dan morfologi spermatozoa mencit jantan yang diberi pemaparan asap rokok?

1.3 Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Untuk mengetahui pengaruh asap rokok terhadap kerusakan motilitas dan morfologi spermatozoa mencit jantan.
2. Untuk mengetahui pengaruh ekstrak bawang putih terhadap pemulihan kerusakan motilitas dan morfologi spermatozoa mencit jantan yang diberi pemaparan asap rokok.

1.4 Manfaat Penelitian

Adapun manfaat dari penelitian ini adalah:

1. Dapat memahami pengaruh asap rokok terhadap kerusakan motilitas dan morfologi spermatozoa mencit jantan.
2. Dapat memahami pengaruh ekstrak bawang putih terhadap pemulihan keruakan motilitas dan morfologi spermatozoa mencit jantan yang diberi pemaparan asap rokok.

1.5 Kerangka Pemikiran

Rokok merupakan olahan tembakau yang mengandung berbagai komponen bahan kimia berbahaya dalam asap rokok yang ditimbulkan dalam pembakaran yang sangat kompleks. Merokok dapat menimbulkan efek patologis, membahayakan organ tubuh, dan dapat menurunkan kesehatan secara umum.

Asap rokok diketahui merupakan sumber utama radikal bebas yang membahayakan hampir setiap organ internal saat orang merokok. Radikal bebas yang juga ditimbulkan akibat terpapar asap rokok dapat menyebabkan kerusakan sel dan deplesi vitamin essensial di dalam tubuh. Ketika terlalu banyak radikal bebas dan tidak cukup antioksidan di dalam tubuh maka dapat menyebabkan stres oksidatif. Sehingga dibutuhkan antioksidan untuk

mencegah dampak destruktif yang disebabkan oleh radikal bebas terhadap tubuh.

Diketahui bawang putih (*Allium sativum* L.) memiliki senyawa organosulfur yang berfungsi sebagai antioksidan alami. Selain itu, bawang putih memiliki berbagai aktivitas farmakologis seperti anti-inflamasi, antikanker, antimikroba, antijamur, menurunkan lipid serum dan kolesterol, meningkatkan aktivitas fibrinolitik dan lain-lain.

1.6 Hipotesis

1. Asap rokok berpengaruh terhadap kerusakan motilitas dan morfologi spermatozoa mencit jantan.
2. Ekstrak bawang putih berpengaruh terhadap pemulihan kerusakan motilitas dan morfologi spermatozoa mencit jantan.

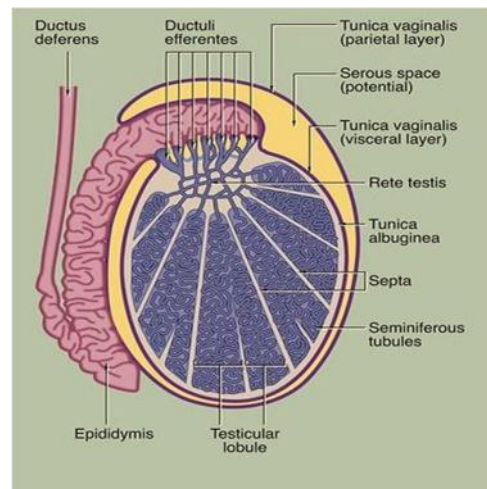
II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Reproduksi Mencit Jantan

Testis merupakan organ reproduksi jantan yang terletak di ekstra abdominal perut yang berada dalam kantung skrotum dan berfungsi untuk menghasilkan sel spermatozoa dan hormon testosteron. Testis berbentuk ovoid, berjumlah 2, berdiameter sekitar 2,5 x 4 cm, dan memiliki berat \pm 32 g. Testis dibungkus oleh tunika vaginalis pars parietalis dan tunika vaginalis pars visceralis yang dipisahkan oleh celah yang berisi cairan serosa. Sedangkan tunika albuginea menempel pada parenkim testis dan menebal membentuk septum yang disebut septula testis. Septula testis membagi lobulus testis. Di dalam lobulus testis terdapat tubulus seminiferus dan jaringan antar tubulus yang mengandung kelompok sel Leydig (Holstein *et al.*, 1999).

Tubulus seminiferus terdiri dari *loop* yang terjalin pada ujung-ujung apikal tubulus lumen yang menyempit dan epitel yang membatasi membentuk lapisan selapis kubus yang mempunyai satu flagela. Terdapat segmen pendek yang dikenal sebagai tubulus rectus yang berfungsi menghubungkan tubulus

seminiferus dengan saluran anastomose yang dibatasi oleh epitel labirin yaitu rete testis. Rete testis membawa sperma yang terkumpul di duktus eferen epididimis dan nantinya di distal menyatu pada duktus epididimis.



Gambar 1. Struktur testis menciit
Sumber: (basicmedicalkey.com)

Tubulus seminiferus terdiri dari tunika fibrosa, lamina basalis, dan epitel germinativum. Jaringan peritubular yang merupakan membran lamina basal berfungsi mengelilingi elemen seluler. Ketebalan jaringan ini biasanya sekitar 8 μm . Jaringan peritubular terdiri dari tunika fibrosa dan lapisan myofibroblast. Myofibroblast berfungsi dalam kontraksi peristaltik tubulus seminiferus untuk pengangkutan spermatozoa imotil ke rete testis. Pada epitel germinativum terdapat dua jenis sel yaitu sel-sel sertoli (penyokong) dan sel-sel germinal. Sel sertoli berfungsi terhadap peningkatan jumlah lipid yang berkorelasi terhadap pertambahan usia individu, memberikan nutrisi untuk sel

germinal, mengirimkan spermatid matang ke lumen tubular, mengatur spermatogenesis dengan memproduksi zat endokrin dan parakrin, menjaga epitel sistem duktus eferen dengan mengeluarkan ABP (*Androgen Binding Protein*), dan berinteraksi dengan sel Leydig antar tubular (Holstein *et al.*, 1999).

Sel leydig memproduksi dan mengeluarkan salah satu hormon reproduksi jantan yaitu testosteron. Testosteron merupakan hormon yang mengaktifkan sumbu testis-hipofisis, pembentukan karakteristik kelamin sekunder, serta berperan penting dalam proses memulai, memproses, dan memelihara spermatogenesis (Holstein *et al.*, 1999).

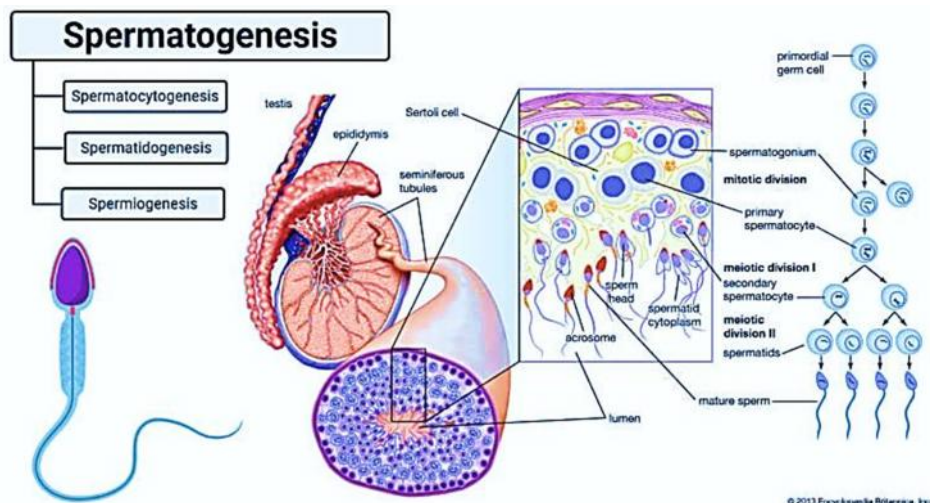
2.2 Spermatogenesis

Produksi sperma terjadi di dalam tubulus seminiferus yang terletak di dalam testis. Spermatogenesis melibatkan tiga proses terintegrasi yaitu spermasitogenesis (mitosis), meiosis, dan spermiogenesis.

Spermatositogenesis merupakan proliferasi sel induk spermatogonia yang membelah secara mitosis menghasilkan spermatosit primer. Proses spermasitogenesis terjadi di tubulus seminiferus testis. Spermatosit primer mengalami pembelahan meiosis I menjadi spermatosit sekunder.

Pembelahan meiosis I terdiri dari profase, metafase, anafase dan telofase.

Profase dari spermatosit primer dibedakan menjadi leptoten, zigoten, pakiten, diploten, dan diakinesis. Spermatosit pakiten merupakan sel yang mudah diamati karena memiliki kromatid tebal, memendek, dan ukuran relatif besar dibandingkan sel spermatogenik yang lainnya. Pada pembelahan meiosis II spermatosit sekunder menjadi spermatid. Spermatid mengalami perubahan morfologi dari bentuk bulat menjadi bentuk oval dan berekor yaitu spermatozoa melalui proses spermiogenesis (Johnson and Everitt, 1990).



Gambar 2. Proses spermatogenesis pada mencit
Sumber: (britannica.com)

2.3 Bawang Putih

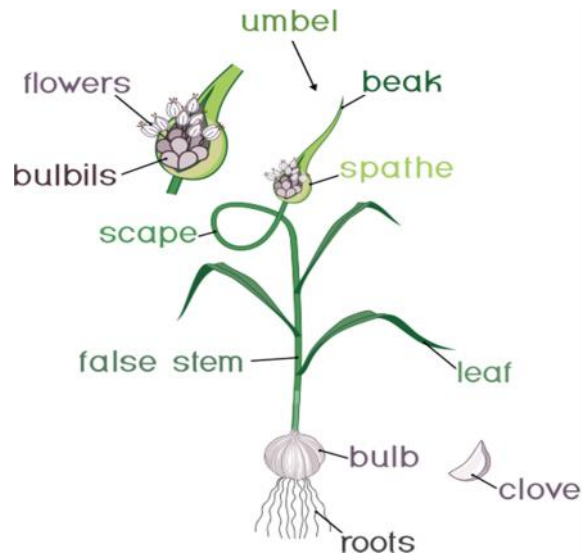
2.3.1 Taksonomi Tanaman Bawang Putih

Menurut Takhtajan (1997), tanaman bawang putih diklasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom : Plantae
Divisi : Spermatophyta
Class : Liliopsida
Ordo : Amaryllidales
Famili : Amaryllidaceae
Genus : *Allium*
Spesies : *Allium sativum* L.

2.3.2 Sifat-sifat Botani Tanaman Bawang Putih

Tanaman bawang putih merupakan tanaman tahunan yang memiliki tinggi sekitar 30-75 cm, tumbuh membentuk rumpun, dan berdiri tegak. Bawang putih memiliki batang semu (*pseudostem*) yaitu batang yang nampak di atas permukaan tanah dan terdiri dari pelepah-pelepah daun panjang sedangkan batang pokok berada di dalam tanah (Santoso, 2000). Batang pokok mengalami rudimentasi, muncul akar-akar serabut dari pangkal batang yang tumbuh mendatar dengan panjang maksimum 10 cm dan berfungsi sebagai alat penghisap makanan (Wibowo, 2007).



Gambar 3. Morfologi *Allium sativum* L.
 Sumber: (simpleseasonal.com)

Terdapat dua tipe dasar bawang putih yaitu *hardneck* dan *softneck*. Pada varietas *hardneck* menghasilkan batang tengah yang kaku dimana batang melengkung di bagian atas dan menumbuhkan kepala polong biji yang disebut bulbil dan setiap umbinya berisi sekitar 5-7 siung besar. Varietas ini ditemukan tumbuh di wilayah utara yang beriklim dingin. Sedangkan varietas *softneck* tumbuh dengan baik pada iklim hangat, varietas ini tidak memiliki tangkai yang kaku dan setiap umbinya berisi sekitar 12 siung.

Sebuah umbi bawang putih terdiri dari 8-20 siung (anak bawang). Antara siung satu dengan lainnya dipisahkan oleh kulit tipis dan liat sehingga membentuk satu kesatuan yang rapat. Umbi bawang putih

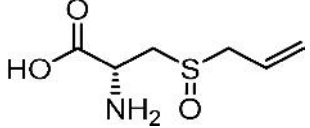
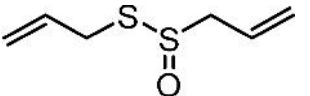
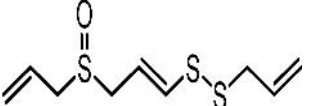
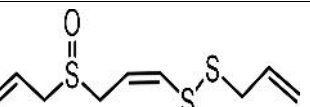
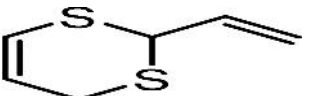
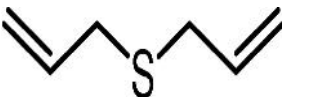
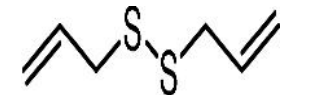
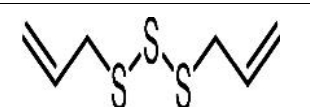

mengandung minyak atsiri (0,1-0,36%), komponen utamanya adalah senyawa organosulfur seperti *alliin*. Selain itu juga mengandung protein (asam amino, glutamyl peptida), glukosida, dan enzim (alliinase, peroksidase, myrodinase). Di dalam siung terdapat lembaga, di samping lembaga terdapat daging pembungkus lembaga yang berfungsi melindungi lembaga dan menyimpan persediaan makanan untuk pertumbuhan tanaman dan perkembangan tanaman baru (Santoso, 1989).

Tumbuhan bawang putih memiliki helaian daun dengan panjang mencapai 30-60 cm, lebar 1,2-5 cm, berbentuk pipih, rata, dan tidak berlubang. Banyaknya daun 7-10 helai per tanaman. Bunga tersusun membulat dengan diameter 4-9 cm membentuk infloresensi payung yang merupakan bunga majemuk. Perhiasan bunga berupa tenda bunga dengan 6 sepal berbentuk bulat telur, terdapat ovarium superior yang tersusun atas 3 ruangan. Buah kecil berbentuk kapsul loculicidal (Zhang, 1999).

2.3.3 Konstituen Kimia Bawang Putih

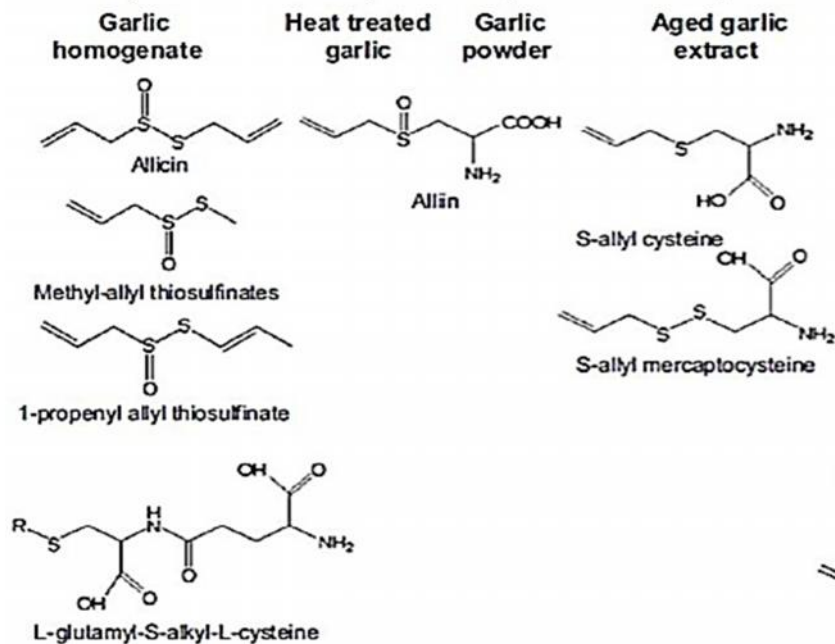
Umbi bawang putih mentah mengandung 65% air, 28% karbohidrat, 2% protein, 1,2% asam amino, 1,5% serat, asam lemak, fenol, senyawa organosulfur, dan elemen lainnya. Menurut Al-Snafi (2013), senyawa

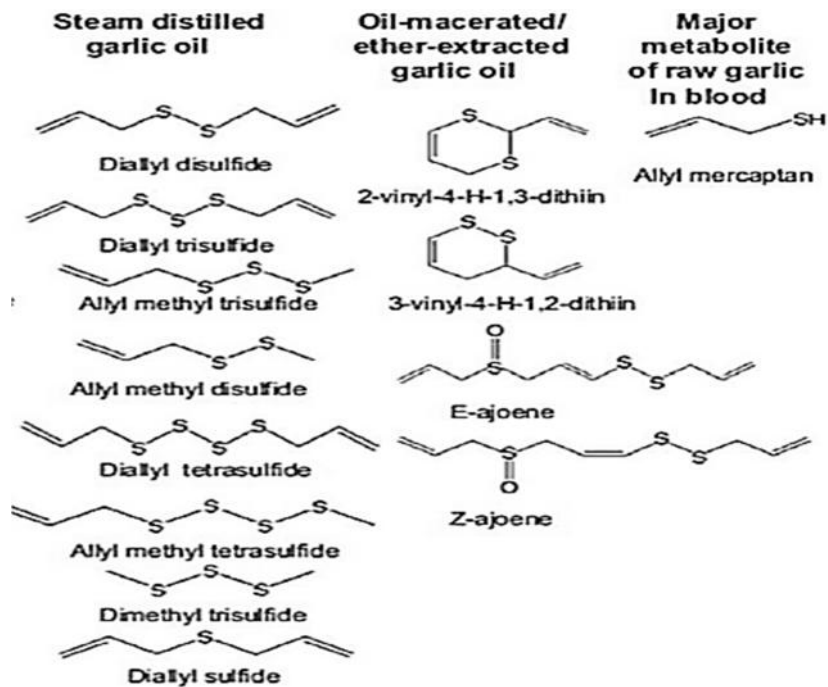
yang menyumbang keseluruhan kandungan sulfur pada bawang putih yaitu:

Komponen	Rumus Molekul	Struktur
Alliin	$C_6H_{11}NO_3S$	
Allicin	$C_6H_{10}OS_2$	
<i>E</i> -Ajoene	$C_9H_{14}OS_3$	
<i>Z</i> -Ajoene	$C_9H_{14}OS_3$	
2-Vinyl-4H-1,3-dithiin	$C_6H_8S_2$	
Diallyl sulfide (DAS)	$C_6H_{10}S$	
Diallyl disulfide (DADS)	$C_6H_{10}S_2$	
Diallyl trisulfide (DATS)	$C_6H_{10}S_3$	
Allyl methyl sulfide (AMS)	C_4H_8S	

Tabel 1. Komponen sulfur dari bawang putih

Bawang putih memiliki bau yang menyengat yang berasal dari senyawa organosulfur termasuk *allicin*, *alliin*, dan *ajoene*. Rata-rata dalam siung bawang putih mengandung 8 g/kg *alliin*. Senyawa sulfur *alliin* menghasilkan *allicin* melalui enzim *allinase* ketika umbi dihancurkan atau dipotong. Pada 1 mg *alliin* setara dengan 0,45 mg *allicin*. *Allicin* ditemukan menjadi konstituen utama bawang putih saat bawang putih diekstraksi dengan pelarut air. Konstituen bioaktif bawang putih terdapat pada bawang putih mentah ataupun pada bawang putih olahan (bubuk bawang putih, minyak bawang putih yang diperoleh dengan distilasi uap atau maserasi dalam minyak nabati, dan ekstrak cair).





Gambar 4. Senyawa organosulfur utama dalam olahan bawang putih

2.4 Asap Rokok

Asap rokok terdiri dari dua komponen yaitu asap utama (*mainstream smoke*) dan asap samping (*sidestream smoke*). Asap utama merupakan asap yang dihirup dan dihembuskan yang dibuat pada saat menghisap rokok yang menyala. Sedangkan asap samping merupakan asap yang mengepul dari ujung rokok yang menyala. Terdapat banyak bahan kimia berbahaya penyebab kanker dalam asap utama diantaranya PAH (*Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*), nitrosamin, karbon monoksida, nikotin, amonia, akrolein, isoprena, benzene, dan toluene. Asap samping memiliki pengaruh besar bagi

kesehatan perokok pasif, yaitu orang yang berada di lingkungan yang tercemar asap rokok, karena beberapa alasan yang telah diidentifikasi oleh sains, diantaranya:

1. Pembakaran tidak lengkap

Suhu rokok yang menyala kira-kira sekitar 400°C dan mendekati 900°C selama hisapan. Bahan kimia beracun hadir dalam jumlah tinggi karena pembakaran yang tidak sempurna yaitu 2-naphtylamine, N-nitrosodimethylamine, 4-aminobiphenyl, dan karbon monoksida.

2. Ukuran partikel

Asap samping mengandung partikel yang lebih kecil dari asap utama. Partikel-partikel kecil yang beracun lebih mudah diserap di dalam paru-paru dan sel lain di dalam tubuh, di mana asap samping dapat berkontribusi pada kanker dan penyakit lainnya (Martin, 2020).

Terdapat tiga komponen toksik dalam asap rokok yaitu karbonmonoksida, nikotin, dan tar. Karbonmonoksida merupakan gas beracun yang tidak berwarna dan tidak berbau. Karbonmonoksida dapat menyebabkan berkurangnya pengiriman dan pemanfaatan oksigen pada jaringan tubuh (Aina, 2005). Nikotin merupakan senyawa yang diserap ke dalam sistem pembuluh darah melalui paru-paru dan disirkulasikan ke otak dalam waktu yang cepat serta dapat menyebabkan penurunan kadar hormon testosteron

(Sukmaningsih, 2009). Tar merupakan bahan yang berifat karsinogen yang tidak sederhana tetapi merupakan campuran yang sangat kompleks dan dapat menyebabkan berbagai penyakit diantaranya kanker, penyakit jantung, bronkitis, gangguan kehamilan, dan impotensi (Aina, 2005).

2.5 Hubungan Asap Rokok dengan Spermatogenesis

Berdasarkan penelitian Sukmaningsih (2009), efek bahan kimia pada rokok dapat menyebabkan gangguan pada spermatogenesis melalui peningkatan produksi radikal bebas atau oksigen yang reaktif. Merokok juga menyebabkan penurunan produksi semen serta dapat menimbulkan kerusakan DNA melalui fragmentasi seluler dan abnormalitas morfologi (kepala, leher, dan ekor) spermatozoa. Hal ini dibuktikan dengan peningkatan basa-basa yang termodifikasi dengan serangan ROS dan yang lebih dominan dari seluruh basa yang teridentifikasi yaitu 8-oksoguanosin. 8-oksoguanosin terbentuk melalui interaksi antara radikal hidroksil (OH) dengan basa guanin yang menyebabkan pembentukan C8-hidroksiguanin. Pada awalnya, reaksi radikal hidroksil memicu pembentukan tambahan (*adduct*) radikal, kemudian oleh pengurangan satu electron membentuk 8-oksoguanosin. Oleh karena itu 8-oksoguanosin dikenal sebagai *biomarker* kerusakan oksidatif DNA pada perokok aktif dan peningkatan kadarnya dapat ditemukan dalam paru-paru dan leukosit perifer (Valvanidis, 2009).

Radikal bebas yang ditimbulkan oleh asap rokok beresiko terhadap kualitas spermatozoa diantaranya:

1. Terhadap Konsentrasi Spermatozoa

Peningkatan radikal bebas dapat menurunkan jumlah spermatosit pakiten dan spermatid sehingga mengakibatkan konsentrasi spermatozoa yang dihasilkan menjadi sedikit atau terjadi penurunan (Karim, 2011).

2. Terhadap Motilitas Spermatozoa

Senyawa radikal bebas yang terkandung pada asap rokok dapat meningkatkan jumlah lipid peroksidasi dan menimbulkan kerusakan serta penurunan integritas membran spermatozoa sehingga mengurangi motilitas. Frekuensi gerakan ekor spermatozoa karena radikal bebas menyebabkan produksi ATP mitokondria menjadi rendah dimana diketahui mitokondria merupakan organel sel tempat proses perombakan atau katabolisme untuk menghasilkan energi bagi pergerakan spermatozoa. Dengan menurunnya motilitas normal spermatozoa maka dapat meningkatkan abnormalitas spermatozoa (Fitriani dkk, 2009).

3. Terhadap Morfologi Sperma

Abnormalitas pada spermatozoa dapat menyebabkan kelainan-kelainan pada spermatogenesis pada saat spermatozoa di dalam tubulus seminiferus dan setelah meninggalkan tubulus seminiferus. Apabila proses

spermatogenesis terganggu maka dapat menyebabkan terbentuknya morfologi spermatozoa yang abnormal (Fitriani dkk, 2009).

III. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan April – Mei 2021, dengan rincian: 7 hari aklimatisasi hewan percobaan, 35 hari perlakuan (pemaparan asap rokok dan pemberian ekstrak bawang putih), serta 7 hari pembedahan, pembuatan suspensi spermatozoa, dan pemeriksaan spermatozoa. Pemeliharaan mencit dan pemberian perlakuan dilakukan di Unit Pengelolaan Hewan Percobaan Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Lampung. Pembuatan ekstrak bawang putih dilakukan di Laboratorium Botani, FMIPA, Universitas Lampung. Proses pembedahan, pembuatan suspensi spermatozoa, dan pemeriksaan spermatozoa mencit dilakukan di Laboratorium Zoologi, FMIPA, Universitas Lampung.

3.2 Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit (*Mus musculus*) galur *Deutsche Denken Yoken* (DDY) jantan sebanyak 30 mencit. Sedangkan sampel pada penelitian ini adalah mencit jantan berusia 5 minggu dengan berat sekitar 20-40 g.

3.3 Jenis Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan memberikan beberapa perlakuan kepada objek penelitian, sehingga jenis penelitian ini termasuk ke dalam penelitian eksperimental. Adapun yang menjadi objek penelitian adalah mencit jantan K1 yang diberikan perlakuan pemaparan asap rokok dan mencit jantan P1 yang diberikan perlakuan pemaparan asap rokok dan pemberian larutan ekstrak bawang putih selama 35 hari.

3.4 Desain Penelitian

Desain penelitian ini menggunakan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang dibagi menjadi 3 kelompok yaitu :

1. Kelompok K0 : Kelompok mencit tanpa diberi paparan asap rokok dan tidak diberi ekstrak bawang putih.
2. Kelompok K1 : Kelompok mencit yang diberi paparan asap rokok dan diberi akuades.
3. Kelompok P1 : Kelompok mencit yang diberi paparan asap rokok dan diberi ekstrak bawang putih dengan dosis 1000 mg/kg BB

Besar sampel dihitung dengan rumus Federer:

(T-1) (n-1)	15
(3-1) (n-1)	15
2n - 2	15
2n	15 + 2

$$n = 17/2$$

$$n = 8,5$$

$$n = 9$$

Keterangan:

T = jumlah kelompok perlakuan

n = jumlah sampel setiap kelompok

Untuk mengantisipasi terjadinya *drop out* atau hilangnya unit eksperimen maka dilakukan koreksi menggunakan rumus sebagai berikut:

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

$$N = \frac{9}{1 - 0,1}$$

$$N = \frac{9}{1 - 0,1}$$

$$N = 10$$

Sehingga besar sampel (N) yang digunakan pada tiap kelompok perlakuan berjumlah 10 ekor mencit.

Keterangan:

N = besar sampel koreksi

n = besar sampel awal

F = perkiraan proporsi *drop out* sebesar 10%

3.5 Kriteria Inklusi dan Eksklusi

3.5.1 Kriteria Inklusi

- a) Mencit tampak sehat (bulu tidak rontok dan tidak kusam, aktivitas aktif dan konsumsi pakan dalam jumlah normal).
- b) Berjenis kelamin jantan
- c) Berat badan 20-40 g
- d) Berusia 5 minggu

3.5.2 Kriteria Eksklusi

- a) Mencit tampak sakit (rambut kusam, rambut rontok atau botak, aktivitas dan gerakan kurang atau tidak aktif, serta tidak keluarnya eksudat yang tidak normal dari mata, mulut, anus, dan genital).
- b) Mencit mati selama masa penelitian
- c) Mencit stress

3.6 Identifikasi Variabel

3.6.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah asap rokok dan ekstrak bawang putih.

3.6.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah morfologi dan motilitas spermatozoa mencit.

3.7 Definisi Operasional Variabel

Tabel 2. Definisi Operasional

Variabel	Definisi Variabel	Cara Ukur	Skala Ukur	Alat Ukur	Hasil Ukur
Asap rokok	Asap rokok adalah campuran kompleks senyawa kimia dalam tembakau yang terikat pada partikel aerosol atau bebas dalam fase gas (Rodgman dan Perfetti, 2009).	Dipapari pada mencit K1 dan P1 di dalam <i>smoking chamber</i>	Numerik	Arloji	Pemberian asap rokok dilakukan selama 15 menit
Ekstrak Bawang Putih	Ekstrak bawang putih adalah ekstrak alami tumbuhan yang mengandung sulfur, vitamin, flavonoid, dan mineral.	Bawang putih diekstraksi untuk memperoleh ekstrak bawang putih kemudian dibuat larutan ekstrak bawang putih dengan penambahan aquades dan Na-CMC	Numerik	Neraca	Pemberian dosis ekstrak bawang putih 1000 mg/kgBB diberikan sebanyak 0,4 mL/hari
Motilitas Spermatozoa	Motilitas spermatozoa mengacu pada pergerakan bersifat progresif (motil) atau abnormalitas dan imotil (Wang dkk, 2009)	Diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 400 kali dengan 4-6 lapang pandang	Numerik	Mikroskop	Presentase motilitas sperma dibandingkan seluruh spermatozoa yang teramati (normal atau abnormal)
Morfologi Spermatozoa	Morfologi spermatozoa mengacu pada bentuk sperma yang meliputi ukuran, leher, dan ekor (Loma Linda University, 2021).	Diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 400 kali	Deskriptif	Mikroskop	Morfologi sperma dianalisa pada seluruh spermatozoa yang teramati (normal atau abnormal)

3.8 Prosedur Penelitian

3.8.1 Tahap Pra-Perlakuan

Pada tahap pra-penelitian prosedur yang dilakukan adalah:

a) Persiapan Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat dan bahan untuk proses pemeliharaan hewan percobaan, pembuatan ekstrak bawang putih, pembuatan kandang dan pemaparan asap rokok, penimbangan berat badan, pemberian ekstrak bawang putih, pembedahan mencit, dan pengamatan spermatozoa mencit.

Pada proses pemeliharaan hewan percobaan dibutuhkan peralatan yaitu kandang mencit, ram kawat, botol minum, dan wadah pakan. Adapun bahan yang digunakan adalah mencit jantan berumur 5 minggu dengan berat sekitar 20-40 g, pelet komersial, sekam padi, dan akuades.

Pada pembuatan ekstrak bawang putih digunakan peralatan yaitu blender, *beaker glass*, batang pengaduk, kertas saring, *rotary evaporator*, dan oven. Bahan pada proses pembuatan ekstrak bawang putih diantaranya bawang putih, etanol 96%, dan Na-CMC.

Pada pembuatan kandang pemaparan dibutuhkan peralatan yaitu plastik cor dan keranjang plastik sedangkan peralatan untuk pemaparan asap rokok digunakan spuit 50 mL dan selang. Adapun

bahan yang digunakan yaitu rokok kretek dengan kandungan 39 mg tar dan 2,3 mg nikotin per batang rokok. Pada penimbangan berat badan digunakan timbangan digital. Pada pemberian ekstrak bawang putih pada mencit digunakan sonde dan *syringe* 1 mL. Pada proses pembedahan mencit digunakan peralatan yaitu pisau bedah, pinset, gunting, jarum pentul, dan meja lilin. Adapun bahan yang digunakan yaitu kloroform, larutan NaCl 0,9%, metanol, dan larutan giemsa 3%. Pada pengamatan spermatozoa digunakan peralatan diantaranya cawan petri, pipet tetes, haemositometer, *cover glass*, *object glass*, dan mikroskop.

b) Pembuatan Ekstrak Bawang Putih

Proses pembuatan ekstrak bawang putih dilakukan langkah sebagai berikut: bawang putih dicuci bersih setelah itu dipotong-potong dan dimasukkan ke dalam blender untuk dihaluskan. Hasil blender ditimbang kemudian dimasukkan ke dalam *beaker glass* untuk dilakukan proses perendaman (maserasi). Pada proses maserasi digunakan pelarut etanol 96% sebanyak 7 liter. Hal ini dikarenakan etanol memiliki kemampuan yang lebih baik dalam menarik zat aktif di dalam ekstrak dibandingkan dengan pelarut lainnya dan harganya yang relatif murah (Durairaj, 2009). Selanjutnya, *beaker glass* yang berisi bawang putih hasil blender dituang etanol 96%, diaduk menggunakan batang pengaduk, ditutup selama 3x24 jam

menggunakan aluminium foil untuk mencegah terjadinya penguapan pada saat proses ekstraksi, dan diletakkan di tempat yang terhindar dari cahaya matahari langsung. Setelah 3 hari (maserasi I), campuran simplisia bawang putih-etanol disaring menggunakan kain saring dan diperoleh maserat (1). Selanjutnya ampas bawang putih hasil penyaringan dari maserasi I ditambahkan etanol 96% kembali, lalu dilakukan maserasi II selama 1 hari. Maserasi II merupakan remaserasi yaitu pergantian pelarut baru yang bertujuan agar senyawa yang terdapat di dalam sampel dapat terekstrak secara menyeluruh. Hasil maserasi II disaring menggunakan corong buchner dengan bantuan vakum untuk mendapatkan maserat (2). Maserat (1) dan (2) dikumpulkan, ekstrak bawang putih-etanol dihilangkan pelarutnya dengan penguapan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40°C, kemudian dioven selama 24 jam hingga diperoleh ekstrak kental.

Ekstrak kental bawang putih kemudian diencerkan dengan akuades dan ditambahkan Na-CMC dengan cara dipanaskan di *hot plate* sampai homogen untuk menghasilkan larutan ekstrak bawang putih. Na-CMC digunakan sebagai penstabil. Zat aktif (*allicin*) yang terdapat pada bawang putih memiliki sifat mudah menguap dan tidak stabil oleh perubahan kimiawi dalam molekulnya, maka penambahan Na-CMC pada pembuatan larutan ekstrak bawang putih

bekerja dengan cara meningkatkan homogenitas partikel zat aktif bawang putih sehingga dapat tersebar rata ke seluruh larutan dan membuat keadaan larutan lebih stabil.

Pada pembuatan ekstrak bawang putih, diketahui:

Dosis ekstrak bawang putih : 1000 mg/kgBB

Berat rata-rata mencit : 30 g

Mencit yang dicekok : 10 mencit

Volume pemberian/mencit : 0,4 mL

Dicari : Berat pasta bawang putih (mg)

Penyelesaian:

a. Dosis yang diberikan : $\frac{30 \text{ g}}{1000 \text{ g}} \times 1000 \text{ mg} = 30 \text{ mg}$

b. Volume yang dibutuhkan : $0,4 \text{ mL} \times 10 \text{ mencit} \times 35 \text{ hari}$
 $= 140 \text{ mL}$ (pelarut akuades)

c. Ekstrak yang dibutuhkan

dalam 140 mL : $\frac{140 \text{ mL}}{0,4 \text{ mL}} \times 30 \text{ mg} = 10.500 \text{ mg}$

Jadi, pembuatan larutan ekstrak bawang putih => Dilarutkan 10.500 mg pasta bawang putih + 1% Na-CMC (1400 mg) dalam 140 mL akuades hangat. Sehingga dalam 0,4 mL larutan ekstrak bawang putih dosis 1000 mg/kgBB mengandung 30 mg ekstrak bawang putih.

c) Pembuatan Kamar Rokok (*Smoking Chamber*)

Pembuatan kamar rokok dirakit sebagai berikut: menyiapkan wadah plastik kemudian dilapisi dengan plastik cor dengan melubangi masing-masing sisi plastik dengan ukuran 1 x 1 cm. Lubang ventilasi dibuat lebih banyak untuk mencegah terjadinya hipoksia. Lalu, diberi lubang saluran sebagai tempat memaparkan asap rokok. Rokok dibakar dan dikeluarkan asapnya dengan bantuan *air pump* hasil modifikasi dengan spuit dan selang.

d) Persiapan Mencit dan Aklimatisasi

Mencit yang digunakan pada penelitian ini didapatkan dari Balai Veteriner Kota Bandar Lampung. Kemudian mencit dipelihara di Unit Pengelolaan Hewan Percobaan Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Lampung. Mencit yang dipakai dalam penelitian yaitu mencit jantan berusia 5 minggu dengan berat 20-40 g. Mencit diaklimatisasi selama 1 minggu dengan menempatkannya di kandang yang terbuat dari plastik dan diberi ram kawat sebagai penutup. Kandang yang dibutuhkan yaitu sebanyak 6 unit kandang yang berisi 5 ekor mencit jantan. Dasar kandang diberi sekam dan diganti 3 hari sekali secara berkala. Kemudian pada setiap kandang, diberikan tempat minum dan wadah pakan sebanyak dua buah per kandang. Pemberian pakan pada mencit dilakukan pagi dan sore hari dan diberikan air minum secukupnya.

3.8.2 Tahap Perlakuan

a) Pemberian Larutan Ekstrak Bawang Putih

Pemberian larutan ekstrak bawang putih diberikan pada kelompok mencit P1 yang dilakukan dengan mencekokkan larutan ekstrak bawang putih menggunakan sonde oral (metode *gavage*).

Penanganan selama proses pemberian larutan ekstrak bawang putih pada mencit yaitu menggunakan penanganan satu tangan (*single handed*). Pertama-tama mencit diletakkan di atas tutup kandang, kemudian ekornya ditarik perlahan ke belakang, lalu mencit diangkat dengan satu tangan memegang lipatan kulit dari tengkuk leher ke belakang yang digenggam menggunakan ibu jari dan telunjuk, pada bagian ekor difiksasi menggunakan jari kelingking yang dipegang dengan kuat untuk mencegah tendangan kaki belakang mencit. Mencit diposisikan dengan kepala vertikal ke atas untuk membuat garis lurus leher dan kerongkongan, tabung *gavage* diarahkan melewati langit-langit mulut sampai ke kerongkongan, kemudian larutan dilepaskan dengan syringe perlahan-lahan. Pemberian larutan ekstrak bawang putih diberikan pada sore hari selama 35 hari.

b) Penimbangan Berat Badan

Berat badan mencit ditimbang setiap 5 hari sekali, terhitung pada hari pertama setelah aklimatisasi. Penimbangan dilakukan sebanyak 8 kali yaitu pada hari perlakuan ke-1, ke-5, ke-10, ke-15, ke-20, ke-25, ke-30, dan hari ke-35

c) Pemaparan Asap Rokok

Pemaparan pada hewan percobaan dilakukan setiap hari di pagi hari pukul 08.00 WIB selama 15 menit pada kelompok K1 dan P1.

Pemaparan dilakukan di dalam kamar rokok (*smoking chamber*).

Pemaparan dilakukan di luar ruangan yang bertujuan supaya tidak terjadi kontaminasi asap rokok pada mencit yang tidak mendapat perlakuan.

d) Pembedahan dan Pembuatan Suspensi Spermatozoa

Dua puluh empat jam (24 jam) setelah hari terakhir perlakuan, mencit ditimbang dan kemudian dikorbankan. Cara pembedahan mencit untuk diambil organ testisnya adalah sebagai berikut:

1. Mencit dimasukkan ke dalam toples plastik yang berisi kloroform sampai menunggu mencit teranastesi.
2. Setelah mencit sudah teranastesi, mencit diposisikan pada meja pembedahan dan kulit dipotong menggunakan gunting dengan sayatan garis tengah perut untuk membuka lapisan peritonium.

Setelah rongga perut dibuka maka selanjutnya mengakses organ reproduksi mencit dengan mengambil organ testis bagian kanan.

3. Selanjutnya, mengambil cauda epididimis dari testis dengan cara memotong bagian proximal corpus epididimis dan bagian distal vas deferens dengan gunting.
4. Cauda epididimis yang sudah dipisahkan diletakkan di dalam cawan petri yang berisi 1 mL NaCl 0,9%. Kemudian, cauda epididimis dipotong-potong sampai halus menggunakan gunting dan diaduk agar tersuspensi dengan NaCl 0,9% sehingga terbentuk suspensi spermatozoa. Suspensi tersebut diamati menggunakan mikroskop.

e) Pengamatan Motilitas Spermatozoa

Suspensi spermatozoa ditetaskan pada haemositometer menggunakan pipet tetes dan ditutup menggunakan gelas penutup. Sediaan diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 400 kali dan memeriksa 4-6 lapang pandang. Kategori motilitas spermatozoa yang diamati yaitu:

Motilitas A: gerakan spermatozoa maju, lurus, dan cepat (progresif).

Motilitas B: gerakan spermatozoa zig-zag, sulit maju/lambat.

Motilitas C: spermatozoa bergerak di tempat.

Motilitas D: spermatozoa diam atau tidak tampak bergerak.

Motilitas normal merupakan jumlah dari motilitas A dan motilitas B, sedangkan *motilitas abnormal* merupakan jumlah dari motilitas C dan motilitas D. Rumus perhitungan motilitas adalah sebagai berikut:

Motilitas normal (%) =

$$\frac{\text{Jumlah sperma normal}}{\text{Jumlah sperma normal} + \text{jumlah sperma abnormal}} \times 100\%$$

Motilitas abnormal (%) =

$$\frac{\text{Jumlah sperma abnormal}}{\text{Jumlah sperma normal} + \text{jumlah sperma abnormal}} \times 100\%$$

f) Pengamatan Morfologi Spermatozoa

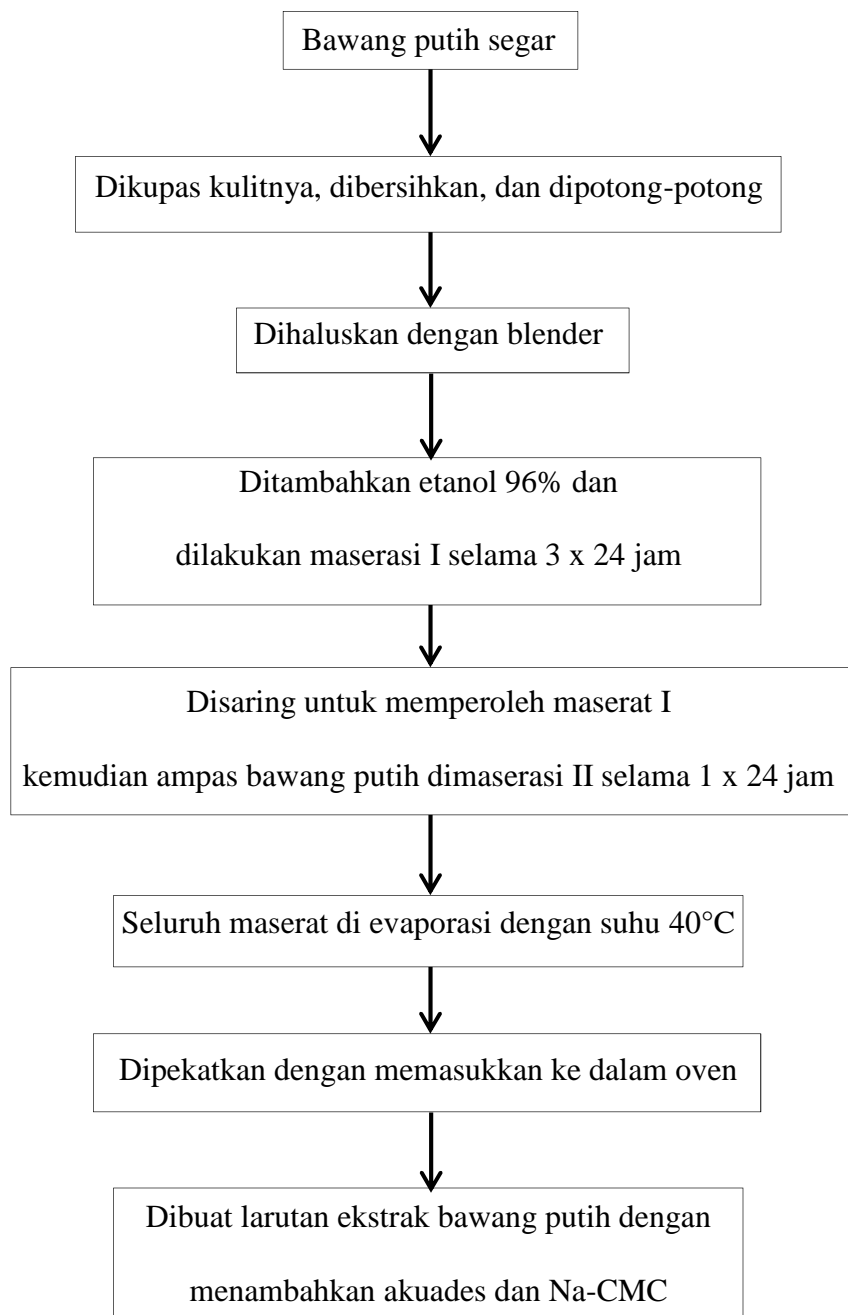
Suspensi spermatozoa ditetaskan di atas gelas objek untuk dibuat preparat apusan (*smear*) dan dikeringkan di udara. Setelah itu, preparat difiksasi dengan metanol selama 3-5 menit, lalu diwarnai dengan larutan giemsa 3% selama 45 menit. Preparat dicuci dengan akuades dan dikeringkan, kemudian preparat diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 400 kali untuk mengetahui morfologi dari 100-150 spermatozoa mencit.

3.9 Rancangan Analisis Data

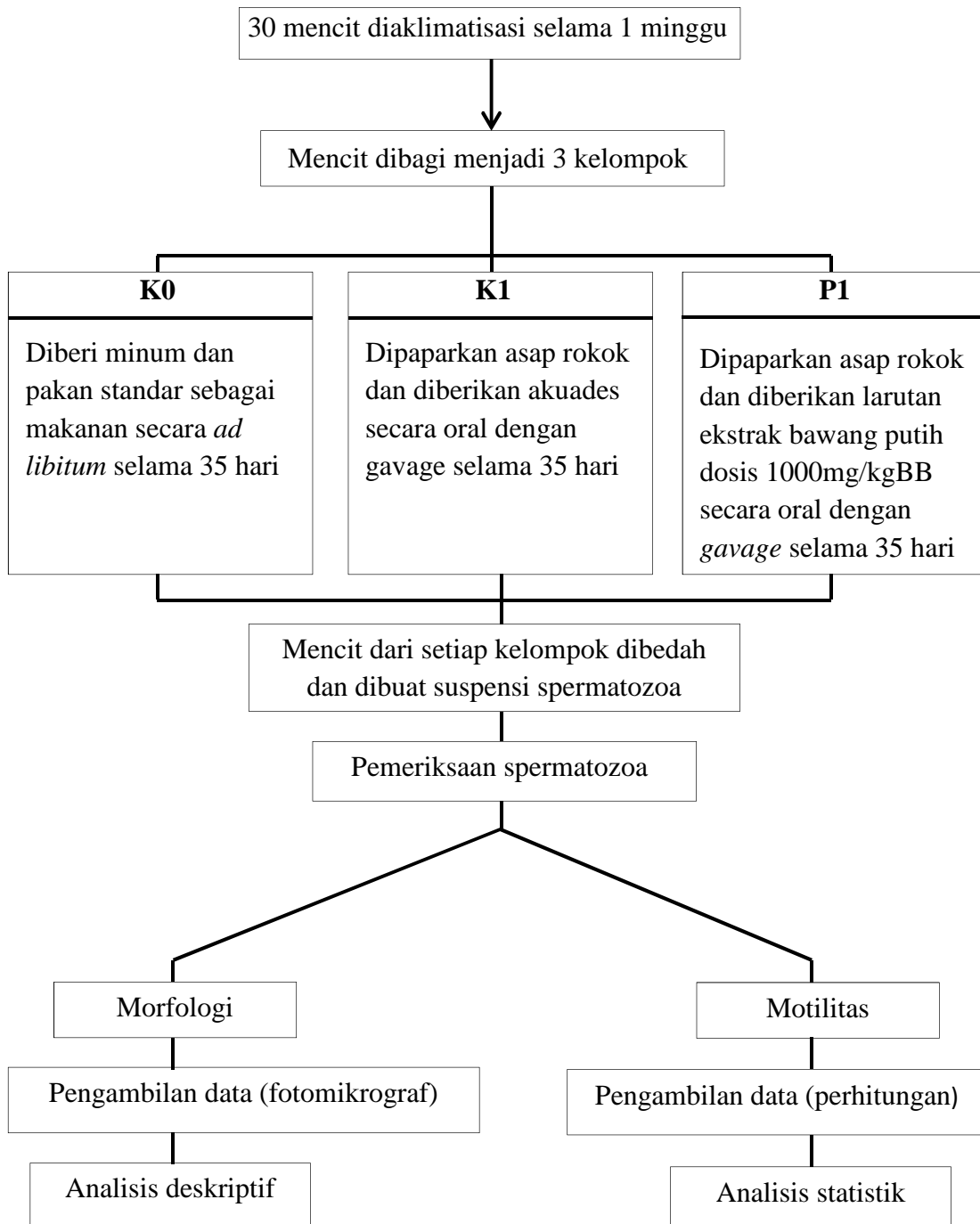
Data yang diperoleh dari hasil pengamatan motilitas spermatozoa di bawah mikroskop diuji menggunakan software statistik (SPSS). Hasil penelitian dianalisis apakah data terdistribusi normal atau tidak dengan uji normalitas. Jika didapatkan data terdistribusi normal serta variasi data homogen, maka dilakukan uji statistik dengan ANOVA. Apabila data yang didapatkan memiliki $P < 0,05$ maka dilakukan uji lanjut dengan uji Duncan. Data motilitas sperma mencit normal dan abnormal disajikan dalam rata-rata ($\% \pm$ SD).

Data yang diperoleh dari hasil pengamatan morfologi spermatozoa di bawah mikroskop dianalisis berdasarkan adanya satu atau lebih fitur abnormal seperti cacat ekor, cacat bagian tengah/leher, dan cacat kepala dengan menyertakan gambar visual (fotomikrograf) dari masing-masing fitur normal dan abnormal.

3.10 Alur Penelitian



Gambar 5. Diagram alir pembuatan larutan ekstrak bawang putih



Gambar 6. Diagram alir penelitian

V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

1. Pengaruh asap rokok terhadap mencit K1 menimbulkan abnormalitas morfologi spermatozoa dan kerusakan motilitas spermatozoa sebesar 62,8%..
2. Pengaruh ekstrak bawang putih terhadap mencit P1 efektif memperbaiki kualitas morfologi spermatozoa normal dan efektif dalam memperbaiki motilitas spermatozoa sebesar 77,1% dari pemaparan asap rokok.

5.2 Saran

1. Perlu dilakukan pengujian lebih lanjut terhadap efek pemberian dosis bawang putih pada mencit jantan yang dipapari asap rokok. Dimulai dari dosis rendah, menengah, dan tinggi untuk melihat perbandingan dosis bawang putih yang lebih efektif dalam pengobatan kualitas sperma.

2. Perlu dilakukan pengujian lebih lanjut terhadap kandungan senyawa aktif pada bawang putih yang dapat meningkatkan kualitas sperma mencit dan toksisitasnya untuk mengevaluasi batas keamanannya.
3. Perlu dikembangkan teknologi produksi rokok bawang putih menjadi solusi rokok pengganti yang sehat terutama karena khasiat antioksidan pada bawang putih dapat memperbaiki kualitas kesuburan perokok.

DAFTAR PUSTAKA

- Aina, N. 2005. Pengaruh paparan asap rokok terhadap spermatogenesis dan kualitas spermatozoa mencit (*Mus musculus L.*) galur swiss. Universitas Negeri Semarang. *Skripsi*.
- Al-Snafi, A. 2013. Pharmacological effects of *Allium* species grown in Iraq. An overview. Health Care Respository. *International Journal of Pharmacy*, 1: 132-147.
- Anita, N. 2004. Perubahan sebaran stadia epitel seminiferus, penurunan jumlah sel-sel spermatogenik dan kadar hormon testosteron total mencit (*Mus musculus L.*) galur DDY yang diberi asap rokok kretek. *Tesis Program Pasca Sarjana Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia*. Jakarta.
- Aprioku, J. S. 2013. Pharmacology of free radicals and the impact of reactive oxygen species on the testis. *Journal of Reproduction and Infertility*, 14(4): 158–172.
- Aqel, M.B., Gharaibah, M.N., Salhab, A.S. 1991. Direct relaxant effects of garlic juice on smooth and cardiac muscles. *Journal Ethnopharmacol*, 33: 13-19.
- Asadpour, R., Azari, M., Hejazi, M., Tayefi, H., Zaboli, N. 2013. Comparison of the protective effects of garlic (*Allium Sativum L.*) extract, vitamin E and n acetyl cystein on testis structure and sperm quality in rats treated with lead acetate. *Journal Medicine Veterinary*, 4(4): 251–257.
- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Omar, A. K. M. 2013. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review: *Journal of Food Engineering*, 117(4): 426–436.
- Baiomy, A.A. and Mansour, A.A. 2015. Genetics and histopathological responses to cadmium toxicity in rabbit's kidney and liver: protection by ginger (*Zingiber officinale*). *Biology of Trace Element Research*. Diakses dari <https://doi.org/10.1007/s12011-015-0561-7>

- Beyer, R. E. 1994. Peran askorbat dalam perlindungan antioksidan biomolekul: Interaksi dengan vitamin E dan ko-enzim Q. *Journal Bioenerg Biomemb*, 26: 349-358.
- Block, E. 1985. *The chemistry of garlic and onion*. Sci. Am. 252: 114-119.
- Bozin, B., Dukic, N. M., Samojlik, I. 2008. Fenolik sebagai antioksidan dalam bawang putih (*Allium sativum* L.). *Journal of Food Chem*, 111: 925–929.
- Challa, A., Rao, D.R., Reddy, B.S. 1997. Interactive suppression of aberrant crypt foci induced by azoxymethane in rat colon by phytic acid and green tea. *Journal of Carcinogenesis*, 18(10): 2023-2026.
- Condorelli, R. A., La Vignera, S., Giacone, F., Iacoviello, L., Vicari, E., Mongioi, L., & Calogero, A. E. 2013. In vitro effects of nicotine on sperm motility and bio-functional flow cytometry sperm parameters. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 26(3), 739–746. Diakses dari <https://doi.org/10.1177/039463201302600317>
- Dewanto, V., Wu, X., Adom, K.K. dan Liu, R.H. 2002. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 3010-3014.
- Durairaj, S., Srinivasan, S., Lhaksamanaperumalsamy, P. 2009. In vitro antibacterial activity and stability of garlic extract at different pH and temperature. *Electronic Journal of Biology*, 5(1): 5-10.
- Fitriani, Eriani, K., Sari, W. 2009. The effect of cigarettes smoke exposed causes fertility of male mice (*Mus musculus*). *Jurnal Natural*, 10: 1-6.
- Fowles, J., and Bates, M. 2000. *The Chemical Constituent in Cigarettes and Cigarette Smoke : Priorities For Harm Reduction*. New Zealand : Epidemiology and Toxicology Group, Kenepuru Science Centre.
- Guyton, A. C., and Hall, J. E. 2014. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran*. Edisi 12. Jakarta.
- Halliwell, B., J.M.C. Gutteridge. 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*. New York: Oxford University Press.
- Hernawan,U.E. dan Setyawan, A.D. 2003. Senyawa organosulfur bawang putih (*Allium sativum* L.) dan aktivitas biologinya. *Jurnal Biofarmasi*, 1 (2): 65-76. Surakarta.
- Holstein, A.F., Schulze, W., Davidoff, M. 1999. *Memahami Spermatogenesis Merupakan Prasyarat Untuk Pengobatan*. Biologi Reproduksi dan Endokrinologi.

- Iswara, A. 2009. Pengaruh pemberian antioksidan vitamin C dan E terhadap kualitas spermatozoa tikus putih terpajan alletherin. Universitas Negeri Semarang. *Skripsi*.
- Johnsons, M. and Everitt, B. 1990. *Essential Reproduction*. 3rd edition. Oxford: Blackwell Science Publisher.
- Julia, D., Salni, S., Nita, S. 2019. Pengaruh ekstrak bunga kembang sepatu (*Hibiscus rosa-sinensis* L.) terhadap jumlah, motilitas, morfologi, viabilitas spermatozoa tikus jantan (*Rattus Norvegicus*). *Biomedical Journal of Indonesia: Jurnal Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya*, 5(1): 34-42. Diakses dari <https://doi.org/10.32539/bji.v5i1.7976>
- Karim, D. 2011. Pengaruh paparan asap rokok elektrik terhadap motilitas, jumlah sperma dan kadar mda testis mencit (*Mus musculus* L.). *Tesis*, 1: 1-60. Medan: Universitas Sumatera Utara.
- Kim, J. S., Kang, O. J., Gweon, O. C. 2013. Comparison of phenolic acids and flavonoids in black garlic at different thermal processing steps. *Journal of Functional Foods*, 5(1): 80–86. Diakses dari <https://doi.org/10.1016/j.jff.2012.08.006>
- Lasengh, L. 1995. *Oxidants, Antioxidants, and Disease Prevention*. Belgium: ILSI Europe.
- Loma Linda University. 2021. *Sperm Morphology (Size and Shape)*. Center for Fertility and IVF. Southern California. Diakses dari <https://lomalindafertility.com/infertility/men/sperm-morphology/>
- Martin, Terry. 2020. Mengapa Asap Utama Begitu Berbahaya. Diakses dari <https://www.verywellmind.com/what-is-mainstream-smoke-2824538>, pada 9 Februari 2021
- Mughniati, S., Sari, D. K., Rendrawan, D., Rahim, L. 2018. Effects of kapok seed extract (*Ceiba pentandra* Gaertn) as contraceptive agent to the quality of spermatozoa in domestic cat (*Felis domestica*). *Jurnal Riset Veteriner Indonesia (Journal of The Indonesian Veterinary Research)*, 2(1): 27-34.
- Musfiroh, M., Rifki, M., Noor, W. 2012. Pengaruh minyak *Nigella sativa* terhadap kualitas spermatozoa tikus wistar yang terpapar asap rokok. *Journal Indo Medical Association*, 62(5).
- Noori, S. 2012. *An overview of oxidative stress and antioxidant defensive system*. Open Access Scientific Report, 1(8): 413-417.

- Novitasari, A.E. dan D.Z. Putri. 2016. Isolasi dan identifikasi saponin pada ekstrak daun mahkota dewa dengan ekstraksi maserasi. *Jurnal Sains*, 6(12): 10-14.
- Oi, Y., Imafuku, M., Shishido, C., Kominato, Y., Nishimura, S. 2001. Garlic supplementation increases testicular testosterone and decreases plasma corticosterone in rats fed a high protein diet. *The Journal of nutrition*, 131(8): 2150-2156.
- Omotoso, G., Oyewopo, A., Kadir, R., Olawuyi, S., Jimoh, A. 2010. Effects of aqueous extract of *Allium sativum* (garlic) on semen parameters in wistar rats. *International Journal of Urology*, 7(2): 1-5.
- Pacifici, R., Altieri, I., Gandini, L., Lenzi, A., Simena, Zuccaro, P. 1993. Nicotine, cotinine and trans-3-hydroxycotinine levels in seminal plasma of smokers. *Therapeutic Drug Monitoring*, 15: 358-363.
- Rachel. 2018. *All About Garlic Scapes*. Simple Seasonal. Diakses dari <https://simpleseasonal.com/farm-to-table/all-about-garlic-scapes>, pada 12 Januari 2021.
- Ramirez, D.A., D.A. Locatelli, R.E. Gonzalez, P.F. Cavagnaro. 2017. Analytical methods for bioactive sulfur compounds in Allium: An integrated review and future directions. *Journal of Food Composition and Analysis*, 61: 4–19.
- Republik Indonesia. 2012. *Peraturan Pemerintah No. 109 Tahun 2012 Tentang Pengamanan Bahan Yang Mengandung Zat Adiktif Berupa Produk Tembakau Bagi Kesehatan*. Tambahan Lembaran RI Nomor 5380. Jakarta: Sekretariat Negara.
- Revel, A., Raanani, N., Younglai, E., Xu, J., Han, R. 2001. Resveratrol, a Natural Eryl Hydrocarbon Receptor Antagonist, Protect Sperm From DNA Damage and Apoptosis Caused by Benzo(a)Pyrene. *Journal of Reproductive Toxicology*, 15: 479-486.
- Rodgman, A & Perfetti, T. 2008. *Komponen Kimia Tembakau dan Asap Tembakau*. Edisi Kesatu. CRC Press. Diakses dari <https://doi.org/10.1201/9781420078848>
- Rogers, K. 2020. Spermatogenesis. Ensiklopedia Britannica. Diakses dari <https://www.britannica.com/science/spermatogenesis>, pada 12 Januari 2021.

- Roosbeh, N., Rostami, S., Abdi, F. 2016. A review on herbal medicine with fertility and infertility characteristics in males. *Iranian Journal of Obstetrics, Gynecology and Infertility*, 19(13): 18-32.
- Santoso, H.B. 1989. *Bawang Putih*. Yogyakarta: Penerbit Kanisius.
- Santoso, H.B. 2000. *Bawang Putih*. Edisi ke-12. Yogyakarta: Penerbit Kanisius.
- Sengupta, P. 2013. The laboratory rat: Relating its age with human's. *International Journal of Preventive Medicine*, 4(6): 624–630.
- Setiawan B. & Suhartono E. 2005. *Stres Oksidatif dan Peran Antioksidan pada Diabetes Melitus*. Majalah Kedokteran Indonesia 55(2): 86-91.
- Sukendro, S. 2007. *Filosofi Rokok. Sehat Tanpa Berhenti Merokok*. Pinus Book Publisher.
- Sukmaningsih, A. 2009. Penurunan jumlah spermatozoa pakiten dan spermatozoa tubulus seminiferus testis mencit (*Mus musculus*) yang dipaparkan asap rokok. *Jurnal Biologi*, 12: 31-2.
- Susilawati, Trinil. 2011. *Spermatologi*. Malang: Universitas Brawijaya Press.
- Takhtajan, A. 1997. *Diversity and Classification of Flowering Plants*. New York: Columbia University Press.
- Tim Farmasi. 2016. *Sistem Reproduksi Pria*. Kunci Media Dasar. Diakses dari <https://basicmedicalkey.com/male-reproductive-system-8/>, pada 12 Januari 2021.
- Tim Farmasi. 2017. *Agonis Reseptor Asetilkolin*. Kunci Medis Dasar. Diakses dari <https://basicmedicalkey.com/acetylcholine-receptor-agonists-2/>, pada 19 September 2022.
- Trifani. 2012. Ekstraksi Pelarut Cair-Cair. Diakses dari <http://awjee.blog.com/2012/11/24/ekstraks-pelarut-cair-cair/>, pada 18 September 2022.
- Valavanidis, T. 2009. 8-OHdG: A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *Journal of Environmental Science and Health. Part C: Environmental Carcinogenesis and Ecotoxicology Reviews*.
- Wang, S. 2007. Beneficial effects of vitamin e in sperm functions in the rat after spinal cord injury. *Journal of Andrology*, 28:334-341.

Wibowo, S. 2007. *Budidaya Bawang: Bawang Putih, Bawang Merah, Bawang Bombay*. Jakarta: Penerbit Penebar Swadaya.

Zhang, X. 1999. *WHO Monographs on Selected Medicinal Plants: Bulbus Allium sativum*. Geneva: World Health Organization.