

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

Soraya Rahmanisa¹, Evi Kurniawaty², Syazili Mustofa³ Natasya Hayatillah⁴

¹Bagian Biologi Molekuler, Fakultas Kedokteran, Universitas Lampung

²Bagian Biokimia, Fakultas Kedokteran, Universitas Lampung

³Bagian Biokimia, Fakultas Kedokteran, Universitas Lampung

⁴Mahasiswa, Fakultas Kedokteran, Universitas Lampung

Abstrak

Indonesia memiliki jumlah perokok terbanyak di Asia Tenggara yang didominasi oleh 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. Penelitian bersifat eksperimental selama 30 hari. Sampel 25 tikus *Rattus norvegicus* 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. 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). Peningkatan jumlah dan viabilitas secara klinis mulai ditemukan pada dosis 100 mg/KgBB dan paling baik pada dosis 400 mg/KgBB. Ekstrak etanol 96% bekatul beras merah dapat mencegah penurunan jumlah dan viabilitas spermatozoa tikus putih yang terpapar asap rokok kretek.

Kata Kunci: rokok kretek, spermatozoa, ekstrak bekatul

The Effect of 96% Ethanol Extract of Red Rice Bran toward Spermatozoa Number and Viability in Kretek Cigarette's Smokes-induced *Sprague dawley* Rats

Abstract

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 it to infertility. Red rice bran extract has lot of potential antioxidants to stop oxidatif stress. 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 smokes 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. There was significant effect from red rice bran extract toward sperm number and viability ($p=0,00$). Average spermatozoa number was 91.90 ± 7.72 (K1), 39.68 ± 7.51 (K2), 79.88 ± 8.63 (P1), 86.40 ± 10.5 (P2), 86.00 ± 5.78 (P3). Average viability was 65.00 ± 6.85 (K1), 29.6 ± 5.85 (K2), 51.4 ± 3.50 (P1), 60.00 ± 6.67 (P2), $61,00\pm 2.91$ (P3). The increasing of number and viability has been achived at dose 100mg/Kg and best at 400 mg/KgBB. 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, spermatozoa, rice bran extract

Korespondensi: Natasya Hayatillah, Alamat Jl. Soemantri Brodjonegoro No. 1, HP 081928006908, e-mail natasyahayatillahna@gmail.com

Pendahuluan

Angka konsumsi rokok secara global terus meningkat setiap tahunnya. *World Health Organization* (WHO) memperkirakan pada tahun 2030 rokok akan dikonsumsi oleh 2

miliar orang di dunia. Dari banyak negara, Indonesia diketahui memiliki prestasi buruk berkaitan dengan jumlah perokok.¹

Indonesia menempati urutan ke-4 dunia dengan jumlah perokok terbanyak setelah Cina, Rusia, dan Amerika Serikat.² Di regional Asia Tenggara, negara tersebut menjadi yang pertama dengan jumlah presentase perokok mencapai 67,4%.³ Lebih parahnya, sebanyak 80% perokok diketahui mulai merokok pada usia <19 tahun, sehingga menempatkan Indonesia sebagai negara dengan jumlah perokok remaja terbanyak di dunia.⁴ Dalam skala nasional, provinsi penyumbang perokok remaja terbanyak adalah Provinsi Lampung yaitu sebesar 60,9%.⁵ Berdasarkan jenis kelamin, banyak perokok tersebut didominasi oleh pria.

Pria perokok di Indonesia jumlahnya 16 kali lebih banyak dibandingkan perokok wanita.⁵ Sebanyak 80,4% diantaranya merupakan konsumen rokok kretek yang setiap harinya mampu mengisap 11,8 batang rokok jenis tersebut.⁶ Perilaku merokok di Indonesia disebut telah sampai ketahap yang sangat memperhatikan, dan telah menjadi kebiasaan meskipun jelas berakibat buruk bagi kesehatan masyarakatnya.⁷ Selain dapat menyebabkan penyakit pada sistem pernapasan, merokok juga ternyata dapat memperngaruhi fungsi organ reproduksi pria hingga menimbulkan kerugian berupa infertilitas padanya.²

Infertilitas adalah ketidakmampuan untuk memiliki anak setelah satu tahun pernikahan yang dialami oleh 15% pasangan di dunia dan 50% kasus dipengaruhi oleh faktor pria.⁸ Di Indonesia, masalah tersebut terus mengalami peningkatan setiap tahunnya.⁹ Selain disebabkan karena kelainan struktur anatomi, 40-90% kasus tersebut ternyata bersifat idiopatik. Namun, pada sperma infertil idiopatik umumnya ditemukan penurunan antioksidan dan peningkatan jumlah radikal bebas.¹⁰ Radikal tersebut diketahui dapat berasal dari paparan luar tubuh, salah satunya adalah merokok.¹¹

Asap rokok mengandung gas dan partikel yang dapat menjadi sumber pembentuk radikal bebas.¹² Apabila radikal tersebut terbentuk melebihi kapasitas antioksidan untuk menanggulangnya maka akan terjadi stres oksidatif. Pada sperma pria, kerusakan oksidatif 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.^{13,14} Penelitian oleh Wulandari *et al.* (2012)¹⁵ yang menunjukkan terdapat penurunan viabilitas sperma sebesar 50,3% pada kelompok tikus yang di paparkan asap rokok selama 15 menit dibandingkan dengan kelompok tikus yang tidak terpapar asap rokok. Penelitian lain yang dilakukan oleh Cui *et al.* (2016)¹⁶ 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.¹⁷ Salah satunya adalah bekatul beras merah.

Bekatul merupakan hasil dari proses penggilingan padi yang kaya akan komponen fitokimia. Komponen seperti polifenol, antosianin, antosinidin, γ -tokoferol, α -tokoferol, dan γ -oryzanol merupakan senyawa yang dapat bekerja sebagai antioksidan.¹⁸ Penelitian ekstraksi etanol 96% bekatul beras merah oleh Widarta *et al.* (2013)¹⁹ menunjukkan bekatul beras merah memiliki aktivitas antioksidan yang cukup baik yaitu 62,41 %. Penelitian lain oleh Laili (2016)²⁰ membuktikan pemberian ekstrak bekatul dengan dosis 200 mg/kg berat badan (BB) tikus merupakan dosis optimal 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 zat antioksidan terhadap jumlah dan viabilitas spermatozoa pada tikus jantan galur *Sprague dawley* yang diinduksi asap rokok kretek.

Metode

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental murni dengan pendekatan *post test only control group design* dan metode rancangan acak lengkap. Pemberian perlakuan pada hewan coba dilakukan di *Pet House* Fakultas Kedokteran (FK) Universitas Lampung (Unila) selama 30 hari pada bulan November-Desember 2017. Penilaian jumlah dan viabilitas spermatozoa dilakukan pada hari ke-31 di Laboratorium Biologi molekuler FK Unila. Sampel penelitian ini adalah tikus putih.

Tikus putih yang digunakan *Rattus norvegicus* galur *Sprague dawley* yang didapat

dari Fakultas Peternakan Institut Pertanian Bogor. Kriteria Inklusinya adalah jantan, berusia 10-14 minggu, BB 200-350 gram. Kriteria eksklusinya adalah tikus mengalami penurunan BB lebih dari 10% setelah masa adaptasi, sakit (tikus berambut kusam, rontok dan tidak bergerak aktif) serta mati selama perlakuan. Berdasarkan rumus Frederer diperoleh 25 tikus sebagai sampel dan 5 sebagai cadangan *drop out*. Tikus kemudian dibagi kedalam 5 kandang perlakuan, sehingga satu kandang ditempati 6 ekor tikus. Perlakuan setiap kelompok dapat dilihat pada table 1. Untuk melakukan perlakuan tersebut diperlukan beberapa alat dan bahan.

Alat-alat yang digunakan adalah lima kandang tikus, tempat makan dan botol minum tikus, sonde lambung, *smoking chamber*, neraca, mikroskop, *cover* dan *object glass*, bilik hitung *improve neubauer*, *minor set*, pipet, pot, spuit 1cc dan 10cc, *handschone*, dan masker. Bahan-bahan yang digunakan adalah NaCl 0,9%, rokok kretek, eosin 2%, serta bahan pembuat ekstrak yaitu bekatul beras merah yang diperoleh dari Serang-Banten, etanol, dan aquades. Proses pembuatan ekstrak etanol 96% bekatul beras merah dapat dilihat pada gambar 1. Sementara perlakuan pemaparan asap dilakukan dalam *smoking chamber*.

Smoking chamber yang dibuat merupakan modifikasi dari penelitian oleh Irawati (2015).²¹ Satu lubang pada *chamber* tersebut terhubung dengan *air pump* yang terbuat dari spuit 10cc dan selang, fungsinya adalah untuk menghantarkan asap kedalam *chamber*. Untuk menghindari hipoksia pada tikus selama pemaparan asap 2 batang rokok kretek maka dibuat beberapa lubang udara. Setelah terpapar asap rokok, tikus kemudian diberikan ekstrak etanol 96% bekatul beras merah secara peroral menggunakan sonde lambung. Setelah diberikan perlakuan selama 30 hari, tikus kemudian diterminasi.

Terminasi tikus dilakukan dengan metode *cervical dislocation* pada hari ke-31. Setelahnya organ testis beserta epididimis tikus diambil dan dibuat cacahan untuk diambil spermanya pada petri dis berisi NaCl 0,9%. Setelah dihomogenkan suspensi yang diperoleh digunakan untuk pengamatan jumlah dan viabilitas spermatozoa.

Pengamatan jumlah dilakukan dengan menggunakan kotak hemositometer *improved neubauer*. Diperiksa dibawah mikroskop dengan perbesaran 400x. Hasil perhitungan dimasukan kedalam rumus penentuan jumlah spermatozoa/ml suspensi sebagai berikut:

$$\text{Jumlah spermatozoa} = n \times \text{pengenceran} \times 10^6$$

juta sperma/ml

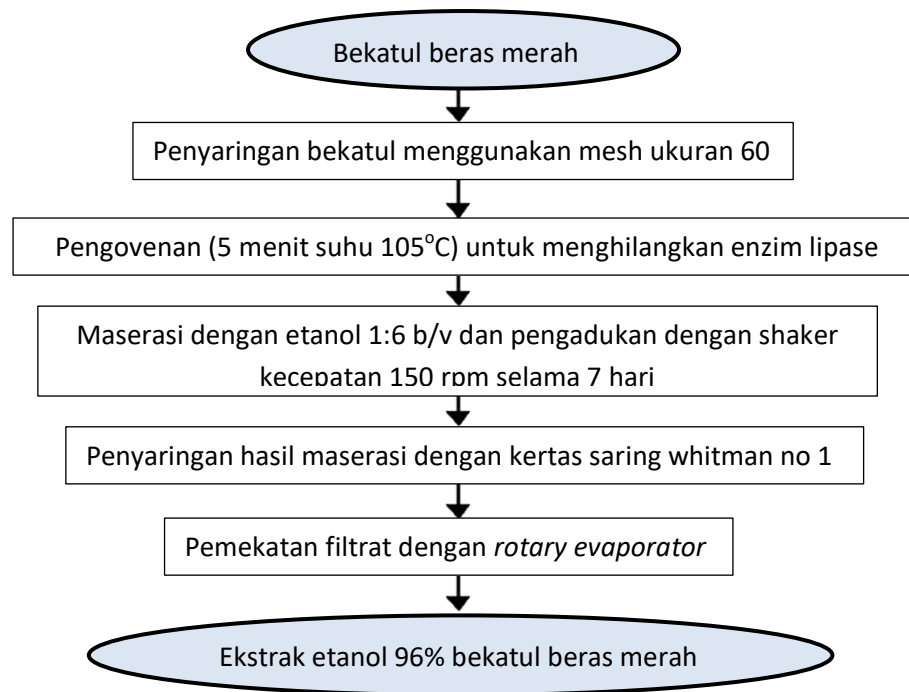
n = jumlah sperma yang dihitung pada kotak A, B, C, dan D.

Pengamatan viabilitas spermatozoa (VS) dilakukan menggunakan metode *dye eclusion* dengan pewarnaan eosin. Diperiksa dibawah mikroskop dengan perbesaran 400x. Diamati kurang lebih 200 spermatozoa dan dihitung spermatozoa yang hidup (tidak menyerap warna) dan spermatozoa yang mati (menyerap warna) kemudian dihitung persentasenya. Spermatozoa hidup akan memiliki kepala yang berwarna bening sedangkan spermatozoa mati dapat diketahui dengan melihat kepala spermatozoa berwarna ungu atau *pink* setelah diwarnai dengan eosin. Untuk mencegah dehidrasi sperma, perhitungan dilakukan dalam waktu kurang dari 30 menit setelah dikeluarkan dari testis tikus. Perhitungan viabilitas menggunakan rumus:

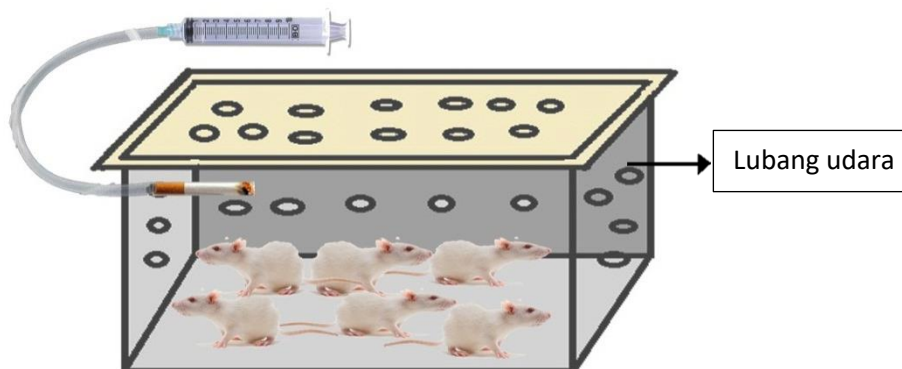
$$\% \text{ VS} = \frac{\text{Jumlah Spermatozoa hidup}}{\text{Total spermatozoa yang diamati}} \times 100\%$$

Tabel 1. Pembagian Kelompok Perlakuan

No	Kelompok	Perlakuan
1	Kontrol 1 (K1)	Tidak dipaparkan asap, tidak diberi ekstrak bekatul beras merah
2	Kontrol 2 (K2)	Dipaparkan asap 2 batang rokok kretek
3	Perlakuan 1 (P1)	Dipaparkan asap 2 batang rokok kretek, diberi ekstrak bekatul beras merah dosis 100mg/KgBB
4	Perlakuan 2 (P2)	Dipaparkan asap 2 batang rokok kretek, diberi ekstrak bekatul beras merah dosis 200mg/KgBB
5	Perlakuan 3 (P3)	Dipaparkan asap 2 batang rokok kretek, diberi ekstrak bekatul beras merah dosis 400mg/KgBB



Gambar 1. Proses Pembuatan Ekstrak Etanol 96% Bekatul Beras Merah.



Gambar 2. Proses Pemaparan Asap Rokok Kretek.

Hasil

Hasil perhitungan rerata dan uji *One Way Anova* dari jumlah spermatozoa dilihat pada tabel 2. Rerata tertinggi didapatkan pada kelompok K1 yaitu kelompok tikus yang tidak terpapar asap rokok dan tidak diberi ekstrak bekatul beras merah. Sementara rerata terendah didapatkan pada kelompok K2 yang merupakan kelompok tikus terpapar asap 2 batang rokok kretek. Terdapat peningkatan secara klinis rerata jumlah spermatozoa setelah diberikan ekstrak etanol 96% bekatul beras merah dosis bertingkat. Hasil Uji *One Way Anova* juga menunjukkan pemberian ekstrak berpengaruh terhadap rerata jumlah spermatozoa. Namun, tidak didapatkan beda

signifikan secara statistik dari rerata jumlah spermatozoa antar kelompok tikus yang diberi dosis bertingkat ekstrak bekatul beras merah. Hasil tersebut ditunjukkan dari hasil uji Post Hoc antar kelompok tersebut yang dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel 2. Rerata Jumlah Spermatozoa Tikus.

Kelompok	Rata-rata±SD (Juta/ml)	P
K1	91,90±7,72	
K2	39,68±7,51	
P1	79,88±8,63	0,000
P2	86,40±10,5	
P3	86,00±5,78	

Tabel 3. Hasil Uji *Post Hoc* Jumlah Spermatozoa Tikus

Kelompok Uji	K1	K2	P1	P2
K1	-	0,000*	0,300	1,000
P1	0,300	0,000*	-	1,000
P2	1,000	0,000*	1,000	-
P3	1,000	0,000*	1,000	1,000

Hasil yang sama juga didapatkan dari pengujian viabilitas spermatozoa pada penelitian ini. Tabel 4 menunjukkan rerata viabilitas terendah juga didapatkan pada kelompok tikus yang hanya terpapar asap 2 batang rokok kretek yaitu K2 dan rerata tertinggi pada kelompok tikus normal yaitu K1. Pemberian ekstrak bekatul juga terbukti berpengaruh terhadap viabilitas spermatozoa setelah tikus terpapar asap rokok karena nilai *p* pada uji One Way Anova <0,05. Hasil uji *Post Hoc* pada tabel 5 menunjukkan tidak didapatkan beda signifikan rerata viabilitas spermatozoa secara statistik pada kelompok yang diberi dosis ekstrak bertingkat.

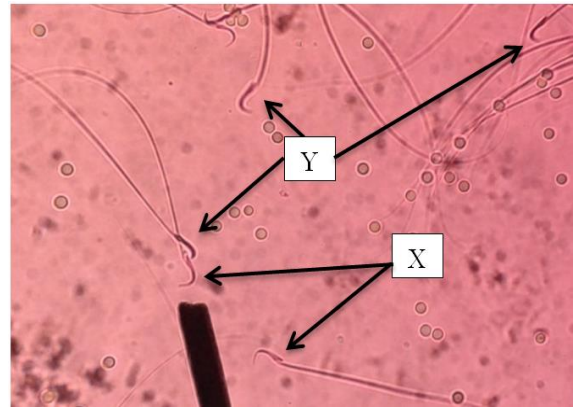
Tabel 4. Rerata Viabilitas Spermatozoa Tikus.

Kelompok	Rata-rata±SD (Juta/ml)	<i>P</i>
K1	65,00±6,85	
K2	29,6±5,85	
P1	51,4±3,50	0,000
P2	60,00±6,67	
P3	61,00±2,91	

Tabel 5. Hasil Uji *Post Hoc* Viabilitas Spermatozoa Tikus.

Kelompok Uji	K1	K2	P1	P2
K1	-	0,000*	0,008*	1,000
P1	0,008*	0,000*	-	0,208
P2	1,000	0,000*	0,208	-
P3	1,000	0,000*	0,110	1,000

Gambaran viabilitas spermatozoa yang diperiksa menggunakan pewarnaan eosin pada penelitian ini dapat dilihat pada gambar 3. Spermatozoa yang mati atau tidak viabel, bagian kepalanya akan berwarna *pink* seperti yang ditunjukkan oleh panah huruf Y. Sementara itu, spermatozoa hidup atau viabel, bagian kepalanya tidak akan terwarnai seperti yang ditunjukkan oleh panah huruf X.



Gambar 3. Viabilitas Spermatozoa Tikus Putih dengan Pewarnaan Eosin.

Pembahasan

Hasil penelitian ini menunjukkan paparan asap 2 batang rokok kretek selama 30 hari mampu menurunkan jumlah dan viabilitas spermatozoa tikus secara bermakna. Penelitian ini sejalan dengan Batubara *et al* (2013)²² yang menyatakan terjadi penurunan jumlah spermatozoa pada hewan coba yang telah terpapar asap 2 batang rokok kretek selama 30 hari. Hasil yang sama didapatkan juga pada penelitian Rula *et al* (2014)²³ yang menyatakan terjadi penurunan 41% jumlah spermatozoa pada tikus yang terpapar asap rokok selama 28 hari. Hasil perhitungan viabilitas pada penelitian ini sejalan dengan penelitian Wulandari *et al* (2012)¹⁵ bahwa tikus yang terpapar asap rokok akan mengalami penurunan viabilitas spermatozoa. Penelitian lain oleh Cui *et al* (2016)¹⁶ pada sampel manusia memperkuat bahwa terjadi penurunan jumlah dan viabilitas spermatozoa pada pria yang merokok dibandingkan dengan yang tidak. Penurunan tersebut diakibatkan oleh ketidakmampuan sperma untuk menanggulangi stres oksidatif akibat radikal bebas yang terdapat pada asap rokok.

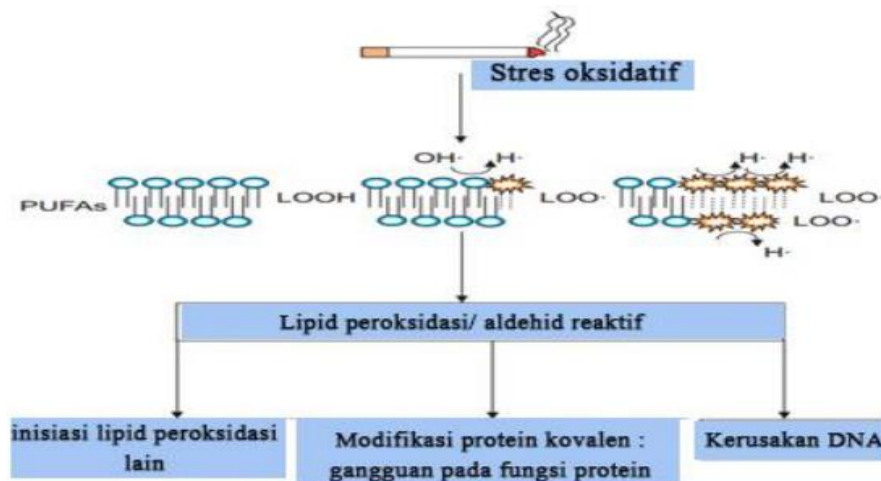
Sperma merupakan tipe sel yang dilaporkan peka terhadap kerusakan oksidatif akibat radikal bebas.²⁴ Radikal bebas adalah molekul yang memiliki satu atau lebih elektron tidak berpasangan pada kulit terluarnya sehingga bersifat tidak stabil.¹⁷ Untuk mencapai kestabilan, molekul tersebut akan selalu berusaha menarik elektron dari molekul atau sel lain, sehingga dapat berujung pada perubahan struktur sel.²⁵ Radikal bebas paling merusak untuk tubuh adalah Reactive Oxygen Species (ROS) dan golongannya.²⁶ Pada sperma normal, beberapa ROS seperti seperti

superoksida ($\bullet\text{O}_2^-$), hidrogen peroksida (H_2O_2), dan nitrit oksida ($\text{NO}\bullet$) sebenarnya diproduksi. Senyawa tersebut dibutuhkan dalam proses sperma menjadi fertil karena akan memicu fosforilasi pada proses kapasitasi, sehingga mempermudah reaksi pemecahan akrosom sperma. Namun, ROS yang diproduksi oleh sperma berada pada level yang rendah, sehingga tidak merusak komponennya dan masih mampu ditanggulangi oleh sistem antioksidan enzimatik yang ada pada tubuh sperma.²⁴ Kerusakan pada sperma akan terjadi apabila jumlah ROS berlebih dan tidak tertanggulangi oleh antioksidan tersebut.^{24,25} Pada penelitian ini, asap rokok menyebabkan terbentuknya ROS yang berlebih.

Asap rokok diketahui dapat membentuk ROS dan *Reactive Nitrogen Species* (RNS). Senyawa tersebut dapat dibentuk secara langsung ataupun melalui interaksi antar senyawa kimianya dalam fase gas. Tar pada rokok diketahui dapat membentuk beberapa radikal bebas seperti karbon monoksida (CO), radikal semiquinon yang terbentuk dari hasil autooksidasi senyawa hidroquinon dengan bantuan tar yang selanjutnya dapat membentuk radikal superoksida ($\bullet\text{O}_2^-$).¹² Selain tar, asap rokok juga mengandung kadmium (Cd) yang diketahui dapat menghasilkan radikal superoksida ($\bullet\text{O}_2^-$), hidrogen peroksida (H_2O_2) dan radikal hidroksil ($\text{OH}\bullet$)²⁶. Semua unsur dan senyawa tersebut masuk kedalam ROS. Sementara itu, nitrogen oksida (NO) yang merupakan radikal bebas nonreaktif yang dihasilkan oleh tar dapat berinteraksi dengan molekul oksigen di udara

dan membentuk senyawa nitrogen dioksida (NO_2), dinitrogen trioksida (N_2O_3), dinitrogen dan tetraoksida (N_2O_4). Radikal peroxinitrat (ONOO^-) juga dapat terbentuk akibat interaksi NO dengan radikal superoksida. Keseluruhan senyawa tersebut merupakan bagian dari RNS.¹² Kelebihan ROS dan RNS tersebut tidak dapat ditanggulangi oleh antioksidan enzimatik yang ada pada sperma. Flaherty (2014)²⁴ menyebutkan bahwa antioksidan yang dihasilkan oleh sperma bersifat sangat sensitif pada kelebihan ROS. Antioksidan tersebut sangat rentan terinaktivasi dan sperma tidak memiliki kemampuan untuk mensintesis lebih banyak antioksidan apabila jumlah ROS berlebih sehingga dapat mengalami stres oksidatif.

Stress oksidatif yang dialami oleh sperma dapat mengakibatkan penurunan jumlah dan viabilitas. Penurunan tersebut dikarenakan adanya perubahan struktur pada asam nukleat, protein, lipoprotein dan lipid di membran plasma sel sperma.²³ Membran sel sperma diketahui kaya akan komponen lipid berbentuk asam lemak tak jenuh atau *polyunsaturated fatty acid* (PUFAs). Ikatan antara radikal bebas dengan PUFAs dapat mengakibatkan terjadinya pembentukan peroksidasi lipid atau *lipid peroxidation* (LPO) seperti yang dapat dilihat pada gambar 4. Pembentukan LPO akan merubah struktur, integritas, permeabilitas, hilangnya fungsi dari membran sel dan dapat berujung pada kematian sel sperma. Produk sekunder dari peroksidasi lipid juga dapat merusak beberapa molekul penting seperti protein dan basa DNA sel.^{13,27,28} Hal ini sesuai



Gambar 4. Mekanisme Asap Rokok Menyebabkan Peroksidasi Lipid.²⁸

dengan penelitian yang dilakukan oleh Ghaffari dan Rostami (2012)²⁹ yang menyatakan bahwa terdapat peningkatan kadar LPO pada pria yang merokok disertai dengan penurunan jumlah spermanya. Tafuri (2015)³¹ juga menyebutkan kerusakan pada struktur DNA akan menyebabkan apoptosis pada sel induk sperma sehingga dapat menurunkan jumlahnya. Peroksidasi lipid pada sperma juga dapat menurunkan viabilitasnya.

Viabilitas spermatozoa adalah ukuran kemampuan atau ketahanan hidup sperma diluar dari testis. Sperma yang hidup akan memiliki membran plasma yang utuh atau intak. Kerusakan membran plasma menjadi tolak ukur kematian sperma karena pentingnya peran membran plasma untuk menjaga sperma tetap hidup.³² Membran plasma akan mengelilingi seluruh sel sperma, melindungi dan menahan organel serta komponen intraselular didalamnya. Membran tersebut juga akan mempertahankan gradien kimia dari ion dan senyawa larut lainnya. Jika membran plasma sperma tidak utuh, maka organel dan komponen intraselularnya dapat terganggu, sehingga menyebabkan kematian sperma. Sperma yang mati dianggap tidak fertil.³³ Pada pewarnaan *dye exclusion* eosin, sperma mati dengan membran tidak intak akan menyerap warna eosin.

Ekstrak etanol 96% bekatul beras merah pada penelitian ini mampu meningkatkan jumlah dan viabilitas spermatozoa tikus yang telah terpapar asap 2 batang rokok kretek. Peningkatan tersebut terjadi karena ekstrak bekatul mengandung senyawa antioksidan nonezimatik. Senyawa antioksidan nonenzimatik merupakan senyawa antioksidan yang berasal dari luar tubuh. Antioksidan dibutuhkan untuk memutuskan reaksi rantai radikal bebas sehingga stres oksidatif dapat terhenti dan tidak menimbulkan kerusakan pada sel. Antioksidan nonenzimatik bekerja dengan cara menjadi *scavenger* untuk ROS.³⁴

Ekstrak bekatul beras merah diketahui mengandung senyawa yang dapat menjadi antioksidan nonenzimatik yaitu α -tokoferol, γ -tokoferol, γ -oryzanol, fenol, antosianin dan antosianidin.^{19,35,36} α -tokoferol dan γ -tokoferol merupakan bagian dari vitamin E. Antioksidan tersebut bekerja sebagai *scavenger* ROS dalam reaksi peroksidasi lipid. Ikatan α -tokoferol dengan radikal peroksi lipid (LOO•) akan membentuk radikal tokoferoksil.

Radikal tersebut relatif lebih stabil sehingga reaksi LPO akibat ROS dapat terhenti. Senyawa lainnya, yaitu γ -oryzanol juga memiliki mekanisme kerja mirip dengan vitamin E. γ -oryzanol akan mendonasikan hidrogen yang dimiliki untuk menetralsasi radikal bebas pada ROS.³⁷ Sementara itu, senyawa fenol diketahui memiliki efek antioksidan *invitro* yang lebih baik dari tokoferol dan asam askorbat atau vitamin C.³⁸ Senyawa antioksidan lainnya yaitu antosianin dan antosianidin masuk kedalam golongan flavonoid. Senyawa tersebut juga bekerja sebagai *scavenger* ROS dengan mendonasikan hidrogennya. Selain bekerja sebagai antioksidan, antosianin dan antosianidin juga merupakan pigmen warna pada bekatul beras merah yang tidak ditemukan pada beras putih. Hal tersebut membuat bekatul beras merah memiliki kandungan antioksidan yang lebih baik dari bekatul beras putih.¹⁸ Adanya efek perbaikan jumlah sperma oleh antioksidan bekatul beras merah pada penelitian ini diperkuat dengan penelitian oleh Amelia (2018) yang menyebutkan pemberian ekstrak etanol 96% bekatul beras merah mampu meningkatkan rerata sperma dalam perhitungan motilitas dan morfologi³⁹, hasil juga sejalan dengan penelitian Dwizella (2018)⁴⁰ dimana spermatosit tikus yang terpapar asap rokok mengalami perbaikan setelah pemberian ekstrak tersebut.

Tidak didapatkan beda signifikan secara statistika rerata jumlah dan viabilitas spermatozoa pada kelompok dosis bertingkat. Hasil ini sejalan dengan penelitian oleh Amelia (2018)³⁹. Hal ini dapat terjadi karena rentang dosis ekstrak bekatul yang digunakan terlalu sempit sehingga kenaikan rerata jumlah dan viabilitas spermatozoa tidak signifikan. Selain itu, kualitas ekstrak juga dapat mempengaruhi. Proses ekstraksi bekatul beras merah pada penelitian ini juga tidak menggunakan tambahan HCL 37%. Menurut Widarta *et al.* (2013)¹⁹ penambahan asam tersebut dapat lebih menjaga kualitas antioksidan dari ekstrak bekatul. Senyawa HCL juga dapat mendekstruksi sel tumbuhan sehingga antioksidan dalam sel tumbuhan dapat terekstraksi dengan baik.⁴¹ Berdasarkan penelitian ini dosis 100 mg/KgBB telah mampu menjadi dosis yang memberikan perbaikan jumlah dan viabilitas spermatozoa dibanding kelompok yang tidak mendapat ekstrak

bekatul. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Heikal *et al.*, (2015)⁴² bahwa dosis ekstrak bekatul 100 mg/KgBB dengan menggunakan pelarut etanol 96% sudah dapat menjadi dosis yang aman untuk dikonsumsi dalam jangka panjang, sementara dosis 500 m/KgBB akan menimbulkan efek toksisitas pada sel tikus putih yang diteliti.

Simpulan

Pemberian ekstrak etanol 96% bekatul beras merah mampu meningkatkan jumlah dan viabilitas spermatozoa tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague dawley* yang diinduksi asap rokok kretek. Peningkatan secara klinis sudah bisa ditemukan pada dosis 100mg/KgBB dan paling baik pada dosis 400mg/KgBB.

Daftar Pustaka

1. Kemenkes RI. Perilaku merokok masyarakat Indonesia. Infodatin. 2015.
2. Eriksen M, Mackay J, Schluger N, Gomeshtapeh FI, Drope J. The tobacco atlas. Edisi ke-5. USA: The american cancer society; 2015.
3. Dorotheo U, Lian TY. The asean tobacco atlas. Edisi ke-2. Thailand: Shouteast asia tobacco control alliance; 2014.
4. World Health Organization. Global Youth Tobacco Survey Indonesia Report 2014. India: World Heath Organization; 2014.
5. Kemenkes RI. Riset kesehatan dasar. Jakarta: Kemenkes RI; 2013.
6. WHO. Global adult tobacco survey: Indonesia report 2011. Indonesia: Badan penelitian dan pengembangan kesehatan Kemenkes RI; 2011.
7. Kemenkes RI. Httts 2016: suarakan kebenaran, jangan bunuh dirimu dengan candu rokok [Internet]; 2016. [disitasi tanggal 1 Oktober 2017]. Tersedia dari: www.depkes.go.id
8. Jungwirth A, Diemer T, Dohle GR, Giwercman A, Kopa Z, Krausz C, *et al.* Guidelines on Male Infertility. UK: European association of urology; 2015.
9. Rahmanisa S, Maisuri R. 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. 2013;3(2):33–7.
10. Ghareeb DA, Sarhan EME. Role of oxidative stress in male fertility and idiopathic infertility: causes and treatment. J diagnostic Tech Biomed Anal. 2014;3(1):1–12.
11. Mangimbulude JC, Karwur FF. Merokok dan oksidasi DNA. J Sains Medika. 2013;5(2):113–20.
12. Wooten JB, Chouchane S, Mcgrath TE. Tobacco smoke constituents affecting oxidative stress. Dalam: Halliwell BB, Poulsen HE, editor. Cigarette smoke and oxidative stress. Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2006.
13. Agarwal A, Virk G, Ong C, Plessis SS. Effect of oxidative stress on male reproduction. World J mens Heal. 2014;32(1):1–17
14. Harlev A, Agarwal A, Gunes SO, Shetty A, Simon S. Smoking and male infertility: an evidence-based review. World J Mens Heal. 2015;33(3):143–60.
15. Wulandari US, Aulanni'am, Wardhana W. 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; 2012.
16. Cui X, Jing X, Wu X, Wang Z, Li Q. Potential effect of smoking on semen quality through DNA damage and the downregulation of Chk1 in sperm. J Mol Med Rep. 2016;14(1):753–61.
17. Mustofa S. Pengaruh pemberian ekstrak tempe terhadap fungsi hati dan kerusakan sel hati tikus putih yang diinduksi parasetamol. JuKeUnila. 2013;3(1):44–52.
18. Friedman M. Rice brans, rice bran oils, and rice hulls: composition, food and industrial uses, and bioactivities in humans, animals, and cells. J Agric Food Chem. 2013;61(45): 10626–8.
19. Widarta IWR, Nocianitri KA, Sari LPIP. Ekstraksi komponen bioaktif bekatul beras lokal dengan beberapa jenis pelarut. J Apl Teknol Pangan. 2013;2(2):75–9.
20. Laili H nur. 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: Universitas Sultan Agung; 2016.

21. Irawati NAV. Pengaruh pemberian vitamin E terhadap jumlah sel spermatogenik dan diameter tubulus seminiferus mencit jantan (*Mus musculus* L) yang dipaparkan asap rokok [skripsi]. Lampung: Universitas Lampung; 2015.
22. Batubara IVD, Wantouw B, Tendean L. Pengaruh paparan asap rokok kretek terhadap kualitas spermatozoa mencit jantan (*Mus musculus*). *J e-biomedik*. 2013;1(1):330–7.
23. Rula A-G, Qazzaz MM, Dabdoub N, Abdul-Ghani A-S. Studies on cigarette smoke induced oxidative DNA damage and reduce spermatogenesis in rats. *J Env Biol*. 2014;35(5):943–7.
24. Flaherty CO. The enzymatic antioxidant system of human spermatozoa. *J Adv Androl*. 2014;2014:1–5.
25. Bansal AK, Bilaspuri GS. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. *J Vet Med Int*. 2011;2011:1–7.
26. Bender DA. Radikal bebas dan nutrisi antioksidan. Dalam Mrurray R, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Rodwell VW, Weil A, editor. *Biokimia harper*. Edisi ke-39. Jakarta: EGC; 2012.
27. Dai JB, Wang ZX, Qiao ZD. The hazardous effect of tobacco smoking on male fertility. *Asian J Androl*. 2015;17(6):954–60.
28. Chung KF, Adcock IM. Multifaceted mechanism in COPD: inflammation, immunity, tissue repair and destruction. *Eur Respir J*. 2008;31(1):1334–56.
29. El-beltagi H. Reactive Oxygen Species, Lipid Peroxidation and Antioxidative Defense Mechanism. *Not Bot Horti Agrobo*. 2017; 41(1):44–57.
30. Ghaffari MA, Rostami M. Lipid peroxidation and nitric oxide levels in male smokers spermatozoa and their relation with sperm motility. *J Reprod Infertil*. 2012;13(3):81–7.
31. Simona Tafuri, Ciani F, Iorio EL, Esposito L, Cocchia N. Reactive oxygen species (ROS) and male fertility. Dalam Bin Wu. *New discoveries in embryology*. UK: Intech; 2015.
32. WHO. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. Edisi ke-5. Switzerland: World health organization; 2010. hlm.26-32.
33. Talwar P. Sperm function test. *J Hum Reprod Sci*. 2015;8(2):61–4.
34. Nimse SB, Pal D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *J RSC Adv*. 2015;1(1):1–36.
35. Moongngarm A, Daomukda N, Khumpika S. Chemical compositions, phytochemicals, and antioxidant capacity of rice bran, rice bran layer, and rice germ. *J APCBEE Procedia*. 2012;2:73–9.
36. Thitipramote N, Pradmeeteekul P, Nimkamnerd J, Chaiwut P, Pintathong P, Thitilerdecha N. Bioactive compounds and antioxidant activities of red (brown red jasmine) and black (kam leum pua) native pigmented rice. *Int food Res J*. 2016;23(1):410–4.
37. Minatel IO, Francisqueti FV, Corrêa CR, Pace G, Lima P. Antioxidant activity of γ -oryzanol: a complex network of interactions. *Int J Mol Sci*. 2016;17 (1107):1–4.
38. El-beltagi H. Reactive oxygen species, lipid peroxidation and antioxidative defense mechanism. *J Not Bot Horti Agrobo*. 2013;41(1):44–57.
39. Amelia L. Pengaruh pemberian ekstrak etanol 96 % bekatul beras merah terhadap motilitas dan morfologi spermatozoa pada tikus putih [skripsi]. Lampung: Universitas Lampung; 2018.
40. Dwizella N. Pengaruh pemberian ekstrak etanol 96% bekatul beras merah (*Oryza nivara*) terhadap jumlah rerata spermatis primer dan ketebalan tubulus seminiferus tikus putih jantan galur *Sprague dawley* yang terpapar asap rokok kretek [skripsi]. Lampung: Universitas Lampung; 2018.
41. Rai IW, Arnata IW. Stabilitas aktivitas antioksidan ekstrak bekatul beras merah terhadap oksidator dan pemanasan pada berbagai pH. *J Teknol dan Ind pangan*. 2014;25:193–9.
42. Heikal OA, Zickri MB, Helal AM, EL-Aksary H, Fiebich BL, Gomaa IEO. Stabilized rice bran extract: acute and 28-day repeated dose oral toxicity with in vitro mutagenicity and genotoxicity study. *Afr J Pharm Pharmacol*. 2015;9(44):1037–50.