

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK BIJI ANGGUR
(*Vitisvinifera*) TERHADAP VIABILITAS SPERMATOZOA
DAN EKSPRESI TUMOR NECROSIS FACTOR ALPHA
(TNF- α) TESTIS PADA HEWAN MODEL
TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*)
YANG DIBERI PAPARAN
ASAPROKOK**

SKRIPSI

Oleh:
ULFA SEPTIANA WULANDARI
105130101111093



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
PROGRAM KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2014**

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK BIJI ANGGUR
(*Vitisvinifera*) TERHADAP VIABILITAS SPERMATOZOA
DAN EKSPRESI TUMOR NECROSIS FACTOR ALPHA
(TNF- α) TESTIS PADA HEWAN MODEL
TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*)
YANG DIBERI PAPARAN
ASAPROKOK**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh:

ULFA SEPTIANA WULANDARI
105130101111093



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
PROGRAM KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2014**

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK BIJI ANGGUR

**(*Vitisvinifera*) TERHADAP VIABILITAS SPERMATOZOA DAN EKSPRESI
TUMOR NECROSIS FACTOR ALPHA (TNF- α) TESTIS PADA
HEWAN MODEL TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*) YANG DIBERI
PAPARAN ASAPROKOK**

Oleh :

ULFA SEPTIANA WULANDARI

NIM.105130101111093

Telah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal 15 Agustus 2014
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES

NIP. 19600903 198802 2 001

drh. Analis Wisnu W., M.Biomed

NIP. 19800904 200812 1 001

Mengetahui,

Ketua Program Studi Kedokteran Hewan
Program Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya

Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES

NIP. 19600903 198802 2 001

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Ulfa Septiana Wulandari
NIM : 105130101111093
Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan
Penulis Skripsi berjudul :

“Pengaruh Pemberian Ekstrak Biji Anggur(*Vitis Vinifera*) Terhadap Viabilitas *STumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- α) Testis Pada Hewan Model Tikus Putih (*Rattus Norvegicus*) Yang DiberiPaparasi Asap Rokok”

Dengan ini menyatakan bahwa :

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang tercantum di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 15 Agustus 2014

Yang Menyatakan,

Ulfa Septiana Wulandari
NIM. 105130101111093

Pengaruh Pemberian Ekstrak Biji Anggur(*Vitis vinifera*) Terhadap Viabilitas Spermatozoa Dan Ekspresi *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- α) Testis Pada Hewan Model Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Yang Diberi Paparan Asap Rokok

ABSTRAK

Infertilitas jantan adalah suatu keadaan yang dipengaruhi oleh faktor kualitas spermatozoa. Indikator kualitas sperma salah satunya yaitu rendahnya viabilitas spermatozoa sehingga tidak dapat membuahi sel telur. Kandungan asap rokok yang tergolong dalam *Radical Oxygen Species* (ROS) dapat menjadi penyebab dari infertilitas. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak biji anggur (*Vitis vinifera*) terhadap peningkatan viabilitas spermatozoa dan penurunan ekspresi TNF- α pada organ testis. Tikus yang dipakai dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan berumur 12 minggu dengan berat badan 175 - 200 gram yang dibagi dalam 5 kelompok. Kelompok 1 adalah tikus kontrol negatif, kelompok 2 adalah kelompok kontrol positif yang diberi paparan asap rokok, kelompok 3, 4, 5 adalah kelompok tikus yang dipapar asap rokok dan mendapat terapi ekstrak biji anggur (*Vitis vinifera*) 0,9 mg/ekor/hari, 2,7 mg/ekor/hari, dan 5,4 mg/ekor/hari. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian ekstrak biji anggur (*Vitis vinifera*) memberikan pengaruh signifikan ($p < 0,05$) terhadap peningkatan viabilitas spermatozoa sampai 88,9 % dan menurunkan ekspresi TNF- α sampai 86,1 % pada organ testis. Dengan pemberian dosis 5,4 mg/ekor/hari. dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak biji anggur (*Vitis vinifera*) dapat meningkatkan viabilitas spermatozoa dan menurunkan ekspresi TNF- α pada organ testis.

Kata kunci : *Vitis vinifera*, *Radical Oxygen Species*, *Rattus norvegicus*, Viabilitas, Spermatozoa, TNF- α .

INFLUENCE OF EXTRACT GRAPE SEED (*Vitis vinifera*) TO VIABILITY SPERM AND THE EXPRESSION OF TUMOR NECROSIS FACTOR ALPHA (TNF- α) TESTES IN RAT (*Rattus norvegicus*) THAT GIVEN EXPOSURE BY CIGARETTE SMOKE

ABSTRACT

Infertility is a condition which affected by sperm quality. One of indicator of sperm quality, is the low of viability of sperm which caused fertilization can not happened in ovum. Contents of cigarette smoke which include in Radical Oxygen Species (ROS) can caused infertility. This studied to determined the influence of extract of *Vitis vinifera* in increased sperm viability and decreased TNF- α expression on testes. The research used 12 weeks aged of male rats body weight 175 – 200 gram (*Rattus norvegicus*) divided by 5 groups. The first of group is negative control group, second is positive group which exposed by cigarette smoke, and third group is therapy groups were given extract of grape seed (*Vitis vinifera*) with each dose consisted of 0.9 mg /rat /day, 2.7 mg /rat /day, and 5.4 mg /rat /day. The results showed that the therapy of extract of grape seed (*Vitis vinifera*) in rats (*Rattus norvegicus*) increased the sperm viability significantly ($p < 0.05$) up to 88,9 % and decreased TNF- α expression on testes to 86,1 % with dose of 5.4 mg /rat /day. It can be concluded that the extract of grape seed (*Vitis vinifera*) increase the viability of sperm and decrease the expression of Tumor Necrosis Factor Alpha in testes.

Keyword : *Vitis vinifera*, Radical Oxygen Species, *Rattus norvegicus*, Viability, Sperm, Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α).

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadirat Tuhan Yang Maha Esa kerana telah memberikan rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan skripsi yang berjudul “Pengaruh Pemberian Ekstrak Biji Anggur (*Vitis vinifera*) Terhadap Viabilitas Spermatozoa Dan Ekspresi *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- α) Testis Pada Hewan Model Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Yang Diberi Paparan Asap Rokok” dapat terselesaikan.

Ketertarikan penulis mengangkat topik ini karena antioksidan buah anggur terutama dalam bijinya yang mengandung banyak *Proanthocyanidins* yang mempunyai kandungan 20% lebih besar dari vitamin E dan 50 % lebih besar dari vitamin C. Antioksidan *Proanthocyanidins* dapat meningkatkan fertilitas dan mencegah kerusakan jaringan yang disebabkan oleh stres oksidatif. Oleh karena itu hasil penelitian ini diharapkan mampu menjadi dasar penelitian guna memberikan sumbangsih dalam bidang reproduksi hewan jantan.

Proses penulisan skripsi ini merupakan sebuah pengalaman yang sangat berharga. Pengalaman yang tidak hanya memberikan tantangan dalam segi keilmuan tetapi juga dalam segi fisik dan mental. Selama penulisan skripsi ini penulis banyak mendapatkan arahan, bimbingan, dan bantuan berbagai pihak. Dengan terselesaikannya penulisan skripsi ini penulis mengucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES., selaku dosen pembimbing pertama dan Ketua Program Studi Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya atas bimbingan, kesabaran, fasilitas dan waktu yang telah diberikan sehingga skripsi ini dapat terselesaikan.
2. drh. Analis Wisnu Wardhana., M. Biomed., selaku dosen pembimbing kedua dan dosen penasehat akademik atas bimbingan, kesabaran, dan waktu yang telah diberikan sehingga skripsi ini dapat terselesaikan.

3. Dyah Kinasih Wuragil S.Si., MP., MS dan drh. Herlina Pratiwi selaku dosen penguji I dan II yang telah mengarahkan dan memberikan bimbingan penulis dalam menyelesaikan penulisan skripsi.
4. Dr. Agung Permana Warih Marhendra, M.Si selaku Ketua Program Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya.
5. Orang tua penulis Bapak Sumadji dan Almh. Ibu Komariyah tercinta yang senantiasa memberikan doa, dukungan dan semangat yang tiada henti demi keberhasilan putrinya, serta kakak tercinta Agus Kusaini S.Ag. dan Wiji Ati S.H yang selalu memberikan doa dan dukungan.
6. Teman - teman kelompok *Vitis Vinifera* Habyb Palyoga, Valola Putri, Ditya Sulanda, Istiana Hidayati, Munip Setyowati, Tino Zainul, Sakti Mustika Wati yang telah berjuang bersama bersama.
7. Seluruh staf Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas MIPA khususnya Noer Muhammad Dliyatul Haq S.Si dan Vivi Sofia S.Si selaku supervisi penelitian atas bimbingan, motivasi dan nasehatnya. Pak Har, dan Pak Mar, yang telah mengarahkan penulis dalam menyelesaikan skripsi.
8. Keluarga besar *Community Part C* 2010 (COMPAC 2010) atas kebersamaan, persahabatan, semangat, inspirasi dan keceriaan, semoga kita semua sukses.
9. Saudara-saudara di kos Jl. Kerto Asri no 19 malang yang selalu memberikan dorongan, semangat dan keceriaan.
10. Semua pihak yang telah membantu dalam penyelesaian penulisan skripsi ini yang tidak mungkin penulis sebutkan satu persatu.

Akhir kata, penulis berharap semoga Allah SWT membalas segala kebaikan yang telah diberikan dan skripsi ini dapat memberikan manfaat dan menambah pengetahuan tidak hanya bagi penulis tapi juga bagi pembaca.

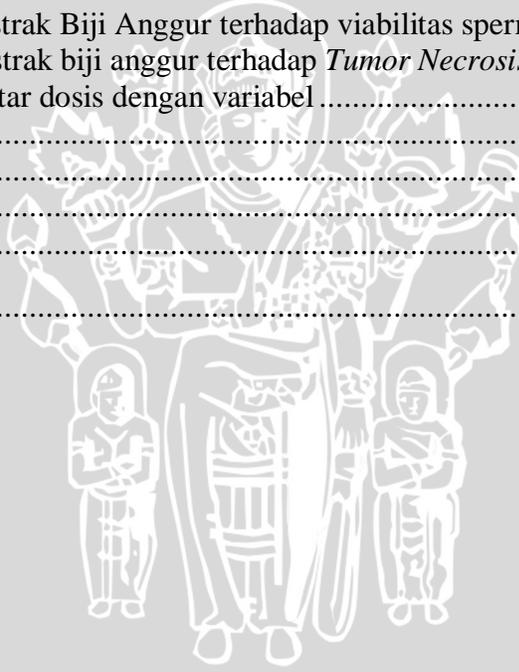
Malang, 14 Juli 2014

penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
DAFTAR ISTILAH DAN SINGKATAN	xiii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Batasan Masalah	4
1.4 Tujuan	5
1.5 Manfaat	5
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Radikal bebas	6
2.1.1 Sifat-sifat radikal bebas	6
2.1.2 Reaksi perusakan oleh radikal bebas	7
2.2 Stress oksidatif dan fungsi reproduksi	8
2.3 Tikus putih (<i>Rattus norvegicus</i>).....	9
2.4 Organ reproduksi hewan jantan.....	11
2.5 Spermatozoa.....	13
2.5.1 Karakteristik Sperma.....	15
2.5.2 Viabilitas Sperma.....	18
2.6 <i>Tumor nekrosis factor alpha</i> (TNF- α)	18
2.7 Taksonomi anggur.....	20
2.7.1 Manfaat biji anggur	21
2.8 Antioksidan	22
2.9 Asap rokok.....	24
2.10 Patomekanisme kerusakan jaringan oleh radikal bebas	24
BAB 3. KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS	26
3.1 Kerangka Konseptual.....	26
3.2 Hipotesis.....	28

BAB 4. METODOLOGI PENELITIAN	29
4.1 Tempat dan Waktu.....	29
4.2 Populasi dan Sampel	29
4.3 Rancangan Penelitian	30
4.4 Definisi Operasional.....	31
4.5 Alat dan Bahan.....	31
4.6 Ekstrak biji anggur.....	32
4.7 Pengambilan organ testis.....	33
4.7.1 Pembuatan preparat histologi	33
4.7.2 Pembuatan preparat imunohistokimia	34
4.8 Perhitungan sperma	34
4.9 Analisa Data	35
BAB 5.HASIL DAN PEMBAHASAN	36
5.1 Pengaruh Ekstrak Biji Anggur terhadap viabilitas sperma	36
5.2 Pengaruh Ekstrak biji anggur terhadap <i>Tumor Necrosis Faktor</i>	41
5.3 Hubungan antar dosis dengan variabel	46
BAB 6.PENUTUP	48
6.1 Kesimpulan	48
6.2 Saran	48
DAFTAR PUSTAKA	49
LAMPIRAN	53



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
2.1 Kriteria konsentrasi sperma	17
4.1 Metode Penelitian	25
5.1 Hasil perhitungan rata-rata viabilitas spermatozoa.....	33
5.2 Hasil perhitungan rata-rataekspresi TNF- α	38

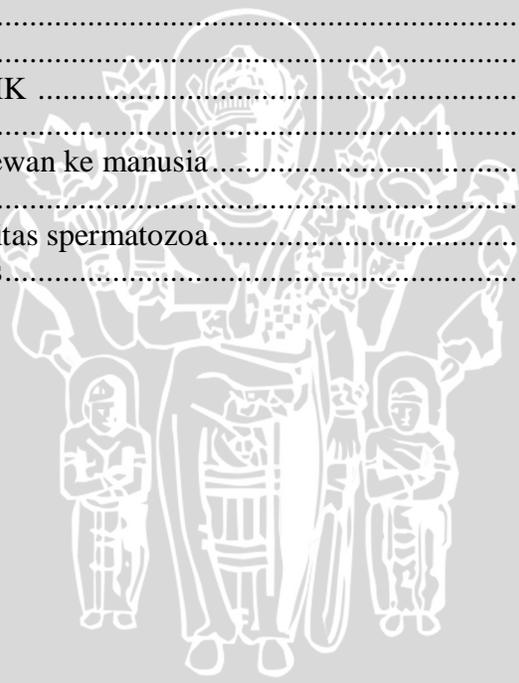


DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 <i>Rattus norvegicus</i>	10
2.2 Morfologi Sperma Tikus	13
2.3 Metabolisme ROS (<i>Reactive Oxygen Spesies</i>)	16
2.4 Buah anggur	17
2.5 Reaksi flavonoid menetralsir radikal bebas	18
2.6 Mekanisme antioksidan	19
3.1 Kerangka konseptual	21
5.1 Viabilitas spermatozoa dengan perbesaran 400x	32
5.2 Ekspresi TNF- α pada testis dengan perbesaran 400x	37

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Sertifikat etik	48
2. Rancangan konsep	49
3. Rancangan perlakuan	51
4. Pemaparan asap rokok.....	52
5. Pembuatan larutan.....	53
6. Pembuatan preparat IHK	54
7. Metode IHK.....	55
8. Tabel konferensi dosis hewan ke manusia.....	56
9. Sertifikat taksonomi	57
10. Statistika untuk viabilitas spermatozoa.....	58
11. Statistika TNF- α testis.....	61



DAFTAR ISTILAH DAN SINGKATAN

ABP	<i>Androgen Binding Protein</i>
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
BNJ	Beda nyata jujur
DAB	<i>diamino benzidine</i>
DNA	<i>Deoxy Nukleic Acid</i>
FBS	<i>fetal bovine serum</i>
FSH	<i>Follicel Stimulating Hormon</i>
GSH Px	<i>Glutation Peroksidase</i>
IHK	Imunohistokimia
IL 1 β	<i>Interleukin-1 beta</i>
KEP UB	Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya
LH	<i>Luteinizing Hormon</i>
NF-kB	<i>Nuclear Factor-kB</i>
OPC	<i>Oligomeric Proanthocyanidin</i>
PBS	<i>Phosphate Buffer Salin</i>
PFA	<i>Paraformaldehyde</i>
PUFA	<i>Polyunsaturated Fatty Acid</i>
RAL	Rancangan Acak Lengkap
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
SA-HRP	<i>Strep Avidin Horse Radish Peroxidase</i>
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i>
UPHP	Unit Pengembangan Hewan Percobaan
WHO	<i>World Health Organization</i>

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang

Infertilitas pada jantan adalah suatu keadaan yang dipengaruhi oleh faktor kualitas sperma. Indikator kualitas sperma salah satunya yaitu rendahnya viabilitas sperma, sehingga tidak dapat menembuahi sel telur. Infertilitas pada jantan dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya kualitas sperma yang kurang bagus, gaya hidup dan lingkungan. Saat ini angka infertilitas di Indonesia mencapai angka 15 % (WHO, 2012). Kasus infertilitas 40 % disebabkan dari faktor pria yang banyak melakukan aktifitas beresiko tinggi dalam hal ini adalah seorang perokok (Agarwal, 2005).

Kasus infertilitas pada hewan banyak terjadi pada hewan kesayangan anjing dan kucing. Studi kasus di Jepang pada tahun 2006 pernah mengkaji hewan kesayangan seperti anjing, yang sering mengikuti majikannya terlebih lagi majikan tersebut merupakan seorang perokok aktif. Studi kasus ini membuktikan bahwa 75% hewan kesayangan tersebut mengalami infertilitas. Kasus infertilitas ini dapat dilihat dari viabilitas, morfologi, dan motilitas Sperma. Kualitas sperma yang kurang bagus tidak akan mampu menembus membran sel telur sehingga bisa dikatakan sperma tersebut infertil (Morita, *et al.*, 2006).

Bidang kesehatan reproduksi sekarang telah memfokuskan perhatian terhadap penelitian tentang radikal bebas yang menjadi salah satu mediator terjadinya

infertilitas dan inflamasi. Radikal bebas akan meningkat dengan adanya pengaruh dari lingkungan dan faktor gaya hidup yang tidak sehat. Respon imun inflamasi yang dihasilkan dapat mengakibatkan efek sitotoksik, peningkatan sekresi mukus, akumulasi sel inflamasi di saluran reproduksi. Salah satu sitokin yang berperan sebagai indikator terjadinya inflamasi adalah sitokin proinflamasi yaitu *Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α)*. *Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α)* yang muncul pada organ testis akibat adanya kerusakan jaringan epitel akibat akumulasi radikal bebas dari asap rokok yang menyebar melalui aliran darah. Secara berlebihan akumulasi radikal bebas dalam organ testis dapat menyebabkan terjadinya infertilitas pada spermatozoa dan kerusakan pada sel sertoli serta sel leydig. Antioksidan dalam tubuh bertindak sebagai penetralisir radikal bebas. Radikal bebas dalam tubuh yang berlebihan akan menyebabkan kerusakan jaringan, dan apoptosis dari sperma. Produksi radikal bebas yang berlebihan dan mekanisme pertahanan tubuh lemah maka memicu terbentuknya stres oksidatif, hal ini akan menurunkan terutama kualitas dari spermatozoa (Agarwal, 2005).

Indonesia merupakan negara yang mempunyai sumber radikal bebas besar diantaranya berasal dari lingkungan, polusi udara, paparan bahan kimia. Sumber radikal bebas yang sangat tinggi berasal dari asap rokok. Seorang perokok aktif dalam satu kali hisapan rokok diperkirakan sebanyak 1014 molekul radikal bebas yang masuk ke dalam tubuh, sedangkan pada perokok pasif 2050 molekul radikal bebas yang masuk ke dalam tubuh. Asap rokok banyak mengandung campuran bahan kimia beracun diantaranya karbonmonoksida, tar, nikotin. Bahan tersebut dapat

menurunkan kadar testoteron, merusak DNA spermatozoa, mengganggu spermatogenesis dan kematian sel, sehingga mengakibatkan menurunnya kualitas spermatozoa (Fowles, *et al.*, 2000).

Antioksidan alami yang dapat menyeimbangkan *scavenging system*, salah satunya bersumber dari buah anggur terutama dalam bijinya yang mengandung banyak flavonoid dan phenol. Penelitian ilmiah telah menunjukkan bahwa dalam flavonoid mempunyai turunan senyawa *Proanthocyanidins* dengan berat molekul 592.5468 mempunyai kandungan 20% lebih besar dari vitamin E dan 50 % lebih besar dari vitamin C sebagai antioksidan. Ekstrak biji anggur salah satu dari beberapa antioksidan yang mampu melintasi pembuluh darah diseluruh tubuh yang bersifat selektif permeabel dan mencegah zat-zat berbahaya masuk dalam tubuh. Studi ilmiah mengindikasikan ekstrak biji anggur yang banyak mengandung *Proanthocyanidins* dapat mengurangi kerusakan jaringan, degenerasi sel, infertilitas dan stroke (Monagas, *et al.*, 2003).

Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan adanya antioksidan dalam ekstrak biji anggur (*Vitis vinifera*) dapat meningkatkan viabilitas spermatozoa dan menurunkan ekspresi *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- α) pada organ testis tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) yang diberi paparan asap rokok.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah yang akan dipecahkan dalam penelitian ini adalah

1. Apakah pemberian ekstrak bijianggur (*Vitis vinifera*) dapat meningkatkan viabilitas spermatozoa tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) yang diberi paparan asap rokok?
2. Apakah pemberian ekstrak biji anggur (*Vitis vinifera*) dapat menurunkan ekspresi *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- α) pada organ testistikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) yang diberi paparan asap rokok?

1.3 Batasan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka penelitian ini dibatasi pada :

1. Tikus putih yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih strain *Wistar* jantan dengan umur 12 minggu dan berat badan 175 – 200 gram yang diperoleh dari Unit Pengembangan Hewan Percobaan (UPHP) Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Penggunaan hewan coba dalam penelitian ini telah mendapatkan sertifikat laik etik oleh Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya No: 201-KEP-UB (**Lampiran 1**)
2. Biji anggur yang digunakan adalah biji jenis anggur hijau (*Vitis vinifera*) yang diperoleh dari kota malang yang banyak mengandung flavonoid *Proanthocyanidins*, *Catechin*, *Epitechin* (Monagas, et al., 2003).
3. Metode ekstraksi biji anggur (*Vitis vinifera*) yang digunakan adalah metode maserasi menggunakan aquades dengan suhu 80°C (Monagas, et al., 2003).

4. Dosis serbuk biji anggur 0,9, 2,7, 5,4 gram/ekor selama 14 hari (Kusumawati, 2004).
5. Rokok yang digunakan dari jenis non filter sejumlah 2 batang setiap hari selama 14 hari (Fowles, 2000).
6. Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah viabilitas spermatozoa dengan menggunakan *eosin blue*, dan ekspresi *Tumor Necrosis Faktor Alpha* (TNF – α) pada organ testis dengan pewarnaan Imunohistokimia (IHK).

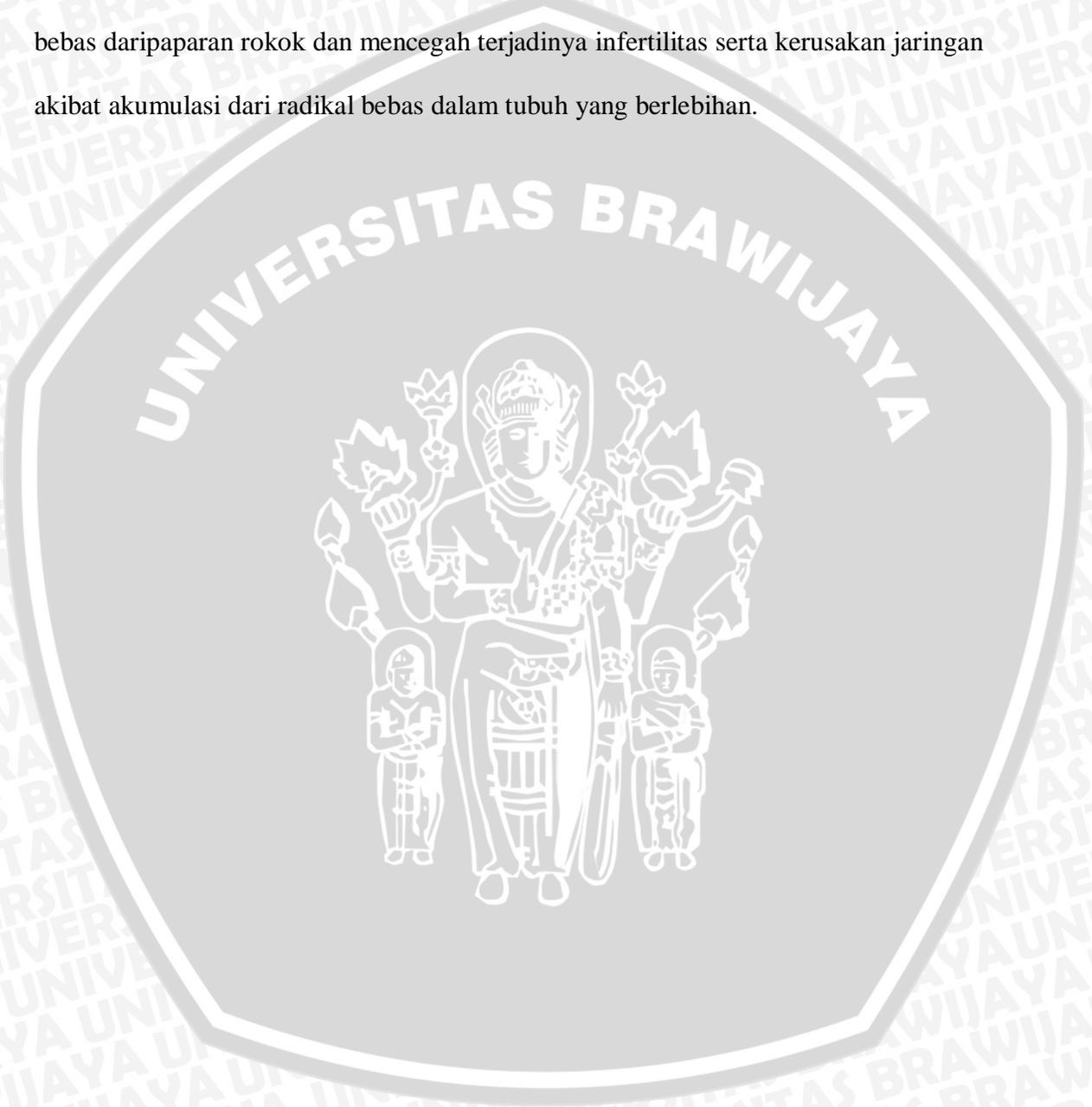
1.4 Tujuan Penelitian

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

1. Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak biji anggur terhadap peningkatan viabilitasspermatozoatikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diberi paparan asap rokok.
2. Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak biji anggur terhadap penurunan ekspresi *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF - α) pada organ testistikus putih(*Rattus norvegicus*)yang diberi paparan asap rokok.
3. Menganalisa hubungan antara dosis biji anggur (*Vitis vinifera*) terhadap peningkatan viabilitas spermatozoa dan penurunan ekspresi *Tumor Necrosis Factor Alpha*(TNF - α) pada organ testis.

1.5 Manfaat Penelitian

Memberikan informasi bahwa antioksidan yang terkandung pada biji buah anggur (*Vitis vinifera*) mampu mengurangi pengaruh yang ditimbulkan oleh radikal bebas daripaparan rokok dan mencegah terjadinya infertilitas serta kerusakan jaringan akibat akumulasi dari radikal bebas dalam tubuh yang berlebihan.



BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Radikal Bebas

Radikal bebas merupakan atom atau gugus atom yang memiliki satu atau lebih elektron tak berpasangan. Karena jumlah elektron ganjil, maka tidak semua elektron dapat berpasangan sehingga bersifat sangat reaktif. Jika jumlahnya sedikit, radikal bebas dapat dinetralkan oleh sistem enzimatik tubuh, namun jika berlebih akan memicu kerusakan jaringan. Radikal bebas merupakan agen pengoksidasi kuat yang dapat merusak sistem pertahanan tubuh karena elektron yang tidak berpasangan (Singh, *et al.*, 2006).

Radikal bebas bersifat reaktif, dapat menyebabkan kerusakan sel, mengurangi kemampuan adaptasi sel, bahkan kematian sel. Sumber radikal bebas yang paling berbahaya adalah yang berasal dari faktor eksternal. Contohnya antara lain pencemaran udara di daerah perkotaan (asap kendaraan, pabrik, rokok), zat kimia dalam makanan, radiasi sinar ultraviolet dan polutan berbahaya lainnya diet tidak sehat, makanan berlemak tinggi dan faktor-faktor lainnya tanpa disadari masuk ke dalam tubuh dan menyebabkan peningkatan produksi radikal bebas.

Radikal bebas adalah molekul yang kehilangan elektron, sehingga molekul tersebut menjadi tidak stabil. Pada saat terjadi infeksi, radikal bebas diperlukan untuk membunuh mikroorganisme penyebab infeksi. Tetapi paparan radikal bebas yang berlebihan dapat menyebabkan kerusakan sel, dan pada akhirnya dapat menyebabkan kematian sel (Tremallen, 2008).

2.1.1 Sifat-sifat Radikal Bebas

Perusakan sel oleh radikal bebas didahului oleh kerusakan membran sel, dengan rangkaian proses sebagai berikut :

1. Terjadi ikatan kovalen antara radikal bebas dengan komponen membran (enzim-enzim membran, komponen karbohidrat membran plasma), sehingga terjadi perubahan struktur dan fungsi reseptor.
2. Oksidasi menyebabkan proses transport lintas membran terganggu.
3. Mengaktifkan sitokin proinflamasi TNF- α dan IL 1 β pada organ.
4. Sitokin proinflamasi akan meningkat ekspresinya pada jaringan yang mengalami akumulasi radikal bebas yang berlebihan (Singh, *et al.*, 2006).

2.1.2 Reaksi Perusakan Oleh Radikal Bebas

Jumlah radikal bebas yang melebihi antioksidan endogen akan membuat radikal bebas bereaksi dengan lemak, protein, asam nukleat seluler, sehingga terjadi kerusakan lokal dan disfungsi organ tertentu. Lemak merupakan biomolekul yang rentan terhadap serangan radikal bebas :

a. Peroksidasi lemak

Membran sel mengandung sumber *Poly Unsaturated Fatty Acid* (PUFA) yang mudah dirusak oleh bahan-bahan pengoksidasi sehingga mengalami proses peroksidasi lemak. Hal ini sangat merusak karena merupakan suatu proses berkelanjutan (Tremallen, 2008).

b. Kerusakan protein

Protein dan asam nukleat lebih tahan terhadap radikal bebas, sehingga kecil kemungkinan terjadi reaksi berantai yang cepat. Serangan radikal bebas terhadap protein sangat jarang kecuali bila sangat ekstensif dan radikal bebas tersebut mampu berakumulasi atau bila kerusakannya terfokus pada daerah tertentu dalam protein salah satu penyebab kerusakan (Tremallen, 2008).

c. Kerusakan DNA

Seperti pada protein kecil kemungkinan terjadinya kerusakan di DNA menjadi suatu reaksi berantai, biasanya kerusakan DNA terjadi bila ada lesi pada suatu pada susunan molekul dan bila terjadi sebelum replikasi maka dapat terjadi mutasi. Radikal bebas dapat menyerang DNA jika terbentuk di sekitar DNA sehingga dapat mengganggu proses spermatogenesis (Tremallen, 2008).

2.2 Stres Oksidatif Dan Fungsi Reproduksi

Stres oksidatif (*oxidative stress*) merupakan keadaan dimana tingkat radikal bebas di dalam tubuh melebihi kapasitas tubuh untuk menetralkannya. Akibatnya intensitas proses oksidasi sel menjadi semakin tinggi dan memicu kerusakan sel. Kelebihan radikal bebas dalam tubuh akan bereaksi dengan lemak protein, asam nukleat seluler, sehingga terjadi kerusakan lokal dan disfungsi organ. Infertilitas pria merupakan masalah yang makin meningkat dalam dekade terakhir ini. Di beberapa negara menunjukkan gejala penurunan kualitas sperma yang cukup menyolok pada pria dewasa yang merupakan peokok aktif (Hinting, 1996). Di Australia kasus infertilitas 50 % penyebabnya juga berasal dari pria yang mempunyai pola hidup

tidak sehat contohnya perokok aktif dan pecandu minuman beralkohol (McLachlan, 2001).

Indonesia, angka kejadian infertilitas telah meningkat mencapai 15-20 % setiap tahun dari sekitar 50 juta pasangan di Indonesia. Penyebab infertilitas sebanyak 40% berasal dari pria, 40% dari wanita, dan 20% dari lingkungan (Hinting, 1996). Banyak faktor yang dapat mengakibatkan infertilitas, dimulai dari gangguan hormonal, stress fisik, dan lingkungan. Olahraga dengan intensitas tinggi merupakan salah satu contoh stress fisik yang dapat mempengaruhi kualitas sperma pada pria (Eliakim, 2006). Kemampuan ROS dalam menurunkan motilitas dan viabilitas sperma melalui peroksidasi membran sel sperma yang diinduksi oleh ROS menyebabkan penurunan fleksibilitas dan pergerakan ekor sperma lemah. Selain peroksidasi membran sel sperma kerusakan terjadi langsung pada mitokondria sperma. *Reactive oxygen species (ROS)* juga mampu secara langsung merusak DNA sperma dengan menyerang basa purin dan pirimidin. ROS juga dapat menginisiasi terjadinya apoptosis dalam sperma (Tremalen, 2008).

Penelitian dengan menggunakan hewan percobaan yang diinduksi asap kendaraan bermotor menunjukkan terjadinya penurunan pada parameter sperma. Kerusakan dalam jaringan testis yang diteliti dengan pewarnaan *Hematoxylin Eosin*. Stres oksidatif yang terjadi pada fungsi reproduksi jika tidak dikoreksi pada akhirnya akan menimbulkan gangguan dan bahkan dapat menyebabkan kemandulan atau infertilitas pada pria (Sukmaningsih, 2009).

2.3 Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) adalah hewan laboratorium hewan yang sengaja dipelihara dan diternakkan untuk dipakai sebagai hewan penelitian atau pangamatan laboratoris. Tikus putih merupakan strain albino dari *Rattus norvegicus*. Tikus Wistar saat ini menjadi salah satu yang strain tikus paling populer yang digunakan untuk penelitian laboratorium. *Rattus norvegicus* jantan dengan umur 12 minggu sudah mulai berkembang hormon – hormon reproduksinya ditandai testis matang siap untuk kawin (Gambar 2.1). Penggunaan Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) sebagai hewan coba dalam kajian fertilitas pasca induksi asap rokok nonfilter dikarenakan hewan tersebut tergolong hewan mamalia dengan umur dewasa kelamin yang tidak lama serta perkawinannya tidak tergantung musim. Pertimbangan ukuran tubuh Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang memudahkan ketika dalam melakukan perlakuan induksi asap rokok nonfilter dalam kajian peningkatan fertilitas juga turut serta sebagai pertimbangan dalam pemilihan hewan coba (Hendriksen, *et al.*, 1991).



Gambar 2.1 *Rattus norvegicus* (Suckow, 2006).

Klasifikasi tikus putih Gambar 2.1 sebagai berikut:

Kingdom : Animalia
Filum : Chordata

Kelas	: Mamalia
Ordo	: Rodentia
Sub Ordo	: Myomorpha
Famili	: Muridae
SubFamili	: Murinae
Genus	: <i>Rattus</i>
Spesies	: <i>Rattus norvegicus</i> (Suckow, 2006).

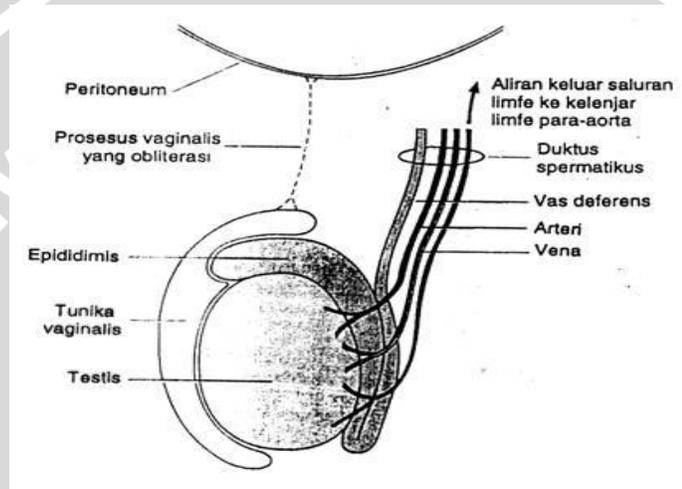
Ciri-ciri galur iniyaitu bertubuh panjang dengan kepala lebih sempit. Telinga tikus ini tebal dan pendek dengan rambut halus seperti terlihat pada Gambar 2.1. Mata tikus putih berwarna merah. Ciri yang paling terlihat adalah ekornya yang panjang. Berat badan tikus jantan pada umur 12 minggu antara 175 – 200 gram, Tikus putih memiliki lama hidup berkisar antara 4-5 tahun. Jenis galur ini dikembangkan di Institut Wistar pada tahun 1906 untuk digunakan dalam biologi dan penelitian medis. Tikus jantan mempunyai kelebihan dibandingkan tikus betina dalam penelitian diantaranya hormon-hormon reproduksi pada umur 12 minggu sudah mulai berfungsi dengan baik (Suckow, 2006).

2.4 Organ Reproduksi Hewan Jantan

1. Testis

Merupakan salah satu organ yang penting dalam reproduksi jantan (Falk, 2001). Testis terdiri dari sepasang gonad yang berbentuk oval (Gambar 2.2). Testis dibungkus skrotum yang terdiri dari tiga atau empat lapisan. Lapis *superficial* kulit, dibawahnya terdapat lapis fibrosa dan jaringan otot yaitu *tunica dartos* dibawahnya terdapat *tunica vaginalis* yang menutupi dinding skrotum. Bagian dalam

testis. Skrotum merupakan kantung berkulit tipis yang mengelilingi dan melindungi testis. Skrotum juga bertindak sebagai sistem pengontrol suhu untuk testis. Didalam testis terdapat lobuli-lobuli yang didalamnya ada saluran yang disebut *tubulus seminiferus* yang menghasilkan spermatozoa (Agarwal, 2005).



Gambar 2.2 Anatomi organ testis (Hafez, 2000).

2. Penis

Organ kopulatoris hewan jantan yaitu penis, mempunyai tugas ganda yaitu pengeluaran urin dan peletakan semen ke dalam saluran reproduksi hewan betina. Penis terdiri dari akar, badan dan ujung bebas yang berakhir pada kepala penis. Badan penis terdiri dari *corpus cavernosum penis* yang relatif besar dan diselaputi oleh suatu selubung fibrosa tebal berwarna putih, *tunica albuginea*. Dibagian ventral terdapat *corpus cavernicum urethrae*, suatu struktur yang relatif lebih kecil yang mengelilingi *urethrae* (Agarwal, 2005).

3. Epididimis

Epididimis adalah suatu struktur memanjang yang bertaut rapat dengan testis. mengandung *ductus epididymidis* yang sangat berliku-liku. Epididimis dapat dibagi atas kepala, badan dan ekor. Epididimis terletak dibagian permukaan dorsal testis dan merupakan tempat sperma (Agarwal, 2005).

Epididimis dibentuk oleh duktus epididimis yang kecil dan melilit secara padat. Saluran tersebut akan menjadi lebih kecil ketika melalui bagian atas epididimis (head of epididimis). Epididimis berfungsi sebagai tempat pematangan, penyimpanan dan sekresi (Hafez, 2000).

4. Vas Deferens

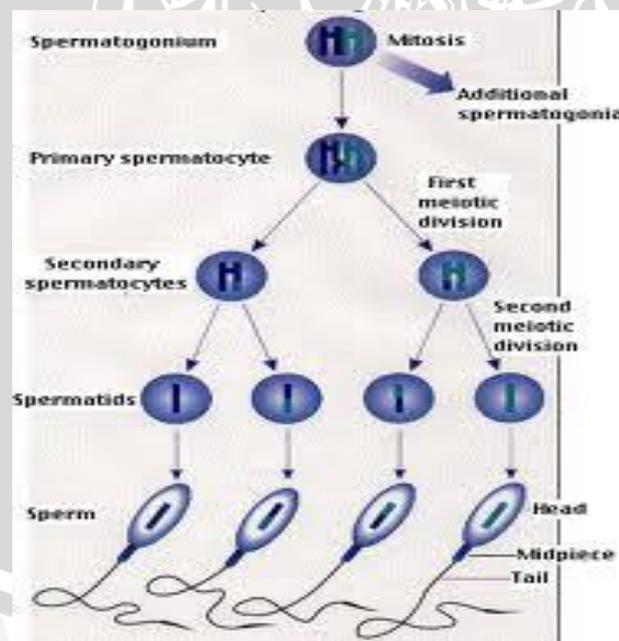
Vas deferens adalah alat atau saluran untuk transportasi spermatozoa. *vas deferens* yang terletak bersebelahan diatas vesica urinaria lambat laun akan menebal dan membesar membentuk ampula. Penebalan ampula disebabkan karena banyak terdapat kelenjar pada dinding saluran. Kelenjar-kelenjar ini bersifat tubuler dan secara histologis sangat mirip dengan struktur kelenjar *vesicularis* (Hafez, 2000).

2.5 Spermatozoa

Spermatozoa merupakan sel yang dihasilkan oleh fungsi reproduksi jantan. Sel tersebut mempunyai kepala, leher dan ekor. Spermatozoa merupakan sel hasil maturasi dari sel epitel germinal yang disebut spermatogonia. Spermatogonia terletak dalam dua sampai tiga lapisan sepanjang batas luar epitel tubulus. Proses perkembangan spermatogonia menjadi spermatozoa disebut spermatogenesis (Gambar 2.3). Pada tahap pertama spermatogenesis, spermatogonia berkumpul di tepi

membran basal. Spermatogonia bermigrasi ke arah sentral di antara sel-sel Sertoli. Sel-sel Sertoli mempunyai membran yang kuat berlekatan satu sama lain pada bagian dasar dan sisi, sehingga dapat membentuk lapisan pertahanan yang mencegah penetrasi dari kapiler-kapiler yang mengelilingi tubulus (Hafez, 2000).

Proses berikutnya adalah pembelahan secara meiosis. Spermatogonium yang masuk ke dalam lapisan sel-sel Sertoli secara berangsur-angsur membesar untuk membentuk suatu spermatosit primer. Spermatosit primer membelah menjadi spermatosit sekunder. Pembelahan meiosis kedua terjadi, di mana kedua kromatid dari 23 kromosom berpisah pada sentromer, membentuk dua pasang 23 kromosom (Hafez, 2000).



Gambar 2.3 Tahapan spermatogenesis (Hafez, 2000).

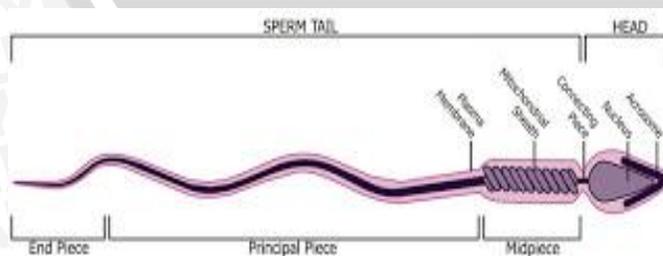
Proses pembentukan spermatozoa dipengaruhi oleh kerja beberapa hormon, diantaranya:

- a. Kelenjer hipofisis menghasilkan hormon perangsang folikel (*Folicle Stimulating Hormon/FSH*) dan hormon lutein (*Luteinizing Hormon/LH*).
- b. LH merangsang sel leydig untuk menghasilkan hormon testosteron.
- c. FSH merangsang sel Sertoli untuk menghasilkan ABP (*Androgen Binding Protein*)

yang akan memacu spermatogonium untuk memulai spermatogenesis (Hafez, 2000).

2.5.1 Karakteristik Spermatozoa

Spermatozoa adalah sel kelamin (gamet) yang diproduksi di dalam testis melalui proses spermatogenesis. Sperma akan dikeluarkan melalui saluran kelamin jantan untuk membuahi sel telur. Spermatozoa adalah sel kelamin yang memegang peranan penting dalam proses pembuahan. Awal spermatozoa sudah ada ketika embrio masih berupa sel-sel gonosit yang sudah aktif mengadakan pembelahan, sehingga menghasilkan spermatogonia (Agarwal, 2005).



Gambar 2.4 Morfologi Sperma tikus (Hafez, 2000).

Spermatogenesis terjadi di tubulus seminiferus. Panjang spermatozoa sekitar 50 µm terdiri dari 2 bagian yaitu kepala dan ekor seperti Gambar 2.4. Spermatozoa berukuran lebih kecil dari oosit. Panjang ekor jauh lebih panjang dari pada panjang kepala. Panjang dari spermatozoa berbeda pada tiap spesies. Panjang dan lebar kepala 0,8 – 10 mikron kali 4,0 – 4,5 mikron pada sperma sapi, domba dan babi, sedangkan pada kuda 7,0 mikron kali 2,7 – 4,0 mikron. Perbedaan sperma tikus dari sperma yang lain yakni terletak pada bagian kepalanya (Agarwal, 2003).

2.5.2 Viabilitas sperma

Pemeriksaan viabilitas dilakukan dengan mengamati kepala spermatozoa bila warna transparan berarti sperma masih hidup dan yang mati pada daerah kepala berwarna biru kehitam. Pengamatan dibawah mikroskop minimal menggunakan 4 lapang pandang dengan perbesaran 10 okuler x 40 objektif (Syahrur, 1994).

Nilai viabilitas spermatozoa dinyatakan dalam prosentase dengan perhitungan:

$$\text{Viabilitas spermatozoa} = \frac{\text{jumla h spermatozoa yang hidup}}{\text{jumla h sampel yang mati}} \times 100 \%$$

Viabilitas spermatozoa dapat dilihat dari motilitas sperma di amati dengan cara sebagai berikut, sperma yang telah dikeluarkan dari testis diaduk agar tercampur diambil 1 tetes sperma dan diletakkan diatas objek glas kemudian ditetesi

eosin blue dicampur lalu di tutup dengan *cover glas*, setelah itu di amati di bawah mikroskop dengan perbesaran 400x yang diamati antra lain (Riwantoro, 2002).

A. Pergerakan individu dari sperma dengan kriteria sebagai berikut:

1. *Progresif motility*

Bergerak aktif, maju lurus atau membentuk lingkaran besar.

2. *Non-progressive motility*

Bergerak lambat, maju dengan lambat atau membentuk lingkaran kecil.

4. *Immotility*

Sperma tidak bergerak sama sekali .

(Riwantoro, 2002).

B. Konsentrasi sperma berdasarkan jarak antar kepala sperma

Pengamatan konsentrasi dari spermatozoa dapat dilihat dengan beberapa kriterian pada tabel dibawah ini (Tabel 2.1)

Tabel 2.1 Kriteria konsentrasi sperma

Kriteria	Keterangan	Konsentrasi sperma (x 10 ⁶ sel) per ml
Densum	Jarak rata-rata antara satu kepala sperma dengan kepala sperma yang lain kurang dari panjang satu kepala sperma	1000 – 2000
Semi Densum	Jarak rata-rata antara satu kepala sperma dengan kepala sperma yang lain sama dengan panjang satu kepala	500 – 1000

	sperma	
Rarum	Jarak rata-rata antara satu kepala sperma dengan kepala sperma yang lain mencapai satu setengah panjang kepala sampai satu panjang sperma keseluruhan	200 – 500
Oligospermia	Jarak rata-rata antara satu kepala sperma dengan kepala sperma yang lain lebih dari panjang satu sel sperma keseluruhan	< 200
Necrospermia	Tidak ditemukan adanya sperma	0

(Riwantoro, 2002).

C. Pewarnaan viabilitas sperma

Sperma memiliki bagian-bagian yang masing-masing memiliki fungsi yang mendukung proses fertilisasi dapat berlangsung. Bagian-bagian tersebut menurut Riwantoro (2002) terbagi atas 3 bagian utama, yaitu:

1. Bagian Kepala

Pada bagian kepala spermatozoon ini, terdapat inti tebal dengan sedikit sitoplasma. Selubung tebal yang dimaksud adalah akrosom, fungsi dari akrosom adalah untuk melindungi, juga menghasilkan enzim. Akrosom ini mengandung enzim yaitu hialuronidase dan akrosin. Yang masing-masing enzim tersebut memiliki fungsi yang berbeda:

- a. Hialuronidase merupakan enzim dapat menembus ovum.
- b. Akrosin menghancurkan glikoprotein yang terdapat di zona pellusida ovum.

2. Bagian Badan

Terdapat sebuah mitokondria berbentuk spiral..

3. Bagian Ekor

Pada bagian ekor sperma yang cukup panjang berupa flagella untuk pergerakan spermatozoa.

Penelitian dengan objek kajian viabilitas spermatozoa menurut Hafez (2000) menggunakan pewarnaan eosin blue akan mewarnai kepala dari spermatozoa. Eosin blue akan memberikan warna biru kehitaman pada kepala sperma, karena pada akrosomnya telah rusak oleh ROS. Akrosom mempunyai dua enzim yaitu hialuronidase dan akrosin yang mudah rusak oleh ROS. Enzim yang telah rusak akan membuat warna dari eosin blue mudah meresap masuk dan mewarnai kepala dari sperma (Hafez, 2000).

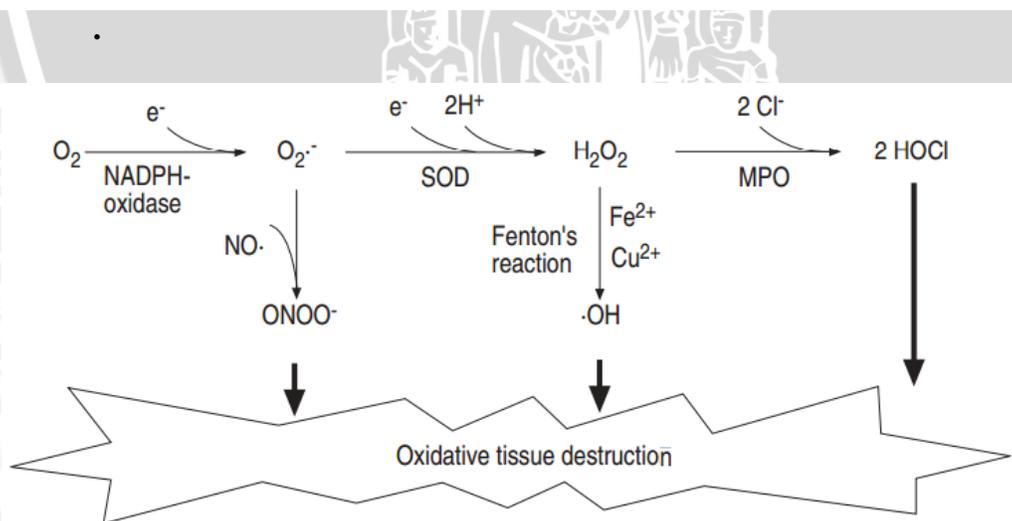
2.6 Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α)

Inflamasi adalah respon fisiologis tubuh terhadap suatu injuri dan gangguan oleh faktor eksternal. Makrofag merupakan pusat dari inisiasi dan progresi. *Tumor necrosis factor alpha* (TNF- α), merupakan sitokin yang diproduksi oleh berbagai tipe sel dan merupakan salah satu mediator imunologi yang pertamakali muncul akibat respons infeksi dan trauma. *Tumor necrosis factor alpha* (TNF- α) juga berperan dalam respons adaptif terhadap inflamasi (Gallin, 2008).

Fungsi TNF- α dalam konsentrasi rendah antara lain menyebabkan sel endotel vaskuler mengekspresikan reseptor permukaan yang baru (molekul adesi) sehingga permukaan sel endotel menjadi adesif. *Tumor necrosis factor alpha* (TNF- α) juga menyebabkan peningkatan kemampuan adhesif netrofil terhadap sel endotel. Jika

produksi TNF- α berlebihan maka akan diproduksi sitokin. Dalam jumlah yang berlebihan TNF- α juga merangsang aktivitas sistem koagulasi dengan mengubah keseimbangan aktivitas prokoagulan dan antikoagulan. Selain itu TNF- α menyebabkan gangguan pada metabolisme. *Reactive Oxygen Species* (ROS) dapat menyebabkan ekspresi TNF- α meningkat sampai bahkan dapat menyebabkan nekrosis jaringan (Gallin, 2008).

Respons imun inflamasi yang dihasilkan dapat mengakibatkan efek siliotoksik, peningkatan sekresi mukus, akumulasi sel inflamasi di saluran napas dan saluran reproduksi. Bahan yang langsung dapat menimbulkan kerusakan pada epitel saluran napas dan saluran reproduksi (misalnya komponen asam, amonia, aldehida). Efek kronik yang ditimbulkan oksidan pada testis mengakibatkan kerusakan jaringan epitel (Gambar 2.3) (Behr, 2012).



Gambat 2.3 Metabolisme *Reactive Oxygen Species* (ROS) (Behr, 2012).

Secara fisiologis, organ pernafasan dan reproduksi memiliki zat antioksidan alamiah seperti protein serum, transferin, seruloplasmin, laktoferin, taurin, vitamin C dan E, glutation (GSH), serta enzim SOD dan katalase (Behr, 2012).

2.7 Taksonomi Anggur



Gambar 2.5 Buah anggur (*Vitis vinifera*) (Monagas, *et al.*, 2003).

Kingdom	: Plantae
Subkingdom	: Tracheobionta
Super Divisi	: Spermatophyta
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Sub Kelas	: Rosidae
Ordo	: Rhamnales
Famili	: Vitaceae
Genus	: <i>Vitis</i>
Spesies	: <i>Vitis vinifera</i> L. (Monagas, <i>et al.</i> , 2003).

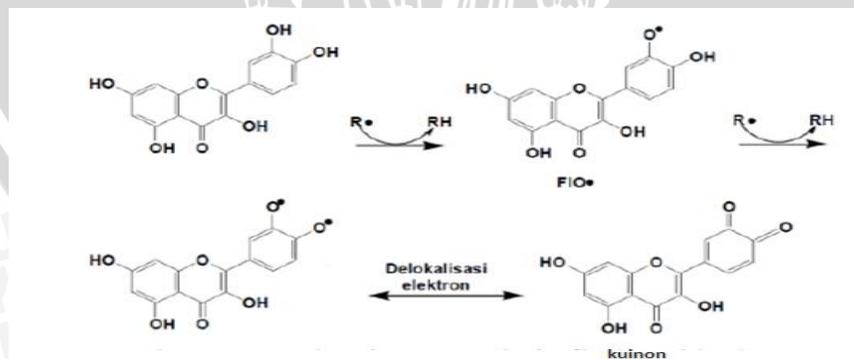
Anggur adalah tanaman asli daerah Eropa dan Mediterania dan merupakan pohon berkayu dari genus "*Vitis*". Gambar 2.4 menjelaskan warna buah ini dihasilkan

karena adanya pigmen poli-fenol di dalamnya. Anggur yang berwarna merah atau ungu kaya antosianin sedangkan yang berwarna hijau mengandung lebih banyak tanin, khususnya *Proanthocyanidins, catechin*. Menariknya senyawa antioksidan yang padat terkonsentrasi pada kulit dan bijinya (Lampiran 9)(Monagas, *et al.*, 2003).

2.7.1 Manfaat biji anggur (*Vitis vinifera*)

Anggur memiliki banyak manfaat kesehatan karena mengandung berbagai jenis senyawa metabolit sekunder, terutama golongan flavonoid dan antosianin, serta resveratrol. Penelitian lain mengungkapkan bahwa senyawa aktif di dalam biji anggur mengandung banyak senyawa antioksidan yang daya kerjanya lebih kuat daripada vitamin C dan vitamin E yaitu proanthocyanidins (Singh, *et al.*, 2006).

Flavonoid umumnya terdapat pada tumbuhan sebagai glikosida, gugusan gula bersenyawa pada satu atau lebih grup hidroksil fenolik. Flavonoid merupakan golongan senyawa fenol terbesar sebagai kandungan khas tumbuhan hijau. Flavonoid terdapat pada seluruh bagian tanaman termasuk pada daun, tangkai, buah, dan akar (Gambar 2.5).



Gambar 2.5 Reaksi flavonoid sebagai antioksidan(Rahma dkk., 2011).

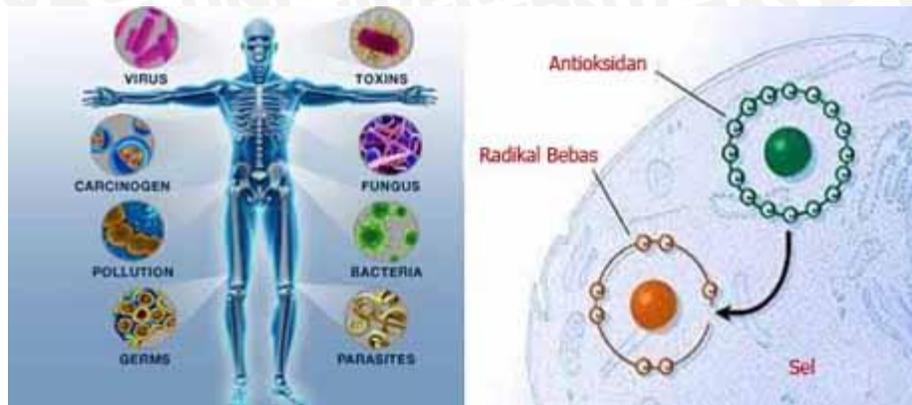
Flavonoid berperan dalam menghambat dan menurunkan aktivitas stres oksidatif. Aktivitas stres oksidatif yang dihambat adalah generasi *reactive oxygen species* (ROS) dengan cara mendonasikan atom hidrogen (H) dari gugus hidroksil (OH) kepada radikal bebas sehingga flavonoid berubah menjadi radikal bebas fenoksil flavonoid kemudian akan diserang kembali oleh radikal bebas. Flavonoid akan menyumbangkan kembali atom H nya lagi untuk menetralkan ikatan rangkap yang dimiliki oleh radikal bebas (Singh, *et al.*, 2006).

Menurut Shearer (2010), flavonoid mampu memberikan atom hidrogen (H) dari gugus hidroksil (OH) kepada radikal bebas (R) sehingga flavonoid berubah menjadi radikal fenoksil flavonoid (FIO*). Sedangkan radikal fenoksil memiliki ikatan rangkap terkonjugasi sehingga tidak menimbulkan radikal bebas dan lebih stabil. Flavonoid juga efektif sebagai *scavenger* radikal bebas peroksil (ROO*), dan radikal hidroksil (OH*) akan diregenerasi menjadi H₂O. Hasil dari regenerasi tersebut bersifat lebih stabil (Astuti, 2008).

2.8 Antioksidan

Antioksidan dapat menghambat atau memperlambat radikal bebas dalam tubuh melalui dua cara yaitu (Gambar 2.6) :

- Melalui penangkapan radikal bebas (*free radical scavenging*). Antioksidan jenis ini disebut sebagai antioksidan primer
- Mengubah hidroperoksida menjadi spesies non radikal, menyerap sinar ultraviolet (Singh, *et al.*, 2006).



Gambar 2.6 Mekanisme antioksidan dalam menghambat oksidasi dalam tubuh (Singh, *et al.*, 2006).

Antioksidan merupakan zat yang dibutuhkan oleh tubuh yang secara umum dapat menghambat oksidasi lemak. Dalam tubuh manusia terdapat radikal bebas, sebagai sampingan dari proses pembentukan energi. Pada jumlah tertentu, radikal bebas dibutuhkan agar dapat membantu sel darah putih atau leukosit untuk menghancurkan bakteri yang masuk ke dalam tubuh (Singh, *et al.*, 2006).

Ada dua cara dalam mendapatkan antioksidan, yaitu :

1. Dari luar tubuh (eksogen) dengan cara melalui makanan dan minuman yang mengandung vitamin C, E, atau betakaroten.
2. Dari dalam tubuh (endogen), yakni dengan enzim superoksida dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH Px), peroxidase, dan katalase yang diproduksi oleh tubuh sebagai antioksidan (Singh, *et al.*, 2006).

Mekanisme kerja antioksidan menetralkan radikal bebas dalam tubuh dengan cara struktur kimia flavonoid menyumbangkan atom H pada radikal bebas sehingga terbentuk radikal bebas flavonoid pada gugus fenoksil yang kemudian akan diserang

oleh radikal bebas lagi dan flavonoid akan menyumbangkan atom H nya lagi sampai ikatan rangkap yang dimiliki radikal bebas tersebut terkonjugasi (Singh, *et al.*, 2006).

2.9 Asap Rokok

Menurut Organisasi Kesehatan Dunia (WHO, 2012), lingkungan asap rokok adalah penyebab berbagai penyakit, dan juga dapat mengenai orang sehat yang bukan perokok. Paparan asap rokok yang dialami terus-menerus pada orang dewasa yang sehat dapat menambah resiko terkena penyakit paru-paru, penyakit jantung, impoten, dan infertilitas pada sperma sebesar 20 – 30 %. Asap rokok juga menyebabkan iritasi mata dan saluran hidung bagi orang yang berada di sekitarnya dan mempunyai resiko kematian yang sama pada perokok aktif.

Asap rokok mengandung sekitar 4000 senyawa, antara lain nikotin, tar dan 3,4-benzopiren, karbon monok-sida, karbon dioksida, nitrogen oksida, amonia, Nikotin. Nikotin dalam asap rokok yang masuk ke paru-paru dengan cepat diabsorpsi dari paru-paru ke dalam darah dan efisiensinya hampir sama dengan apabila diberikan secara intravena. Senyawa ini mencapai otak dan merusak spermatozoa dalam waktu 8 detik setelah pemaparan (Gilman, 2001).

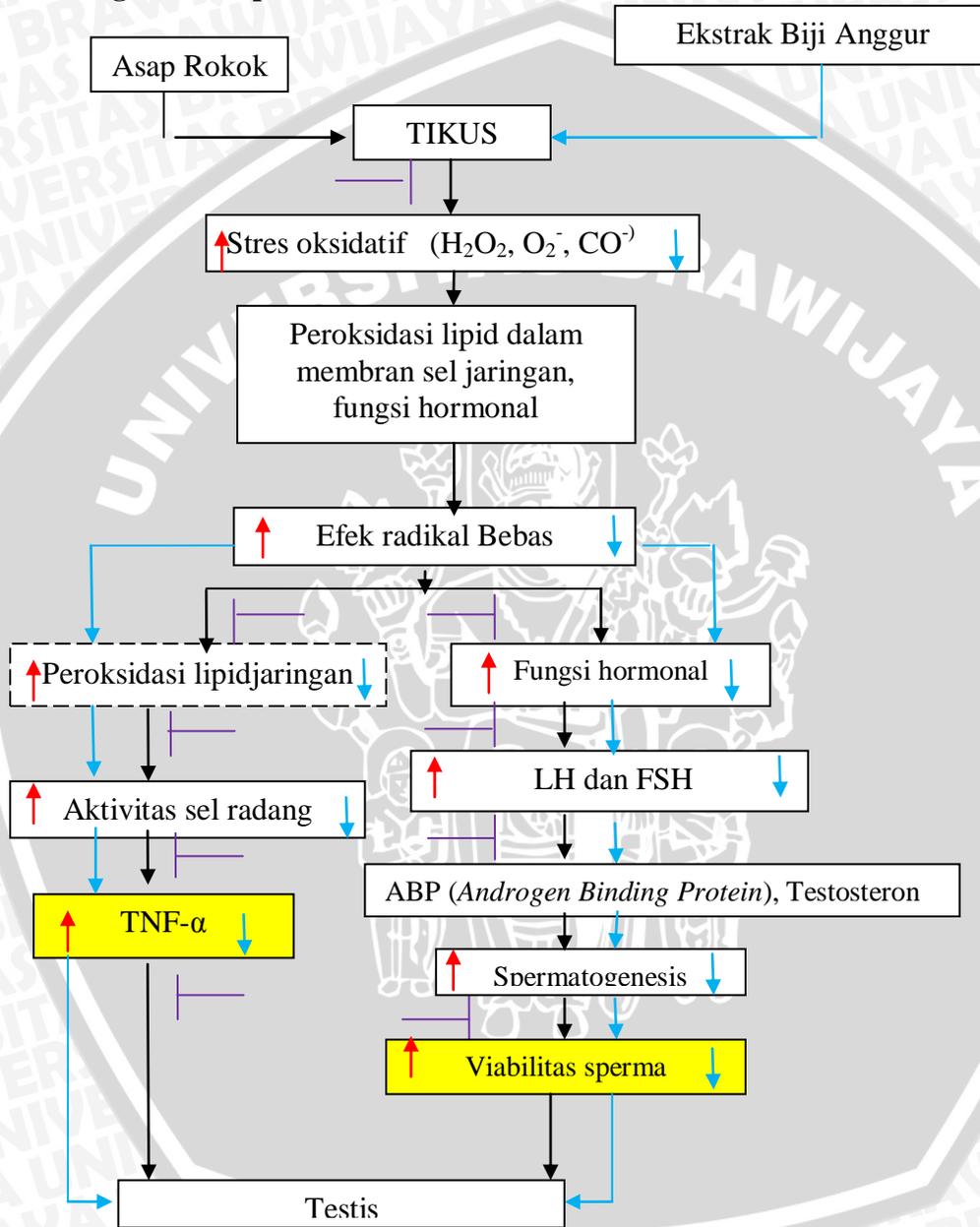
2.10 Patomekanisme Kerusakan Jaringan Akibat Radikal Bebas Asap Rokok Non Filter

Organ reproduksi dapat rusak oleh radikal bebas dengan cara radikal bebas masuk kedalam tubuh kemudian bercampur kedalam darah, yang mana darah akan diedarkan keseluruh tubuh dan ke otak. Radikal bebas yang terbawa dalam peredaran darah akan diteruskan melalui membran plasma yang kemudian akan mestimulus pituitari anterior untuk meningkatkan sekresi *Luteinizing Hormon (LH)* dan *Folicle stimulating Hormone (FSH)*. *Luteinizing Hormon (LH)* yang disekresi akan menstimulus sel leydig pada testis sehingga memproduksi testosteron. *Folicle stimulating Hormone (FSH)* yang disekresi oleh pituitari anterior akan menurunkan jumlah sel sertori pada testis pada proses spermatogenesis. Sel sertoli merupakan tempat spermatozoa memperoleh nutrisi. Radikal bebas dalam kajian infertilitas pada hewan coba merusak spermatozoa dengan cara merusak akrosom pada kepala spermatozoa kemudian menyerang inti sel tempat DNA berada (Hafez, 2000).

Sperma yang dirusak ROS ini akan mengalami kematian karena kerusakan yang disebabkan oleh ROS ini bersifat degeneratif. Pengamatan menggunakan eosin blue terlihat kepala sperma berwarna biru kehitaman karena pigmen akrosom berupa enzim hialuronidase dan akrosin telah dirusak oleh ROS sehingga dalam pewarnan sperma yang mati akan menyerap warna. Kerusakan jaringan dalam testis oleh ROS melalui mekanisme dimana ROS akan merusak jaringan epitel testis. Kemudian ROS mengaktifasi sel T CD4+, Sel T CD4+ akan mengaktifkan makrofag pada sel sertoli. Makrofag akan memproduksi sitokin proinflamasi TNF- α dalam proses kerusakan jaringan (Stockham, 2008).

BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

3.1 Kerangka Konsep



Gambar 3.1 Kerangka konseptual

Keterangan :
 : Parameter yang Diteliti
 ▼ : Induksi, efek
 ⬇ : Terapi Antioksidan
 : Penurunan
 ⬆ : Hambatan
 ⬆ : Peningkatan

Asap rokok mengandung sekitar 4000 senyawa, antara lain nikotin, tar dan 3,4-benzopiren, karbon monoksida, karbon dioksida, nitrogen oksida, amonia, Nikotin. Pemaparan asap rokok secara terus-menerus akan meningkatkan stres oksidatif dalam tubuh. Hal ini dapat menyebabkan kerusakan jaringan melalui mekanisme perusakan lipid, hormonal dan DNA mengalami kerusakan. Kerusakan sel-sel tersebut dapat mengakibatkan terjadinya reaksi peradangan atau inflamasi. Proses ini diawali dengan proses pelepasan sitokin proinflamasi seperti TNF- α , yang akan menstimulasi reaksi peradangan. Akibatnya disaluran reproduksi terjadi proses inflamasi.

Rangsangan asap rokok non filter yang diberikan secara terus menerus dalam tubuh akan diteruskan melalui membran plasma, aliran darah yang kemudian akan memstimulus hipotalamus yang akan menghasilkan *Gonadotropin hormone* (GnRH) untuk merangsang anterior pituitary menghasilkan *Luteinizing Hormon* (LH) dan *Folicle stimulating Hormone* (FSH). *Luteinizing Hormon* (LH) akan merangsang sel Leydig untuk menghasilkan hormon testosteron. *Folicle stimulating Hormone* (FSH) merangsang sel sertoli, sel sertoli merupakan tempat spermatozoa memperoleh nutrisi, sel sertoli menghasilkan ABP (*Androgen Binding Protein*) yang akan memacu spermatogonium untuk memulai proses spermatogenesis. Induksi asap rokok non filter dapat menurunkan kualitas spermatozoa, khususnya daya tahan hidup sperma (viabilitas) setelah keluar dari testis untuk mencapai sel telur karena fungsi hormon reproduksi yang menurun.

Menurunnya hormon reproduksi dikarenakan hormon FSH dan LH yang dihasilkan anterior pituitary rendah. Induksi asap rokok dapat meningkatkan ekspresi TNF- α pada organ testis karena peroksidasi lipid dalam membran sel jaringan telah dirusak oleh ROS, dan ROS akan mengaktifkan makrofag pada sel sertoli sehingga sitokin proinflamasi diproduksi. Adanya ekspresi disekitar sel sertoli juga akan mempengaruhi spermatozoa dalam memperoleh nutrisi dari sel sertoli.

Antioksidan utama dalam biji anggur adalah *proanthocyanidin* bekerja optimal dengan cara memberikan atom hydrogen (H) kepada radikal bebas yang menyebabkan radikal bebas menjadi kurang reaktif. Antioksidan juga dapat menyeimbangkan antara sistem pertahanan tubuh dan radikal bebas sehingga stress oksidatif dapat diturunkan. Stres oksidatif menurun maka kerusakan protein, lipid, DNA dan penurunan fungsi hormon reproduksi juga akan menurun yang pada akhirnya dapat menurunkan kerusakan pada spermatozoa, sehingga viabilitas sperma akan meningkat. Ekspresi *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- α) pada jaringan testis disekitar sel sertoli yang merupakan faktor inflamasi dapat diminimalisir.

3.2 Hipotesis

1. Pemberian ekstrak biji anggur dapat meningkatkan viabilitas spermatozoa tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diberi paparan asap rokok.
2. Pemberian ekstrak biji anggur dapat menurunkan ekspresi *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF α) pada organ testis tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang di beripaparan asap rokok.

BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan September 2013 sampai dengan bulan April 2014 di Laboratorium Fisiologi Hewan dan Laboratorium Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya, Malang.

4.2 Populasi dan Sampel

4.2.1 Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) yang diperoleh dari Unit Pengembangan Hewan Percobaan (UPHP) Universitas Gadjah Mada, tidak ada abnormalitas dan dalam kondisi sehat serta ditandai dengan gerakan yang aktif.

4.2.2 Sampel (Kusriningrum, 2008).

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

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

$$5n-5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Keterangan :

t= jumlah perlakuan

n = jumlah pengulangan

4.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental laboratorik dan rancangan penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Sampel penelitian menggunakan tikus jantan spesies *Rattus norvegicus* jantan *Strain* wistar berumur 12 minggu dengan berat badan sekitar 200 gram sebagai hewan coba. Pemilihan tikus (*Rattus norvegicus*) sebagai objek kajian dikarenakan tergolong hewan mamalia dengan umur dewasa kelamin yang tidak lama serta perkawinannya tidak tergantung musim (Hendriksen, *et al.*, 1991). Adapun variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah :

Variabel bebas : Induksi asap rokok dan ekstrak biji anggur

Variabel terikat : Viabilitas spermatozoa dan ekspresi TNF- α

Variabel kontrol : Jenis kelamin, umur, berat badan tikus, pakan, minum dan kandang.

Pembagian kelompok tikus dilakukan setelah aklimatisasi selama 7 hari kemudian tikus dikelompokkan kedalam 5 kelompok perlakuan. Kelompok 1 kelompok kontrol sehat yang selama perlakuan hanya diberi pakan normal. Kelompok P1 kontrol sakit tikus pada kelompok ini selain diberi pakan normal juga di induksi asap rokok setiap hari. Kelompok P2 merupakan kelompok terapi ekstrak biji anggur dengan dosis 0,9 mg/ekor. Kelompok P3 kelompok tikus terapi dengan dosis 2,7 mg/ekor ekstrak biji anggur. Kelompok P4 kelompok tikus terapi 5,4 mg/ekor ekstrak biji anggur. Kerangka operasional penelitian ini seperti pada

Lampiran 3. Pengelompokkan tikus (*Rattus norvegicus*) dalam penelitian ini dapat dilihat pada rancangan penelitian seperti pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1 Rancangan penelitian yang digunakan

Kelompok	Keterangan	Variabel yang Diamati	
		Viabilitas sperma	Ekspresi TNF- α
Kontrol negatif/sehat (P0)	Tanpa perlakuan		
Kontrol positif (P1)	Pemaparan asap rokok 2 batang setiap hari.		
Perlakuan 1 (P2)	Pemaparan asap rokok 2 batang setiap hari, terapi ekstrak biji anggur (<i>Vitis vinifera</i>) dengan dosis 0,9 mg/ekor.		
Perlakuan 2 (P3)	Pemaparan asap rokok 2 batang setiap hari. Terapi ekstrak biji anggur (<i>Vitis vinifera</i>) dengan dosis 2,7 mg/ekor.		
Perlakuan 3 (P4)	Pemaparan asap rokok 2 batang setiap hari. Terapi ekstrak biji anggur (<i>Vitis vinifera</i>) dengan dosis 5,4 mg/ekor.		

4.4. Definisi Operasional

1. Paparan Asap Rokok

Rokok yang digunakan adalah rokok jenis non filter. Rokok ini mengandung kadar senyawa Tar 39 mg/ 2 batang dan Nikotin 2,3 mg/ 2 batang. Pemaparan asap rokok 2 batang setiap hari untuk setiap kelompok perlakuan selama 14 hari, dan setiap pemaparan 2 batang rokok akan dihabiskan dalam waktu 15 menit (Fowles, 2000).

2. Dosis ekstrak biji anggur

Pada manusia, dosis ekstrak biji anggur efektif sebagai antioksidan sebesar 50 – 300 mg/hari (Kusumawati, 2004).

Dosis I (kelompok tikus perlakuan 2)

$$= 50 \text{ mg} \times 0,018$$

$$= 0,9 \text{ mg/ekor} \times 6 \text{ ekor}$$

$$= 5,4 \text{ mg/hari}$$

Dosis II (kelompok tikus perlakuan 3)

$$= 150 \text{ mg} \times 0,018$$

$$= 2,7 \text{ mg/ekor} \times 6$$

$$= 16,2 \text{ mg/hari}$$

Dosis III (kelompok tikus perlakuan 4)

$$= 300 \text{ mg} \times 0,018$$

$$= 5,4 \text{ mg/ekor} \times 6$$

$$= 32,4 \text{ mg/hari}$$

4.5 Alat dan Bahan

Alat yang dipergunakan dalam penelitian ini diantaranya adalah; Timbangan, kandang tikus, smoking pump, alat bedah dan papanbedah, *objekglass*, cawan petri, pipet tetes, pengaduk kaca, tabung polipropilen, vortex, autoclave, mikropipet, mikrotube, *disposable syringe*, mikroskop olympus BX51, tabung reaksi, timer, lemari pendingin.

Bahan yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) umur 12 minggu dengan berat badan 175-200 gram, rokok nonfilter 112 batang, aquades,

pakan tikus, Alkohol 70%,80%,90%,100%, NaCl fisiologis, antibodi primer (anti *Rat* TNF – α), antibodi sekunder berlabel biotin (*Anti Rabbit IgG biotin labeled*), larutan PBS, PFA 4 %, H₂O₂ (Hidrogen Peroksida 3%), *Fetal bovine serum* (FBS), *Strep Avidin Horse Radish Peroxidase* (SA-HRP), *Diamino benzidine* (DAB), Entellan, dan xylol.

4.6. Ekstrak biji anggur

Biji buah anggur yang digunakan dalam penelitian ini adalah biji buah anggur dari jenis anggur hijau yang diambil dari kota malang. Tahapan yang dilakukan yang pertama dipisahkan biji dari daging buahnya. Biji anggur kemudian dikeringkan di tempat teduh dengan suhu udara 25 °C selama 14 hari. Biji anggur yang kering kemudian digiling sampai menjadi serbuk halus, kemudian dimaserasi dengan aquades 100 ml selama 5 jam, hingga diperoleh 12 ml ekstrak yang banyak mengandung *phroanthocyanidin* (Singh. 2000).

4.7. Pengambilan Organ Testis Tikus

Pada penelitian ini tikus satu per satu didislokasi leher untuk dikoleksi organ yang akan diteliti beserta sampel darah sesuai dengan peraturan etik penelitian. Pada parameter viabilitas spermatozoa dan ekspresi TNF- α organ yang diambil adalah testis. Testis diambil beserta epididimisnya pertama-tama. Pengambilan organ testis ini dilakukan dengan mengeluarkan testis dexter dan sinister dari skrotum dan dicuci

dengan NaCl fisiologis 0,9 % dan direndam dalam larutan *Paraformaldehida* (PFA) 4% untuk pembuatan preparat histologi (Sirois, 2005).

4.7.1. Pembuatan Preparat Imunohistokimia (Jusuf, 2009).

Langkah – langkah dalam proses pembuatan preparat yaitu :

Preparat testis direndam kedalam xylol I, xylol II, etanol bertingkat (100%,90%,80%,70%), dan aquades secara berurutan,masing-masing direndam selama 5 menit. Dicuci dalam PBS selama 3 x 5 menit. Ditetesi H₂O₂ 3% selama 20 menit, dicuci dengan PBS selama 3 x 5 menit. Direndam dalam 5% BSA dalam PBS selama 30 menit dan dicuci dalam PBS selama 3 x 5 menit. Preparat kemudian direaksikan dengan antibodi primer (*AntiRat TNF- α*) selama 24 jam dengan suhu 4°C dan dilakukan pencucian kembali dengan PBS pH 7,4 selama 3 x 5 menit. Langkah selanjutnya diinkubasi dengan antibodi sekunder berlabel biotin (*Anti Rabbit IgG biotin labeled*), selama 1 jam dengan suhu ruang. Dicuci kembali dengan PBS pH7,4 selama 3 x 5 menit.

Preparat ditetesi dengan SA-HRP (*Strep avidin horse radish peroxidase*) selama 40 menit dengan suhu ruang. Kemudian dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 selama 3 x 5 menit. Substrat DAB (*Diamano benzidine*) ditambahkan dan diinkubasi selama 10 menit lalu dicuci kembali dengan PBS pH7,4 selama 3 x 5 menit. Selanjutnya *counterstaining* menggunakan *hematoxylen* selama 5 menit lalu preparat dicuci dengan air mengalir. Dibilas dengan aquades dan dikeringkan. Tahapan yang

terakhir di *mounting* dengan *entellan* dan ditutup dengan *cover glass*. Lalu diamati menggunakan mikroskop olympus BX51 dari perbesaran 100x dan dilanjut ke perbesaran 400x.

Penelitian ini menggunakan dua jenis antibodi, yaitu antibodi primer (Anti Rat TNF- α) yang akan berikatan dengan antigen di dalam jaringan dan antibodi sekunder berlabel biotin (*Anti Rabbit IgG biotin labeled*) yang akan mengenali ikatan antar antigen jaringan dengan antibodi primer. Pemberian enzim berupa SA-HRP (*Streptavidin horse radish peroxidase*) dilakukan setelah pemberian kedua jenis antibodi. Ikatan antigen-antibodi primer- antibodi sekunder berlabel biotin akan berikatan dengan streptavidin yang berasal dari SA-HRP. Afinitas streptavidin terhadap biotin jauh lebih tinggi dibandingkan dengan avidin, karena streptavidin memiliki empat binding site sehingga mampu mengikat empat molekul biotin sehingga intensitas warna sel positif akan lebih kuat (Jusuf, 2009).

Adanya enzim HRP yang juga berasal dari SA-HRP pada ikatan kompleks antigen-antibodi akan menyebabkan terjadinya perubahan warna pada saat diberikan substrat. Substrat yang digunakan dalam metode ini adalah romogen DAB sehingga sel yang mengandung TNF- α akan terlihat coklat pada sitoplasmanya sedangkan pada sel yang tidak mengandung TNF- α tidak akan ditemukan warna coklat.

4.8.Perhitungan Spermatozoa

Sperma yang berada dalam testis dan epididimis dikeluarkan pada *objek glass*. Kemudian ditetesi larutan eosin blue dan ditutup dengan *cover glass* lalu diamati di

bawah mikroskop (Fiser,*et al.*,2007).Pemeriksaanviabilitas dilakukan dengan mengamati kepala spermatozoa,bila warna transparan berarti sperma masih hidup dan yang mati pada daerah kepala berwarna hitam. Pengamatan dibawah mikroskop minimal menggunakan 4 lapang pandang dengan perbesaran 10 okuler x 40 objektif.Nilai viabilitas spermatozoa dinyatakan dalam persen dengan perhitungan menurut Riwantoro (2002):

$$\text{Viabilitas spermatozoa} = \frac{\text{jumla hspermatozoayang hidup}}{\text{jumla hsampelyangmati}} \times 100 \%$$

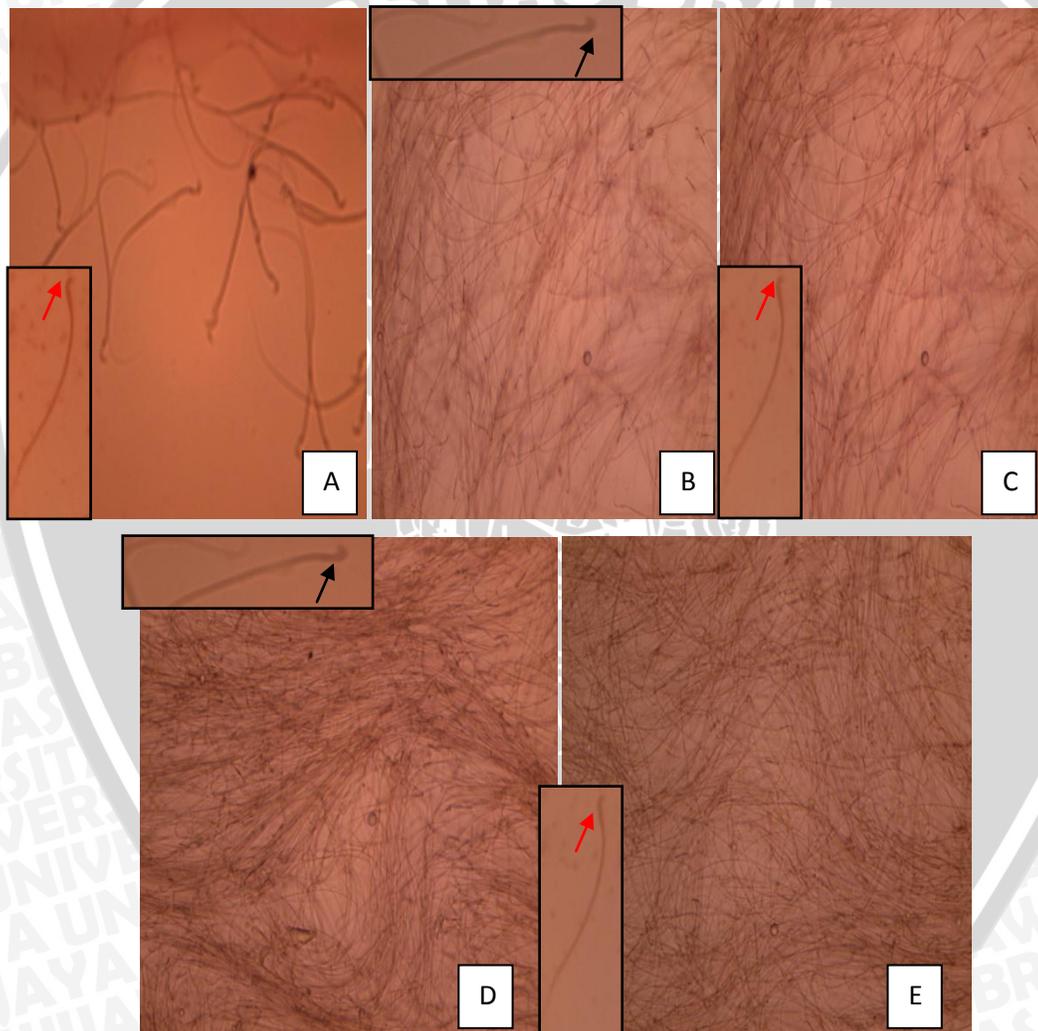
4.9Analisa Data

Hasil pengamatan preparat viabilitas sperma dan imunohistokimia testis dimati secara kualitatif menggunakan mikroskop cahaya Olympus BX51 perbesaran 100x dilanjut perbesaran 400x kemudian dilanjutkan pengamatan secara kuantitatif. Pengamatan viabilitas spermatozoa dan ekspresi *Tumor necrosis factor alpha* (TNF- α) yang dilakukan dengan menggunakan 4 lapang pandang dibawah mikroskop. Data kuantitatif *Tumor necrosis factor alpha* (TNF- α) kemudian dianalisa dengan program *axio vision*. Data statistik viabilitas sperma dan ekspresi TNF- α dianalisis dengan One Way Anova pada SoftwareSPSS 16.0 *For Windows*,apabila terdapat perbedaan nyata uji dilanjutkan dengan perbandingan berganda uji Tukey atau Beda Nyata Jujur (BNJ) $\alpha = 5 \%$ (Kusriningrum, 2010).

BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Pengaruh Ekstrak Biji Anggur Pasca Paparan Asap Rokok Non Filter Terhadap Viabilitas Spermatozoa Tikus (*Rattus norvegicus*) jantan

Viabilitas spermatozoatikus (*Rattus norvegicus*) jantan pasca paparan asap rokok dan mendapat terapi ekstrak biji anggur dengan metode pengamatan langsung (Gambar 5.1).



Gambar 5.1 Viabilitas spermatozoa tikus (*Rattus norvegicus*) jantan pasca paparan asap rokok dan mendapat terapi ekstrak biji anggur dengan menggunakan perbesaran 400x

Keterangan :A = testis kontrol sehat; B= testis kontrol positif; C= testis perlakuan terapi 1 dengan dosis 0,9 mg biji anggur; D= testis perlakuan terapi 2 dengan dosis 2,7 mg biji anggur; E= testis perlakuan terapi 3 dengan dosis 5,4 mg biji anggur(mati, ➤ hidup).

Hasil pengamatan secara langsung terhadap viabilitas spermatozoa tikus putih jantan menggunakan pewarnaan eosin blue, setelah apusan sperma diatas objek glass. Pengamatan dilakukan secara langsung dengan menggunakan mikroskop olympus BX51 pada perbesaran 400x. Perbesaran ini morfologi sperma terlihat jelas dan kepala sperma terwarnai biru menunjukkan spermatozoa mati, sedangkan yang tidak terwarnai menunjukkan spermatozoa hidup pada Gambar 5.1. Kepala sperma yang terwarnai dikarenakan akrosom telah dirusak oleh ROS sehingga bila diwarnai sperma akan menyerap warna.

Hasil perhitungan jumlah sperma tikus (*Rattus norvegicus*) jantan yang hidup dan mati pasca induksi asap rokok didapatkan jumlah rata-rata sperma yang hidup dan mati seperti ditampilkan pada Tabel 5.1.

Tabel 5.1 Hasil perhitungan rata-rata viabilitas spermatozoa dengan menggunakan 4 lapang pandang

Perlakuan	Rata-rata viabilitas spermatozoa	Peningkatan viabilitas spermatozoa (%)*
kontrol negatif (P1)	26,96 ± 1,44 ^a	-
Kontrol positif (P2)	13,38 ± 1,27 ^b	0
Terapi 1 (P3) ekstrak biji anggur 0,9mg/ekor	19,48 ± 1,00 ^c	45,5
Terapi 2 (P4) ekstrak biji anggur 2,7 mg/ekor	23,21 ± 1,36 ^d	73,4
Terapi 3 (P5) ekstrak biji	25,28 ± 1,46 ^{ad}	88,9

anggur 5,4 mg/ekor

Keterangan : Penggunaan notasi menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) antar kelompok perlakuan

*Peningkatan viabilitas spermatozoa dihitung berdasarkan hasil rata-rata viabilitas spermatozoa dibandingkan dengan kontrol positif

Perhitungan jumlah rata-rata viabilitas spermatozoa Tabel 5.1 dilakukan dengan statistika *One Way Anova* yang menunjukkan adanya perbedaan antar perlakuan, dilanjutkan dengan uji BNJ yang menunjukkan hasil berbeda nyata antar perlakuan secara signifikan ($p < 0,05$) (Lampiran 10).

Terapi ekstrak biji anggur dapat meningkatkan viabilitas spermatozoa Tabel 5.1. Pembagian kelompok terbagi dalam lima kelompok yaitu kelompok kontrol perlakuan negatif (P1), kelompok kontrol positif (P2) kelompok yang mendapatkan induksi asap rokok. Kelompok terapi 0,9 mg/ekor (P3) mempunyai prosentase viabilitas spermatozoa 45,5 % dibandingkan dengan kelompok kontrol sakit. Kelompok terapi 2,7 mg/ekor (P4) mengalami peningkatan prosentase viabilitas spermatozoa sebesar 73,4 % dibandingkan dengan kelompok P3. Sedangkan pada kelompok perlakuan terapi 5,4 mg/ekor (P5) mempunyai prosentase 88,9 % mengalami kenaikan sebesar 15,5 % dari kelompok P4 dan 43,4 % dari kelompok P3 kenaikan prosentase pada kelompok terapi ini dikarenakan dosis ekstrak biji anggur pada kelompok P5 lebih banyak sehingga antioksidan yang masuk dalam tubuh semakin banyak untuk menetralkan radikal bebas. Kelompok terapi ekstrak biji anggur 5,4 mg/ekor merupakan kelompok yang memberikan hasil yang optimal dalam meningkatkan viabilitas spermatozoa pasca pemaparan asap rokok.

Kelompok terapi 3 selain dilihat dari prosentase peningkatan spermatozoa dapat dilihat dari notasi statistika Tabel 5.1. Notasi statistika menunjukkan bahwa terapi 3 tidak berbeda nyata dengan kelompok kontrol negatif dikarenakan pengaruh dari produksi sperma yang cukup banyak karena antioksidan yang masuk dalam tubuh mampu meningkatkan produksi FSH dan LH. Viabilitas sperma merupakan salah satu indikator dari kualitas sperma dapat membuahi sel telur atau tidak. Viabilitas adalah daya tahan hidup sperma setelah keluar dari testis hingga mencapai sel telur dalam tubuh betina.

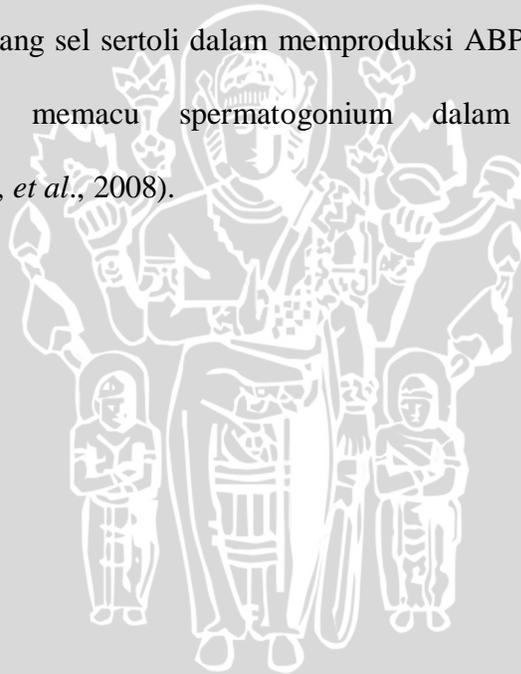
Tahapan spermatozoa disebut spermatogenesis, tahapan ini terbagi menjadi dua yaitu tahap pertama disebut spermatocytogenesis yang dimulai dari spermatogonia berkumpul ditepi membrane basal. Spermatogonia bermigrasi ke arah sentral di antara sel-sel Sertoli. Sel-sel Sertoli mempunyai membran yang kuat berlekatan satu sama lain pada bagian dasar dan sisi, sehingga dapat membentuk lapisan pertahanan yang mencegah penetrasian dari kapiler-kapiler yang mengelilingi tubulus. Proses berikutnya pembelahan secara meiosis. Spermatogonium yang masuk ke dalam lapisan sel-sel Sertoli secara berangsur-angsur membesar untuk membentuk suatu spermatosit primer. Spermatosit primer membelah menjadi spermatosit sekunder. Pembelahan meiosis kedua terjadi, di mana kedua kromatid berpisah pada sentromer. Tahap kedua yaitu perkembangan spermatid menjadi spermatozoa, tahapan ini disebut tahap spermiogenesis (Syahrudin, 1994).

Induksi asap rokok memberikan efek yang cukup besar bagi viabilitas sperma. Radikal bebas (ROS) dari karbon monoksida mempengaruhi sel sertoli yang

berperan sebagai penentu reproduksi sel spermatozoa dan sumber nutrisi bagi sel spermatozoa. Radikal bebas akan merangsang hipotalamus yang akan menghasilkan Gonadotropin hormone (GnRH) untuk merangsang anterior pituitary menghasilkan *Luteinizing Hormon* (LH) dan *Folicle stimulating Hormone* (FSH). *Luteinizing Hormon* (LH) akan merangsang sel Leydig untuk menghasilkan hormon testosteron. *Folicle stimulating Hormone* (FSH) merangsang sel Sertoli, sel Sertoli merupakan tempat spermatozoa memperoleh nutrisi, sel Sertoli menghasilkan ABP (*Androgen Binding Protein*) yang akan memacu spermatogonium untuk memulai proses spermatogenesis. Produksi radikal bebas (ROS) yang berlebihan dapat merusak materi genetik (DNA) yang dibawa oleh spermatozoa. Radikal bebas merusak tahapan spermatogenesis pada tahap spermiogenesis, pada tahap ini spermatozoa yang diselubungi oleh akrosom akan dirusak ROS dengan cara merusak enzim-enzim yang melapisi akrosom sampai nukleus yang berisi materi genetik. Enzim-enzim pada akrosom diantaranya: akrosin, hyaluronidase. Akrosin adalah enzim proteolitik untuk menembus zona pellusida, hyaluronidase untuk menembus cumulus ooforus pada sel telur betina.

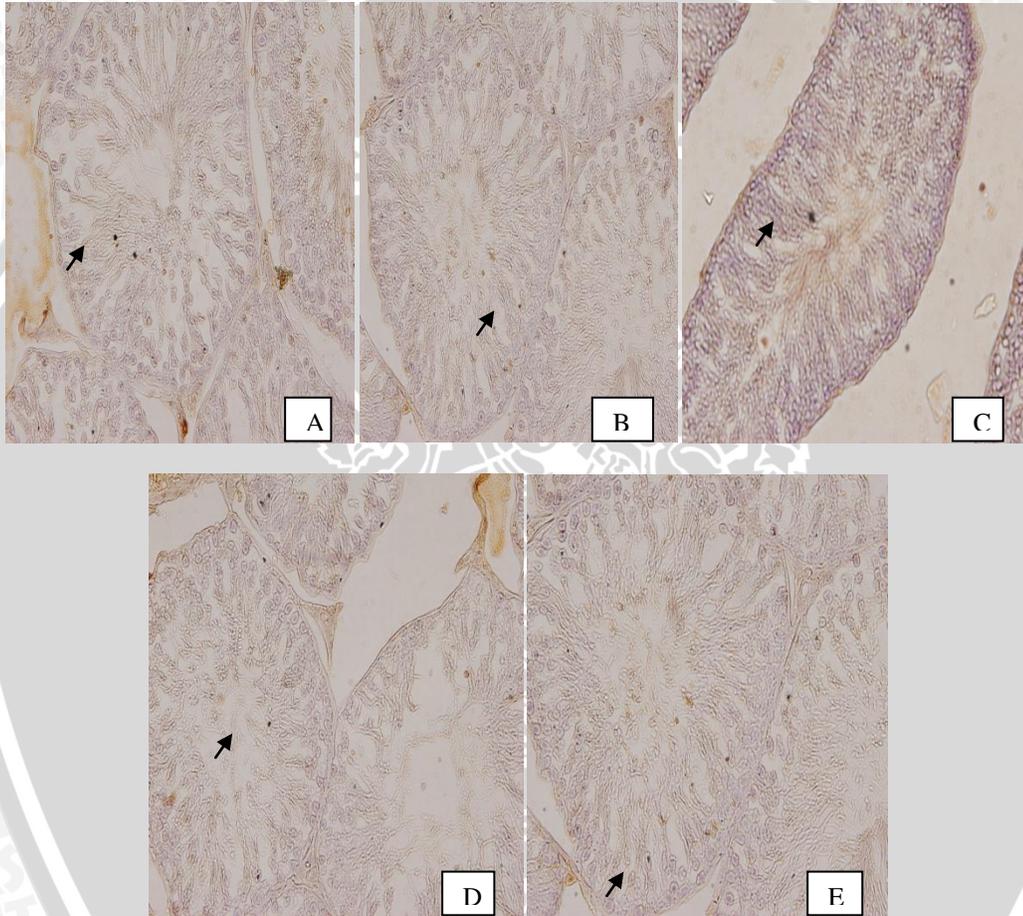
Antioksidan alami yang terdapat dalam biji anggur mengandung banyak flavonid. Pemberian terapi ekstrak biji anggur sebagai antioksidan memberikan efek daya stimulasi yang spontan dan cepat pada hipotalamus. Cara antioksidan masuk ke dalam tubuh melalui peredaran darah ke hipotalamus dan seluruh tubuh. Pada hipotalamus akan menghasilkan hormon GnRH (*Gonadotropin Releasing Hormone*)

yang kemudian akan menstimulus anterior pituitary untuk menghasilkan hormon LH dan FSH. Peningkatan hormon *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) dan *Luteinizing Hormone* (LH) oleh anterior pituitary yang sebelumnya mengalami penurunan akibat karbon monoksida dari asap rokok yang masuk ke dalam tubuh, mempengaruhi kinerja dari hipotalamus untuk menghasilkan GnRH (*Gonadotropin Releasing Hormone*). Peningkatan produksi *Luteinizing Hormone* (LH) akan merangsang sel Leydig untuk lebih banyak memproduksi hormon testosteron. *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) merangsang sel Sertoli dalam memproduksi ABP (*Androgen Binding Protein*) yang akan memacu spermatogonium dalam memulai proses spermatogenesis (Pierick, *et al.*, 2008).



5.2 Pengaruh Ekstrak Biji Anggur Terhadap Ekspresi *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- α) Pada Organ Testis Pasca Paparan Asap Rokok Non Filter

Ekspresi *Tumor Necrosis Factor Alfa* pada organ testis tikus pasca paparan asap rokok dan mendapat terapi ekstrak biji anggur pada Gambar 5.2



Gambar 5.2 Ekspresi *Tumor Necrosis faktor* (TNF- α) pada organ testis pasca paparan asap rokok dan terapi ekstrak biji anggur dengan Perbesaran 400x.

Keterangan : A = testis kontrol negatif; B= testis kontrol positif; C= testis perlakuan terapi 1 dengan dosis 0,9 mg biji anggur; D= testis perlakuan terapi 2 dengan dosis 2,7 mg biji anggur; E= testis perlakuan terapi 3 dengan dosis 5,4 mg biji anggur
(\blacktriangleright ekspresi TNF- α)

Hasil pewarnaan dengan metode *imunohistokimia* (IHK) menunjukkan bahwa adanya ekspresi TNF- α pada setiap perlakuan yang terlihat dengan munculnya warna coklat pada bagian sel sertoli. Gambar 5.2 (A) merupakan kelompok tikus kontrol sehat dimana sel yang terekspresi oleh TNF- α pada sel sertoli sangat sedikit. Gambar 5.2 (B) merupakan tikus kontrol positif yang mana banyak warna coklat pada sel sertoli apabila dibandingkan dengan tikus control negatif. Hal ini dikarenakan TNF- α berupa sitokin meningkat sehingga menunjukkan adanya inflamasi. Gambar 5.2 (C) merupakan kelompok tikus terapi ekstrak biji anggur *vitis vinifera* dosis 0,9 mg/ekor dimana pada kelompok ini terlihat penurunan warna coklat pada sel sertoli dibandingkan dengan tikus kontrol sakit.

Ekstrak biji anggur mampu memberikan efek untuk menurunkan TNF- α . Gambar 5.2 (D) merupakan kelompok terapi ekstrak biji anggur *vitis vinifera* dosis 2,7 mg/ekor. dimana dengan dosis yang lebih besar mampu menurunkan ekspresi TNF- α lebih banyak dari pada gambar kelompok perlakuan C. Gambar (E) merupakan kelompok terapi dengan dosis ekstrak biji anggur *vitis vinifera* dosis 5,4 mg/ekor, dimana pada kelompok terapi ini menunjukkan ekspresi TNF- α yang ditandai dengan adanya warna coklat pada sel sertoli mengalami penurunan dikarenakan pemberian dosis yang lebih tinggi mampu menurunkan ekspresi TNF- α .

Rata – rata ekspresi TNF- α dihitung dengan program *Axio vision* untuk mengetahui berapa prosentase lapang pandang yang terekspresi pada preparat Imunohistokimia yang dilakukan pada penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 5.2.

Tabel 5.2 Hasil perhitungan rata-rata dan penurunan Ekspresi *Tumor necrosis Factor alpha* (TNF- α) testis

Perlakuan	Mean TNF- α \pm SD	Peningkatan ekspresi TNF- α (%)	Penurunan ekspresi TNF- α (%)*
kontrol sehat (P1)	0,72 \pm 0,43 ^a	-	-
Kontrol sakit (P2)	10,82 \pm 1,39 ^b	1402	0
Terapi 1 (P3) ekstrak biji anggur 0,9 mg/ekor	4,28 \pm 1,52 ^c	-	60,4
Terapi 2 (P4) ekstrak biji anggur 2,7 mg/ekor	3,80 \pm 0,82 ^d	-	64,8
Terapi 3 (P5) ekstrak biji anggur 5,4 mg/ekor	1,50 \pm 0,65 ^e	-	86,1

Keterangan : Penggunaan notasi menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) antar kelompok perlakuan.

*Penurunan ekspresi TNF- α dihitung berdasarkan hasil rata-rata ekspresi dan dibandingkan dengan kontrol sakit

Pemberian ekstrak biji anggur *Vitis vinifera* dapat menurunkan ekspresi *Tumor necrosis Factor alpha* pada organ testis. Pada setiap dosis menunjukkan adanya penurunan ekspresi sitokin TNF- α dibandingkan dengan kontrol sakit.

Kelompok terapi 0,9 mg/ekor (P3) mempunyai prosentase ekspresi sebesar 60,4 % dosis yang diberikan merupakan dosis terendah dalam penelitian ini, karena antioksidan yang masuk dalam tubuh dalam jumlah sedikit sehingga belum mampu menetralkan radikal bebas yang masuk dalam tubuh. Kelompok terapi 2,7 mg/ekor (P4) mengalami penurunan ekspresi sebesar 64,8 % dibandingkan dengan kelompok P3 dikarenakan anti oksidan yang masuk dalam tubuh semakin banyak dan radikal bebas yang ternetralkan juga semakin banyak. Sedangkan kelompok terapi 5,7 mg/ekor (P5) mempunyai prosentase ekspresi 86,1 % mengalami penurunan ekspresi 25,7 % dari kelompok P3 dan 21,8 % dari kelompok P4 dosis pada kelompok ini radikal bebas yang ternetralkan semakin banyak oleh anti oksidan yang masuk dalam tubuh. Nilai ekspresi dihitung dengan program axio vision pada preparat testis hasil pewarnaan imunohistokimia. Hasil perhitungan statistika *One Way Anova* (Lampiran 11) menggunakan *SPSS 16.0 For Windows* menunjukkan adanya perbedaan yang nyata dari kelima kelompok perlakuan ($p < 0,05$).

Sitokin TNF- α yang dilepaskan oleh makrofag pada jaringan epitel testis akan meningkat ekspresinya apabila jumlah radikal bebas yang dikenali sebagai antigen oleh tubuh dalam jumlah yang banyak . Kelompok perlakuan terapi 3 dengan dosis ekstrak biji anggur 5,4 mg/ekor merupakan kelompok yang memberikan hasil yang optimal dalam penelitian penurunan ekspresi TNF- α pada organ testis pasca pemaparan asap rokok. Ekspresi TNF- α pada tikus yang diinduksi asap rokok non filter mengalami peningkatan jumlah ekspresi hal ini dikarenakan terlalu banyak pelepasan sitokin TNF- α oleh makrofag pada jaringan epitel testis.

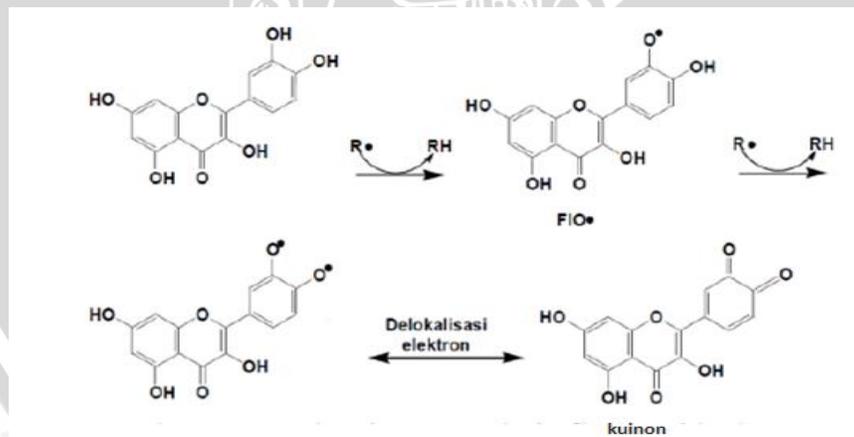
Kerusakan jaringan epitel pada saluran reproduksi terjadi karena adanya sel mediator inflamasi. Proses inflamasi berperan penting pada kerusakan jaringan pada testis. Peningkatan produksi mukus pada testis dapat mengganggu proses dari spermatogenesis. Paparan asap rokok akan mengaktivasi sel T CD4+ pada saluran reproduksi. Sel T CD4+ akan berdeferensiasi menjadi Th2, saat proses diferensiasi akan dihasilkan IL-4 dan IL-5 yang akan dikenali oleh MHC II yang kemudian menghasilkan IFN- γ . IFN- γ akan mengaktifkan makrofag dan kemudian makrofag tersebut akan melepaskan sitokin proinflamasi yaitu TNF- α . Paparan asap rokok mempengaruhi lama inflamasi dan menyebabkan kerusakan struktur epitel yang melapisi organ testis (Green, 2000).

Flavonoid dalam biji buah anggur mampu menghambat dan menurunkan aktivitas stres oksidatif dalam tubuh. Aktivitas stres oksidatif yang dihambat adalah generasi *Reactive oxygen spesies* (ROS) yang merupakan agen pengoksidasi kuat yang dapat merusak sistem pertahanan tubuh karena elektron yang dimiliki banyak tidak berpasangan dan sangat reaktif. Flavonoid dalam biji anggur memberikan atom H pada radikal bebas sehingga radikal bebas yang tidak mempunyai pasangan elektron akan mempunyai pasangan sehingga ikatan rangkap yang dimiliki radikal bebas akan netral. Flavonoid mampu menurunkan ekspresi TNF- α pada organ testis dengan cara mencegah aktifnya makrofag pada sekitar sel sertoli yang memproduksi sitokin proinflamasi sehingga dengan adanya antioksidan menunjukkan kembalinya struktur jaringan epitel pada organ testis dan makrofag pada sel sertoli dapat dicegah pengaktifannya (Singh, *et al.*, 2006).

5.3 Hubungan Antara Dosis Biji Anggur (*Vitis vinifera*) Terhadap Peningkatan Viabilitas Spermatozoa Dan Penurunan Ekspresi *Tumor Necrosis Factor Alpha*(TNF - α) Pada Organ Testis.

Anggur memiliki banyak manfaat kesehatan karena mengandung berbagai jenis senyawa metabolit sekunder, terutama golongan flavonoid dan antosianin, serta resveratrol. Penelitian lain mengungkapkan bahwa senyawa aktif di dalam biji anggur mengandung banyak senyawa flavonoid yang daya kerjanya lebih kuat daripada vitamin C dan vitamin E yaitu proantocyanidins (Singh, *et al.*, 2006).

Flavonoid umumnya terdapat pada tumbuhan sebagai glikosida, gugusan gula bersenyawa pada satu atau lebih grup hidroksil fenolik. Flavonoid merupakan golongan senyawa fenol terbesar sebagai kandungan khas tumbuhan hijau. Flavonoid terdapat pada seluruh bagian tanaman termasuk pada daun, tangkai, buah, biji dan akar Gambar 5.3.



Gambar 5.3 Reaksi flavonoid sebagai antioksidan (Rahmadkk., 2011).

Flavonoid berperan dalam menghambat dan menurunkan aktivitas stres oksidatif. Aktivitas stres oksidatif yang dihambat adalah generasi *reactive oxygen*

species (ROS) dengan cara mendonasikan atom hidrogen (H) dari gugus hidroksil (OH) kepada radikal bebas sehingga flavonid berubah menjadi radikal bebas fenoksil flavonoid kemudian akan diserang kembali oleh radikal bebas. Flavonoid akan menyumbangkan kembali atom H nya lagi untuk menetralkan ikatan rangkap yang dimiliki oleh radikal bebas (Singh, *et al.*, 2006).

kerja antioksidan pendonor atom hidrogen pada reaksi berantai radikal bebas terhadap asam lemak tidak jenuh jamak (PUFA, poly unsaturated fatty acids). Antioksidan pemecah rantai reaksi radikal menjadi produk non-radikal yang lebih stabil. Antioksidan radikal yang terbentuk dari antioksidan pendonor atom hidrogen dapat bereaksi dengan radikal-radikal alkil (R*), alkoksil (RO*), dan peroksil (ROO*) dari PUFA dan membentuk senyawa non-radikal yang stabil (Saputra, 2009).

Dosis ekstrak biji anggur 5,4 mg/ekor yang diberikan pada kelompok terapi merupakan kelompok yang memberikan hasil yang optimal dalam penelitian penurunan ekspresi TNF- α pada organ testis dan peningkatan viabilitas spermatozoa pasca pemaparan asap rokok. Dosis 5,4 mg/ekor merupakan dosis yang banyak memberikan antioksidan didalam tubuh, dengan banyaknya antioksidan yang masuk kedalam tubuh banyak juga radikal bebas yang akan dinetralsir. Radikal bebas dari asap rokok masuk kedalam tubuh perokok pasif sebesar 85 % senyawa toksik yang masuk. Senyawa toksik sebesar 85 % yang masuk kedalam tubuh perokok pasif tidak dapat dinetralsir oleh tubuh sendiri, sehingga dibutuhkan antioksidan yang cukup banyak untuk menetralsirnya. Biji anggur mengandung senyawa flavonoid yang tinggi sebagai antioksidan.

BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

1. Ekstrak biji anggur (*Vitisvinifera*) memberikan pengaruh nyata terhadap peningkatan viabilitas sperma tikus putih (*Rattus norvegicus*) pasca induksi asap rokok. Dosis biji anggur terbaik terhadap peningkatan viabilitas spermatozoa pada pemberian dosis 5,4 mg/ekor.
2. Ekstrak biji anggur (*Vitisvinifera*) memberikan pengaruh nyata terhadap penurunan ekspresi sitokin TNF- α pada organ testis tikus putih (*Rattus norvegicus*) pasca induksi asap rokok. Dosis biji anggur terbaik terhadap penurunan ekspresi sitokin TNF- α pada organ testis pada pemberian dosis 5,4 mg/ekor.

6.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lanjutan tentang bentuk sediaan penggunaan ekstrak biji anggur (*Vitisvinifera*) yang dimanfaatkan untuk hewan khususnya *pet animal*.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, K.A.,A.H. Lichtman., and J.S Pober. 2000. Cytokin in Cellular and MoleculerImmunology 4th ed.Philadelphia, WB Saunders; 233-267.
- Agarwal. A., and T.M .Said. 2005. Oxidative stress, DNADamage and apoptosis in male infertility: a clinicalapproach, *BJU Internat.*95:503-507
- Alaunir, N. 2002.Penentuan Kadar Nikotin dalam Berbagai Merk Rokok yang Beredar di Sumatera Barat. Padang: IKIP
- Aviram, M. 2003. Polyphenolic Flavonoids Content and Antioxidant Activities Of PJ and various Fruit Juices [Pomegranate Juice(PJ), PJ/Blueberry, MOBETA, Orange-Carrot-Banana, Orange-Carrot, Mango, Apple-kiwi, and Tahitian NONI]: a comparative Study. The Lipid Research Laboratory. Technion Faculty. The Rappaport Family Institute for research in the medical science and Rambam medical Center. Haifa. Israel.
- Astuti, S.2008. Isovlavon Kedele dan Potensinya sebagai Penangkap Radikal Bebas. Jurnal Teknologihasil Pertanian Universitas Lampung, Lampung. Volume13, N0.2.
- Baratawidjaja. K.G. 2004. Imunologi Dasar : Sitokin. Balai Penerbit FK-UI. Jakarta.128-131
- Barnes P.J., S.D. Shapiro., and R.A, Pauwels. 2003. Choronic Obstructive reproductive disease: Molecular and Cellular Mechanisms. *European Journal*, 22:672-688.
- Bruce.N., and J.J Ames, "Dietary Carcinogens and Anticarcinogens, Oxygen radicals and degenerative diseases", *Science* V221 N4617 pp1256-1264 2003.
- Calnek, B. 1997. Imunohistokimia.Ames : Jowa State University Press.
- Chen. Z., A.M Trbovich.,J.L Shifren., D.J Dorer., and B.L. Bailey. 2006. Relationship BetweenHuman Semen Characteristics and SpermApoptosis : A Pilot Study.,*J.Androl.*27:1: 112-120
- Cruzan. R.A., G.C Corley., J.JHard., K.E.Mertens., McMartin., W.M. Snellings., R.Gingell., and J.A. Deyo. 2004. *Subchronic Toxicity of Ethylene Glycol in Wistar and F-344 Rats Related to Metabolism and Clearance of Metabolites.* *Toxicological Sciences* 81(2): 502-511.

- Dellman., and H. Dieter. 1992. Buku Teks Histologi Veteriner. Penerbit Universitas Indonesia. Jakarta.
- Dube M.F.,and C.R. Green.2002.Methods of Collection of Smoke Analytical Purposes. Recent Advances in Tobacco Science8: 42-102.
- Fowles. J., and M. Bates. 2000. The Chemical Constituents in Cigarettesand Cigarette Smoke : Priorities For Harm Reduction.Epidemiology and Toxicology Group. ESR ; KenepuruScience Centre. New Zealand.
- Fuadi, A. 2009.*Pengaruh Ekstrak Etanol Daun Alpukat (Persea Americana Mill) Terhadap Gambaran Ureum dan Kreatinin Pada Tikus Jantan Yang diinduksi Etilen Glikol.*[Skripsi]. Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor.
- Gallin, J.I. 2008. *Inflammation in Fundamental Immunology*.Raver Press. London. 721-734.
- Gilman, A.G. 2001. The Pharmacological Basic of Therapeutics, Vol.I, Pergamon Press, Singapore, 180-181, 545-549, 563.
- Green, E.A, and R.A Flavell. 2000. The temporal importance of TNF- α Exspresion in the development of cancer in tates.Journal immunity,12: 459-469
- Hendriksen, C. F. M., and H.B Koeter. 1991. *Animals In Biomedical Research*. Elsevier Science Publiser.Amsterdam.
- Leong.L.P. and G. Shui. 2002 “An investigation of antioxidant capacity of fruitsin Singapore markets”, Food Chemistry 76 :69–75.
- Hafez. ESE.,and B. Hafez. 2000. Reproduction in FarmAnimal (7thed). Lippincott Williams & WikinsUSA. Philadelphia.
- Hidayat, S., Sugati, S., dan R.J. Hutapea, 2001.*Inventaris Tanaman Obat Indonesia I*.Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan. Jakarta.
- Koolhaas, J.M. 2010.*The UFAW Handbook on The Care and Management of Laboratory and Other Research Animals, The Laboratory Rat*, 8th Edition.Wiley Blackwell. Groningen.

- Kusriningrum. 2008. *Perancangan Percobaan*. Airlangga University Press.Surabaya hal 21.
- Kusriningrum. 2010. *Analisa data Percobaan*. Airlangga University Press.Surabaya hal 25.
- Murray, Robbert K., D.K. Granner., and W.V Rodwell. 2009. *Biokimia Herper*, Edisi 27, EGC, Jakarta.
- Nakada K., A. Sato., K. Yoshida., and T. Morita. 2006. *Male Infertility*, PNAS . 103(41): 15148-15153
- Nora, Z. 2007. *Pengaruh Ekstrak Daun Kumis Kucing (Orthosiphon Stamineus Benth) dan Bunga Kenop (Gomphrena Globosa L.) Terhadap Proliferasi Sel Limfosit Tikus*. [Tesis].Sekolah Pasca Sarjana Institut Pertanian Bogor.
- Pietrick, R.H., and H.Dejong.2008. *viability spermatozoon of spermatogenesis*. WB Saunders Company
- Popa, C., M.G. Netea., M. V. Riel., M. Van der meer., and J.W. A. Stalenhoef. 2007. *The role of TNF- α in choric inflamatory condition, intermediary metabolism, and cardiovascular risk*. J Lipid Res 48:751-762
- Potter. W.P.2007. *Rat and Mice: Introduction and use in research*. Health Sciences Center for Education Resorces University of Woshington.
- Rahmah, N. L., Aulanni'am, dan A. Rososdiana. 2011. *Potensi Fraksi Etanol dan Etil Asetat Rumput Laut Coklat (Sargassum duplicatum Bory) Terhadap penurunan kadar Malondialdehid dan perbaikan Gambaran histologis Jejunum Usus Halus Tikus IBD (Inflammatory Bowel Disease)*. *Jurnal Ilmiah Kedokteran Hewan UB Malang*. Vol. 4, No. 1.
- Rantam, F.A. 2003. *Metode Imunologi*. Airlangga University Press. Surabaya.
- Riwantoro. 2002. *Bioteknologi Peternakan*. Media Pengembangan Peternakan. 9:34-49.
- Shearer, P. 2010. *Canine dan feline geriatric health*.Banfield applied research.
- Saputra, A.A.H. 2009. *Uji Aktivitas Anti Lithiasis Ekstrak Etanol Daun Alpukat (Persea americana Mill) Pada Tikus Jantan*. [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Hewan. Institut Pertanian Bogor.

Simon M., R. Joanne.,M. Sarwatt., G.S.Matt., W.W David., C.E. Peter.,C.W Douglas C.,M.S Bernard., R. Doctrow., J.L Gordon., “Extension of Life-Span with Superoxide Dismutase/Catalase Mimetics”, Science V289 N5484 pp1567-1569 2000.

Shah, B.N.,K.D.,Raiyani., and D.C, Modi. 2011. *Antiuro lithiatic Activity Studies of Memordica charantia Linn Fruits*. International Journal of Pharmacy Research and Technology 1(1): 6-11.Superoxide Dismutase/Catalase Mimetics”, Science V289 N5484 pp1567-1569 2000.

Singh, D., R., Kaur.,V. Chander., and K. Chopra. 2006. *Antioxidants in The Prevention and inflamation from oxidative stress of Renal Disease*.Journal Medicine Food 9(4): 443–450.

Sirait.2007. *Penuntun Fitokimia dalam Farmasi*. Institut Teknologi Bandung Press. Bandung.

Sirois, M. 2005. *Laboratory Animal Medicine: Principles and Procedures*. Elsevier. United States of America.

Stuenke. C.A.1991. *Neural Regulation of pituitary fencion*.Mc Grow-hill.New York.

Stockham, S.L.,and M.A, Scott. 2008. *Fundamental of Veterinary Clinical Pathology*, 2nd Edition. Blackwell Publishing. Iowa.

Suckow, M.A., S.H.Weisbroth., and C.L Franklin. 2006. *The Laboratory Rat*. Elsevier. San Diego.

Sukmaningsih.2009. Penurunan Jumlah Spermatisit Pakiten dan Spermatisid Tubulus Seminiferus Testis pada Mencit (*Mus musculus*) yang Dipaparkan Asap Rokok.*Jurnal Biologi* 8 (2) : 31–35.

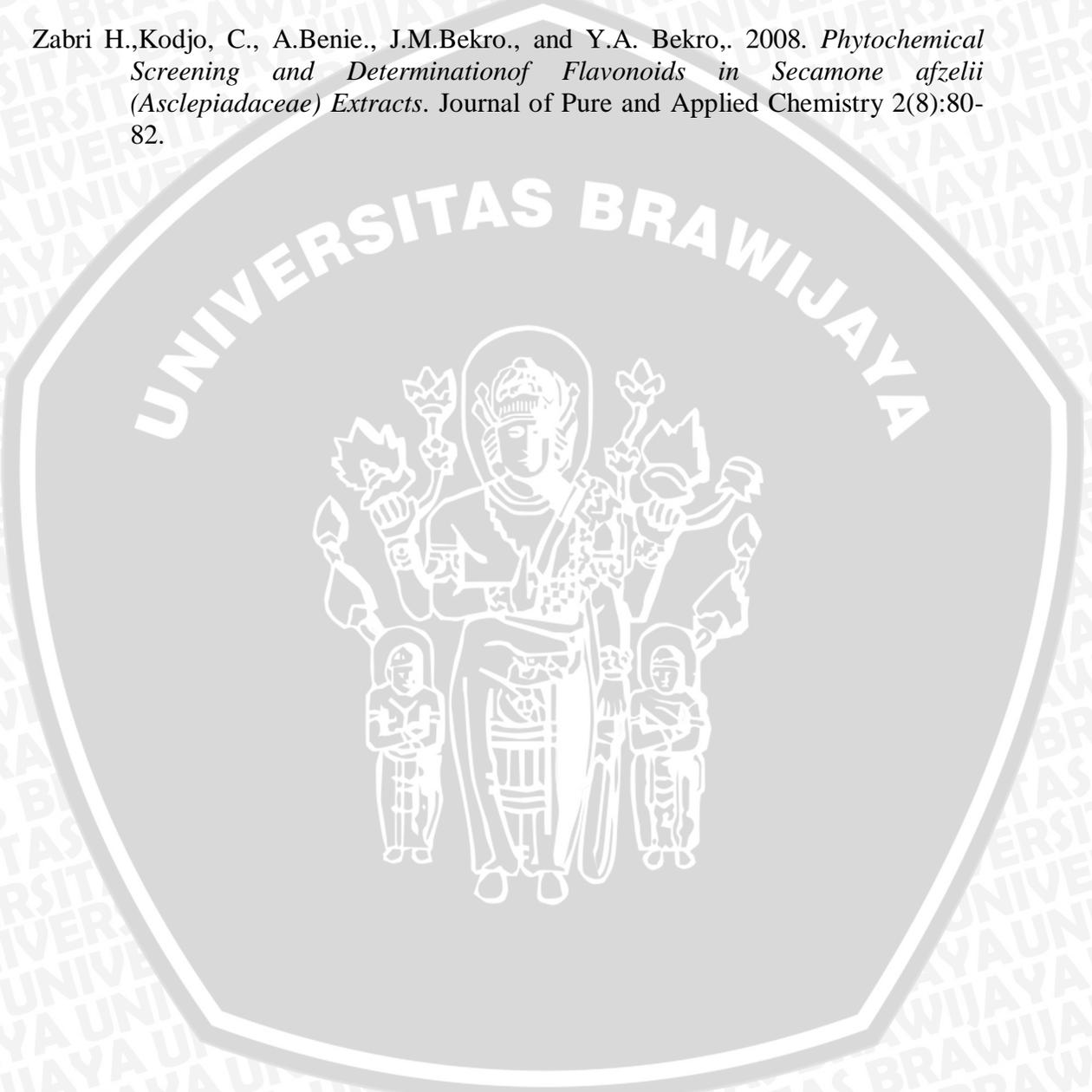
Syahrum, H. M. 1994. *Reproduksi dan Embriologi*. Jakarta : Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia

Toelihere,M.R. 2005. *Ilmu Kebidanan pada Ternak Sapi dan Kerbau*.Penerbit Universitas Indonesia (UI-Press). Jakarta.

Tremallen, K. 2008. *Oxidative Stress and Infertility– A Clinical Perspective*. Human Reproduction Update,1–16

World Health Organization.2012. Pencegahan dan Pengendalian ISPA di Fasilitas Pelayanan Kesehatan. http://www.who.int/csr/resources/publication/AM_pandemicbahasa.pdf. Diakses tanggal 07 Mei 2014.

Zabri H.,Kodjo, C., A.Benie., J.M.Bekro., and Y.A. Bekro.,. 2008. *Phytochemical Screening and Determinationof Flavonoids in Secamone afzelii (Asclepiadaceae) Extracts*. Journal of Pure and Applied Chemistry 2(8):80-82.





LAMPIRAN

Lampiran 1Sertifikat Laik Etik



KOMISI ETIK PENELITIAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

KETERANGAN KELAIKAN ETIK
"ETHICAL CLEARENCE"

No: 201-KEP-UB

KOMISI ETIK PENELITIAN (ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE)
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG
DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA:

PENELITIAN BERJUDUL : PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK BIJI ANGGUR (*Vitis vinifera*) TERHADAP VIABILITAS *Spermatozoa* DAN EKSPRESI TNF- α PADA HEWAN MODEL TIKUS YANG DIBERI PAPAN ASAP ROKOK

PENELITI : ULFA SEPTIANA WULANDARI

UNIT/LEMBAGA/TEMPAT : UNIVERSITAS BRAWIJAYA

DINYATAKAN : LAIK ETIK

Malang, 3 Januari 2014
Ketua Komisi Etik Penelitian
Universitas Brawijaya



Prof.Dr.drh. Aulanni'am, DES.
NIP. 19600903 198802 2 001

Lampiran 2. Konsep penelitian

1. Pemaparan asap rokok non filter selama 14 hari
2. Pemberian terapi ekstrak biji anggur selama 14 hari
3. Pembedahan kontrol positif pada hari ke-15
4. Pembedahan perlakuan negatif 1,2 dan 3 pada hari ke- 29

Keterangan:

1. Pemberian paparan asap rokok non filter selama 14 hari 2 batang setiap hari dan dihabiskan dalam waktu 15 menit
2. Terapi ekstrak biji anggur selama 14 hari dengan rincian dosis/hari sebagai berikut:

$$\frac{M1}{V1} = \frac{M2}{V2}$$

Keterangan

M1= Berat total serbuk biji anggur per kelompok

M2= Berat serbuk biji anggur per ekor

V1= Volume total ekstrak biji anggur

V2= Volume ekstrak biji anggur yang dibutuhkan per ekor tikus

Dosis perlakuan 1

$$\frac{M1}{V1} = \frac{M2}{V2}$$

$$\frac{5,4}{12} = \frac{0,9}{V2}$$

$$V2= 2 \text{ ml}$$

Dosis perlakuan 2

$$\frac{M1}{V1} = \frac{M2}{V2}$$

$$\frac{16,2}{12} = \frac{2,7}{V2}$$

$$V2= 2 \text{ ml}$$

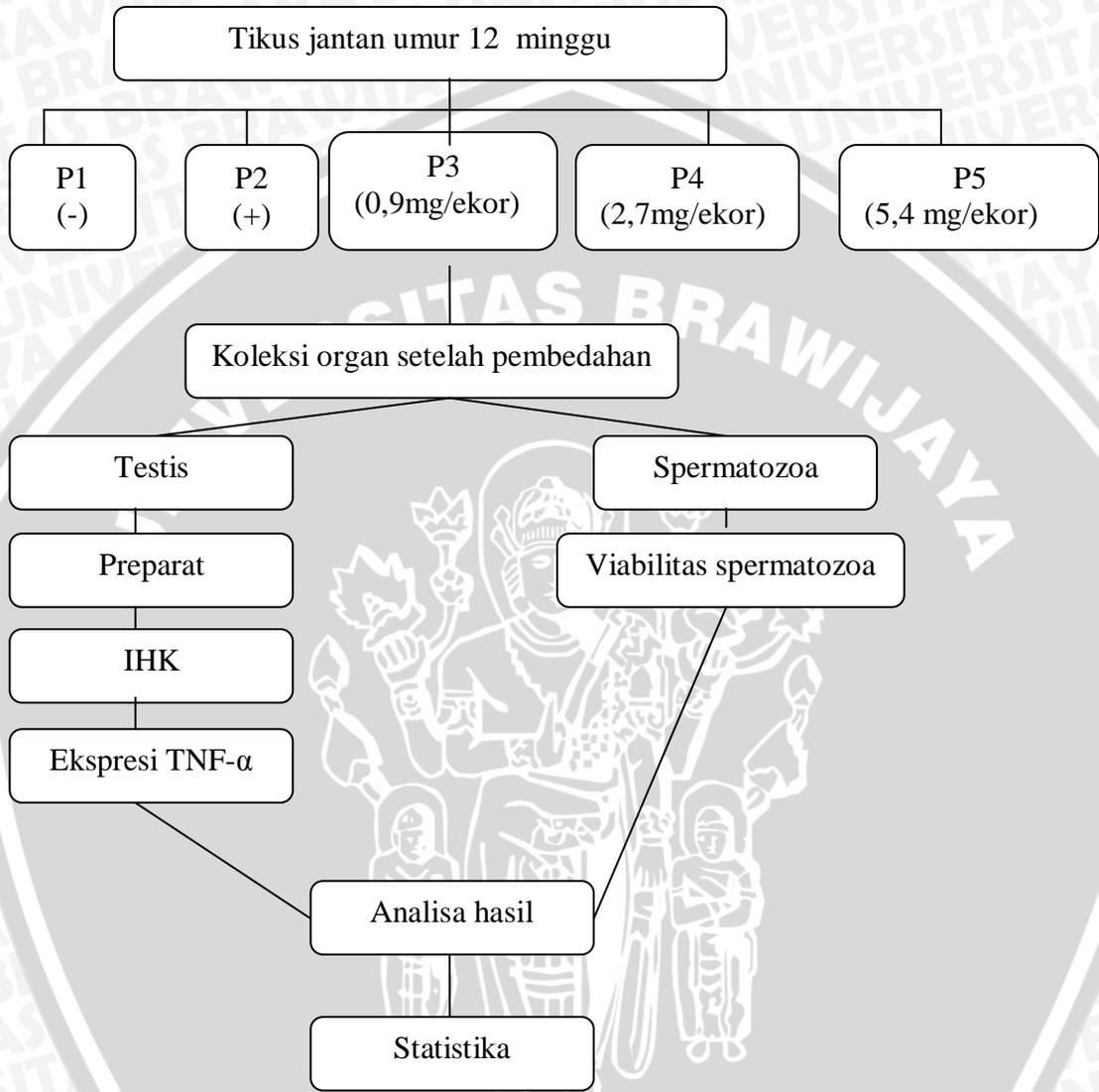
Dosis perlakuan 3

$$\frac{M1}{V1} = \frac{M2}{V2}$$

$$\frac{32,4}{12} = \frac{5,4}{V2}$$

$$V2= 2 \text{ ml}$$

Lampiran 3. Rancangan perlakuan



Keterangan :

Tikus yang digunakan sebanyak 30 ekor,terbagi menjadi 5 kelompok dan tiap kelompok terdiri dari 6 ekor tikus. Pembagian kelompok sebagai berikut:

1. Kelompok pertama sebagai kontrol negatif, Tikus tidak diberi apa – apa kecuali air minum dan makanan pada hari ke 15 tikus kelompok ini dibedah.

2. Kelompok kedua sebagai kontrol positif sebagai perlakuan 1. Tikus akan dipapar asap rokok selama 15 menit setiap hari selama 14 hari, dan 15 menit setelah pemaparan asap rokok diberi minum dan makan.
3. Kelompok ketiga sebagai kelompok perlakuan 2. Tikus akan dipapar asap rokok selama 15 menit setiap hari selama 14 hari dan 15 menit setelah pemaparan asap rokok diberi minum dan makan. dihari ke 15 sampai dengan hari ke 28 diberi terapi ekstrak biji anggur dengan cara sonde lambung dengan dosis terapi 1 sebesar 0,9 mg/ekor.
4. Kelompok keempat sebagai kelompok perlakuan 3. Tikus akan dipapar asap rokok selama 15 menit setiap hari selama 14 hari dan 15 menit setelah pemaparan asap rokok diberi minum dan makan. dihari ke 15 sampai dengan hari ke 28 diberi terapi ekstrak biji anggur dengan cara sonde lambung dengan dosis terapi 2. Sebesar 2,7 mg/ekor.
5. Kelompok kelima sebagai kelompok perlakuan 4. Tikus akan dipapar asap rokok selama 15 menit setiap hari selama 14 hari dan 15 menit setelah pemaparan asap rokok diberi minum dan makan. dihari ke 15 sampai dengan hari ke 28 diberi terapi ekstrak biji anggur dengan cara sonde lambung dengan dosis terapi 3 sebesar 5,4 mg/ekor.

LAMPIRAN 4.Pemaparan Asap Rokok

Cara pemaparan :

1. Tempat pemaparan berupa kotak kaca (50 x 40 x 20 cm)
2. 1 kelompok tikus dimasukkan ke dalam 1 kotak kaca dan segera di tutup
3. Rokok non filter dipasang pada ujung pipa atau smooking pump
4. Rook dinyalakan dengan menggunakan korek api kemudian asap dimasukkan dalam kotak kaca sampai memenuhi kotak
5. Pemaparan dilakukan selama 15 menit setiap hari, Pemaparan dilakukan setiap pagi hari
6. Setiap pemaparan asap ,kotak kaca dan smoking pump selalu dibersihkan terlebih dahulu dari sisa asap rokok sebelumnya



Lampiran 5. Pembuatan Larutan

1 Pembuatan larutan phosphate buffer salin (PBS) Ph 7,4

KCl sebanyak 0,1 gram, KH_2PO_4 sebanyak 0,1 gram, NaCl 4 gram dan Na_2HPO_4 sebanyak 1,08gram dicampur dan dilarutkan dalam 250 ml aquades steril dan dihomogenkan menggunakan magnetik stirrer dalam gelas ukur 500 ml pH larutan diatur mencapai 7,4. Kemudian dipindahkan larutan kedalam gelas labu ukur 500 ml dan ditambah aquades steril.

2 Pembuatan Larutan NaCl fisiologis 0,9 %

Rumus NaCl fisiologis 0,9 % adalah $0,9/100 \times 500 = 4,5$ gram
Ditimbang NaCl sebanyak 4,5 gram dan dilarutkan terlebih dahulu dalam 100 ml aquades steril. Dipindahkan kedalam gelas labu ukur 500 ml dan diencerkan dengan aquades hingga tanda batas.

3 Pembuatan paraformaldehid (PFA 4%)

$$V_1M_1 = V_2M_2$$

$$V_1 \times 37\% = 100 \text{ ml} \times 4\%$$

$$V_1 = 10,8 \text{ ml}$$

Langkah pertama yang dilakukan adalah membuat NaCl fisiologis 0,9 % sebagai pelarutnya yaitu ditimbang NaCl sebanyak 1,8 gram lalu dilarutkan dalam 200 ml aquades kemudian distirrer. Larutan PFA 4% dapat dibuat dengan mengambil 10,8 ml formaldehid 37% dimasukkan dalam labu ukur 100 ml dan ditambahkan NaCl fisiologis sampai tanda batas.

Lampiran 6. Pembuatan preparat untuk pemeriksaan IHK

Testis dalam PFA

- Diambil dan direndam dalam etanol 70% selama 24 jam
- Dimasukkan kedalam etanol 80% selama 2 jam
- Dimasukkan dalam etanol 90% selama 20 menit
- Dimasukkan dalam etanol 95% selama 30 menit diulang 3 kali

Testis hasil dehidrasi dengan etanol

- Dimasukkan dalam larutan xilol selama 20 menit sebanyak 2 kali pada suhu ruang
- dimasukkan kedalam larutan xilol selama 30 menit pada suhu 60-63 °C
- Dichelupkan dalam parafin cair
- Embedding blok
- Didinginkan pada suhu pada 4°C

Testis dalam blok parafin

- Disayat seukuran 5 µm
- Dimasukkan dalam air hangat dengan suhu 38-40°C
- Diambil dengan objek glass
- Dikeringkan diatas hot plate dengan suhu 38-40°C
- Diinkubasi pada suhu 38-40°C selama 24 jam

Preparat testis

Lampiran 7. Metode pewarnaan Imunohistokimia

Preparat testis

- Xylol I, Xylol II, alkohol bertingkat (100%,90%,80,70%), Aquades 1x5 menit
- Dicuci PBS pH 7,4 selama 3x5 menit
- 3 % Hidrogen peroksida dalam diomizine water selama 20 menit
- Dicuci PBS pH 7,4 selama 3x5 menit
- FBS (Fetal bovine serum) 5 % dalam PBS , 30 menit
- Dicuci PBS pH7,4 selama 3 x 5menit
- (1:100) antibodi primer (anti rat tnf α)24 jam pada suhu 4°C yang diencerkan dalam 1% bsa dalam PBS)
- Dicuci PBS pH 7,4 selama 3 x 5menit
- antibodi berlabel biotin (goat anti rat biotin labeled) 1 jam pada suhu ruang
- Dicuci PBS pH 7,4 selama 3 x 5menit
- SA-HRP (strept avidin-Horse rdist peroxidase) 30-60 menit pada suhu ruang
- Dicuci PBS pH 7,4 selama 3 x 5menit
- Cromogen DAB (3,3 – diaminobenzidine tetrahydrochloride) 10-20 menit pada suhu ruang
- Dicuci aquades selama 3 x 5menit
- Counter stain (Hematoksilen-eosin)5 menit pada suhu ruang
- Dicuci aquades selama 3 x 5menit
- Mounting dengan entellan

Hasil

Lampiran 8 Tabel konversi dosis hewan ke manusia

	Mencit 20 gram	Tikus 200gram	Marmut 44gram	Kelinci 1,5 gram	Anjing 12kg	Manusia 70 kg
Mencit 20gram	1,0	7,0	12,25	27,8	124,2	387,9
Tikus 200gram	0,14	1,0	1,74	3,9	17,8	56,0
Marmot 44 gram	0,08	0,57	1,0	2,25	10,2	31,5
Kelinci 1,5 gram	0,04	0,25	0,44	1,0	4,5	14,2
Anjing 12 kg	0,008	0,06	0,1	0,22	1,0	3,1
Manusia 70 kg	0,0026	0,018	1,031	0,07	0,32	1,0

(Laurance and Bacharach, 1964)

Lampiran 9Sertifikat taksonomi *Vitis vinivera*



LABORATORIUM TAKSONOMI, STRUKTUR DAN
PERKEMBANGAN TUMBUHAN
JURUSAN BIOLOGI, FAKULTAS MIPA
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
JALAN VETERAN, MALANG 65145
Telepon/faks: 0341-575841

KETERANGAN IDENTIFIKASI

No. 0130/Takso.Identifikasi/03/2014

Kepala Laboratorium Taksonomi, Struktur dan Perkembangan Tumbuhan, Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya, menerangkan bahwa spesimen yang dibawa oleh:

Nama : Ulfa Septiana Wulandari
Ditya Sulanda B
Valola Putri Perdana
Habyb Palyoga
Sakti Mustikkka Wati
Istiana Hidayati
Munip Setyowati
Tino Zainul

Instansi : Program Kedokteran Hewan, Universitas Brawijaya

Berdasarkan deskripsi karakter dan kunci identifikasi pada Flora of Java (Backer dan Van den Brink, 1968), volume II, halaman 87, diidentifikasi sebagai:

Familia : Vitaceae
Genus : *Vitis*
Species : *Vitis vinifera* L.
Nama lokal : Anggur hijau

Demikian surat keterangan identifikasi ini dibuat untuk digunakan seperlunya.

Malang, 11 Maret 2014

Kepala Laboratorium
Taksonomi, Struktur dan
Perkembangan Tumbuhan,

Dr. Serafinah Indriyani, M.Si.
NIP. 19630909198802 2 001

Lampiran 10. Viabilitas sperma

perlakuan	u1	u2	u3	u4	u5	u6	total	rata-rata
p1	19,4	32,6	27	32,1	33	17,7	161,8	26,96667
p2	14,3	14,4	11,8	11,6	14,2	14	80,3	13,38333
p3	20,7	21	20,5	18,8	18,6	17,3	116,9	19,48333
p4	19,4	17,7	24,8	27,9	25,2	24,3	139,3	23,21667
p5	20,9	20,5	20,8	32,3	24,2	33	151,7	25,28333

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Data
N		30
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	21.667
	Std. Deviation	6.4473
	Absolute	.175
Most Extreme Differences	Positive	.175
	Negative	-.114
Kolmogorov-Smirnov Z		.956
Asymp. Sig. (2-tailed)		.320

Test of Homogeneity of Variances

data			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.

6.650	4	25	.162
-------	---	----	------

ANOVA

data

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	701.720	4	175.430	8.706	.000
Within Groups	503.747	25	20.150		
Total	1205.467	29			

Anova signifikan kurang dari 0.05

Multiple Comparisons

Tukey HSD

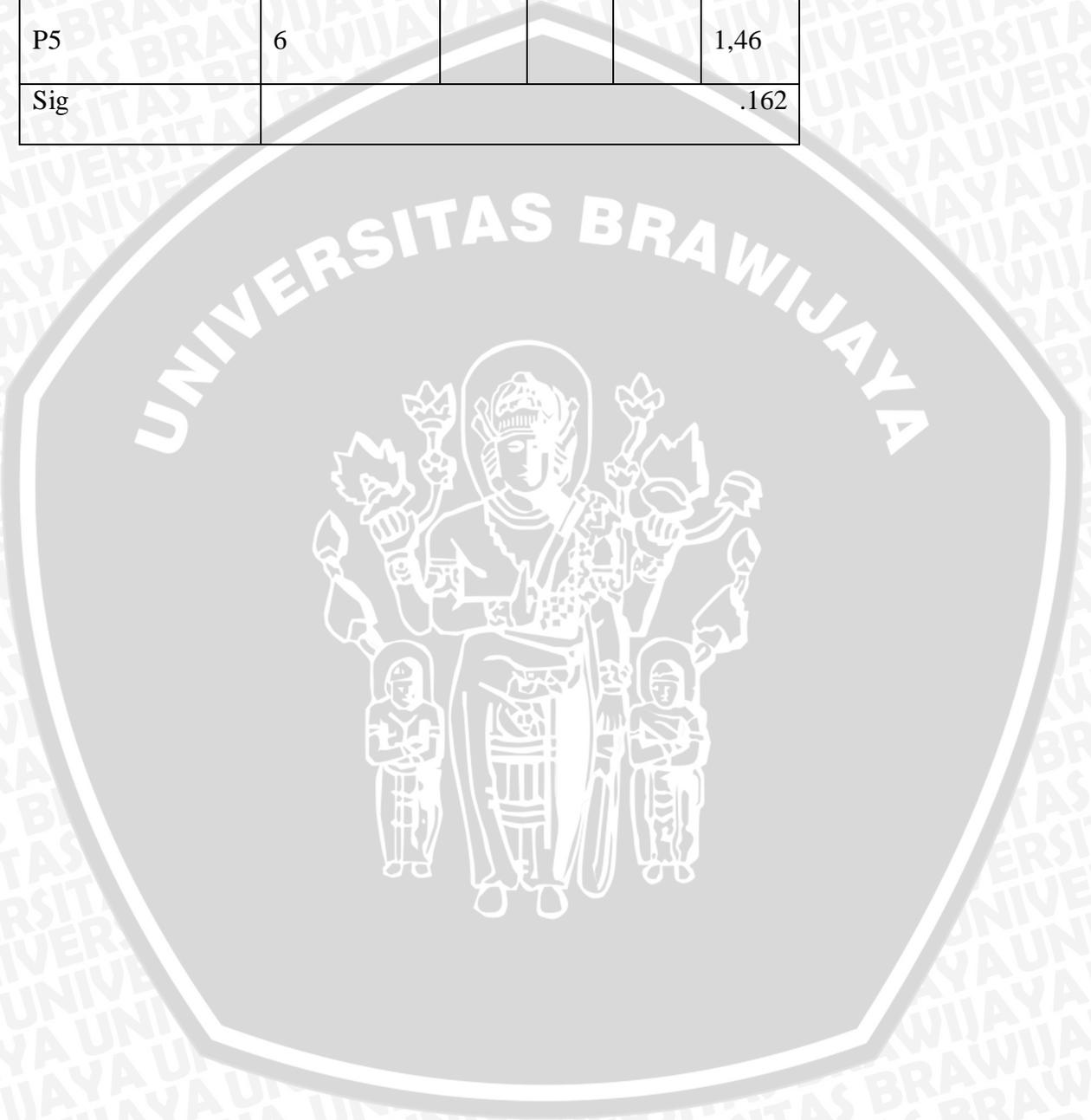
(I) prlakuan	(J) prlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
p1	p2	13.5833*	2.5916	.000	5.972	21.195
	p3	7.4833	2.5916	.056	-.128	15.095
	p4	3.7500	2.5916	.605	-3.861	11.361
	p5	1.6833	2.5916	.965	-5.928	9.295

p2	p1	-13.5833*	2.5916	.000	-21.195	-5.972
	p3	-6.1000	2.5916	.162	-13.711	1.511
	p4	-9.8333*	2.5916	.007	-17.445	-2.222
	p5	-11.9000*	2.5916	.001	-19.511	-4.289
	p1	-7.4833	2.5916	.056	-15.095	.128
p3	p2	6.1000	2.5916	.162	-1.511	13.711
	p4	-3.7333	2.5916	.608	-11.345	3.878
	p5	-5.8000	2.5916	.199	-13.411	1.811
	p1	-3.7500	2.5916	.605	-11.361	3.861
p4	p2	9.8333*	2.5916	.007	2.222	17.445
	p3	3.7333	2.5916	.608	-3.878	11.345
	p5	-2.0667	2.5916	.929	-9.678	5.545
	p1	-1.6833	2.5916	.965	-9.295	5.928
p5	p2	11.9000*	2.5916	.001	4.289	19.511
	p3	5.8000	2.5916	.199	-1.811	13.411
	p4	2.0667	2.5916	.929	-5.545	9.678

Tukey HSD^a

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05			
		a	b	c	d
P1	6	1,44			
P2	6		1,27		

P3	6		1,00
P4	6		1,36
P5	6		1,46
Sig			.162



Lampiran 11. TNF alfa testis

kelompok perlakuan	area percent 1	area percent 2	area percent 3	area percent 4	area percent 5	jumlah	rata-rata
kontrol negatif	0,66	0,56	0,68	0,84	0,86	3,6	0,72
kontrol positif	10,72	10,7	10,98	10,9	10,98	54,28	10,856
terapi 1	4,06	4,04	4,86	4,35	4,12	21,43	4,286
terapi 2	3,85	3,7	3,95	3,74	3,78	19,02	3,804
terapi 3	1,73	1,86	1,66	1,12	1,14	7,51	1,502

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		data
N		25
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	3.0336
	Std. Deviation	2.92747
	Absolute	.216
Most Extreme Differences	Positive	.216
	Negative	-.180
Kolmogorov-Smirnov Z		1.079
Asymp. Sig. (2-tailed)		.195

Test of Homogeneity of Variances

data			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
14.424	4	20	.475

ANOVA

data

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	136.149	4	34.037	9.790	.000
Within Groups	69.534	20	3.477		
Total	205.683	24			

Tukey HSD

(I) V1	(J) V1	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	-6.53600*	1.17927	.000	-10.0648	-3.0072
	3	-1.96600	1.17927	.475	-5.4948	1.5628
	4	-1.68400	1.17927	.618	-5.2128	1.8448
	5	-.38200	1.17927	.997	-3.9108	3.1468
2	1	6.53600*	1.17927	.000	3.0072	10.0648
	3	4.57000*	1.17927	.007	1.0412	8.0988
	4	4.85200*	1.17927	.004	1.3232	8.3808
	5	6.15400*	1.17927	.000	2.6252	9.6828
3	1	1.96600	1.17927	.475	-1.5628	5.4948
	2	-4.57000*	1.17927	.007	-8.0988	-1.0412
	4	.28200	1.17927	.999	-3.2468	3.8108
	5	1.58400	1.17927	.669	-1.9448	5.1128

4	1	1.68400	1.17927	.618	-1.8448	5.2128
	2	-4.85200*	1.17927	.004	-8.3808	-1.3232
	3	-.28200	1.17927	.999	-3.8108	3.2468
	5	1.30200	1.17927	.802	-2.2268	4.8308
5	1	.38200	1.17927	.997	-3.1468	3.9108
	2	-6.15400*	1.17927	.000	-9.6828	-2.6252
	3	-1.58400	1.17927	.669	-5.1128	1.9448
	4	-1.30200	1.17927	.802	-4.8308	2.2268

Tukey HSD^a

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05				
		a	b	c	d	e
P1	5	0,43				
P2	5		1,39			
P3	5			1,52		
P4	5				0,82	
P5	5					0,65
Sig						1.000