

**EFEK PREVENTIF EKSTRAK ETANOL PROPOLIS
LEBAH *Trigona sp* TERHADAP HISTOPATOLOGI
DAN PROFIL PITA PROTEIN TESTIS TIKUS
(*Rattus norvegicus*) HASIL PAPANAN
ASAP ROKOK**

SKRIPSI

Oleh

WIJAYA KUSUMA MAHERU

125130100111039



PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN

FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2016

**EFEK PREVENTIF EKSTRAK ETANOL PROPOLIS
LEBAH *Trigona sp* TERHADAP HISTOPATOLOGI
DAN PROFIL PITA PROTEIN TESTIS TIKUS
(*Rattus norvegicus*) HASIL PAPARAN
ASAP ROKOK**

SKRIPSI

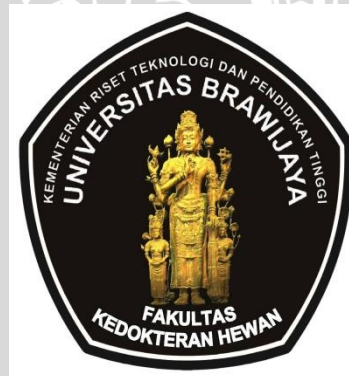
Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar

Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh

WIJAYA KUSUMA MAHERU

125130100111039



PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN

FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2016

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**Efek Preventif Ekstrak Etanol Propolis Lebah *Trigona sp* Terhadap
Histopatologi dan Profil Pita Protein Testis Tikus (*Rattus norvegicus*)
Hasil Paparan Asap rokok**

Oleh:

WIJAYA KUSUMA MAHERU

125130100111039

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada Tanggal
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

Dr. Dra. Herawati, MP

NIP. 19580127 198503 2 001

drh.Fajar Shodiq Permata, M.Biotech

NIP. 19870501 201504 1 001

Mengetahui,

Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Brawijaya

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

NIP. 19600903 198802 2 001

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Wijaya Kusuma Maheru

NIM : 125130100111039

Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan

Penulis Skripsi berjudul:

“Efek Preventif Ekstrak Etanol Propolis Lebah *Trigona sp* Terhadap Histopatologi dan Profil Pita Protein Testis Tikus (*Rattus norvegicus*) Hasil Paparan 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 termaktub 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.

Yang menyatakan,

(Wijaya Kusuma Maheru)

NIM. 125130100111039

Efek Preventif Ekstrak Etanol Propolis Lebah *Trigona sp* Terhadap Histopatologi dan Profil Pita Protein Testis Tikus (*Rattus norvegicus*) Hasil Paparan Asap rokok

ABSTRAK

Asap rokok merupakan faktor lingkungan yang menyebabkan kerusakan fisik. Paparan asap rokok menyebabkan penurunan jumlah sel spermatogenik dan perubahan stadium epitel seminiferus. Ekstrak etanol propolis lebah *Trigona sp* mengandung flavonoid *Caffeic Acid Phenethyl Ester* (CAPE) sebagai antioksidan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui histopatologi dan profil pita protein testis pada tikus (*Rattus norvegicus*) hasil paparan asap rokok yang diberi ekstrak propolis lebah *Trigona sp*. Ekstraksi menggunakan metode maserasi. Hewan coba yang digunakan adalah tikus putih jantan strain wistar umur 8-12 minggu dengan berat 150-200 gram. Penelitian terdiri dari lima kelompok meliputi kelompok tikus sehat (K-), kelompok tikus dipapar asap rokok (K+), kelompok tikus P1, P2, P3 masing-masing diberi ekstrak etanol propolis lebah *Trigona sp* 10 mg/200gr/hari, 20 mg/200gr/hari, 30 mg/200gr/hari kemudian dipapar asap rokok 2 batang perhari selama 15 menit selama 14 hari. Histopatologi testis menggunakan pewarnaan *Hematoxylin-Eosin* diamati secara kualitatif dan kuantitatif. Data kualitatif dianalisis secara deskriptif sedangkan data kuantitatif dengan menghitung sel leydig pada 5 lapang pandang dan dilanjutkan analisa statistik One-Way ANOVA serta uji BNJ ($p < 0,05$). Profil pita protein testis dianalisa secara semi kuantitatif menggunakan metode SDS-PAGE untuk menghitung berat molekul protein yang muncul. Hasil menunjukkan pemberian ekstrak propolis lebah secara signifikan dapat mencegah kerusakan sel spermatogenik, sel sertoli dan sel leydig serta menurunkan ekspresi *Heat Shock Protein* 69 kDa, dan 90 kDa dan meningkatkan ekspresi protein 26 kDa dan 52 kDa. Kesimpulan dari penelitian ini adalah ekstrak propolis lebah *Trigona sp* dosis 30 mg/200 gr BB dapat digunakan sebagai preventif pada tikus hasil paparan asap rokok.

Kata Kunci : Asap Rokok, Propolis, Histopatologi Testis, Profil Pita Protein Testis

Preventive Effects of Ethanol Extracts Propolis Bee *Trigona* sp Against Histopathology and Protein Band Profile Testis Rat (*Rattus norvegicus*) from Exposure cigarette smoke

ABSTRACT

Cigarette smoke was an environmental factor that caused physical damage. Exposure cigarette smoke caused decreasing number of spermatogenic cells and changed the seminiferous epithelium stage. The ethanol extract of bee propolis *Trigona* sp contained flavonoids *Caffeic acid phenethyl ester (CAPE)* as an antioxidant. This study aimed to determine extract propolis bee *Trigona* sp in the histopathology and protein band profiles in the testes of rats (*Rattus norvegicus*) the result of exposure cigarette smoke. Extraction using maceration method. Animals were used male rats strain Wistar aged 8-12 weeks with weight 150-200 grams. The study consisted of five groups consisted group of healthy mice (K), a group of mice was exposed to cigarette smoke (K +), groups of rats P1, P2, P3 given the ethanol extract of propolis bee *Trigona* sp 10 mg / 200gr / day, 20 mg / 200gr / day, 30 mg / 200gr / day and then exposed by 2 sticks smoke per day for 15 minutes within 14 days. Histopathology testes using Hematoxylin-eosin staining was observed qualitatively and quantitatively. Qualitative data were analyzed descriptively while quantitative data by calculating the Leydig cells in the visual field and proceed 5 Statistical analysis One-Way ANOVA and HSD test ($p < 0.05$). Testicular protein band profile semi quantitatively analyzed using SDS-PAGE method to calculate molecular weight protein that appears. The results showed bee propolis extract can significantly prevent damage spermatogenic cells, Sertoli cells and Leydig cells and decrease the expression of Heat Shock Protein 69 kDa and 90 kDa and 26 kDa protein expression enhances and 52 kDa. The conclusion of this study was the bee propolis extract *Trigona* sp dose of 30 mg / 200 gr could be used as a preventive in rat from the exposure cigarette smoke.

Keywords: Cigarette Smoke, Propolis, Histopathology Testis, Profile Pita Protein Testis

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa atas berkat dan anugerah-Nya sehingga laporan Skripsi yang berjudul “Efek Preventif Ekstrak Etanol Propolis Lebah *Trigona sp* Terhadap Histopatologi dan Profil Pita Protein Testis Tikus (*Rattus norvegicus*) Hasil Paparan Asap rokok ” ini dapat terselesaikan.

Dengan penuh rasa hormat penulis mengucapkan terimakasih kepada pihak yang secara langsung maupun tidak langsung telah membantu dalam penyusunan Laporan Skripsi ini. Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada:

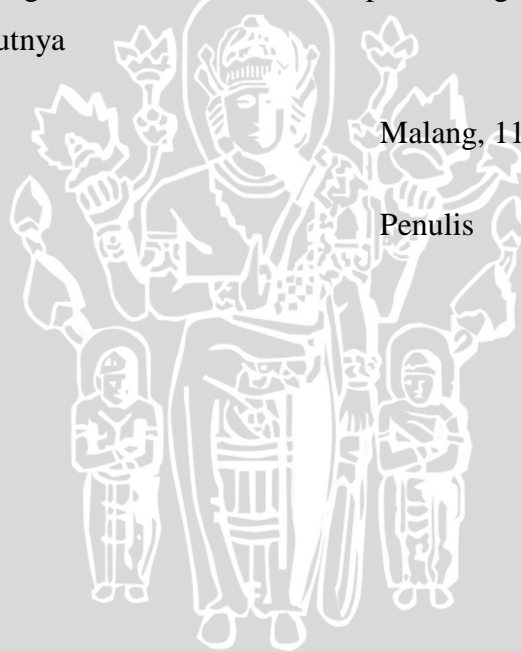
1. Dr. Dra. Herawati, MP selaku dosen pembimbing I atas segala bantuan, kesempatan, bimbingan, arahan serta dukungan yang diberikan kepada penulis
2. Drh. Fajar Shodiq Permata, M.Biotech selaku dosen pembimbing II atas segala bantuan, kesempatan, bimbingan, arahan serta dukungan yang diberikan kepada penulis
3. Drh. Ajeng Aeka, M.Sc selaku dosen penguji I atas saran, masukan, koreksi serta perbaikan yang diberikan kepada penulis
4. Drh. Fidi Nur Aini E.P.D, M.Si selaku dosen penguji II atas saran, masukan, koreksi serta perbaikan yang diberikan kepada penulis
5. Prof. Dr. Aulanni'am, drh. DES selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya
6. Drh. Dyah Ayu Oktavianie, M.Biotech selaku Wakil Dekan 1 bidang akademik Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya
7. Seluruh dosen yang telah membimbing dan memberikan ilmu selama menjalankan studi di Program Studi Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya.
8. Ayahanda Ir. Ilyas, M.T , Ibunda Isnaneti serta saudara/i saya yang tercinta Ridho Satria Hidayat dan Barkiah Syafitri untuk doa, kasih sayang, dukungan serta pengorbanan baik moril maupun materi selama ini.
9. Terima kasih rekan-rekan satu penelitian Trigona Sweet yaitu Eli, Retno, Fitri dan Wiwid atas kerjasama dan waktunya selama penelitian ini berlangsung.

10. Keluarga Besar DPM FKH UB LUGAS 2015 dan HARMONIS 2014 yang telah memberikan semangat kepada penulis.
11. Teman-teman seperjuangan keluarga besar angkatan 2012 PKH UB khususnya kelas B atas cinta, persahabatan, semangat, inspirasi, keceriaan dan mimpi- mimpi yang luar biasa.
12. Keluarga Besar Laboratorium Embriologi dan Radiologi Veteriner yang telah memberikan semangat kepada penulis.
13. Seluruh pihak lain yang telah membantu penulis dalam penyelesaian penulisan Laporan Skripsi ini yang tidak mungkin penulis sebutkan satu persatu.

Penulis sadar bahwa Laporan Skripsi ini jauh dari sempurna oleh sebab itu kritik dan saran yang konstruktif dari semua pihak sangat diharapkan demi penyempurnaan selanjutnya

Malang, 11 Februari 2016

Penulis



DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
LEMBAR PERNYATAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG	xiii
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	5
1.3 Batasan Masalah	5
1.4 Tujuan	6
1.5 Manfaat	7
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Hewan Coba Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>)	8
2.2 Radikal Bebas	9
2.3 Antioksidan	11
2.4 Asap Rokok	11
2.5 Propolis Lebah <i>Trigona sp</i>	13
2.6 Testis	16
2.7 Profil Pita Protein Testis	19
BAB III KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN	
3.1 Kerangka Konseptual	22
3.2 Hipotesa Penelitian	25
BAB IV METODOLOGI PENELITIAN	
4.1 Tempat dan Waktu Penelitian	26
4.2 Sampel Penelitian	26
4.3 Rancangan Penelitian	27
4.4 Variabel Penelitian	28
4.5 Materi Penelitian	28
4.5.1 Bahan Penelitian	28
4.5.2 Alat Penelitian	29
4.6 Tahapan Penelitian	29
4.6.1 Persiapan Hewan Coba	29
4.6.2 Pembuatan Ekstrak Etanol Propolis	30
4.6.3 Uji Fitokimia Ekstrak Etanol Propolis Lebah <i>Trigona sp</i>	31
4.6.4 Dosis Ekstrak Etanol Propolis Lebah <i>Trigona sp</i>	31
4.6.5 Pemberian Ekstrak Etanol Propolis Lebah <i>Trigona sp</i>	32
4.6.6 Paparan Asap Rokok	32

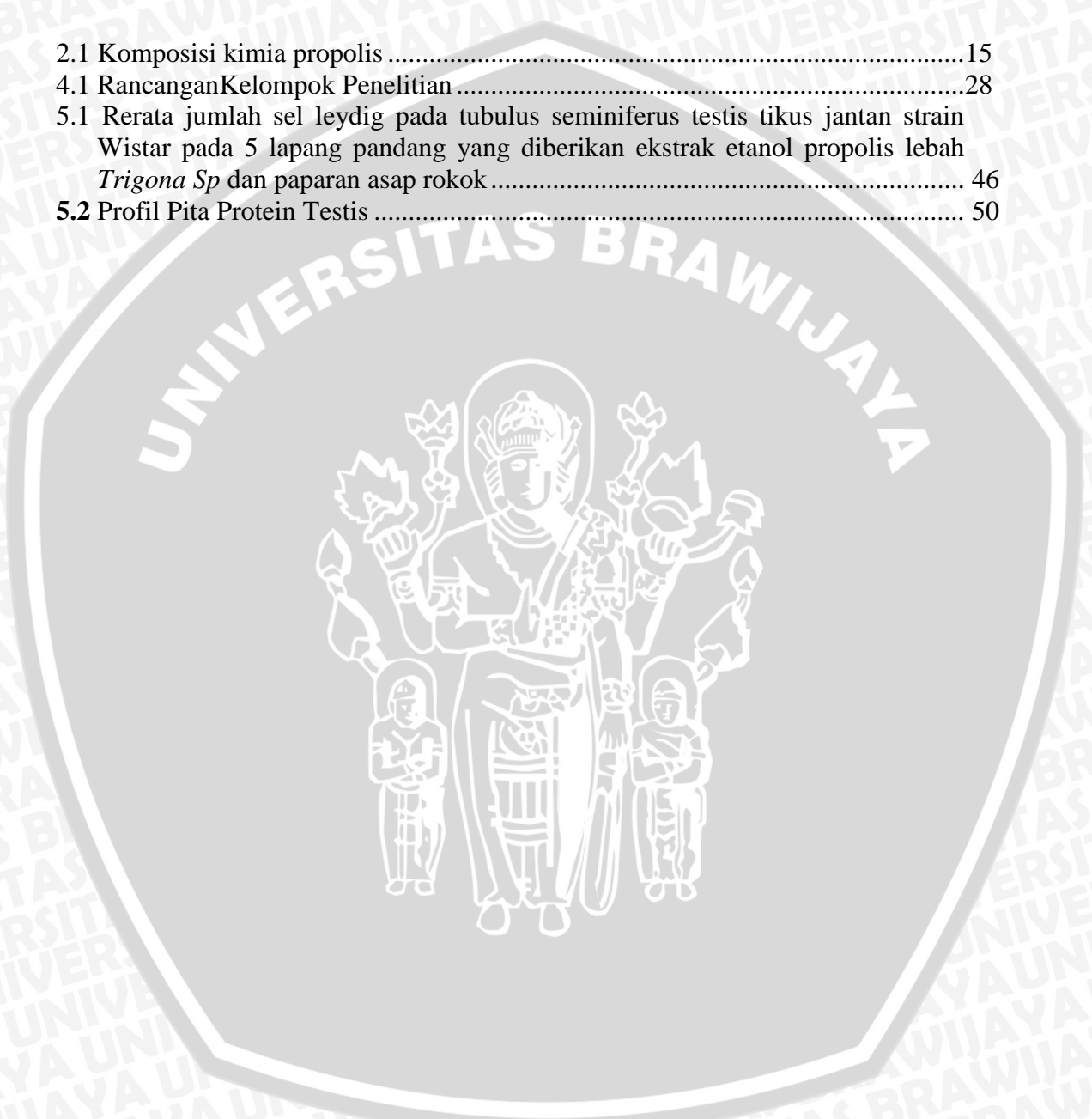


4.6.7 Pengambilan Organ Testis.....	33
4.6.8 Pembuatan Preparat Histologi testis	34
4.6.9 Uji Profil Pita Protein Testis.....	36
4.7 Analisa Data	40
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN	
5.1 Efek Preventif Ekstrak Etanol Propolis Lebah <i>Trigona sp</i> terhadap Histopatologi Testis Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>) Hasil Paparan Asap rokok.....	41
5.2 Efek Preventif Ekstrak Etanol Propolis Lebah <i>Trigona sp</i> terhadap Profil Pita Protein Testis Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>) Hasil Paparan Asap rokok	50
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN	
6.1 Kesimpulan	57
6.2 Saran	57
DAFTAR PUSTAKA	58



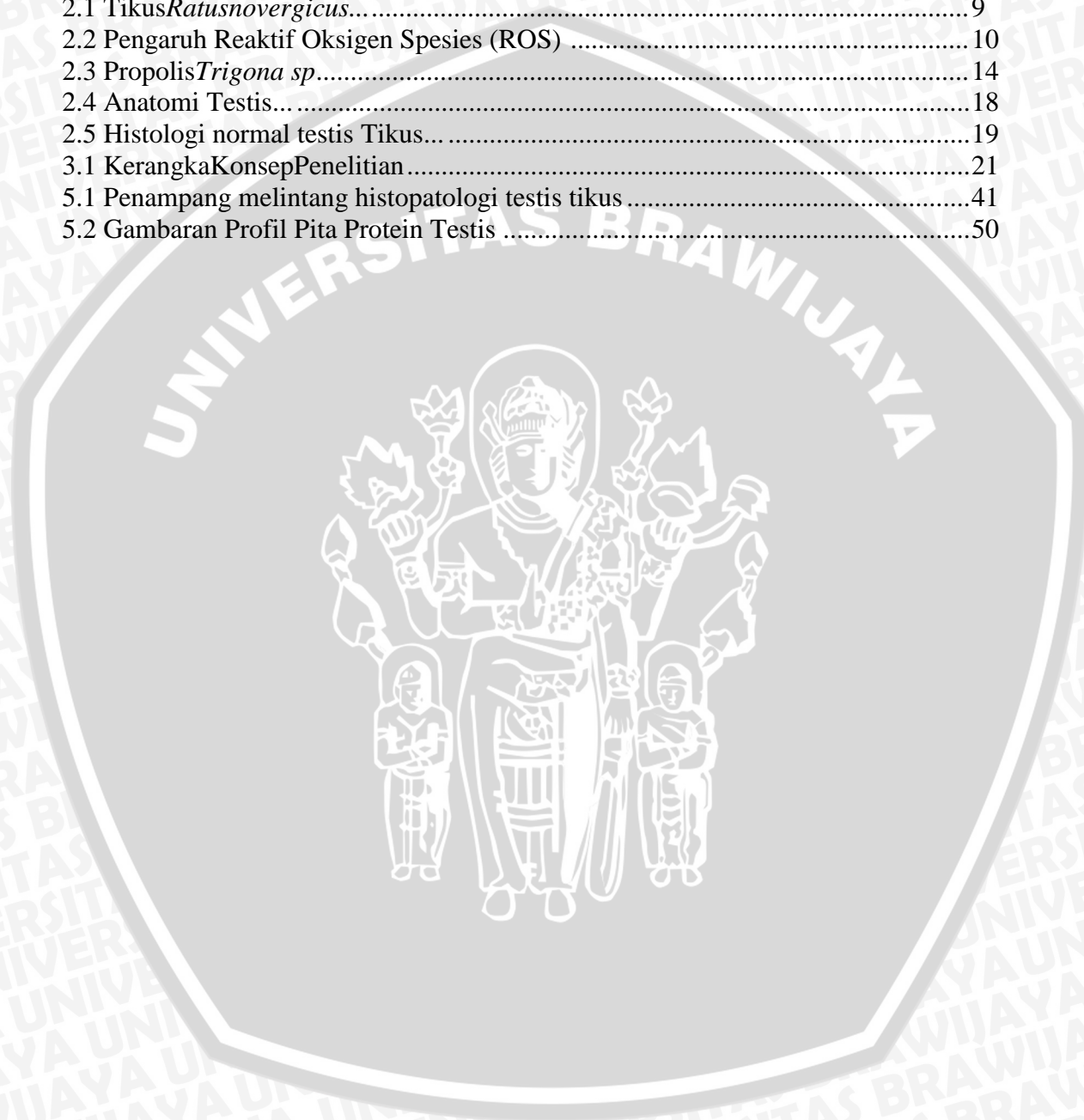
DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
2.1 Komposisi kimia propolis	15
4.1 RancanganKelompok Penelitian	28
5.1 Rerata jumlah sel leydig pada tubulus seminiferus testis tikus jantan strain Wistar pada 5 lapang pandang yang diberikan ekstrak etanol propolis lebah <i>Trigona Sp</i> dan paparan asap rokok	46
5.2 Profil Pita Protein Testis	50



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Tikus <i>Ratusnovergicus</i>	9
2.2 Pengaruh Reaktif Oksigen Spesies (ROS)	10
2.3 Propolis <i>Trigona sp</i>	14
2.4 Anatomi Testis.....	18
2.5 Histologi normal testis Tikus.....	19
3.1 Kerangka Konsep Penelitian.....	21
5.1 Penampang melintang histopatologi testis tikus.....	41
5.2 Gambaran Profil Pita Protein Testis	50



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Sertifikat Laik Etik	64
2. Hasil Uji LCMS	65
3. Dosis Perhitungan Pemberian Ekstrak Etanol Propolis Lebah <i>Trigona sp</i>	66
4. Pembuatan sediaan propolis konsentrasi 30 mg/ml dengan volume 150 ml	67
5. Asumsi jumlah tar dan nikotin terhirup seekor tikus	68
6. Kerangka Konseptual	69
7. Pembuatan Preparat Histopatologi Organ Testis menggunakan metode parafin...70	70
8. Persentase penurunan dan peningkatan rerata sel leydig	72
9. Komposisi larutan dalam isolasi protein dan SDS PAGE	73
10. Isolasi Protein.....	74
11. Penentuan Profil Pita Protein dengan SDS PAGE.....	75
12. Penentuan Berat Molekul.....	76
13. Perhitungan Berat Molekul Hasil SDS-PAGE.....	77
14. Hasil Uji Statistika Sel Leydig.....	79



DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG

Simbol/ Singkatan Keterangan

ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
BNJ	Beda Nyata Jujur
%	persen
GATS	<i>Global Adult Tobacco Survey</i>
PAH	<i>Polynuclear Aromatic Hydrogen</i>
GnRH	<i>Gonadotropin Releasing Hormone</i>
FSH	<i>Follicle Stimulating Hormone</i>
LH	<i>Luteinizing hormone</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
G6PD	<i>Glucose-6-phospate dehydrogenase</i>
H ₂ O ₂	Hydrogen Peroksida
NAC	N-acetyl-cystein
ml	mili
mg	miligram
cm	Sentimeter
g	Gram
BB	Berat badan
°C	Derajat Celcius
OH ⁻	Hidroksil
O ₂ ⁻	Superoksida
NO	Nitrik oksida
LOO	Lipid peroksil
¹ O ₂	Singlet oksigen
HOCl	Asam hipoklorat
O ₃	Ozon
GSH	Glutation
CAPE	Caffeic acid phenethyl ester
TLR	<i>Tool Like Receptor</i>
pH	Potensial Hidrogen
Cu	Cooper
Zn	Zinc
Mn	Manganese
kDa	Kilo Dalton
PUFA	<i>Poly unsaturated fatty acid</i>
ONOO ⁻	Peroksinitrit
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
PBS	<i>Phospat Buffer Saline</i>

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Merokok merupakan cara utama dalam penggunaan tembakau di Indonesia. Sebanyak 34,8% (59,9 juta) dari populasi orang dewasa saat ini merokok. Dari persentase tersebut, 67,0% (57,6 juta) perokok laki-laki dan 2,7% (2,3 juta) perokok wanita. Sebanyak 133,3 juta orang dewasa berusia 15 tahun ke atas yang termasuk perokok pasif di rumah. Berdasarkan usia, orang dewasa berusia 25-44 memiliki jumlah tertinggi orang yang terpapar rokok di rumah (59,4 juta). Kelompok umur 15-24 tahun dan 45-64 tahun memiliki jumlah paparan sama sekitar 32 juta (Global Adult Tobacco Survey, 2011). Tidak menutup kemungkinan di area rumah tersebut terdapat hewan peliharaan yang terkena paparan asap rokok juga.

Menurut Garrett et al., (2007) menemukan bahwa kucing terpapar asap rokok sebanyak satu rokok per hari memiliki resiko 4 kali lebih besar terdiagnosis karsinoma sel skuamosa mulut, jenis yang sangat agresif dari kanker mulut. Lebih dari 90% kucing didiagnosis dengan karsinoma sel skuamosa mulut meninggal dalam waktu satu tahun, bahkan setelah dilakukan kemoterapi dan pengobatan radiasi.

Rokok adalah salah satu produk tembakau yang dimaksudkan untuk dibakar dan dihisap dan/atau dihirup asapnya, termasuk rokok kretek, rokok putih, cerutu atau bentuk lainnya yang dihasilkan dari tanaman *nicotiana tabacum*,

nicotiana rustica, dan spesies lainnya (Peraturan Pemerintah Republik Indonesia Nomor 109, 2012). Rokok mengandung lebih dari 4000 komponen kimia. Sekitar kurang lebih 100 komponen bersifat toksik seperti bahan karsinogen, tar, nikotin, nitrosamin, karbonmonoksida, senyawa PAH (*Polynuclear Aromatic Hydrogen*), fenol, karbonil, klorin dioksin, dan furan (Fowles dan Bates, 2000).

Tar adalah kumpulan dari beribu-ribu bahan kimia dalam komponen padat asap rokok dan bersifat karsinogenik. Komponen tar mengandung radikal bebas, yang berhubungan dengan resiko timbulnya kanker (Revianti, 2005). Nikotin merupakan alkaloid yang sangat toksik yaitu stimulan depresan ganglionik. Nikotin menyebabkan penurunan kadar hormon testosteron melalui mekanisme penghambatan fungsi sel Leydig yang berfungsi sebagai sekretor hormon testosteron. Nikotin juga dapat mempengaruhi kerja sistem saraf pusat dengan cara menghambat kerja *Gonadotropin Releasing Hormone* (GnRH), sehingga pembentukan *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) dan *Luteinizing hormone* (LH) terhambat. Terhambatnya pembentukan FSH dan LH akan mengakibatkan spermatogenesis berjalan tidak normal (Musfiroh dkk, 2012). Kemudian *Polynuclear Aromatic Hydrogen* (PAH) dalam asap rokok dapat menyebabkan atrofi testis, menghambat spermatogenesis, dan merusak morfologi spermatozoa (Revel *et al.* 2001).

Testis merupakan organ reproduksi jantan yang memiliki peran vital dalam proses spermatogenesis hingga pematangan spermatozoa. Lebih dari 90% testis terdiri dari tubulus semineferus yang merupakan tempat menghasilkan sperma. Tubulus tersebut tersusun berkeluk-luk di dalam testis dan sangat panjang

(Arjatmo, 2005). Menurut Nieschlag (2000), testis memiliki dua fungsi yaitu untuk memproduksi hormon testosteron dan memproduksi spermatozoa. Proses spermatogenesis tersebut dipengaruhi oleh regulasi hormon. Regulasi hormon pada proses spermatogenesis dipengaruhi oleh hormon testosteron.

Asap rokok mengandung ROS (*reactive oxygen species*) dimana ROS akan menginduksi reaksi inflamasi pada traktus genitalia jantan dengan dilepaskannya mediator-mediator inflamasi yang mengaktifasi leukosit. Leukosit yang teraktivasi akan menghasilkan ROS dalam kadar yang tinggi pada semen, yang menimbulkan terjadinya stres oksidatif. ROS yang diproduksi sel fagosit menyebabkan kerusakan pada DNA, protein, dan lipid (Colagar *et al.*, 2007). Menurut Kurnia dkk (2013), menjelaskan bahwa paparan asap rokok menyebabkan apoptosis pada sel spermatogenik tikus, penurunan kadar testosteron, berat testis, jumlah sel - sel spermatogenik, dan adanya perubahan stadium epitel seminiferus setelah dipapar asap rokok dalam beberapa stadium sel spermatogenik.

Protein merupakan bagian terpenting dari sel-sel tubuh dan merupakan bagian terbesar dari substansi kering dari organ-organ tubuh. Protein berfungsi dalam menentukan struktur sel, alat pengenalan antar molekul dan proses katalis (Sumardjo, 2009). HSP merupakan protein yang disintesis melalui tanggapan sel terhadap gangguan yang berasal dari lingkungan. HSP membantu sintesa, pelipatan, pertemuan dan transpor intraseluler berbagai protein serta melindungi protein dari agregasi. Berdasarkan berat molekulnya terdapat beberapa tipe HSP diantaranya HSP20, HSP25/27, HSP 60, HSP 70 dan HSP 90 (Pockley, 2001).

Pencegahan kerusakan organ testis akibat radikal bebas dapat diatasi dengan terapi preventif yang mengandung antioksidan. Beberapa tahun terakhir, minat baru akan penggunaan senyawa alami diketahui meningkat, dan yang lebih penting yaitu peran senyawa alami sebagai dasar untuk pengembangan obat (Sarvankumar *et al.*, 2011).

Propolis merupakan substansi resin (sejenis getah tanaman) yang berasal dari kulit kayu dan pucuk-pucuk tanaman, terutama dari tanaman *poplar* (*Populus* spp.), *birch* (*Betula* spp.), atau *conifer*(sejenis pinus), yang dikumpulkan oleh lebah dan kemudian dicampur dengan lilin dan air liur lebah. Propolis digunakan untuk melindungi pintu sarang lebah (Bankova *et al.* 2014). Propolis memiliki berbagai aktivitas biologi, seperti sebagai antibakteri, antiinflamasi, antioksidatif, hepatoprotektif, tumoricidal, dan sebagai antiplatelet (Chen, 2007). Menurut Radiati (2008), kandungan dalam propolis dapat berperan sebagai antioksidan dengan cara menangkap radikal hidroksil dan superoksida kemudian menetralkan radikal bebas sehingga melindungi sel, mempertahankan keutuhan stuktur sel dan jaringan dan melindungi lipid terhadap reaksi yang merusak. Kemudian Nakajima (2009) menyebutkan *Caffeic acid* dalam kandungan propolis memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi. *Caffeic acid* mampu meningkatkan ekspresi *glucose-6-phosphate dehydrogenase* (G6PD) yang didapat dari ekspresi gen antioksidan 4-6 kali lebih kuat terhadap oksidan, H_2O_2 , dan radikal bebas $O_2^{\bullet-}$ dibanding vitamin C dan N-acetyl-cystein (NAC).

Penelitian dilakukan untuk mengetahui efek preventif ekstrak etanol propolis lebah *Trigona sp* terhadap histopatologi testis dan profil pita protein tikus yang diberi paparan asap rokok.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah yang akan dibahas dalam penelitian ini adalah :

1. Apakah pemberian ekstrak etanol propolis lebah *Trigona sp* dapat mencegah kerusakan histologi testis tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang dipapar asap rokok ?
2. Apakah pemberian ekstrak etanol propolis lebah *Trigona sp* dapat mencegah perubahan gambar profil pita protein pada testis tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang dipapar asap rokok ?

1.3 Batasan Masalah

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

1. Tikus putih yang digunakan adalah tikus putih jantan galur wistar dengan umur 8-12 minggu dengan berat badan 150-200 gram yang diperoleh dari Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Muhamadiyah Malang. Penggunaan hewan coba dalam penelitian telah mendapatkan sertifikat laik etik dari Komisi Etik Penelitian Universitas Muhamadiyah Malang No: E.5.a/104/KEPK-UMM/VII/2016 (Lampiran 1).
2. Rokok yang digunakan adalah rokok non filter. Pemaparan asap rokok dilakukan pemberian 2 batang perhari selama 15 menit selama 14 hari (Sulanda, 2014).

3. Pemaparan asap rokok dilakukan dengan menempatkan tikus pada kotak kaca yang diberi lubang dan selanjutnya asap rokok dimasukkan menggunakan *smoking pump*.
4. Propolis *Trigona sp.* yang didapatkan dari peternakan lebah di daerah Lawang Kabupaten Malang.
5. Kandungan Fitokimia Ekstrak Etanol Propolis lebah *Trigona sp* telah diuji di Laboratorium Kimia Analitik Politeknik Negeri Malang.
6. Dosis ekstrak etanol propolis lebah *Trigona sp* yang diberikan pada tikus yang dipapar asap rokok perhari yaitu sebesar 10 mg/200gr/hari, 20 mg/200gr/hari dan 30 mg/200gr/hari dengan konsentrasi 30mg/ml dan diberikan sekali sehari secara peroral selama 3 minggu dimulai pada hari ke-8 sampai pada hari ke-28.
7. Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah pengamatan histopatologi testis untuk melihat kerusakan sel leydig, sel sertoli dan sel spermatogenik dengan menggunakan pewarnaan HE dan profil pita protein testis menggunakan metode SDS-PAGE pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang dipapar asap rokok .

1.4 Tujuan Penelitian

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

1. Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol propolis lebah *Trigona sp* mencegah kerusakan histologi testis tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang dipapar asap rokok.

2. Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol propolis lebah *Trigona sp* mencegah perubahan profil pita protein testis tikus putih (*Rattus novergicus*) yang dipapar asap rokok.

1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini bermanfaat sebagai salah satu sumber kajian untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol propolis lebah *Trigona sp* terhadap histopatologi dan profil pita protein tikus (*Rattus novergicus*) hasil paparan asap rokok.



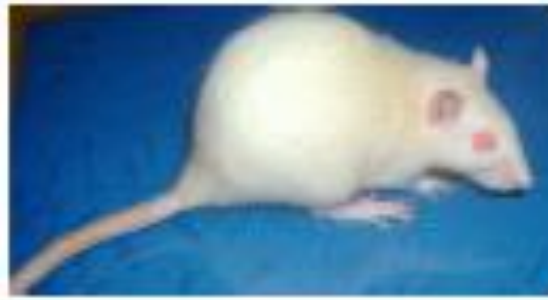
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Hewan Coba Tikus (*Rattus norvegicus*)

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur wistar merupakan hewan coba yang banyak digunakan dalam berbagai penelitian karena sifatnya yang mudah dipelihara dan hewan yang relatif sehat (Suryaningsih, 2014). Penggunaan tikus karena memiliki struktur dan fungsi organ-organ yang mirip terhadap pengaruh bahan – bahan atau agen yang dicobakan, umur yang singkat, jumlah anak yang banyak, dan cara pemeliharaan yang relatif mudah juga merupakan hal-hal yang penting yang dipertimbangkan oleh para peneliti (Nurdiani, 2006). Panjang tikus putih dapat mencapai 40 cm dengan berat badan bervariasi antara 140 gram hingga 500 gram dan dapat hidup selama 4 tahun (Kusumawati, 2004).

Berdasarkan data biologis, kebutuhan air tikus putih yaitu 8-11 mL/100g BB sedangkan kebutuhan makanan yaitu 5g/100g BB. Temperatur tubuh 35,9-37,5^o C dengan rata-rata kelembaban 40-60% dan mengalami kematangan seksual pada umur 50-60 hari (Kusumawati, 2004). Menurut Besselsen (2004) klasifikasi dari tikus putih adalah

Kingdom	: Animalia
Class	: Mamalia
Ordo	: Rodentia
Family	: Muridae
Genus	: Rattus
Spesies	: <i>Rattus norvegicus</i>



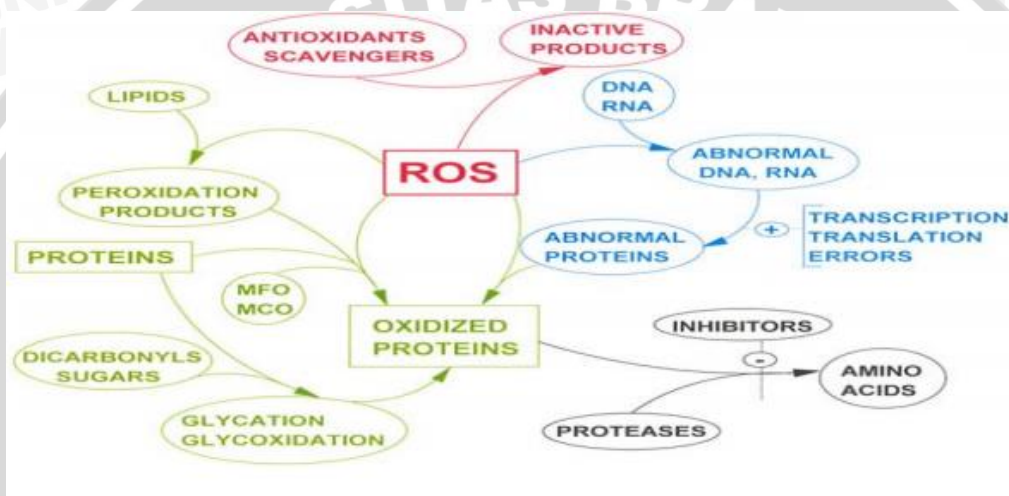
Gambar 2.1 Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) (Akbar, 2010)

2.2 Radikal Bebas

Radikal bebas adalah sebuah molekul atau atom yang mempunyai satu atau lebih elektron tidak berpasangan pada orbital terluarnya. Radikal bebas bersifat tidak stabil, sangat reaktif dan dapat merebut elektron dari molekul lain dalam upaya mendapatkan pasangan elektronnya. Molekul bersifat reaktif dan akan menyerang molekul stabil di dekatnya sehingga menjadi radikal bebas. Dengan demikian radikal bebas memicu terjadinya reaksi yang akhirnya menyebabkan kerusakan sel (Sikka, 2004). Radikal bebas dapat terbentuk melalui dua cara, yaitu : (1) secara endogen, sebagai respon normal dari rantai peristiwa biokimia dalam tubuh, dalam sel (intrasel) maupun ekstrasel, dan (2) secara eksogen, radikal bebas didapat dari polutan lingkungan, asap rokok, obat-obatan, dan radiasi ionisasi atau sinar ultra violet (Langseth, 2000).

Radikal bebas terjadi terus menerus di semua sel bagian dari fungsi normal. Reaktif Oksigen Spesies (ROS) merupakan radikal bebas yang berperan penting dalam proses fisiologi tubuh yang akan merugikan integritas jaringan biologis dan memediasi kerusakan. Mekanisme kerusakannya melibatkan peroksidasi lipid, yang menghancurkan struktur sel, lipid, protein dan nukleat asam (Poli *et al.*, 2004). Adapun efek dari ROS bisa dilihat pada **Gambar 2.1**.

Beberapa senyawa ROS yang penting dalam kehidupan makhluk hidup adalah : yang tergolong radikal bebas seperti radikal hidroksil (OH[•]), radikal superoksida (O₂^{•-}), radikal nitrik oksida (NO) dan radikal lipid peroksil (LOO[•]); serta yang tergolong non radikal seperti hidrogen peroksida (H₂O₂), singlet oksigen (¹O₂), asam hipoklorat (HOCl), dan ozon (O₃) (Lee *et al.*, 2004).



Gambar 2.2 Pengaruh Reaktif Oksigen Spesies (ROS) (Williams, 2008)

Radikal bebas terbentuk secara endogen maupun eksogen dapat terjadi melalui sederetan reaksi proses inisiasi, proses propagasi dan proses terminasi. Proses inisiasi diawali dengan pembentukan awal radikal bebas (R[•]) dengan melibatkan molekul yang stabil (RH). Proses propagasi terjadi perubahan radikal bebas (R[•]) hasil proses inisiasi menjadi radikal bentuk lain (ROO[•]). Terbentuknya penggabungan dua radikal bebas membentuk produk produk baru yang stabil (Sarma *et al.*, 2010).

2.3 Antioksidan

Antioksidan adalah senyawa pemberi elektron (*electron donor*), sedangkan secara biologis adalah senyawa yang mampu menangkal dan merendahkan dampak negatif oksidan dalam tubuh. Antioksidan bekerja dengan cara mendonorkan satu elektronnya kepada senyawa yang bersifat oksidan sehingga aktifitas senyawa oksidan tersebut bisa terhambat (Winarsi, 2007).

Berdasarkan mekanisme kerjanya, antioksidan digolongkan menjadi 3 kelompok yaitu antioksidan primer, sekunder dan tersier. Antioksidan primer meliputi enzim superoksida dismutase (SOD), katalase dan glutathion peroksidase (GSH-Px). Antioksidan primer bekerja dengan cara mencegah pembentukan senyawa radikal bebas yang telah terbentuk menjadi molekul yang kurang aktif. Antioksidan sekunder merupakan antioksidan eksogenous atau non enzimatis (Winarsi, 2007). Antioksidan sekunder meliputi vitamin E, vitamin C, beta karoten, flavonoid, asam urat, bilirubin dan albumin (Soewoto, 2001). Antioksidan sekunder ini bekerja dengan cara memotong reaksi oksidasi berantai dari radikal bebas atau dengan cara menangkapnya. Akibatnya radikal bebas tidak beraksi dengan komponen seluler (Winarsi, 2007). Kelompok antioksidan tersier meliputi sistem enzim DNA-repair dan metionin sulfoksida reduktase, dimana enzim-enzim ini berfungsi dalam perbaikan biomolekuler yang rusak akibat reaktivitas radikal bebas.

2.4 Asap rokok

Asap rokok dihasilkan dari pembakaran produk tembakau yang disebut rokok. Asap rokok berdasarkan keluarnya asap dari bagian rokok dapat dibagi

menjadi 2 yaitu *side stream smoke* adalah asap yang berasal dari ujung rokok yang terbakar dan *main stream smoke* adalah asap yang berasal dari ujung rokok yang kemudian dihisap melewati filter (Tjandra, 2001). Asap rokok yang berbahaya adalah asap rokok sampingan (*side stream smoke*) yang dihirup oleh perokok pasif. Perokok pasif merupakan orang-orang yang tidak merokok namun secara tidak sengaja ikut menghirup asap rokok disekitar perokok.

Asap rokok dibagi menjadi dua fase yaitu fase partikulat dan fase gas. Fase partikulat terdiri atas nikotin, nitrosamine, *N-nitosonornicotine*, logam, poliaromatik hidrokarbon (PAH), dan amina karsinogen (*4-aminobiphenyl*) sedangkan fase gas terdiri dari karbon monoksida, karbon dioksida, benzene, ammonia, formaldehid, hidrogen sianida, *N-nitrosodimethylamine*, dan *N-nitrosodiethylamine* (Lodovici and Bigagli, 2009). Efek asap rokok menurut Ziech *et al* (2011) dapat menyebabkan menurunkan level antioksidan dalam darah, meningkatkan pelepasan radikal superoksida dan oksidasi dari glutathion (GSH). GSH merupakan antioksidan yang melindungi DNA dari kerusakan oleh *Reactive Oxygen Species* (ROS). Satu kali hisapan asap rokok diperkirakan mengandung 1016 molekul radikal bebas yang masuk ke dalam tubuh. Asap rokok mengandung gas kimia sebanyak 92% seperti karbon monoksida, karbondioksida, hydrogen sianida, amoniak, oksida dari nitrogen dan senyawa hidrokarbon dan partikel aerosol sebanyak 8% seperti tar, nikotin, benzopiren, fenol, dan cadmium (Yani, 2006). Paparan asap rokok yang menerus dapat mambah resiko kerusakan berbagai organ paru-paru, jantung bahkan kerusakan testis akibat radikal bebas yang terkandung didalam asap rokok (Fauzan dkk, 2003).

Pengaruh asap rokok dapat mempengaruhi sintesis hormon testoteron melalui dua mekanisme. Mekanisme pertama melibatkan komponen logam (kadmium dan nikel) dalam asap rokok yang dapat mengganggu aktifitas enzim adenil siklase pada membran sel leydig sehingga mengakibatkan terhambatnya sintesis hormon testoteron. Mekanisme kedua melibatkan nikotin dalam asap rokok yang dapat menstimulasi medula adrenal untuk melepaskan katekolamin. Katekolamin dapat mempengaruhi sistem saraf pusat sehingga dapat mengganggu proses spermatogenesis dan sintesis hormon testoteron melalui mekanisme umpan balik antara hipotalamus-hipofisis anterior testis (Anita, 2004).

2.5 Propolis Lebah *Trigona sp*

2.5.1 Definisi Propolis

Kata propolis berasal dari bahasa Yunani yang terdiri dari dua kata yaitu pro dan polis. Kata pro memiliki arti sebelum sedangkan kata polis berarti kota. Propolis didefinisikan sebagai pelindung sarang lebah dari terhadap faktor-faktor berbahaya yang terdapat diluar sarang. Lebah menghasilkan propolis dari resin yang dikumpulkan dari berbagai tumbuhan kemudian resin tersebut dicampur bersama saliva dan berbagai enzim pada lebah (Lofty, 2006). Berikut merupakan klasifikasi lebah menurut Indra (2009) :

Kingdom	: <i>Animalia</i>
Filum	: <i>Arthropoda</i>
Kelas	: <i>Insecta</i>
Ordo	: <i>Hymenoptera</i>
Sub Ordo	: <i>Apocrita</i>
Famili	: <i>Aptidae</i>

Bangsa : *Apini*
Genus : *Trigona*
Spesies : *Trigona sp*

Propolis memiliki aroma wangi dengan warna kuning hingga coklat tua. Aroma yang tercium merupakan aroma senyawa aromatis volatil (Salatino *et al*, 2005). Propolis bersifat lengket pada sarang yang baru dibentuk. Pada suhu 15⁰C propolis akan mengeras dan akan pecah pada suhu 5⁰C sedangkan pada suhu 25⁰C sampai 45⁰C propolis bersifat lembut, elastik dan sangat lengket. Semakin tinggi suhu (60⁰C sampai 100⁰C) propolis akan mencair (Pietta *et al.*, 2002). Propolis digunakan untuk melindungi pintu sarang lebah yang mana akan mensterilkan setiap lebah yang masuk. Selain itu lebah juga menggunakan propolis untuk memperbaiki sarang mereka yang retak atau rusak (Bankova *et al.*, 2000).



Gambar 2.3 Propolis *Trigona sp* (panah merah) (Djajasaputra, 2010)

2.5.2 Kandungan Kimia Propolis

Komposisi kimia propolis dipengaruhi oleh jenis tumbuhan asal resin. Asal resin sal inilah yang juga menyebabkan perbedaan warna dan aroma pada jenis propolis yang berbeda (Salatino *et al*, 2005). Nakajima (2009)

menyebutkan propolis memiliki aktivitas antioksidan tertinggi yaitu pada jenis flavonoid *Caffeic acid phenethyl ester (CAPE)*. Flavonoid merupakan senyawa fenol yang dikenal mempunyai potensi sebagai antioksidan serta anti-inflamasi. Selain *Caffeic acid phenethyl ester (CAPE)*, kandungan flavonoid lainnya pada propolis diantaranya quercetin, pinostrobin, kaempferol, galangin, pinocembrin, pinobaksin serta beberapa jenis senyawa yang berasal dari golongan phenolic yang lainnya yaitu *cinnamic acid, cinnamic alkohol, vanilin, benzyl alkohol, benzoic acid serta ferulic acid* (Pradipta, 2010). Komposisi kimia propolis menurut Pietta *et al.*, (2002) dapat dilihat pada tabel 2.1.

Tabel 2.1 Komposisi kimia propolis

Kelas komponen (%)	Grup komponen
Resin 45-55%	Flavonoid (CAPE, pinostrobin, kaempferol, galangin, pinocembrin, pinobaksin)
Lilin dan asam lemak 25-53%	sebagian besar berasal dari lilin lebah dan tanaman
Minyak essensial 10%	Senyawa volatil
Protein 5%	Protein berasal dari pollen dan 16 asam amino seperti arginin dan prolin sebanyak 45,8 %
Senyawa organik lain dan mineral 5%	Semua mineral (Fe, Zn, Au, Ag, Cs, Hg, La, dan Sb) kecuali Su dan senyawa organik (keton, laktan, kuinolon, gula, vitamin A, vitamin B (B ₁ ,B ₂ ,B ₆ , dan B ₈), vitamin C, vitamin E, Vitamin D, asam benzoate dan esternya)

2.4.3 Manfaat Propolis

2.4.3.1 Sebagai antioksidan

Antioksidan merupakan zat yang dapat berperan sebagai donor hydrogen ataupun aksseptor elektron (Ardhie, 2011). Antioksidan

berpenting untuk melindungi komponen lipid, protein dan asam nukleat seluler dari kerusakan stress oksidatif yang diinduksi oleh radikal bebas (Stanojevic *et al*, 2009). Selain itu, antioksidan juga berfungsi sebagai *scavenger* atau perangkap radikal bebas (Winarsi, 2007).

Cadenas dan Packer (2002) menjelaskan propolis memiliki ikatan fenol yaitu *Caffeid Acid Phenethyl Ester* (CAPE) yang merupakan sisi aktif dari flavonoid. CAPE membantu menurunkan aktivitas radikal hidroksil menjadi tidak reaktif melalui peningkatan aktivitas *scavenger* dalam melawan radikal bebas

2.4.3.2 Mekanisme Propolis sebagai Anti-inflamasi

Propolis dapat menghambat inflamasi melalui sintesis eikosanoid. Sintesis eikosanoid akan terhambat akibatnya kandungan asam arakidonat di membran fosfolipid sel akan menurun. Pelepasan prostaglandin, leukotrin dan tromboksan sebagai mediator inflamasi akan terhambat karena penurunan asam arakidonat. Manfaat propolis sebagai antiinflamasi didukung oleh adanya flavonoid, asam aminodan derivat asam sinamat (Sabir, 2005).

2.5 Testis

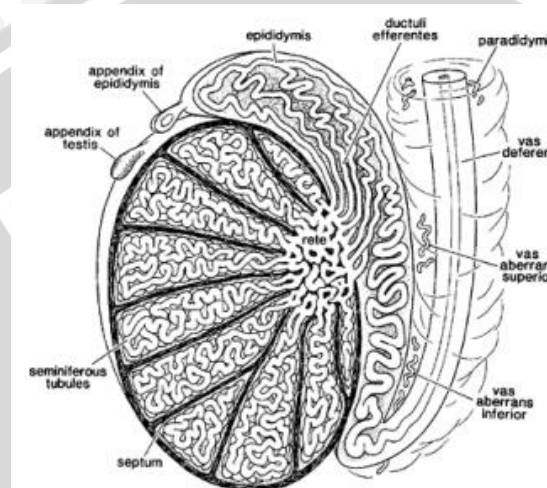
2.5.1 Fisiologi Testis

Testis adalah organ reproduksi jantan dengan dua fungsi utama yaitu, memproduksi spermatozoa dan menghasilkan hormon androgenik.

Secara mikroskopik, testis dapat dibagi menjadi 2 bagian utama yaitu:

- a. Tubulus seminiferus, memiliki fungsi untuk pembentukan sel spermatozoa (spermatogenesis). *Tubular compartment* (tubulus seminiferus) mengisi 60-80% dari volume testis total. Kompartemen ini terdiri dari sel germinativum (*cellula spermatogenica*) yang berproliferasi dan dua jenis sel somatik yaitu sel peritubular (epitel germinal) dan sel Sertoli yang tidak berproliferasi. Sel peritubular (myofibroblas) adalah sel yang mengisi dari dinding tubulus seminiferous. Sel ini terdiri dari 6 lapisan konsentris yang dipisahkan satu sama lain oleh serat kolagen. Sel ini menghasilkan protein kontraktile yang fungsinya adalah mengantar sperma untuk keluar dari tubulus seminiferous menuju ductus efferent melalui kontraksi peristaltic dari tubulus.
- b. Sel intersisial Leydig (Leydig cell), berada diantara tubulus seminiferus dan memiliki fungsi utama untuk memproduksi hormon androgen pada pria. Sekresi sel Leydig distimulasi adanya Luteinizing Hormone (LH) yang di sekresi dari hipofisis anterior. Sel Leydig memproduksi hormon testosteron, merupakan hormon jantan yang paling penting. Embriologi sel Leydig berasal dari *undifferentiated mesenchymal-like Stem cells*. Letak Sel Leydig berada diantara tubulus seminiferus, sehingga mempunyai nama lain yaitu sel intersisial Leydig. Sel Leydig dewasa berbentuk oval, dengan sitoplasma yang eosinofilik, kaya retikulum endoplasma halus dan mitokondria dengan tubular cristae, yang merupakan

karakter untuk sel penghasil steroid. Differensiasi sel mesenkim intersisial menjadi sel Leydig dibawah pengaruh dari LH. Selain Sel Leydig, pada kompartemen intersisial juga terdapat makrofag dan limfosit (Welsh *et al*, 2008).



Gambar 2.4. Anatomi Testis

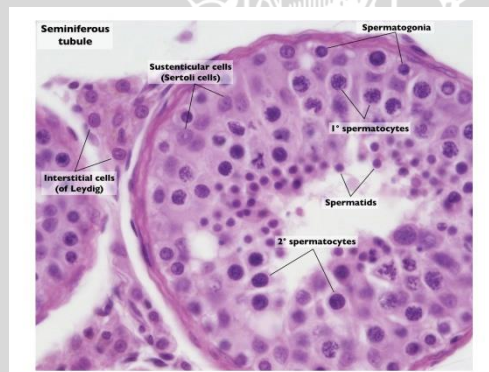
2.5.1 Histologi Testis

Testis terdiri atas 900 lilitan tubulus seminiferus, yang masing-masing mempunyai panjang rata-rata lebih dari setengah meter, dan merupakan tempat pembentukan sperma (Guyton, 2007). Gambaran histologis testis sebagai berikut:

- a. Tubulus seminiferus : Epitel tubulus seminiferus berada tepat di bawah membran basalis yang dikelilingi oleh jaringan ikat fibrosa yang disebut jaringan peritubuler yang mengandung serat-serat jaringan ikat, sel-sel fibroblast dan sel otot polos yang disebut dengan sel mioid. Diduga kontraksi sel mioid ini dapat mengubah diameter tubulus

seminiferus dan membantu pergerakan spermatozoa. Pada ujung setiap lobulus, lumennya menyempit

- b. Spermatogonium mengandung kromatin pucat terletak di samping lamina basalis.
- c. Sel sertoli berbentuk piramid panjang dan terletak pada membran basal yang dikelilingi sel-sel spermatogenik.
- d. Sel leydig terdapat pada bagian interstitial, dengan sitoplasma bervakuola, inti sel terdapat kromatin kasar, dan sitoplasma sel kaya dengan benda-benda inklusi seperti titik lipid.



Gambar 2.5 Histologi normal Tubuli seminiferi testis yang berisi sel-sel spermatogenik (pewarnaan hematoksilin-eosin (HE), pembesaran objektif 100 kali) (Solihati dkk, 2013).

2.6 Profil Pita Protein Testis

Protein merupakan bagian terpenting dari sel-sel tubuh dan merupakan bagian terbesar dari substansi kering dari organ-organ tubuh.

Protein berfungsi dalam menentukan struktur sel, alat pengenalan antar molekul dan proses katalis (Sumardjo, 2009). Suatu protein yang dihasilkan karena adanya *Heat Shock Response* (HSR) disebut *Heat Shock Protein* (HSP). HSR merupakan respon berbasis genetik yang

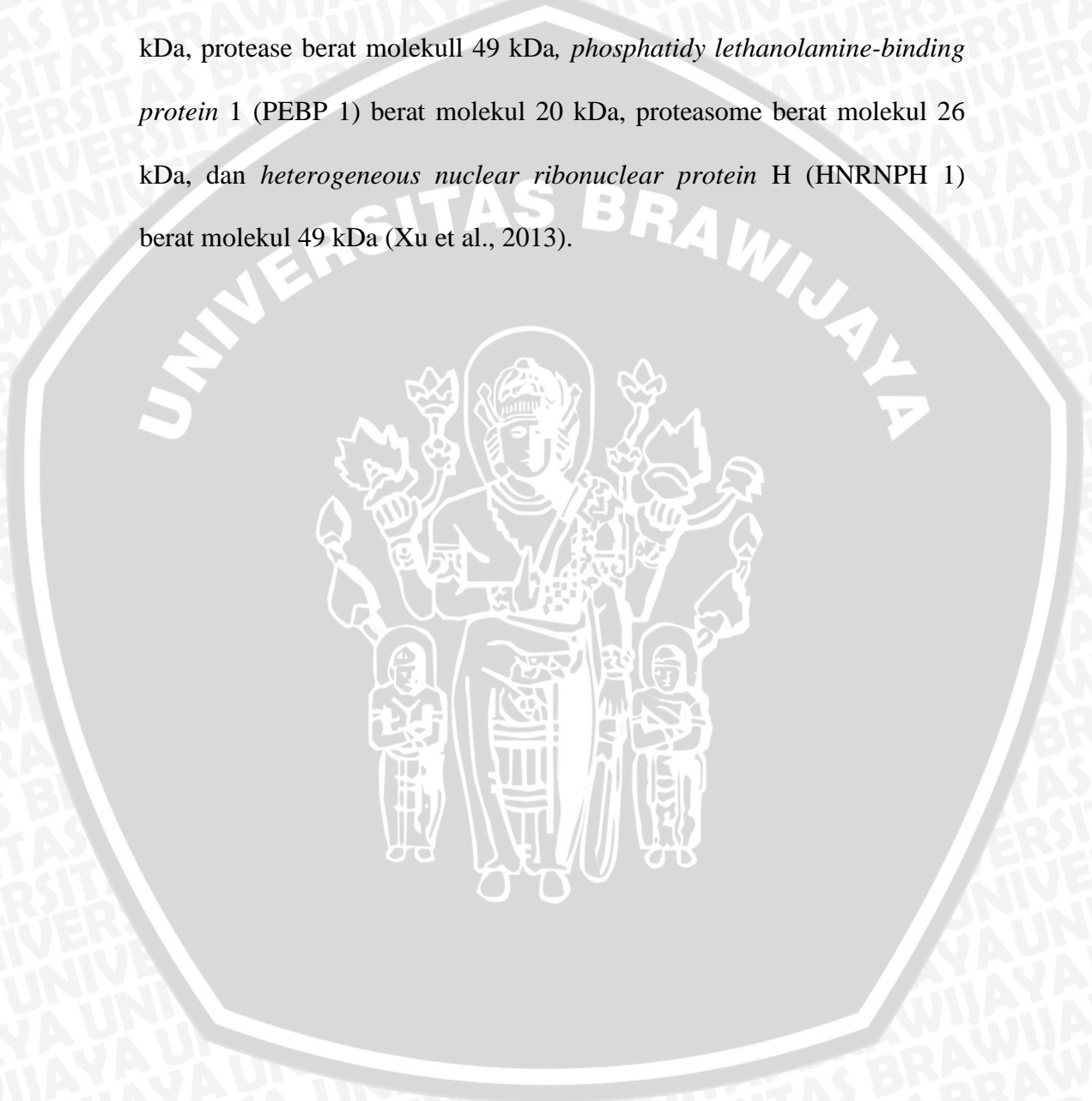
menginduksi gen-gen pengkode molekul *chaperon*, protease dan protein-protein yang penting melalui mekanisme pertahanan dan pemulihan terhadap jejas seluler yang berhubungan dengan adanya *misfolded protein*. HSR menandakan adanya macam gangguan yang bersifat fisiologis maupun yang berasal dari lingkungan. Secara normal, HSP membantu sintesa, pelipatan, pertemuan dan transpor intraseluler berbagai protein serta melindungi protein dari agregasi. HSP meningkat dalam kondisi stres penuh seperti serangan hipertermi dan stimulus stres lainnya, termasuk infeksi virus, iskemik, terpapar bahan toksik serta radikal bebas, Seperti pada **Tabel 2.1** (Macario *et al.*, 2005).

Tabel 2.1 Stresor pada sel yang menginduksi *Heat Shock Protein*

Stressor pada Sel	Nama atau Deskripsi
Fisik	Panas, dingin, keadaan iradiasi (termasuk paparan ultraviolet)
Oksigen	Radikal Bebas (<i>Reactive oxygen species</i>), hidrogen peroksida, iskemia
pH	Alkalosis, asidosis
Biologis	Infeksi, inflamasi
Fisiologis	Ketidakeimbangan hormonal
Osmosis	Shock Hiperosmosis atau hipoosmosis

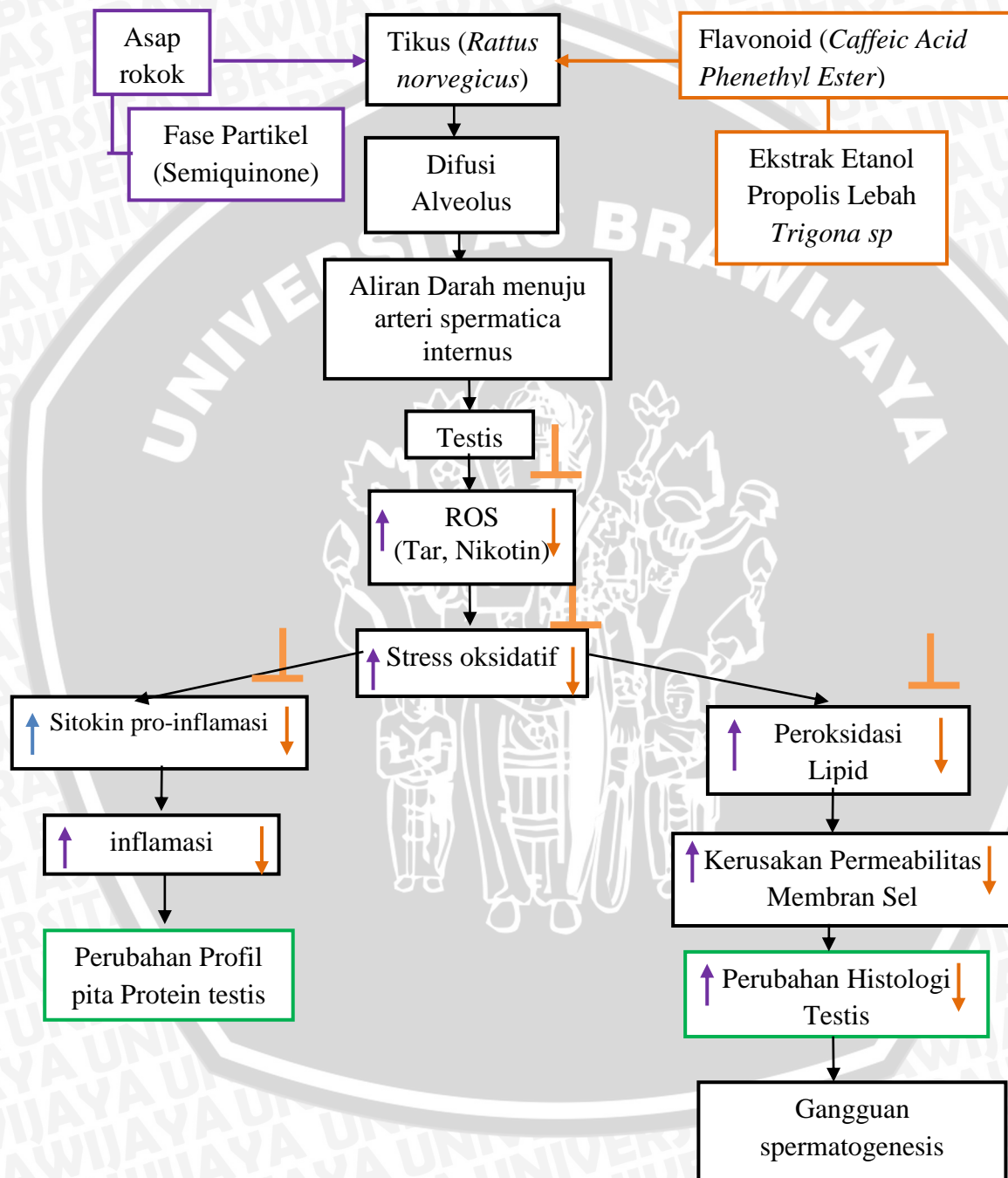
Klasifikasi kelas-kelas Hsp dilakukan berdasarkan ukuran molekul dan fungsinya. Ada subkelas Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40 (J-domain proteins) dan *small heat shock protein* (sHsp). Angka yang mengikuti kata Hsp menunjukkan berat molekulnya, contoh: angka 100 menunjukkan berat molekul dari Hsp, yakni 100 kDa. sHsp adalah subkelas dari Hsp yang mempunyai karakter massa molekuler monomer yang rendah (9-40 kDa) (Wu dan Tanguay, 2006).

Protein yang terdapat dalam testis yaitu *Heat Shock Protein* (HSP) 70 dan 90, Actin berat molekul 42 kDa, tubulin berat molekul 50 kDa, *androgen binding protein* berat molekul 52 kDa, *fructose* berat molekul 37 kDa, protease berat molekul 49 kDa, *phosphatidy lethanolamine-binding protein 1* (PEBP 1) berat molekul 20 kDa, proteasome berat molekul 26 kDa, dan *heterogeneous nuclear ribonuclear protein H* (HNRNPH 1) berat molekul 49 kDa (Xu et al., 2013).



BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESA PENELITIAN

3.1 Kerangka konseptual



Gambar 3.1 Kerangka Konseptual



Keterangan :

- ↓ : Pengaruh Ekstrak Etanol Propolis □ : Parameter yang Diamati
↑ : Pengaruh Paparan Asap rokok ⊥ : Menghambat

Paparan asap rokok diberikan 2 batang perhari selama 15 menit selama 14 hari. Paparan asap rokok akan terhirup oleh tikus dan masuk ke dalam saluran pernafasan. Asap rokok dibagi bedakan menjadi dua yaitu fase gas seperti nitrogen monoksida (NO) yang akan menjadi radikal bebas apabila teroksidasi, dan fase partikulat seperti nikotin, tar, benzopiren, dibensokarbol, senyawa PAH (*Polynuclear Aromatic Hydrogen*) dan logam. Fase partikulat akan masuk ke peredaran darah melalui alveoli paru. Radikal bebas tersebut akan diedarkan ke seluruh tubuh oleh aliran darah (arteri spermatica internus). Asap rokok mengandung *reactive oxygen species* (ROS) dalam kadar yang tinggi seperti anion superoksida (O_2^-), hidrogen peroksida (H_2O_2), dan radikal hidroksil (OH). Radikal bebas bersifat reaktif, tidak stabil dan dapat membentuk radikal baru dengan cara menarik elektron dari molekul lain sehingga terjadi rantai reaksi (*chain reaction*). Radikal bebas dapat bereaksi dengan *poly unsaturated fatty acid* (PUFA) pada membrane sel, protein dan asam nukleat seluler. Reaksi radikal bebas pada PUFA yang disebut peroksidasi lipid yang kemudian menghasilkan radikal karbon. Radikal karbon kemudian menyerang ulang rantai samping PUFA dan menghasilkan radikal karbon baru dan peroksida lipid.

ROS menginduksi reaksi inflamasi pada traktus genitalia tikus jantan dengan dilepaskannya mediator-mediator inflamasi. ROS dalam kadar yang

tinggi pada semen, yang menimbulkan terjadinya stres oksidatif. ROS tersebut menyebabkan kerusakan pada DNA, protein, dan lipid. Kerusakan DNA mempercepat proses apoptosis sel germinal (Colagar *et al.*, 2007). Kerusakan pada jaringan testis ini dapat diamati melalui gambaran histopatologi jaringan testis menggunakan pewarnaan *Hematoxilin Eosin* (HE). Gambaran histopatologi jaringan testis kemudian diamati secara kualitatif menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 100x dan 400x. Menurut Macario *et al.*, (2005), stress oksidatif dapat memicu aktivasi sitokin pro-inflamasi seperti IL-1, IL-6, dan TNF α , yang turut berperan dalam munculnya *Heat Shock Protein* (HSP). HSP meningkat dalam kondisi stres penuh seperti serangan hipertermi dan stimulus stres lainnya, termasuk infeksi virus, iskemik, terpapar bahan toksik serta radikal bebas. Protein stress yang muncul diamati menggunakan metode SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrilamide Gel Electrophoresis*) berdasarkan berat molekulnya.

Pada penelitian ini, hewan model paparan asap rokok diberi Ekstrak Etanol propolis lebah *Trigona sp* yang mengandung flavonoid *Caffeic Acid Phenethyl Ester* (CAPE) sebagai antioksidan dengan cara menangkap radikal hidroksil dan superoksida kemudian menetralkan radikal bebas sehingga melindungi sel, mempertahankan keutuhan struktur sel dan jaringan dan melindungi lipid terhadap reaksi yang merusak. Mekanisme tersebut diharapkan memberikan efek pencegahan terhadap mampu mencegah kerusakan jaringan testis dan perubahan profil pita protein testis.

3.2 Hipotesis Penelitian

Dari rumusan permasalahan, maka hipotesis dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Pemberian ekstrak etanol propolis lebah *Trigona sp* mampu mencegah kerusakan histologi testis tikus putih jantan (*Rattus novergicus*) yang dipapar asap rokok.
2. Pemberian ekstrak etanol propolis lebah *Trigona sp* mampu mencegah perubahan profil pita protein pada testis pada tikus putih jantan (*Rattus novergicus*) yang dipapar asap rokok.



BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan pada bulan April-Juli 2016 di Laboratorium Biomedik FK Universitas Muhammadiyah Malang, laboratorium Biomedik FK UB dan Patologi Anatomi FK Universitas Brawijaya Malang. Pengujian fitokimia propolis lebah *Trigona sp* dilakukan di Laboratorium Kimia Analitik Politeknik Negeri Malang.

4.2 Sampel Penelitian

Hewan model yang digunakan dalam penelitian ini yaitu tikus jantan (*Rattus norvegicus*) galur wistar dengan bobot tikus antara 150-200 gram dan berumur 8-12 minggu. Hewan coba diaklimatisasi terlebih dahulu selama tujuh hari dengan pemberian ransum basal standar *Association of Analytical Communities* (AOAC) (2005). Aklimatisasi bertujuan untuk penyesuaian hewan coba terhadap kondisi laboratorium. Penelitian ini bersifat eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan estimasi sampel dihitung berdasarkan rumus (Kusriningrum, 2008) :

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

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

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

$$5n-5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 20/5$$

$$n \geq 4$$

Keterangan dari rumus di atas yaitu jumlah kelompok perlakuan disimbolkan dengan huruf p sedangkan jumlah ulangan yang diperlukan disimbolkan dengan huruf n. Berdasarkan perhitungan di atas, maka lima jenis kelompok perlakuan akan memerlukan jumlah ulangan minimal dalam setiap kelompok yaitu empat kali.

4.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode Rancang Acak Lengkap (RAL) dan bersifat eksperimental. Hewan coba dibagi menjadi lima kelompok perlakuan yaitu (Lampiran 6):

- K (-) : Tikus tidak diberikan paparan asap rokok dan perlakuan propolis
- K (+) : Tikus diberikan paparan asap rokok dua batang perhari selama 15 menit selama 14 hari tetapi tidak diberikan ekstrak etanol propolis dimulai pada hari ke 15 sampai hari ke 28
- P1 : Tikus diberikan ekstrak etanol propolis 10 mg/200gr/hari dimulai pada hari ke 8 sampai hari ke 28 dan diberi paparan asap rokok dua batang perhari selama 15 menit selama 14 hari
- P2 : Tikus diberikan ekstrak etanol propolis 20 mg/200 gr/hari dimulai pada hari ke 8 sampai hari ke 28 dan diberi paparan asap rokok dua batang perhari selama 15 menit selama 14 hari
- P3 : Tikus diberikan ekstrak etanol propolis 30 mg/200gr/hari dimulai pada hari ke 8 sampai hari ke 28 dan diberi paparan asap rokok dua batang perhari selama 15 menit selama 14 hari

Tabel 4.1 Rancangan Kelompok Penelitian

Variabel yang diamati Histopatologi testis dan Profil pita protein	Ulangan			
	1	2	3	4
Kelompok kontrol negatif (K-)				
Kelompok kontrol positif (K+)				
Kelompok preventif 10mg/200 gr (P1)				
Kelompok preventif 20 mg/200 gr (P2)				
Kelompok preventif 30 mg/200 gr (P3)				

4. 4 Variabel Penelitian

Variable yang dapat diamatai pada penelitian ini yaitu :

- Variabel bebas : Ekstrak etanol propolis *lebah Trigona sp*, paparan asap rokok
- Variabel tergantung : Gambaran histopatologi testis dan Profil pita protein testis
- Variabel kendali : Jenis kelamin tikus, berat badan tikus, umur tikus dan pakan tikus.

4.5 Materi Penelitian

4.5.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu propolis lebah *Trigona sp* yang berasal dari peternakan lebah di Lawang, Kabupaten Malang, tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) galur Wistar dengan bobot badan 150-200 gram dan berumur 8-12 minggu sebanyak 20 ekor, pakan tikus, etanol 70%, etanol absolut, NaCl fisiologis 0,9%, alkohol 70%, Larutan PBS (Phospat Buffer Saline), PBS-Tween PMSF, akuades, eosin, hematoksilin, phosphate Buffer Saline-Azida (PBS-azida), 1mM PSMF, 50 mM KH₂PO₄, 0,5 % Nonidet

P-40, acrylamide, Tris Cl (pH 8,8), SDS 10%, aquadest, Tetramitelin diamina (TEMED) , ammonium perosulfat (APS) 10%, Laemml buffer, methanol, ethanol, protein marker, silver nitrat 25%, formaldehid 10%, entellan, parafin.

4.5.2 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu kandang pemeliharaan hewan coba, kandang kaca dengan smoke pump, beker gelas, gelas obyek, gelas ukur, erlenmeyer, spuit oral atau sonde 1 mL, alat bedah, mikroskop cahaya, mikropipet, penjepit, gelas objek, mikroskop cahaya Olympus BX51, vorteks, formalin 10%, mikrotom, gel caster, kaca, penjepit kaca, appendorf 1,5 ml, masker, glove, tissue, kertas label, seperangkat alat sentrifugasi, vortex, alat elektroforesis.

4.6 Tahapan Penelitian

4.6.1 Persiapan Hewan Percobaan

Tikus diaklimatisasi selama tujuh hari agar dapat beradaptasi dengan lingkungan baru. Pakan yang diberikan adalah ransum basal dengan komposisi serat (5%), protein (20%), dan lemak (5-10%). Pakan diberikan satu kali setiap hari dan diberikan minum secara adlibitum. Tikus dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan yang terdiri dari 4 ekor tikus pada setiap kelompok. Tikus dipelihara pada kandang berukuran 17.5 x 23.75 x 17.5 cm dengan suhu optimum ruangan tikus 22-24°C dan kelembaban 50-60%.

4.6.2 Pembuatan Ekstrak Etanol Propolis

Ekstraksi adalah metode untuk mengambil zat-zat yang terkandung dalam suatu campuran menggunakan pelarut yang sesuai. Pelarut yang diperbolehkan yaitu etanol, atau campuran keduanya. Etanol adalah pelarut yang paling sering digunakan karena mampu melarutkan zat yang bersifat polar, semipolar, non polar, mampu mengendapkan protein dan menghambat kerja enzim sehingga menghambat proses hidolisi dan oksidasi serta sifatnya yang tidak beracun (Khopkar, 2002). Propolis tidak bisa langsung digunakan. Propolis harus diekstraksi dengan pelarut yang cocok. Pelarut yang paling sering digunakan untuk ekstraksi adalah air, methanol, etanol, kloroform, diklorometana, eter, dan aseton. Banyak dari komponen antibakteri dapat larut di dalam air atau alkohol. Pelarut etanol juga memberikan efek aktifitas antioksidan propolis yang tertinggi dengan flavonoid yang terekstrak diantaranya yaitu kemferida (flavonol), akaseton (flavon) dan isoramnetin (Bankova et al, 2014).

Pengambilan sampel diawali dengan pembuatan rendaman propolis yang berasal dari propolis kasar (Radiati, 2008). Menurut Mantirezo dan Lamorena (2004) pembuatan ekstrak etanol propolis memerlukan perbandingan propolis dengan etanol yaitu 1:3. Alat yang digunakan yaitu Thermostirer berkecepatan 150 rpm selama 4 jam dibantu dengan Magnetic Stirrer 5 cm. Hasil yang diperoleh disaring menggunakan kertas saring hingga diperoleh filtrat propolis. Filtrat tersebut diuapkan dengan rotary evaporator pada suhu $\pm 70^{\circ}$ C berkecepatan 2-3 rpm untuk memisahkan filtrat dari pelarut. Ekstrak propolis

dihitung untuk membuat dosis kemudian ditambahkan dengan tween 80 pada (Lampiran 4) sebagai pengemulsi dan diencerkan dengan akuades. Hal ini dilakukan karena propolis bersifat lengket. Hewan coba kemudian diberikan ekstrak propolis secara peroral (Radiati, 2008).

4.6.3 Uji Fitokimia Ekstrak Etanol Propolis Lebah *Trigona sp*

Analisis fitokimia merupakan analisis kualitatif untuk mengetahui komponen bioaktif yang terdapat dalam tiap pelarut ekstrak etanol propolis. Uji fitokimia yang dilakukan menggunakan uji LC-MS pada (Lampiran 2). Uji *Liquid Chromatograph Mass Spectrometry* (LC-MS) merupakan teknik kromatografi cair dengan detektor spektrofotometer massa. Spektrofotometer massa bekerja dengan molekul pengion yang kemudian akan memilih dan mengidentifikasi ion menurut massa.

4.6.4 Dosis Ekstrak Etanol Propolis Lebah *Trigona sp*

Lethal dosage (LD_{50}) merupakan dosis yang dapat mematikan separuh hewan percobaan. Pada tikus LD_{50} propolis yang diberikan secara peroral mencapai 10.000 mg/kg (Sarto *and* Saragih, 2009). Hardianty (2011) menyatakan 10.000 mg propolis setara dengan 7 ons propolis sekali konsumsi pada manusia dengan berat badan 70 kg. Penelitian ini menggunakan dosis ekstrak etanol propolis lebah *Trigona sp* yaitu 15 mg/300 gr BB (Radiati, 2008). Kelompok P1, P2, dan P3 pada penelitian ini diberikan propolis dengan dosis sesuai perhitungan pada (lampiran 3) yaitu 10 mg/200 gr/hari, 20 mg/200 gr/hari, dan 30 mg/200 gr/hari dengan konsentrasi ekstrak etanol propolis 30 mg/ml.

4.6.5 Pemberian Ekstrak Etanol Propolis

Menurut Ngatidjan (2006) cara pemberian ekstrak etanol propolis pada tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) galur Wistar yaitu dipegang leher bagian belakang dengan tangan kiri sehingga kulit tikus terjepit ibu jari dan jari telunjuk. Pegangan diperkuat dengan jepitan pangkal ibu jari dengan ibu jari lainnya pada kulit punggung dan ekor dikaitkan dengan kelingking tangan kiri tersebut. Tangan kanan memegang sonde yang berisi bahan uji yaitu ekstrak etanol propolis lebah *Trigona sp.* Sonde dimasukan sampai ke lambung secara hati-hati. Sonde dipastikan tepat masuk ke lambung kemudian bahan uji dipompakan ke luar. Pemberian Ekstrak etanol propolis selama 21 hari.

4.6.6 Paparan Asap rokok

Pelakuan pertama pada tikus adalah pemberian paparan asap rokok menggunakan kandang kaca dengan smoking pump. Pemaparan asap rokok dilakukan pada kelompok kontrol positif dan kelompok perlakuan terapi dengan dosis 2 batang rokok per kelompok setiap hari selama 2 minggu (Hardi, 2014). Dua batang rokok per hari selama 2 minggu telah mengakibatkan kerusakan testis, maka dari itu kami ingin mencoba pemberian dua batang perhari selama 2 minggu. Tikus dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan secara acak. Kelompok pertama adalah kelompok kontrol negatif (K-) yang masing-masing tikus tidak diberi perlakuan apapun mulai hari ke-8 sampai hari ke-28. Kelompok kedua adalah kelompok kontrol positif (K+) yang masing-masing tikus diberi paparan asap rokok dua batang perhari selama 15 menit selama 14 hari tanpa diberi ekstrak propolis. Kelompok ketiga adalah perlakuan 1 (P1) yang masing-

masing tikus diberi paparan asap rokok dua batang perhari selama 15 menit selama 14 hari dan diberi ekstrak etanol propolis sebanyak 10 mg/200gr/hari. Kelompok keempat adalah perlakuan 2 (P2) yang masing-masing tikus diberi paparan asap rokok dua batang perhari selama 15 menit selama 14 hari dan diberi ekstrak propolis sebanyak 20 mg/200gr/hari. Kelompok kelima adalah perlakuan 3 (P3) yang masing-masing tikus diberi paparan asap rokok dua batang perhari selama 15 menit selama 14 hari dan diberi ekstrak etanol propolis sebanyak 30 mg/200gr/hari. Pemberian propolis dilakukan pada tikus kelompok ketiga (P1), kelompok keempat (P2), dan kelompok kelima (P3) secara peroral (PO) pada hari ke-8 hingga hari ke-28. Paparan asap rokok dilakukan pada tikus kelompok kontrol positif (K+), P1, P2, dan P3 pada hari ke-15 hingga hari ke-28.

4.6.7 Pengambilan Organ Testis

Pengambilan organ testis pada hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) dilakukan pada hari ke-29 setelah dipapar asap rokok dan diberi ekstrak etanol propolis lebah (*Trigona sp*). Organ testis didapatkan dengan cara euthanasia tikus melalui dislokasi leher. Tikus diletakan dengan posisi rebah ventral kemudian dilakukan pembedahan pada bagian abdomen dengan posisi tikus rebah dorsal. Testis tikus diambil dan dicuci NaCl fisiologis 0,9% dan dimasukkan dalam formalin 10% sebagai larutan fiksatif untuk pembuatan preparat histologi (Sulanda, 2014).

4.6.7 Pembuatan Preparat Histopatologi Testis

Langkah-langkah pembuatan preparat histopatologi testis menurut Jusuf (2009) yaitu fiksasi, dehidrasi, clearing, embedding, sectioning, pewarnaan HE dan pengamatan preparat histopatologi. Fiksasi dilakukan untuk mengawetkan dan mengeraskan jaringan setelah organ testis diambil. Fiksasi dilakukan dengan memasukkan sampel testis dalam formalin 10%. Dehidrasi merupakan tahapan untuk mengeluarkan air dari dalam jaringan tujuannya agar ruang-ruang antar sel dalam jaringan dapat diisi dengan parafin. Dehidrasi menggunakan alkohol secara bertingkat yaitu 70 % selama 1 hari , 80% selama 1 hari , 90%, 95% dan absolute selama 20 menit dalam suhu 4°C. *Clearing* merupakan tahap pengeluaran alkohol dari jaringan dan menggantinya dengan xylol yang dapat berikatan dengan parafin. *Embedding* merupakan proses pengeluaran cairan clearing agent dari jaringan kemudian diganti dengan parafin. Jaringan testis dicelupkan parafin cair kemudian parafin akan memadat. Untuk pembuatan preparat testis, hasil dari tahap embedding dimasukkan pada penjepit (*block holder*) kemudian berlanjut pada tahap sectioning yang diawali dengan mengatur ukuran ketebalan irisan yaitu $\pm 4\mu\text{m}$. Hasil irisan kemudian dipindahkan menggunakan kuas ke air hangat 38-40°C. Irisan tersebut diambil dengan gelas objek. Potongan dikeringkan dan diletakan diatas hot plate 40⁰-45⁰C sampai kering kemudian dilakukan pewarnaan hematoklin dan eosin atau dikenal dengan pewarnaan Hematoxilin Eosin (HE). Pewarnaan diawali dengan memasukkan preparat dalam xilol I dan II selama 5 menit yang disebut sebagai proses deparafinasi. Selanjutnya preparat dimasukkan dalam etanol bertingkat

dari etanol absolut, 95 %, 90 %, 80 %, dan 70 % selama 5 menit yang disebut sebagai proses rehidrasi. Setelah proses rehidrasi, preparat direndam dalam aquades selama 5 menit kemudian dilakukan pewarnaan hematoxilin selama 10 menit. Hasil pewarnaan dicuci selama 30 menit dengan air mengalir dan dibilas dengan aquades selama 5 menit. Selanjutnya dilakukan pewarnaan dengan eosin selama 5 menit dan dicuci kembali selama 10 menit dengan air mengalir serta dibilas dengan aquades selama 5 menit. Setelah pewarnaan, dilakukan dehidrasi dengan memasukkan preparat pada alkohol dari 80 %, 90 %, dan 95 % hingga alkohol absolut. Selanjutnya dilakukan clearing dengan memasukkan xilol I-III selama 3 menit dan dikering anginkan. Tahapan terakhir yaitu *mounting* (perekatan) menggunakan entellan serta ditutup menggunakan *cover glass* (Lampiran 7). Hasil pembuatan preparat histopatologi testis dilakukan pembesaran mikroskop cahaya Olympus BX51 perbesaran lemah (100x) dilanjutkan perbesaran kuat (400x) untuk melihat adanya perubahan histopatologi testis berupa nekrosis secara kualitatif. Menurut Widhiantara (2010), Perhitungan jumlah sel leydig pada bagian interstisial testis atau di antara tubulus seminiferus yang satu dengan lainnya 5 lapang pandang dengan pembesaran mikroskop (400x).

4.6.8 Pemeriksaan Profil Pita Protein Testis

4.6.8.1 Persiapan Sampel Testis

Organ testis ditimbang sebesar 0,5 gr dengan menggunakan timbangan digital lalu organ dipotong kecil-kecil dengan menggunakan gunting, kemudian ditambah larutan PBS-Tween : PMSF (9 : 1) sebanyak 1 mL, ditambah sedikit

pasir kuarsa dan digerus dengan mortar dingin diletakkan di atas balok es. Setelah itu homogenat ditambah dengan larutan PBS-Tween : PMSF (9 : 1) sebanyak 2 ml dan dipindahkan kedalam mikrotube. Kemudian dihomogenkan dengan menggunakan vortex kemudian disentrifugasi selama 15 menit (6000 rpm). Selanjutnya supernatnya diambil dan di masukkan kedalam mikrotube dan ditambah etanol absolut dingin dengan perbandingan 1:1 dan dibiarkan selama semalam hingga terbentuk endapan. Setelah itu disentrifugasi 10.000 rpm selama 15 menit, diambil endapannya dan keringkan sampai bau etanol hilang. Kemudian endapan ditambah dengan larutan 0,02 M Tris-HCl pH 6,5 dingin dengan perbandingan volume 1:1 (Walter, 2000). Supernatan yang terbentuk dimasukkan ke dalam tabung yang baru untuk digunakan pengujian profil pita protein testis berdasarkan berat molekulnya dengan metode SDS-PAGE.

4.6.8.2 Proses SDS-PAGE

Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrilamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) merupakan teknik yang dapat digunakan untuk menganalisa munculnya protein penanda kerusakan sel dengan cara memisahkan rantai polipeptida pada protein berdasarkan berat molekulnya yang mempengaruhi kemampuan bergerak dalam arus listrik. Metode ini sering digunakan untuk memonitor pemurnian protein dan menentukan berat molekul protein (Wilson and Walker, 2000). Penambahan SDS dan pemanasan akan mendenaturasi protein. SDS akan menyelubungi setiap molekul protein dengan muatan negatif sehingga akan tertarik ke arah anoda apabila ditempatkan pada medan listrik. Poliakrilamid

digunakan sebagai medium karena memiliki ukuran pori-pori yang kecil sehingga molekul kecil lebih cepat bermigrasi dari pada molekul yang besar (Saputra, 2014).

Menurut Rantam (2003) langkah kerja SDS-PAGE yaitu mencetak running gel 12%, mencetak stacking gel 5%, persiapan sampel, elektroforesis,, pencucian hasil running. Tahapan dalam mencetak running gel 12% yaitu diawali dengan pencampuran bahan-bahan running gel 12% (acrylamide 2,5 ml, Tris HCl (pH 8,8) 1,2 ml, SDS 10% 1,2 ml, aquadest 1,1 ml, TEMED 5 μ l, APS 10% 30 μ l) sampai homogen kemudian campuran tersebut dimasukkan dalam gelas plate melalui dindingnya agar tidak terbentuk gelembung, sampai \pm 1 cm dari atas. Buthanol ditambahkan diatasnya sampai penuh (\pm 1 ml) kemudian dibiarkan selama 25 menit pada suhu kamar agar gel membeku, selanjutnya sisa buthanol dibuang dan dibersihkan dengan PBS lalu dikeringkan. Tahapan mencetak stacking gel 5% sama seperti mencetak running gel yaitu bahan-bahan stacking gel 5% (acrylamide 0,66 ml, Tris HCl (pH 6,8) 0,8 ml, SDS 10% 0,8 ml, aquadest 0,8ml, TEMED 4 μ l, APS 10% 20 μ l) dicampur hingga homogen kemudian campuran tersebut dimasukkan di atas running gel yang telah mengeras hingga penuh. Comb dimasukkan dan diinkubasikan pada suhu kamar selama 15-25 menit sampai stacking gel mengeras. Langkah terakhir yaitu melepas serta mencuci stacking gel dengan electrophoresis buffer. Sampel menggunakan supernatan yang telah disiapkan pada tahap persiapan sampel testis sebanyak 15 μ l kemudian dicampur dengan Laemmli buffer dengan perbandingan 2:1 lalu dimasukkan ke dalam appendorf yang telah di lubangi tutupnya dengan jarum $\frac{1}{2}$

tusukan (3 lubang). Campuran tersebut dipanaskan dengan waterbath pada suhu 100°C selama 5 menit. Elektroforesis dimulai dengan memasang gelas plate dan dirangkai dengan frame dari bio-Rad. Sampel dan marker yang telah dibuat dimasukkan ke dalam lubang comb. Marker yang digunakan adalah Unstained Broad Range Protein Ladder dengan berat molekul 5 – 250 kDa. Elektroforesis dijalankan dengan tegangan 125 V dan kuat arus 40 mA. Proses ini dihentikan setelah warna biru turun (Laemmli turun) kurang lebih tiga sampai empat jam. Pencucian hasil running dilakukan setelah tahap elektroforesis. Gel hasil elektroforesis dimasukkan ke dalam petridish dan dilakukan 4 kali pencucian. Pencucian pertama menggunakan methanol 25 ml, acetic acid 3,75 ml, aquadest. Pencucian kedua menggunakan methanol 2,5 ml, acetic acid 3,75 ml, aquadest. Pencucian ketiga menggunakan glutaraldehyde 10 %. Pencucian keempat menggunakan aquadest 100 ml sebanyak 3 kali pencucian. Masing-masing pencucian dilakukan selama 30 menit.

4.6.8.3 Pewarnaan dengan Comassie Brilliant Blue-250

Gel hasil elektroforesis kemudian dilakukan pewarnaan dengan *Comassie Brilliant Blue-250* selama 30-60 menit. Selama proses pewarnaan dilakukan dengan gel tetap digoyang kemudian gel dicuci dalam larutan destining selama 24 jam (w/v) dengan tetap digoyang. Setelah proses pewarnaan akan diperoleh pita-pita protein yang tampak pada gel.

4.6.8.4 Penentuan Berat Molekul

Lembaran gel hasil pewarnaan didokumentasi dengan mesin Gel-Doc kemudian dilakukan pengukuran terhadap hasil gambar dalam bentuk

softcopy. Jenis-jenis protein diketahui dengan membandingkan berat molekul hasil SDS-PAGE dengan marker protein dalam sampel. Kemudian dilakukan pengukuran panjang tracking pita. Panjang tracking pita yaitu panjang track dari atas pita sampai dasar pita. Jarak tracking tiap band yaitu panjang track dari atas pita sampai band yang akan dicari berat molekulnya. Pita pertama yang harus dihitung adalah pita protein marker karena pada protein marker telah diketahui berat molekulnya sehingga digunakan sebagai panduan mencari berat molekul sampel lainnya. Selanjutnya mencari nilai retention factor (rf) yaitu dengan membagi jarak tracking dengan panjang tracking, setelah didapatkan nilai (rf) maka dibuat rumus persamaan garis lurusnya, rumus inilah yang digunakan mencari berat molekul sampel yang diuji, pada rumus tersebut terdiri atas sumbu x dan sumbu y, nilai (rf) sebagai sumbu y dan sumbu x sebagai log berat molekul, untuk mendapat nilai berat molekul maka antilog berat molekul tersebut (Arif, 2012). Penentuan berat molekul dilakukan dengan menghitung nilai R_f (*Retardation factor*) dari masing-masing pita dimana:

$$R_f = \frac{\text{jarak pergerakan protein dari tempat awal (cm)}}{\text{jarak pergerakan warna dari tempat awal (cm)}}$$

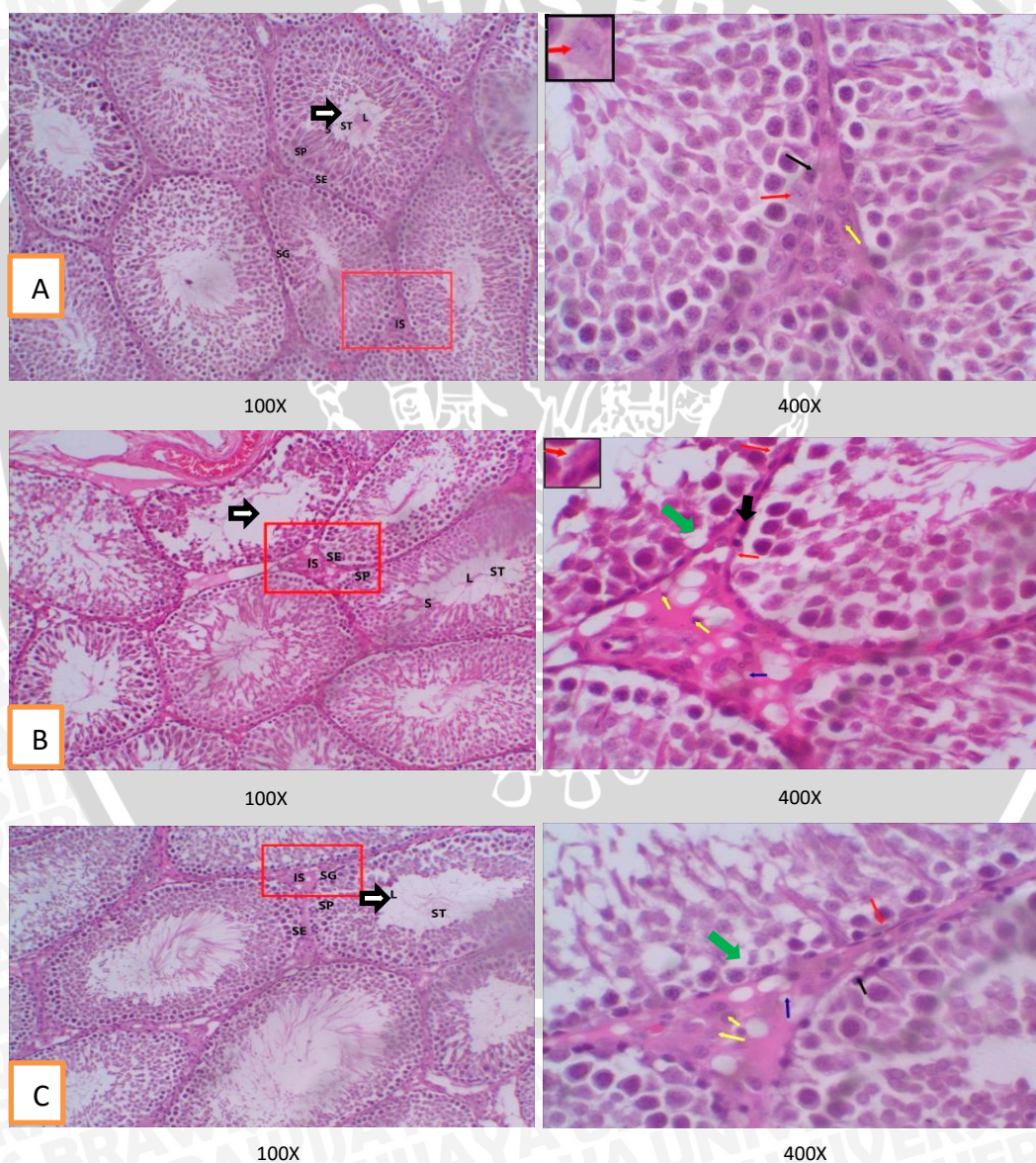
4.6.9 Analisis Data

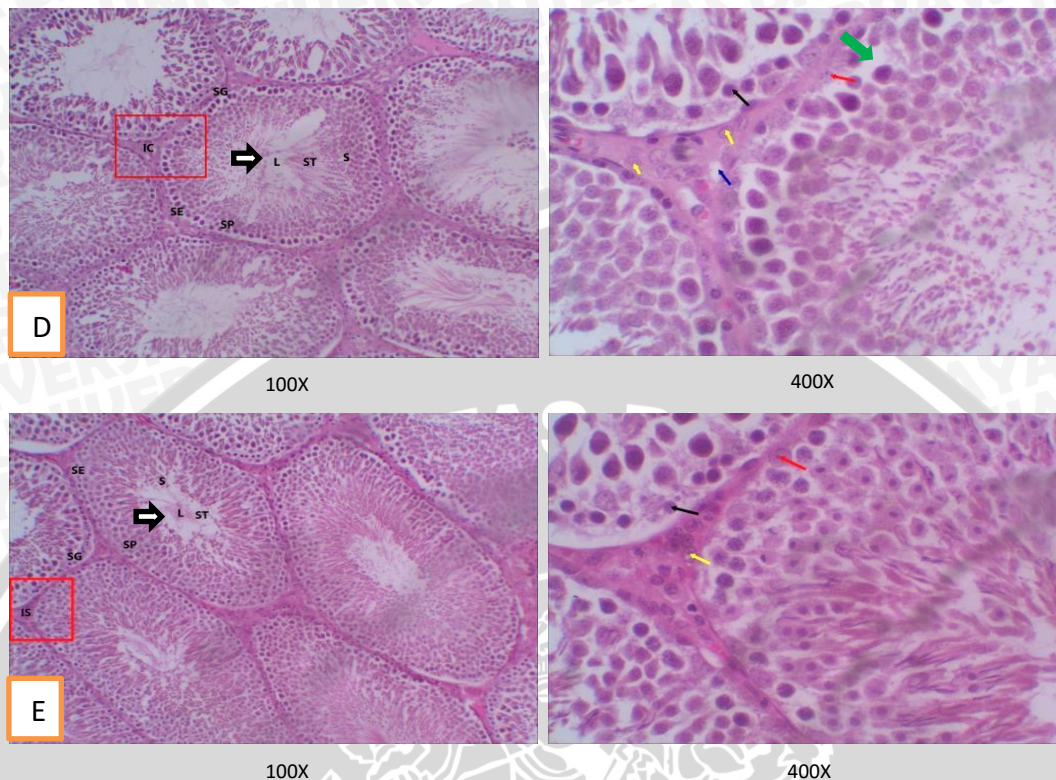
Analisa data yang digunakan dalam penelitian yaitu histopatologi testis dengan analisa kualitatif dan kuantitatif. Data Kuantitatif didapatkan dari perhitungan sel leydig dalam 5 lapang pandang, dilanjutkan analisa statistik menggunakan One-Way ANOVA dan uji BNP ($p < 0,05$) dan profil pita protein testis dengan analisa secara semi kuantitatif untuk menghitung berat molekul protein yang muncul.

BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Efek Preventif Ekstrak Etanol Propolis Lebah *Trigona sp* terhadap Histopatologi Testis Tikus (*Rattus norvegicus*) Hasil Paparan Asap rokok

Efek Preventif Ekstrak Etanol Propolis Lebah *Trigona sp* terhadap Histopatologi Testis Tikus (*Rattus norvegicus*) Hasil Paparan Asap rokok diamati secara kualitatif (Gambar 5.1) dan kuantitatif (Tabel 5.1) yang dapat diketahui melalui pewarnaan Hemaktosilin-Eosin (HE)





Gambar 5.1 Penampang melintang histopatologi testis tikus. K- (A). K+ (B) P1 (C). P2 (D). P3 (E). Ket. *Interstitial cell* (IC), spermatogonium (SG), spermatositosi primer (sp), spermatid (S), spermatozoa (ST), sel sertoli (SE), Panah(↷) = perubahan lumen tubulus seminiferus, → = sel spermatogonium, → = sel sertoli, → = sel leydig, → = vakuola, dan → = ruang kosong. Perbesaran mikroskop: 100× dan 400x; Pewarnaan menggunakan Hematoksilin-Eosin.

Tubulus seminiferus di kelilingi oleh membran basal yang ditutupi oleh jaringan ikat fibrosa dan sel myoid. Tubulus seminiferus merupakan tempat terjadinya spermatogenesis. Proses spermatogenesis dimulai dari sel spermatogonium yang terletak dibasal dengan bentuk sel yang besar dengan inti besar dan sitoplasma pucat. Sel-sel tersebut mengalami mitosis dan menghasilkan spermatosit primer yang memiliki ukuran paling besar (diantara sel-sel gamet), inti heterochromatic, dan terletak di antara membran basal dan lumen tubulus. Kemudian dari pembelahan meiosis pertama ini timbul sel berukuran lebih kecil

yang disebut spermatosit sekunder yang kromosom haploid. Selanjutnya spermatosit sekunder akan membelah secara meiosis II membentuk spermatid berukuran kecil dan intinya dengan daerah kromatin padat. Setelah itu, terjadi transformasi spermatid menjadi spermatozoa disebut spermiogenesis.

Pada tubulus seminiferus juga terdapat sel sertoli, dan sel spermatogenik yang berperan penting pada spermatogenesis. Menurut Heffner (2008), sel sertoli berperan dalam menutrisi saat spermatogenesis dan memfagosit sitoplasma spermatid yang dikeluarkan. Selain itu sel ini menghasilkan *Androgen Binding Protein (ABP)*. Peningkatan ABP ini menyebabkan tingginya konsentrasi testosteron yang penting bagi pembentukan dan pematangan spermatozoa pada proses spermatogenesis. Sedangkan Sel leydig memproduksi hormon testosteron yang diperlukan untuk memulai proses meiosis pada sel spermatosit juga berfungsi dalam pematangan spermatozoa dalam epididimis.

Hasil pengamatan pada jaringan testis tikus jantan galur Wistar kelompok negatif (A) memperlihatkan lumen tubulus seminiferus padat akan sel spermatogenik dan sel sertoli. Sel spermatogenik tersusun berlapis sesuai dengan tingkat perkembangannya dari membran basalis menuju ke arah lumen tubulus dan sel Sertoli memiliki warna pucat dengan nukleus berbentuk oval inti dan bentuk sel yang tidak beraturan, sedangkan di antara tubulus terdapat sel leydig bergerombol yg memiliki inti bulat dan sitoplasma granular yang eosinofilik. Hal ini menandakan spermatogenesis berjalan dengan normal. Sesuai dengan pendapat Hargono (2013), menyatakan bahwa spermatogenesis normal dicirikan dengan sel spermatogenik tersusun berlapis sesuai dengan tingkat

perkembangannya dari membran basalis menuju ke arah lumen tubulus yakni spermatogonia, spermatosit, spermatid.

Pada kelompok Kontrol Postif (B) kepadatan spermatozoa di dalam lumen tubulus jelas berbeda dengan yang terlihat pada kelompok kontrol. Lumen tubulus mengandung spermatosit dan spermatid yang lebih sedikit sehingga lumen terlihat lebih besar dan tidak terisi penuh dengan spermatozoa. Kemudian adanya kerusakan sel yang mengarah pada kematian sel sertoli berupa membran sel yang mengalami penyusutan akibat radikal bebas asap rokok. Struktur membran sel tersusun atas gabungan dari sekelompok molekul yang berikatan sangat kuat, bermuatan netral serta saling berkaitan satu dengan yang lain. Kerusakan membran sel akibat radikal bebas akan mengubah seluruh struktur makromolekul membran sel dan menyebabkan gangguan pada proses metabolisme sel. Proses metabolisme sel yang terganggu menyebabkan sel tidak dapat mempertahankan fluiditas dan komponen yang berada dalam intrasel sehingga sel mengalami kematian (nekrosis). Terjadinya penyusutan sel sertoli dan sel leydig mengakibatkan gangguan hormonal pada tikus. Menurut Permatasari (2014), rusaknya sel leydig dan sel sertoli akan mempengaruhi kerja hormon LH, FSH dan testosteron. Ikatan antara LH dengan reseptor LH pada bagian membran sel dapat terhambat, sehingga sel leydig tidak dapat mensekresi hormon testosteron secara optimal. Ikatan FSH dengan reseptor FSH yang terhambat menyebabkan terhambatnya perkembangan sel sertoli sebagai penghasil *androgen binding protein* (ABP) yang menjadi *carrier* testosteron. Menurunnya jumlah ABP berbanding lurus dengan penurunan jumlah testosteron yang berperan dalam



spermatogenesis. Hal ini didukung oleh pendapat Sukmaningsih (2009) menyatakan bahwa kandungan nikotin dan PAH dalam asap rokok mempengaruhi kerja sistem saraf pusat dengan cara menghambat kerja GnRH sehingga rangsangan terhadap testis berkurang dan pembentukan FSH (*Follicle Stimulating Hormone*) dan LH (*Luteinizing Hormone*) terhambat. Pada pengamatan histologi testis terlihat adanya vakuola di daerah interstitial tubulus seminiferus dikarenakan: Adanya proses autofagi sel leydig. Menurut Kundu dan Thompson (2008), autofagi merupakan proses katabolisme pemecahan komponen-komponen sel yang tidak lagi diperlukan dalam keadaan normal maupun patologis. Vakuola berperan penting dalam proses autofagi. Selama proses autofagi dilakukan oleh lisosom, sedangkan vakuola menjaga keseimbangan antar biogenesis dan degradasi zat-zat dalam sel. Selain itu, juga terdapat ruang kosong berbentuk bulat di daerah membran basal yang dimungkinkan karena lisisnya sel spermatosit. Sel spermatosit yang lisis diakibatkan karena sel tidak dapat mempertahankan fluiditas sehingga sel mengalami kematian dan meninggalkan ruang kosong di membran basal.

Pada kelompok perlakuan propolis 10 mg/200 gr (C) dan 20 mg/200gr BB (D) kepadatan spermatozoa di dalam lumen tubulus jelas berbeda dengan yang terlihat pada kelompok kontrol negatif serta masih terdapat penyusutan sel sertoli dan sel leydig meskipun tidak sebanyak pada kontrol positif. Hal ini dikarenakan efek ekstrak etanol propolis memiliki daya antioksidan yang lebih rendah dan belum mampu untuk menetralkan radikal bebas. Pemberian propolis sebagai antioksidan eksogen terbukti dapat mencegah terjadinya peningkatan ROS. Hal ini

disebabkan karena ROS yang tidak dapat dinetralisir oleh antioksidan endogen, akan dinetralisir oleh berbagai antioksidan yang dikandung propolis salah satunya yakni CAPE (*Caffeic Acid Phenetyl Ester*) yang terdapat dalam kandungan Flavonoid Ekstrak Etanol Propolis *Trigona sp.* Kemampuan propolis sebagai antioksidan dapat menangkap radikal hidroksi dan superoksida kemudian menetralkan radikal bebas sehingga melindungi sel dan mempertahankan keutuhan struktur sel dan jaringan serta dapat melindungi membran lipid.

Pada kelompok perlakuan propolis 30 mg/200 gr (E), kepadatan spermatozoa di dalam lumen tubulus terlihat padat dan tidak berbeda nyata dengan kelompok kontrol negatif. Kemudian tidak terdapat adanya penyusutan sel sertoli dan sel leydig yang menandakan spermatogenesis berjalan normal. Ini disebabkan karena propolis 30 mg/200 gr mampu bertindak sebagai pencegahan penyusutan dan fragmentasi sel dengan cara propolis sebagai antioksidan dapat menangkap radikal hidroksi dan superoksida kemudian menetralkan radikal bebas sehingga melindungi sel dan mempertahankan keutuhan struktur sel dan jaringan serta dapat melindungi membran lipid. Adapun data pendukung rerata jumlah sel leydig tubulus seminiferus pada 5 lapang pandang (Tabel 5.1).

Tabel 5.1 Rerata jumlah sel leydig pada tubulus seminiferus testis tikus jantan galur Wistar pada 5 lapang pandang yang diberikan ekstrak etanol propolis lebah *Trigona sp* dan paparan asap rokok

Kelompok	Mean±SD	Peningkatan	Penurunan
K(-)	107.5±5.25 ^d	-	-
K(+)	40.25±4.99 ^a	-	62,5%
P1	55.5±9.94 ^b	37,5%	-
P2	74.25±5.12 ^c	84,5%	-
P3	96±5.59 ^d	138,5%	-

Keterangan : Perbedaan notasi (a,b,c,d) menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antar perlakuan terhadap jumlah sel leydig (p<0.05).

Perbedaan rerata jumlah sel leydig antara kelompok Kontrol negatif (tidak diberi paparan asap rokok) dengan kelompok Kontrol positif (diberi paparan asap rokok) menunjukkan perbedaan hasil yang signifikan ($p < 0,05$) (**Tabel 5.1**). Pada kelompok Kontrol Positif terjadi penurunan rerata jumlah sel leydig pada testis tikus jantan jika dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif. Penurunan rata-rata jumlah sel leydig pada kelompok Kontrol positif menunjukkan bahwa paparan asap rokok yang diberikan selama 14 hari dapat menurunkan jumlah sel leydig.

Pemberian preventif ekstrak etanol propolis lebah *Trigona sp* dengan dosis 10 mg/200grBB (P1), 20 mg/200grBB (P2) dan dosis 30 mg/200grBB (P3) dapat mencegah dari penyusutan sel leydig jika dibandingkan dengan kelompok positif (**Tabel 5.1**). Secara statistika jumlah rata-rata sel leydig kelompok P1 dan P2 menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan ($p > 0,05$) dengan kelompok Kontrol positif. Sedangkan kelompok P3 menunjukkan perbedaan jumlah rata-rata yang signifikan ($p < 0,05$) dengan kelompok Kontrol positif. Sehingga dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol propolis 30mg/200grBB/hari dapat mencegah penyusutan sel leydig secara signifikan jika dibandingkan dengan dosis lainnya.

Tikus Kelompok Kontrol negatif (K-) memiliki rata-rata jumlah sel leydig 107,5 karena hanya diberi pakan normal sehingga secara fisiologis jumlah radikal bebas tidak melebihi jumlah antioksidan dalam tubuh sehingga antioksidan yang terdapat dalam tubuh mampu menetralsir radikal bebas yang ada dan menghambat terjadinya peroksidasi lipid.

Tikus Kelompok Kontrol Sakit (K+) memiliki rata-rata jumlah sel leydig 40.25 dan mengalami penurunan rerata jumlah sel leydig sebesar 62,5%. Hal ini disebabkan karena jumlah radikal bebas (ROS) akan meningkat dalam tubuh dan akan memicu terjadinya proses peroksidasi lipid. Menurut Pangkahila (2007), asap rokok yang merupakan sumber radikal bebas dapat mengakibatkan kerusakan sel secara umum dengan tiga cara yaitu Peroksidasi komponen lipid dari membran sel dan sitosol, yang menyebabkan serangkaian reduksi asam lemak (otokatalisis) yang berakibat kerusakan membran dan organel sel, merusak DNA yang mengakibatkan mutasi DNA bahkan kematian sel, dan modifikasi protein teroksidasi. Penurunan jumlah sel leydig pada hewan coba yang menerima perlakuan paparan asap rokok akan menyebabkan terjadinya penurunan sekresi hormon testosteron secara umum dan secara langsung akan menghambat proses spermatogenesis. Jika keadaan ini berlangsung dalam waktu yang cukup lama maka akan meningkatkan potensi infertilitas dan terhambatnya aktivitas reproduksi hewan coba tersebut.

Rata-rata jumlah sel leydig pada tikus kelompok P1 dan P2 secara statistika berbeda nyata dengan kelompok kontrol sehat (K-) yang ditunjukkan dengan notasi yang berbeda dengan Kontrol sehat, sehingga dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak etanol propolis lebah *Trigona sp* masing-masing dengan dosis 10mg/200gr/hari dan 20mg/200gr/hari belum mampu mencegah kerusakan sel leydig pada tikus yang telah dipapar asap rokok 2 batang perhari selama 14 hari. Rendahnya rata-rata jumlah sel leydig pada Kelompok P1 dan P2 jika dibandingkan dengan P3 disebabkan karena dosis pemberian ekstrak etanol

propolis yang lebih rendah dari kelompok P3 sehingga memiliki daya antioksidan yang lebih rendah dan belum mampu untuk menetralsir radikal bebas sebagai pemicu terjadinya peroksidasi lipid secara signifikan.

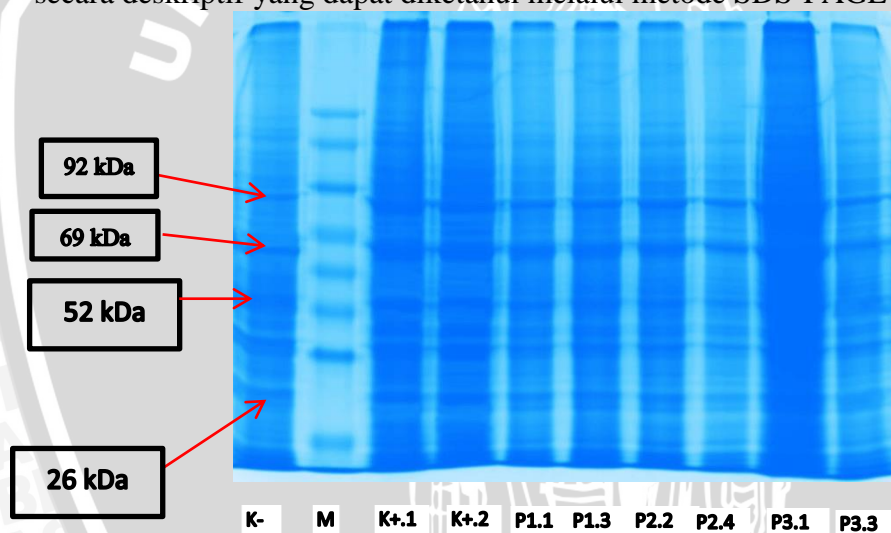
Rata-rata jumlah sel leydig tikus Kelompok P3 secara statistika tidak berbeda nyata dengan Kontrol Sehat (K-) yang ditunjukkan dengan notasi yang sama, dengan rata-rata lebih rendah jika dibandingkan dengan Kelompok Sehat serta peningkatan jumlah rerata sel leydig sebesar 138,5% . Hal ini disebabkan pemberian terapi ekstrak etanol propolis lebah *Trigona sp* dengan dosis 30 mg/200gr/hari pada tikus Kelompok P3 yang sebelumnya yang telah dipapar asap rokok 2 batang perhari selama 14 hari mampu mencegah kerusakan sel leydig dalam tubuh. Ekstrak etanol propolis lebah *Trigona sp* memiliki kandungan CAPE yang dapat menetralsir radikal bebas yang dapat timbul dari pemaparan asap. Kemampuan propolis sebagai antioksidan eksogen dalam tubuh akan mengurangi pembentukan radikal bebas yang berperan dalam proses peroksidasi lipid, sehingga apabila proses peroksidasi lipid dapat dicegah.

Pemberian propolis sebagai antioksidan eksogen terbukti dapat mencegah terjadinya peningkatan ROS. Hal ini disebabkan karena ROS yang tidak dapat dinetralsir oleh antioksidan endogen, akan dinetralsir oleh berbagai antioksidan yang dikandung propolis salah satunya yakni CAPE (*Caffeic Acid Phenetyl Ester*) yang terdapat dalam kandungan Flavonoid Ekstrak Etanol Propolis *Trigona sp*. Kemampuan propolis sebagai antioksidan dapat menangkap radikal hidroksi dan superoksida kemudian menetralkan radikal bebas sehingga melindungi sel dan mempertahankan keutuhan struktur sel dan jaringan serta dapat melindungi

membran lipid. Flavonoid (CAPE) dan terfenoid pada propolis dapat memberikan elektron pada O₂- dan mengubahnya menjadi O₂ Propolis mengandung fenol yang mempunyai daya antioksidan lebih poten dari vitamin C dan vitamin E, sehingga dapat meredam reaksi rantai yang ditimbulkan ROS dengan baik. (Hairrudin, 2009).

5.2 Efek Preventif Ekstrak Etanol Propolis Lebah *Trigona sp* terhadap Profil Pita Protein Testis Tikus (*Rattus norvegicus*) Hasil Paparan Asap rokok

Efek Preventif Ekstrak Etanol Propolis Lebah *Trigona sp* terhadap Profil Pita Protein Testis Tikus (*Rattus norvegicus*) Hasil Paparan Asap rokok akan diamati secara deskriptif yang dapat diketahui melalui metode SDS-PAGE (Gambar 5.2)



Tabel 5.2 Profil Pita Protein Testis

BM (kDa)	Kelompok				
	Kontrol negatif	Kontrol positif	Preventif 10mg/200gr BB	Preventif 20mg/200gr BB	Preventif 30mg/200gr BB
92	✓	✓✓	✓	✓	✓
69	✓	✓✓	✓	✓	✓
52	✓✓	✓	✓	✓	✓✓
26	✓✓	✓	✓✓	✓✓	✓✓

Keterangan : ✓✓ : terekspresi lebih banyak, ✓ : terekspresi lebih sedikit

Gambar 5.2 menunjukkan protein dengan berat molekul 92 kDa diduga sebagai *Heat Shock Protein* (HSP90). Hsp90 adalah suatu jenis protein chaperone yang banyak ditemukan dan berpartisipasi dalam pelipatan (*folding*), pengelompokan (*assembly*), pematangan dan stabilisasi protein-protein seluler, terutama protein yang berperan dalam transduksi sinyal, regulasi siklus sel, dan pertahanan diri. Hsp90 terlihat berperan sebagai salah satu faktor dalam kaskade sinyal untuk aktivasi eNOS. Selain aktivasi eNOS, penempelan Hsp90 pada eNOS juga akan mengubah bentuk konformasi eNOS. Perubahan konformasi ini menentukan molekul apakah yang akan dihasilkan eNOS. Molekul itu dapat berupa NO. Jadi, sejauh ini Hsp90 diketahui berperan dalam melakukan inhibisi terhadap produksi superoksida dan meningkatkan sintesis NO melalui jalur fosforilasi untuk mengaktifkan eNOS. *Endothelial nitric-oxide synthase*/eNOS yang teraktivasi oleh Hsp90 kemudian akan menghasilkan produk nitrit oksida (NO), suatu radikal bebas yang penting dalam mempertahankan homeostasis. NO yang dihasilkan oleh sel endotel akan mengakibatkan vasodilatasi, inhibisi agregasi platelet, penempelan leukosit, dan proliferasi otot polos vaskular. Pada kelompok kontrol positif, protein dengan berat molekul 92 kDa terekspresi banyak yang mengindikasikan terjadinya peningkatan *Reactive Oxygen Species* (ROS) melalui oksidasi metabolit menjadi senyawa yang lebih reaktif.

ROS dari asap rokok dalam kadar yang tinggi pada semen, menimbulkan terjadinya stres oksidatif. ROS tersebut menyebabkan kerusakan pada DNA, protein, dan lipid. Sehingga protein dengan berat

molekul 92 kDa akan meningkat untuk melindungi sel. Pada kelompok P1 dan P2 masih terlihat ekspresi protein dengan berat molekul 92 kDa banyak terlihat dari tebalnya pita protein pada tabel 5.2. yang berarti bahwa ekstrak etanol propolis lebah *Trigona sp* 10 mg/200grBB dan 20 mg/200 gr BB belum mampu menurunkan ekspresi protein berat molekul 92 kDa. Pada kelompok P3 ekspresi protein berat molekul 92 kDa sedikit yang berarti ekstrak etanol propolis lebah *Trigona sp* 30 mg/200 gr BB telah mampu menurunkan *Reactive Oxygen Species* (ROS), diperlihatkan dengan pita protein yang tipis.

Gambar 5.2 menunjukkan protein dengan berat molekul 69 kDa diduga sebagai *Heat Shock Protein* (HSP70). HSP70 merupakan kelompok dari Hsp terdiri polipeptida yang berat molekul berkisar 66-78 kDa. Di testis, *heat shock protein* (Hsp) diperlukan untuk spermatogenesis dan melindungi sel dari bahaya lingkungan seperti panas, radiasi, dan bahan kimia (Rockett et al. 2001). Pada keadaan stres, biasanya sel berada pada kondisi yang tidak menguntungkan untuk pelipatan protein. HSP 70 akan terekspresi lebih banyak. Peningkatan ekspresi chaperone membantu perbaikan dari kerusakan protein dari keadaan yang memungkinkan terjadinya stres (Koeva et.al. 2005). Pada kelompok kontrol positif, protein dengan berat molekul 69 kDa terekspresi banyak yang mengindikasikan terjadinya peningkatan *Reactive Oxygen Species* (ROS) melalui oksidasi metabolit menjadi senyawa yang lebih reaktif.

ROS dari asap rokok dalam kadar yang tinggi pada semen, menimbulkan terjadinya stres oksidatif. ROS tersebut menyebabkan kerusakan pada DNA, protein, dan lipid. Sehingga protein dengan berat molekul 69 kDa akan meningkat untuk melindungi sel. Pada kelompok P1 dan P2 masih terlihat ekspresi protein dengan berat molekul 69 kDa banyak terlihat dari tebalnya pita protein pada tabel 5.2. yang berarti bahwa ekstrak etanol propolis lebah *Trigona sp* 10 mg/200grBB dan 20 mg/200 gr BB belum mampu menurunkan ekspresi protein berat molekul 69 kDa. Pada kelompok P3 ekspresi protein berat molekul 69 kDa sedikit yang berarti ekstrak etanol propolis lebah *Trigona sp* 30 mg/200 gr BB telah mampu menurunkan *Reactive Oxygen Species* (ROS), diperlihatkan dengan pita protein yang tipis. Menurut Koeva *et.al.*, (2005) Pita protein 69 kDa akan tetap ada dan tidak hilang dikarenakan dalam kondisi normal, protein tersebut disintesis selama fase meiosis spermatogenesis.

Gambar 5.2 menunjukkan protein dengan berat molekul 52 kDa diduga sebagai Androgen Binding Protein (ABP). Menurut Munell *et. al* (2002), Androgen-binding protein (ABP) adalah glikoprotein yang dihasilkan oleh sel Sertoli testis dan disekresi terutama ke lumen tubulus seminiferus. ABP mengikat androgen dan estrogen tertentu dengan afinitas tinggi dan diinternalisasi oleh sel-sel spermatogenik dan epididimis melalui spesifik reseptor. Protein ini dapat mempengaruhi tindakan steroid dengan mengubah serapan dan metabolisme Ligan serta dengan berinteraksi langsung dengan reseptor spesifik pada sel target. Konsentrasi ABP testis rendah selama

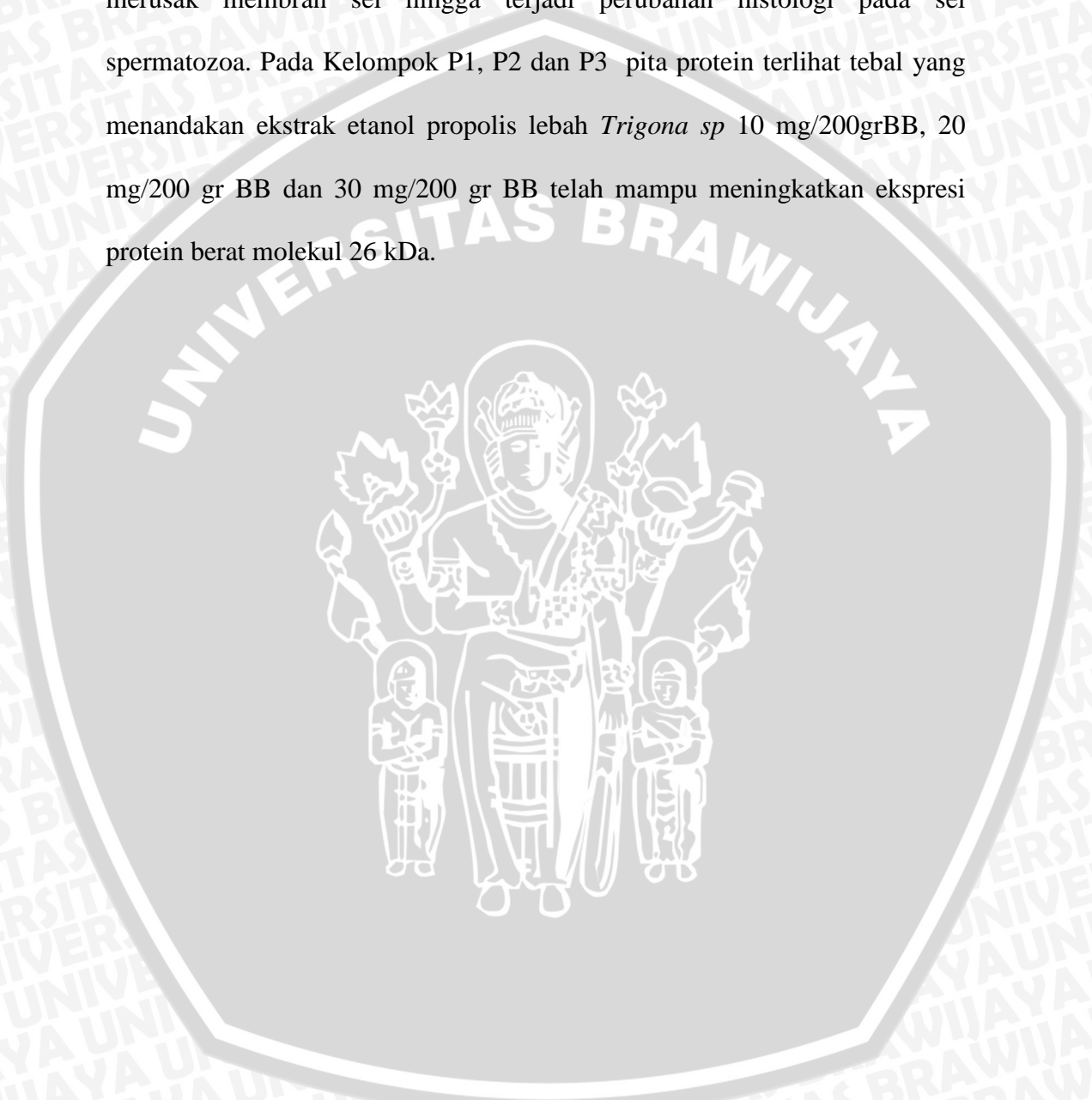
periode perinatal dan peningkatan selama masa pubertas. *Androgen binding Protein* berkisar dari 46 kDa sampai 60 kDa, dengan mayoritas isoform > 50 kDa. Penurunan *Androgen Binding Protein* (ABP) menandakan terhambatnya hipotalamus mengeluarkan faktor pelepas yang menstimulus kelenjar hipofisa anterior untuk sekresi FSH. Sehingga FSH akan menurunkan rangsangan terhadap sel sertoli penghasil ABP. Menurunnya jumlah ABP berbanding lurus dengan penurunan jumlah testosteron yang berperan dalam spermatogenesis. Menurut Rahmawati (2013), efek nikotin pada asap rokok yang bekerja langsung pada bagian *medial basal* hipotalamus. Pengaruh nikotin dalam asap rokok terhadap indeks sel sertoli pada hewan coba tikus dilaporkan oleh Ahmadnia et al. (2007), didapatkan bahwa terjadi penurunan indeks sel sertoli. Sehingga pada kelompok kontrol positif pita protein dengan berat molekul 52 kDa yang terekspresi sedikit. Pada kelompok kontrol negatif ekspresi dari pita protein 52 kDa banyak yang menandakan *Androgen Binding Protein* (ABP) terproduksi secara normal. Sedangkan pada Kelompok P1 dan P2 pita protein terlihat masih berbeda nyata dengan kelompok kontrol negatif yang menandakan ekstrak etanol propolis lebah *Trigona sp* 10 mg/200grBB dan 20 mg/200 gr BB belum mampu meningkatkan ekspresi protein berat molekul 52 kDa. Namun beda halnya dengan kelompok P3 dimana ekspresi protein berat molekul terbilang banyak yang mengindikasikan ekstrak etanol propolis lebah *Trigona sp* mampu meningkatkan ekspresi *Androgen Binding Protein* (ABP). Menurut Sunarto (2011), Pita protein yang tebal menunjukkan bahwa kandungan protein tersebut besar atau konsentrasinya

besar sedangkan pita yang tipis menunjukkan bahwa kandungan proteinnya sedikit.

Gambar 5.2 menunjukkan protein dengan berat molekul 26 kDa diduga sebagai proteasome. Proteasome adalah protein dalam semua eukariota dan archaea, dan dalam beberapa bakteri. Fungsi utama dari proteasome adalah untuk menguraikan protein yang tidak dibutuhkan atau rusak oleh proteolisis, reaksi kimia yang memecah ikatan peptida. Pada eukariota, proteasome terletak di inti dan sitoplasma. Enzim yang membantu reaksi tersebut disebut protease. Proteasome adalah bagian dari mekanisme utama dimana sel-sel mengatur konsentrasi protein tertentu dan mendegradasi protein yang gagal melipat. Jalur degradasi proteasomal penting untuk berbagai proses seluler, termasuk siklus sel, regulasi ekspresi gen, dan tanggapan terhadap stres oksidatif. Selain berlokasi di akrosom, proteasom juga terdeteksi pada ekor spermatozoa dimana berperan penting pada rilisnya sperma (Zimmerman dan Peter, 2009).

Pada **Tabel 5.2**, kelompok kontrol negatif protein dengan berat molekul 26 kDa terekspresi banyak terlihat dengan ketebalan pita protein yang berbeda dengan kontrol positif. Tebalnya pita protein disebabkan karena banyaknya proteasome di dalam testis. Sedangkan pada kelompok kontrol positif protein dengan berat molekul 26 kDa terekspresi sedikit terlihat tipisnya pita protein, memandakan sedikitnya proteasome di dalam testis. Sedikitnya proteasome disebabkan karena sedikitnya spermatozoa di dalam tubulus seminiferus. Jumlah proteasome berbanding lurus dengan jumlah spermatozoa. Menurut

Xu et al.(2013), regulasi proteasome akan menurun ketika dipapar asap rokok. Ini disebabkan ROS akan mengakibatkan peroksidasi lipid dan merusak membran sel hingga terjadi perubahan histologi pada sel spermatozoa. Pada Kelompok P1, P2 dan P3 pita protein terlihat tebal yang menandakan ekstrak etanol propolis lebah *Trigona sp* 10 mg/200grBB, 20 mg/200 gr BB dan 30 mg/200 gr BB telah mampu meningkatkan ekspresi protein berat molekul 26 kDa.



BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan bahwa :

1. Pemberian ekstrak etanol propolis *Trigona sp* pada tikus paparan asap rokok dengan dosis 30mg/200gr/hari mampu mencegah penyusutan sel sertoli dan sel leydig serta terbentuknya vakuola di daerah interstitial tubulus seminiferus.
2. Pemberian ekstrak etanol propolis *Trigona sp* pada tikus paparan asap rokok dengan dosis 30mg/200gr/hari mampu menurunkan ekspresi *Heat Shock Protein* 69 kDa, dan 90 kDa dan meningkatkan ekspresi protein 26 kDa dan 52 kDa.

6.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan saran yang dapat dilakukan yakni :

1. Perlu adanya penelitian observasi pemberian ekstrak etanol propolis *Trigona sp* dosis 30 mg/200gr pada hewan kecil yang pemiliknya seorang perokok.
2. Perlu adanya penelitian pemberian ekstrak etanol propolis *Trigona sp* sebagai terapi penyakit lain.



DAFTAR PUSTAKA

- Ahmadnia, H. Ghanbari, M. Moradi, M. R. Khaje-Dalouee, M. 2007. Effect of Cigarette Smoke on Spermatogenesis in Rats. *Urol J.* 2007;4:159-63.
- Akbar, B, 2010. Tumbuhan Dengan Kandungan Senyawa Aktif Yang Berpotensi Sebagai Bahan Infertilitas. Jakarta: Adabia Press.
- Anita N. 2004. *Perubahan Sebaran Stadia Epitel Seminiferus, Penurunan Jumlah Sel-Sel Spermatogenik dan Kadar Hormon Testosteron Total Mencit (Mus musculus L) Galur DDY Yang Diberi Asap Rokok Kretek.* Tesis Program Pasca Sarjana Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia
- AOAC. *International.* 2005. *Official Methods Of Analysis Of AOAC International.* 2 vols. 16 editions. Arlington VA. USA. Association of Analytical Community
- Ardhie,A.M. 2011. *Radikal Bebas Dan Peran Antioksidan Dalam Mencegah Penuaan.* *Medicinus Scientific Journal Of Pharmaceutical Development And Medical Application* 24(1):4-9
- Bankova et al,2014. *Propolis volatile compounds: chemical diversity and biological activity.* *Chemistry Central Journal* 2014, 8:28.
- Bankova et al .2000. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie* 31 ; 3–15.
- Besselsen, D.G. 2004. *Biology of Laboratory Rodents.* <www.uac.arizona.edu.> [Diakses tanggal 2 Februari 2016]
- Burdock, G.A. 1998. *Review of the Biological Properties and Toxicity of Bee Propolis (Propolis).* *Food and Chemical Toxicology* 36 : 347-363
- Cadenas, E., and Packer, L. 2002. *Expanded Caffeic Acid and Related Antioxidant Compound: Biochemical and Cellular Effects.* *Handbook of Antioxidants.* Second edition. California : Marcel Dekker, Inc. p. 279-303
- Chen et al.2007.*Antiplatelet Activity of Caffeic Acid Phenethyl Ester Is Mediated through a Cyclic GMP-Dependent Pathway in Human Platelets.* *Chinese Journal of Physiology* 50(3); 121-126
- Colagar AH, Jorsaraee GA, Marzony ET. 2007. Cigarette smoking and the risk of male infertility. *Pak J Biol Sci.* 10(21):3870-3874
- Djajasaputra, M.R.S. 2011. *Potensi Budaya Lebah Trigona dan pemanfaatan propolis sebagai antibiotik alami untuk sapi PO.* [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Hewan. Institut Pertanian. Bogor.
- Fauzan, dkk. 2003. *Penentuan Kadar Nikotin Dalam Asap rokok.* *Jurnal Ekologi Kesehatan* 3(2) : 273-274.

- Fowles J, Bates M. 2000. *The Chemical Constituents in Cigarettes and Cigarette Smoke: Priorities For Harm Reduction. Epidemiology and Toxicology Group*. ESR ; Kenepuru Science Centre. New Zealand.
- Garrett LD, Sandra MM, Jennifer JM. 2007. Feline oral squamous cell carcinoma: An overview. *Veterinary Medicine Magazine*.
- Global Adult Tobacco Survey. 2011. *Tobacco Burden Facts*. World Health Organization. Indonesia.
- Goluzza T. et al. 2014. Macrophages and Leydig Cells in Testicular Biopsies of Azoospermic Men. Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International.
- Hardi, R.M. 2014. *Pengaruh Terapi Rebusan Akar Gantung Pohon Beringin (Ficus benjamina L.) Terhadap Kadar Malondialdehida (MDA) dan Profil Pita Protein Serum Tikus (Rattus norvegicus) Hasil Papara Asap rokok [Skripsi]*. Program Kedokteran Hewan. Universitas Brawijaya
- Hardianty, D. 2011. *Pemberian Ekstrak etanol propolis Peroral Menurunkan Kadar F2-Isoprostan Dalam Urin Tikus Putih (Rattus norvegicus) Jantan Yang Mengalami Aktivitas Fisik Maksimal [Thesis]*. Program Studi Ilmu Biomedik. Program Pascasarjana. Universitas Udayana. Denpasar
- Hargono, FR. 2013. Gambaran Histopaologik Testis Mencit Swiss (*Mus musculus*) Yang Diberi Kedelai (*Glycine max*) Dan Paparan Dengan Asap Rokok. *Jurnal e-Biomedik (eBM), Volume 1, Nomor 2, Juli 2013, hlm. 824-829*
- Indra, S. 2009. *Aktivitas Antibakteri Mikrokapsulasi Propolis Trigona spp Pandeglang Setelah Terpapar Cairan Rumen Sapi [Skripsi]*. Institut Pertanian Bogor
- Khopkar. 2002. *Konsep Dasar Kimia Analitik*. Universitas Indonesia Press. Jakarta
- Koeva Y. et.al. 2005. Heat Shock Protein-70 Expression in Testis Following Endurance Training of Rats. *Proceedings of The Balkan Scientific Conference of Biology In Plovdiv (Bulgaria) From 19th till 21st of May 2005.P.288-294*.
- Krell, R. 1996. Value added products from beekeeping. *Food and Agriculture of Organization Agricultural Service Bulletin 124, Rome*.
- Kumar, V., Cotran, R.S., Robbins, S.L. 2003. Robbins Basic Pathology, In : Cellular Injury Adaptation, and Death. WB.Saunders. Philadelphia.
- Kundu M, Thompson CB (2008). "Autophagy: Basic Principles and Relevance to Disease". *Annual Review of Pathology* **3**: 427–455.

- Kurnia H, Permatasari N, Subandi. 2013. Pengaruh ekstrak jintan hitam terhadap MDA dan sel spermatogonium tikus yang dipapar asap rokok kretek subakut. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*. 26(3) :161-165.
- Kusriningrum.2008. *Dasar Perancangan Percobaan dan Rancangan Acak Lengkap*. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya
- Kusumawati, D. 2004. *Bersahabat dengan Hewan Coba*. Gadjah Mada University Press : Yogyakarta
- Langseth, L. 2000. *Antioxidants and Their Effect on Health*. Di dalam: Schmidl M.K. and T.P. Labuza (Eds.). *Essentials of Functional Foods*. Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland.
- Lee, J., N. Koo, and D.B. Min. 2004. *Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals*. *Compre Rev. in Food Sci. and Food Safety*. 3: 21-33.
- Lofty,M. 2006. *Biological Activity Of Bee Propolis In Health And Disease*. *Asian Pac J. Cancer Prev*. 7 (1) : 22-31.
- Macario et al. 2005. *Sick Chaperones, Cellular Stress, and Disease*. *The New England Journal of Medicine*, pp. 1489-1501.
- Mantirezo AC, Lamorena M. 2004. Extraction and initial characterization of Propolis from stingless Bees (*Trigona Biro Fries*). Di dalam *Proceeding of 7th Asian Apicultural Association Conference and 10th BEENET Symposium And Technofora Los Banos, 23-27 Februari 2004. Los Bano: Univ Philippines.hlm : 321-329*.
- Munell F . et al. 2002. *Androgen-Binding Protein and Review Reproduction: Where Do We Stand?.* *Journal of Andrology*, Vol. 23, No. 5:598-609.
- Musfiroh M. Rifki M. Noor W. 2012. *Pengaruh Minyak Nigella sativa terhadap Kualitas Spermatozoa Tikus Wistar yang Terpapar Asap Rokok*. *J Indon Med Assoc*, Volum: 62, Nomor: 5.
- Nakajima, Y., Tsuruma, K., Shimazawa, M., Mishima.S., Hara, H. 2009. *Comparison of Bee Products Based on Assays of Antioxidant Capacities. Nagaragawa Research Center*. Department of Biofunctional Evaluation, Molecular Pharmacology, Gifu Pharmaceutical University, Japan. *Journal BioMed Central Medicine* 9(4): 1472-6882.
- Ngatidjan, 2006. *Metode Laboratorium dalam Toksikologi Cetakan Ke-1*. Bagian Farmakologi dan Toksikologi Fakultas Kedokteran UGM : Yogyakarta
- Nurdiani Winda. 2006. *Laporan Praktikum Uji Sensoris dan Motorik Fisiologik Hewan*.

- Pangkahila, W. 2007. *Anti-Aging Medicine. Memperlambat Penuaan Meningkatkan Kualitas Hidup*. Penerbit Buku Kompas. Jakarta.
- Peraturan Pemerintah Republik Indonesia Nomor 109 Tahun 2012 Tentang Pengamanan Bahan Yang Mengandung Zat Adiktif Berupa Produk Tembakau Bagi Kesehatan
- Permatasari FA., Agung P.W.M., Aulanni'am.2014. Studi Terapi Ekstrak Kulit Buah Manggis (*Garcinia mangostana* L.) Terhadap Penurunan Kadar *Malondialdehyde* (MDA) Pada Organ Testis Dan Jumlah Spermatozoa Tikus (*Rattus norvegicus*) Hasil Induksi Paparan Asap Rokok. Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya.
- Pietta, P.G, Gardana, & A.M. Pieta. 2002. Analytical methods for quality control of propolis. *Filoterapia* 73 Suppl 1:S7-20.
- Pockley, A.G. 2001. *Heat shock proteins in health and disease : therapeutic targets or therapeutic agents?*. Cambridge University press : United Kingdom
- Poli G, Leonarduzzi G, Biasi F, Chiarotto E. 2004. *Oxidative stress and cell signaling*, *Current Medicinal Chemistry*, 11; 1163–1182.
- Pradipta, IGN.D.O. 2010. *Pengaruh Pemberian Propolis Secara Topikal Terhadap Migrasi Sel Poliformonuklear Pada Luka Sayat Tikus* [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Universitas Jember
- Radiati, L. E., dkk. 2008. *Pengaruh Pemberian Ekstrak etanol propolis Terhadap Sistem Kekebalan Seluler Pada Tikus Putih (Rattus norvegicus) Galur Wistar*. *Jurnal Teknologi Pertanian* 9(1) : 1- 9
- Rahmawati, Iis. 2013. Pengaruh Nikotin Selama 1-2 minggu Terhadap Jumlah Sel-Sel Spermatis Primer, Spermatisid Pada Mencit (*Mus musculus*). *Jurnal Keperawatan Soedirman (The Soedirman Journal of Nursing)*, Volume 8, No.3: 176-183
- Revel A, Raanani N, Younglai E, Xu J, Han R. 2001. *Resveratrol: a natural aryl hydrocarbon receptor antagonist, protect Sperm from DNA damage and apoptosis caused by benzo(a)pyrene*. *Reprod Toxicol*.15:479- 86.
- Revianti S. 2005. *Peranan antioksidan saliva pada patogenesis kanker orofaring yang disebabkan oleh pengaruh merokok*. *Majalah Kedokteran Gigi* (Edisi Khusus Temu Ilmiah Nasional IV). 3025 .
- Sabir, A. 2005. *Respons Inflamasi Pada Pulpa Gigi Tikus Setelah Aplikasi Ekstrak Etanol Propolis (EEP)*. *J. Dent* 38 (2) : 77-83
- Salatino, A., et al. 2005. *Origin And Chemical Variation Of Brazilian Propolis*. *Evid Base Complement Alternat Med* 2(2):33-38.

- Sarto, M., Saragih, H. 2009. Penentuan Toksisitas Sub kronik Trombo Propolis Pada Mencit (*Mus Musculus L*) Balb-C Jantan. Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu . Yogyakarta: Fakultas Biologi Universitas Gajah Mada.
- Sarma AD, Mallick AR, Ghosh AK. 2010. *Free Radicals and Their Role in Different Clinical Conditions: An Overview*. International Journal of Pharma Sciences and Research (IJPSR) Vol.1(3), 2010, 185-192.
- Sarvankumar, Guguloth. 2011. *Hepatoprotective Activity Of Vitex Negundo Linnbark Against Chemical Induced Toxicity In Experimental Rats*. Department of Pharmacology, Nandha College of Pharmacy and Research Institute, Erode, Tamilnadu. India.
- Sikka SC. 2004. *Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Andrology and Assisted Reproductive Technology*. Journal of Andrology, Vol. 25, No. 1 pg 5-18.
- Soewoto, H. 2001. *Antioksidan Eksogen Lini Pertahanan Kedua Dalam Menanggulangi Peran Radikal Bebas*. Dalam : Materi Kursus Penyegar Radikal Bebas Dan Antioksidan Dalam Kesehatan : Dasar, Aplikasi Dan Pemanfaatan Bahan Alami. Jakarta : FK-UI.
- Solihati N, Purwantara P, Supriatna I, Winarto A. 2013. *Development of spermatogenic cells and sperm quality after administration of pegagan extract (Centella asiatica)*. JITV 18(3): 192-201. DOI: 10.14334/jitv.v18i3.321.
- Stanojevic et al. 2009. *Antioxidant Activity And Total Phenolic and Flavonoid Contens of Hieracium pilosella L. Extract*. Sensors 9(7) :5702-5714
- Sulanda, DB. 2014. *Pengaruh Pemberian Ekstrak Biji Anggur (Vitis vinifera) Terhadap Ekspresi Interleukin-1-Beta (IL-1 β) Dan Gambaran Histopatologi Testis Tikus Putih (Rattus norvegicus) Galur Wistar Yang Diberikan Paparan Asap Rokok*. [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Brawijaya.
- Sumardjo, D. 2009. *Pengantar Kimia : Buku Panduaan Kuliah Mahasiswa Kedokteran dan Program Strata I Fakultas Bioeksata Edisis I*. Buku Kedokteran EGC : Jakarta
- Sunarto. 2011. *Karakteristik Pola Pita Protein Anodonta Woodiana Lea Akibat Terpapar Logam Berat Cadmium (Cd)*. Jurnal EKOSAINS, Vol. III, No. 1 :41-46
- Welsh M, Saunders PT, Fischen M, et al. *Identification in rats of a programming window for reproductive tract masculinization, disruption of which leads to*

hypospadias and cryptorchidism. The Journal of clinical investigation. 2008; 118: 1479-90.

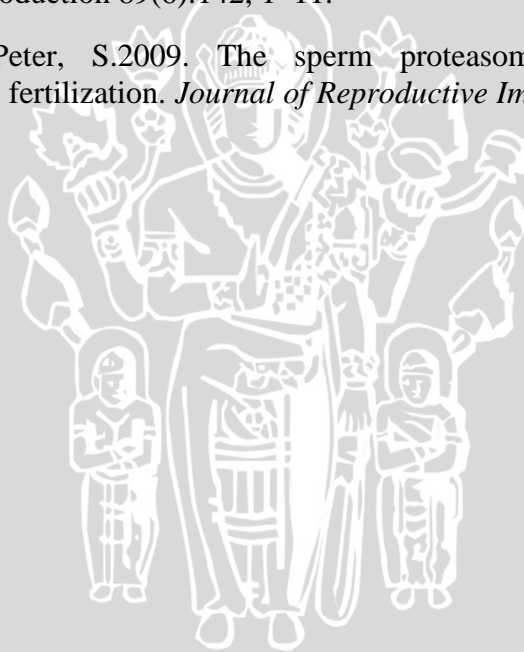
Widhiantara, IG. 2010. Terapi Testosteron dan LH (*Luteinizing Hormone*) Meningkatkan Jumlah Sel Leydig Mencit Yang Menurun Akibat Paparan Aasp Rokok.[Tesis]. Program Pascasarjana. Universitas Udayana.

Winarsi, H. 2007, *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Yogyakarta : Penerbit Kanisius. p: 13-15, 77-81.

Wu, T. and Tanguay, R.M. 2006. *Antibodies against heat shock proteins in environmental stress and diseases: friend or foe*. Cell Stress & Chaperon, 11, pp.1-12.

Xu et al.2013. Cigarette Smoking Exposure Alters Pebp1 DNA Methylation and Protein Profile Involved in MAPK Signaling Pathway in Mice Testis. *Biologu of Reproduction* 89(6):142, 1–11.

Zimmerman,S dan Peter, S.2009. The sperm proteasome during sperm capacitation and fertilization. *Journal of Reproductive Immunology* 83 :19–25.



LAMPIRAN

Lampiran 1 Sertifikat Laik Etik



KOMISI ETIK PENELITIAN
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH MALANG
KETERANGAN KELAIKAN ETIK
"ETHICAL CLEARANCE"

NO: E.5.a/104/KEPK-UMM/VII/2016

KOMISI ETIK PENELITIAN UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH MALANG

TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG DIUSULKAN,
MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA:

PENELITIAN BERJUDUL	: Efek Preventif Ekstrak Etanol Propolis Lebah <i>Trigona sp</i> Terhadap Histopatologi dan Profil Pita Protein Testis Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>) Hasil Paparan Asap Rokok
PENELITI	: Wijaya Kusuma Maheru (125130100111039)
UNIT / LEMBAGA / TEMPAT	: Lab. Farmakologi FK UMM
DINYATAKAN	: Laik Etik

Malang, 25 Juli 2016
Ketua Komisi Etik
Univ. Muhammadiyah Malang

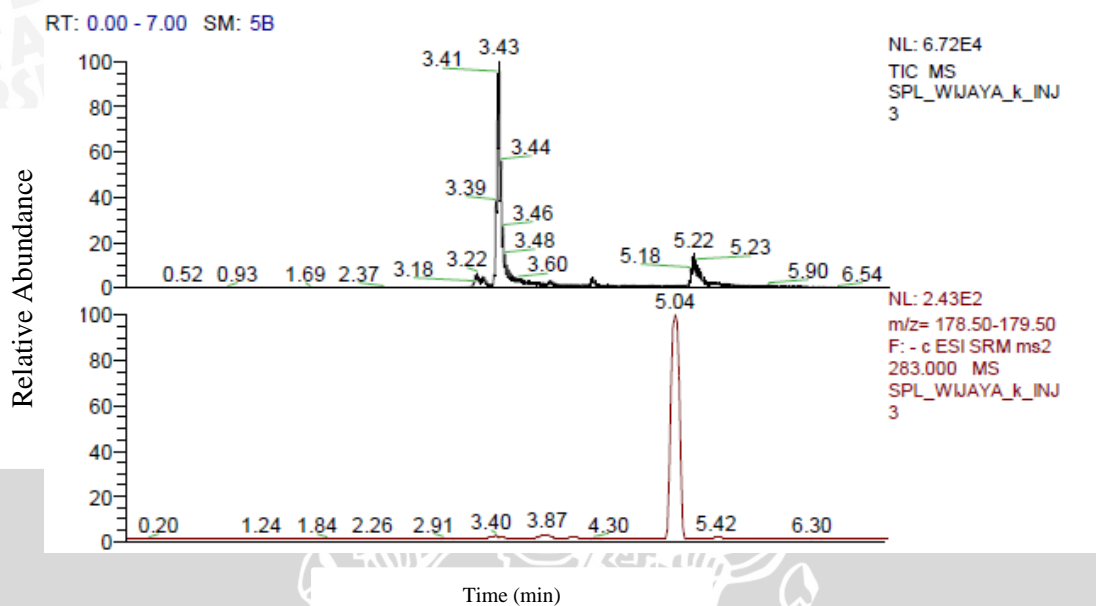


Dr. Djaka Handaja, MPH
NIDN: 07.22.12.430



Lampiran 2. Hasil Uji LCMS

Uji *Liquid Chromatography Mass Spectrofotometry* (LCMS) untuk mengetahui adanya flavonoid di dalam ekstrak etanol propolis lebah *Trigona sp*



Berdasarkan data hasil uji LCMS diatas diketahui bahwa ekstrak etanol propolis lebah *Trigona sp* yang digunakan sebagai preventif tikus hasil paparan asap rokok terdapat kandungan flavonoid CAPE dengan berat molekul 283gram/mol.

Lampiran 3.Dosis Perhitungan Pemberian Ekstrak Etanol Propolis Lebah *Trigona sp.*

Menurut Radiati (2008) perhitungan dilakukan dengan membuat homogenitas beberapa komponen seperti rata-rata berat badan manusia dan tikus. Perhitungan tersebut yaitu

- a. Rata-rata berat badan manusia yang diambil secara umum yaitu 50 kg = 50000 gram
- b. Standar dosis propolis pada manusia adalah 100 mg (Krell, 1996)
- c. Rata-rata berat badan tikus yang diambil secara umum adalah 200 gram
- d. Dosis pada hewan coba (tikus) yaitu 25x, 50x, dan 75x dosis standar pada tikus
- e. 1 mL ekstrak etanol propolis mengandung 30 mg propolis

Perhitungan dosis standar untuk tikus :

$$= \frac{\text{Berat rata-rata tikus} \times \text{standar pemberian propolis}}{\text{Berat rata-rata manusia}}$$

$$= \frac{200 \text{ g} \times 100 \text{ mg}}{50000 \text{ g}}$$

= 0,4 mg (dosis 1x), pada penelitian Radiati (2008) menggunakan dosis 25x, oleh sebab itu pada penelitian ini menggunakan peningkatan dosis menjadi 25x, 50x, dan 75x.

Karena 1 mL propolis = 30 mg propolis maka dosis pada tikus 25x, 50x, dan 75x adalah

a. $75x \rightarrow 75 \times 0,4 = 30 \text{ mg}$

$$\text{Dosis} : \frac{30 \text{ mg}}{30 \text{ mg}} \times 1 \text{ ml} = 1 \text{ mL}$$

b. $50x \rightarrow 50 \times 0,4 = 20 \text{ mg}$

$$\text{Dosis} : \frac{20 \text{ mg}}{30 \text{ mg}} \times 1 \text{ ml} = 0,66 \text{ mL}$$

c. $25x \rightarrow 25 \times 0,4 = 10 \text{ mg}$

$$\text{Dosis} : \frac{10 \text{ mg}}{30 \text{ mg}} \times 1 \text{ ml} = 0,33 \text{ mL}$$

Lampiran 4. Pembuatan sediaan propolis konsentrasi 30 mg/ml dengan volume 150 ml

2.1 Pembuatan Tween 80 1% v/v

Volume tween 80 1% (v/v) yang dibutuhkan yaitu 150 ml, maka perhitungannya:

$$1 \text{ ml tween} / 100 \text{ ml larutan} = X \text{ ml tween} / 150 \text{ ml}$$

$$X \text{ ml tween} = 150 \text{ ml} / 100 \text{ ml}$$

$$X \text{ ml tween} = 1,5 \text{ ml}$$

Maka, diperlukan 1,5 ml Tween 80 kemudian ditambahkan 148,5 ml akuades untuk membuat sediaan 150 ml .

2.2 Pembuatan sediaan propolis konsentrasi 30 mg/ml dengan volume 150 ml

Jika 1 ml sediaan propolis mengandung 30 mg propolis, maka perhitungan untuk pembuatan sediaan propolis 30 mg/ml dengan volume 150 ml yaitu

$$= 30 \text{ mg propolis} \times 150 \text{ ml}$$

$$= 4500 \text{ mg propolis}$$

Maka diperlukan 4500 mg propolis yang ditambahkan dalam pembuatan sediaan propolis konsentrasi 30 mg/ml dengan volume 150 ml

Lampiran 5. Asumsi jumlah tar dan nikotin terhirup seekor tikus

- Luas kandang tikus : $p \times l \times t : 30\text{cm} \times 50\text{ cm} \times 20\text{ cm} = 30.000\text{cm}^3$
 $1\text{ cm}^3 = 1\text{ ml}$, jikalau luas kandang 30.000cm^3 maka volumenya 30.000 ml.
- Respirasi normal tikus = 100x/menit
- Volume Tidal tikus = 1,6 ml
- Jumlah Tar dan Nikotin : 39 mg dan 2,3 mg /rokok, pada penelitian ini penggunaan rokok sebanyak 2 buah/15 menit/hari/kelompok. Jikalau 2 rokok berarti jumlah tar dan nikotin yaitu 78 mg dan 4,6 mg

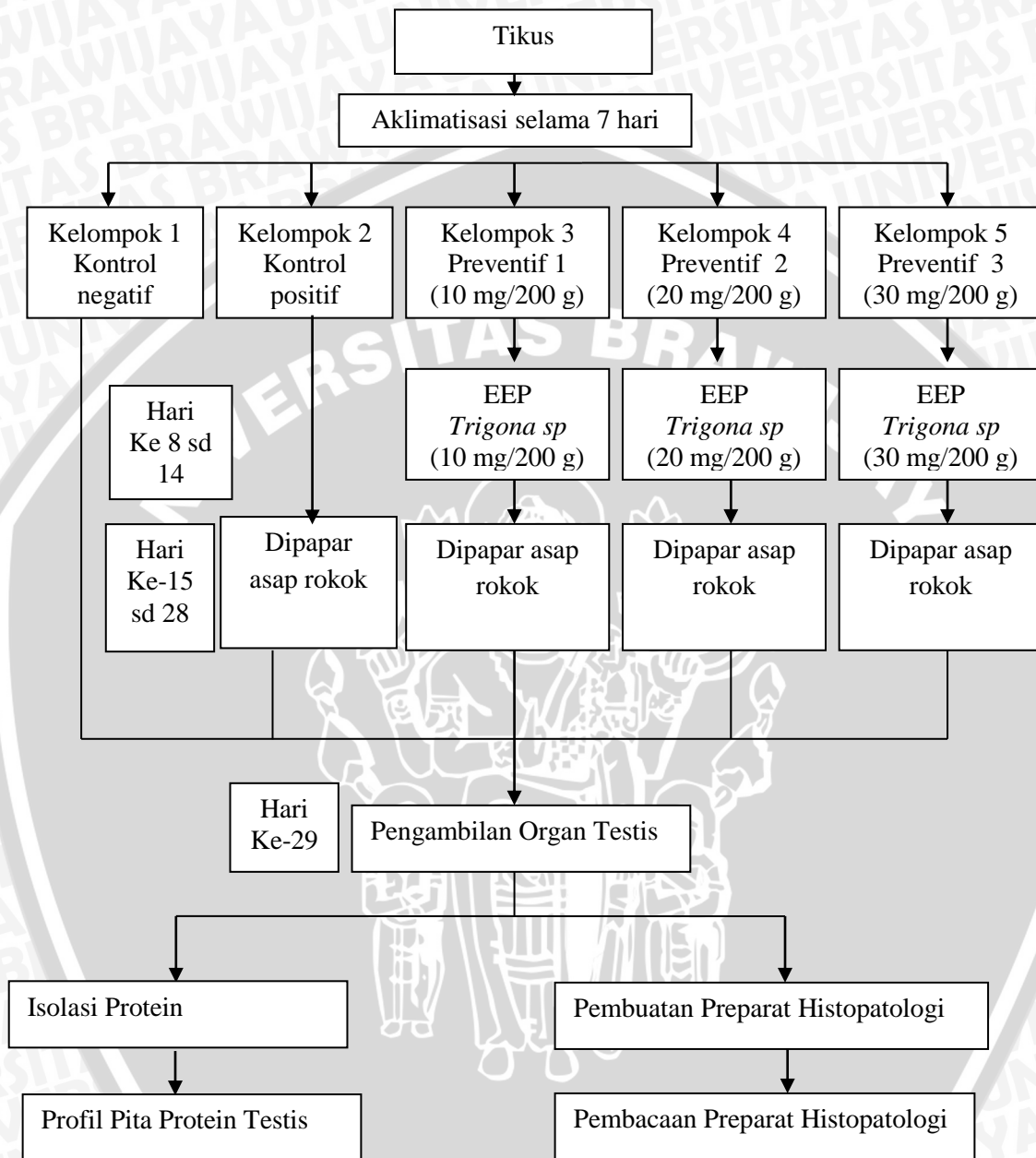
Tar yang dihirup/respirasi = $78\text{ mg} / 30.000\text{ ml} = 7800\text{ }\mu\text{g}/30.000\text{ ml} = 2,6\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$, jikalau volume tidal tikus 1,6 ml maka tar yang dimungkinkan dihirup oleh tikus sebanyak :

$$2,6\text{ }\mu\text{g}/\text{ml} = X\text{ }\mu\text{g}/1,6\text{ml}$$

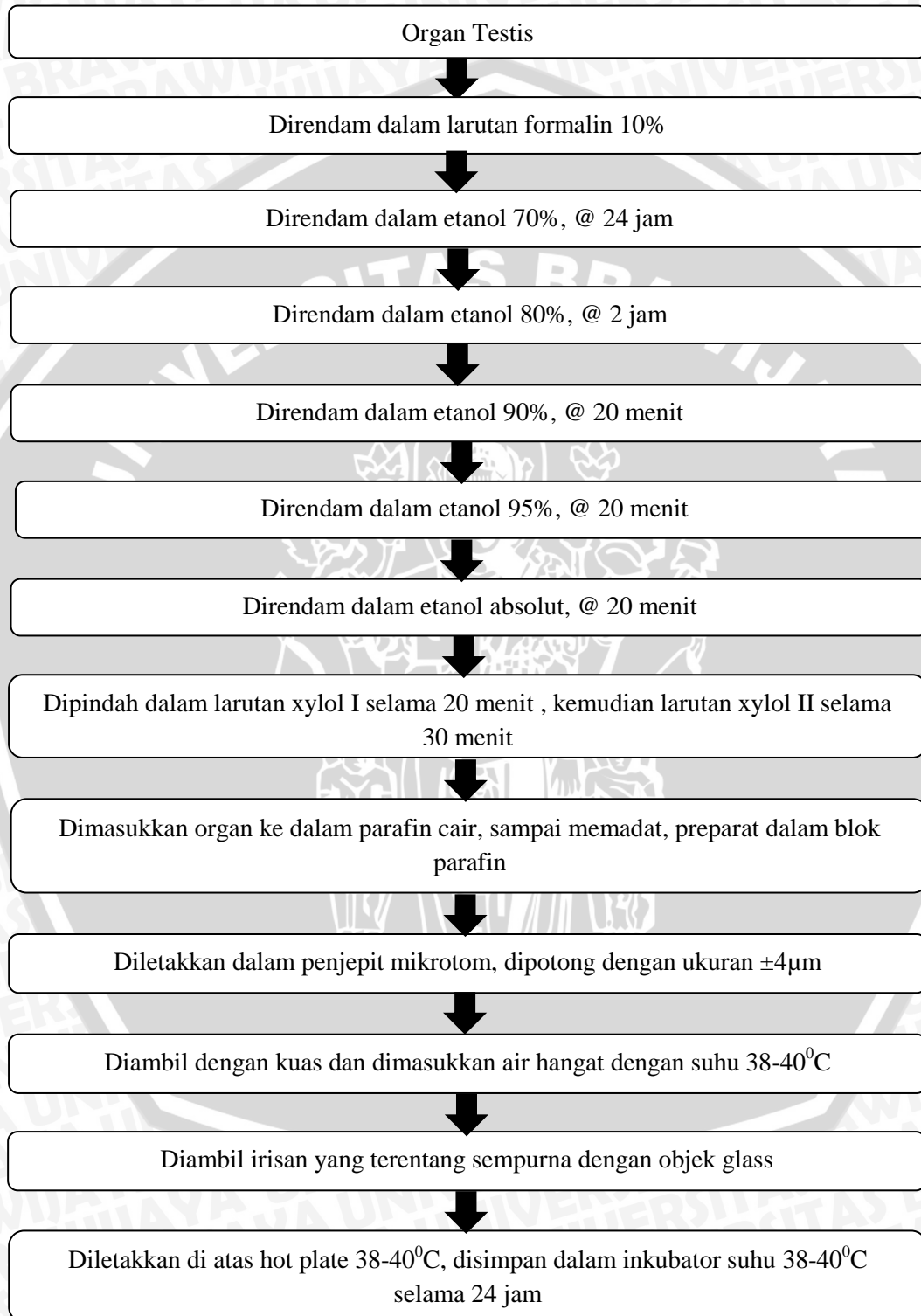
$$X\text{ }\mu\text{g} = 4,16\text{ }\mu\text{g}\text{ (per respirasi).}$$

- Jika Respirasi normal tikus = 100x/menit dan pemaparan selama 15 menit. Maka jumlah tar yang terhirup :
 $4,16\text{ }\mu\text{g} \times 100 \times 15\text{ menit} = 6240\text{ }\mu\text{g} = 6,24\text{ mg}$

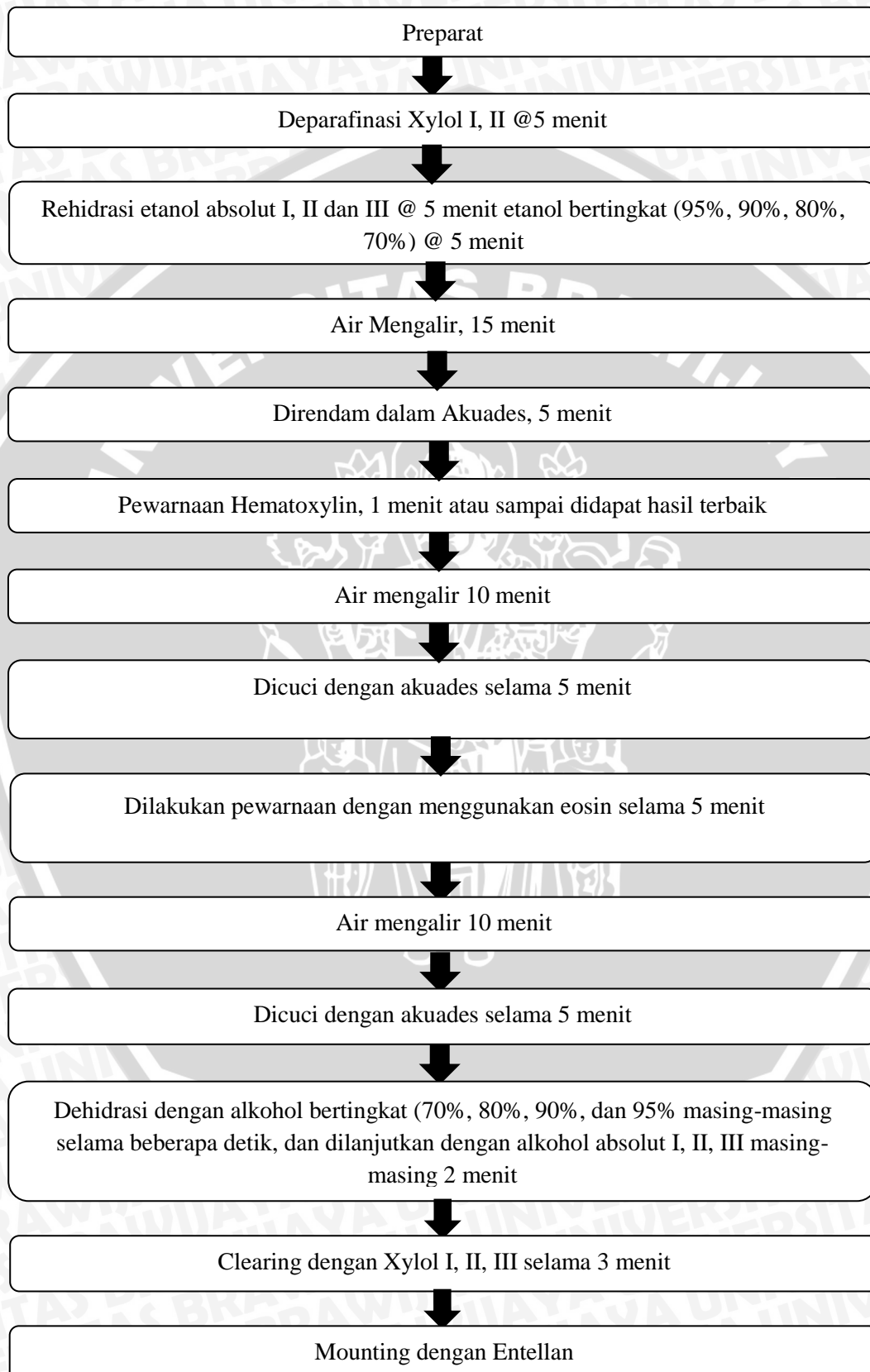
Lampiran 6 Kerangka Operasional



Lampiran 7. Pembuatan Preparat Histopatologi Organ Testis Menggunakan metode parafin



Pewarnaan Hematoxylin-Eosin (HE)



Lampiran 8. Persentasi Penurunan dan Peningkatan rerata sel leydig

Persentasi Penurunan Sel Leydig

Persentase penurunan **rataan sel leydig** terhadap tikus kontrol negatif adalah sebagai berikut:

$$\begin{aligned}\% \text{ Rerata Sel Leydig} &= \frac{\text{Rataan sehat} - \text{Rataan sakit}}{\text{Rataan sehat}} \\ &= \frac{107,5 - 40,25}{107,5} \\ &= 62,5 \%\end{aligned}$$

Persentasi Peningkatan Rataan sel leydig terhadap Kontrol

Persentasi peningkatan rerata sel leydig tikus (*Rattus novvergicus*) hasil paparan asap rokok yang diberi ekstrak propolis sebagai berikut:

1. Perlakuan tikus terapi dengan pemberian preventif dosis 10mg/200gr

$$\begin{aligned}\% \text{ Rerata Sel Leydig} &= \frac{\text{Rataan preventif 10mg/200gr} - \text{Rataan sakit}}{\text{Rataan sakit}} \\ &= \frac{55,5 - 40,25}{40,25} \\ &= 37,8 \%\end{aligned}$$

2. Perlakuan tikus terapi dengan pemberian preventif dosis 20mg/200gr

$$\begin{aligned}\% \text{ Rerata Sel Leydig} &= \frac{\text{Rataan preventif 20mg/200gr} - \text{Rataan sakit}}{\text{Rataan sakit}} \\ &= \frac{74,25 - 40,25}{40,25} \\ &= 84,5 \%\end{aligned}$$

3. Perlakuan tikus terapi dengan pemberian preventif dosis 30mg/200gr

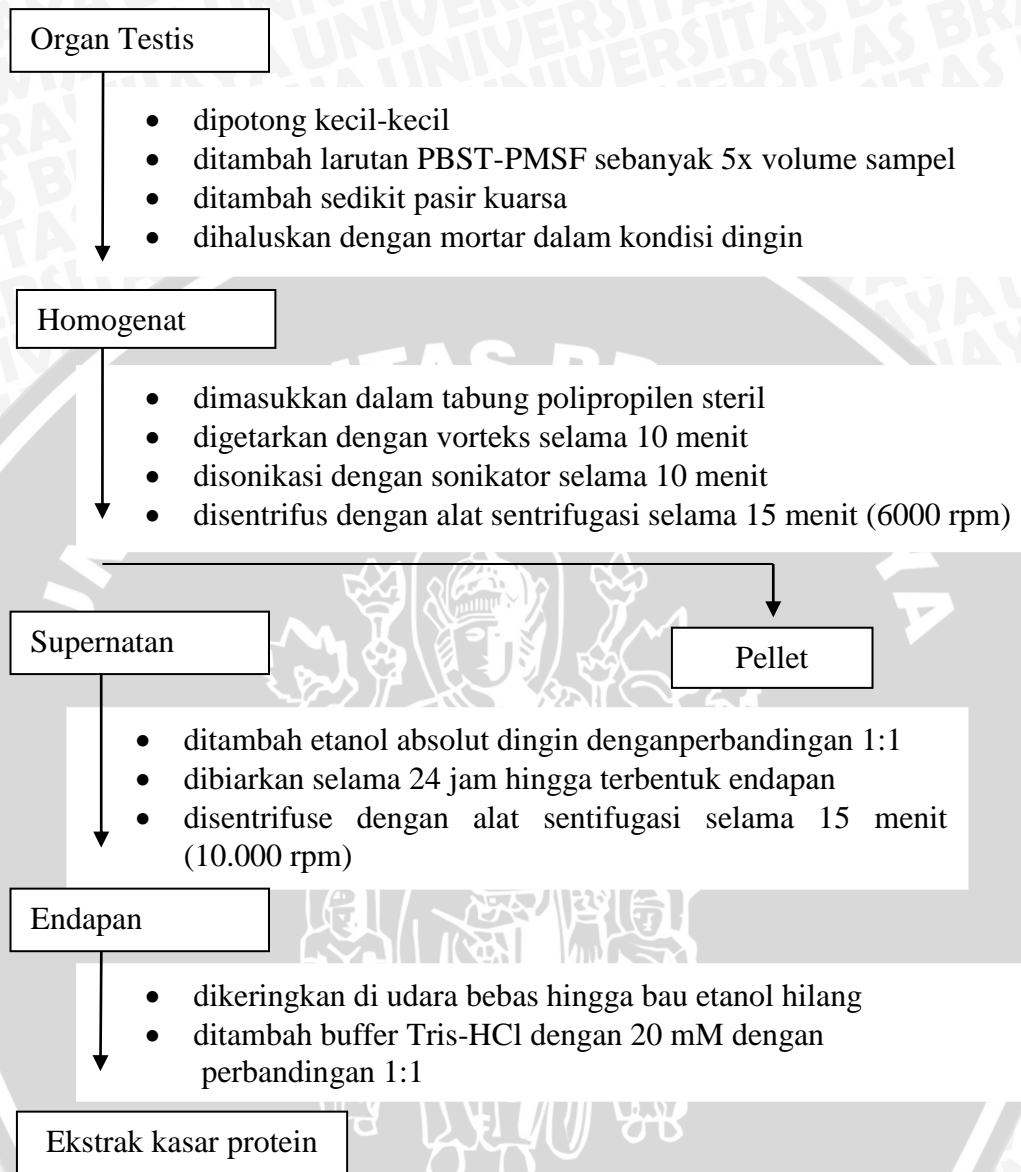
$$\begin{aligned}\% \text{ Rerata Sel Leydig} &= \frac{\text{Rataan preventif 30mg/200gr} - \text{Rataan sakit}}{\text{Rataan sakit}} \\ &= \frac{96 - 40,25}{40,25} \\ &= 138,5 \%\end{aligned}$$

Lampiran 9. Komposisi larutan dalam isolasi protein dan SDS PAGE

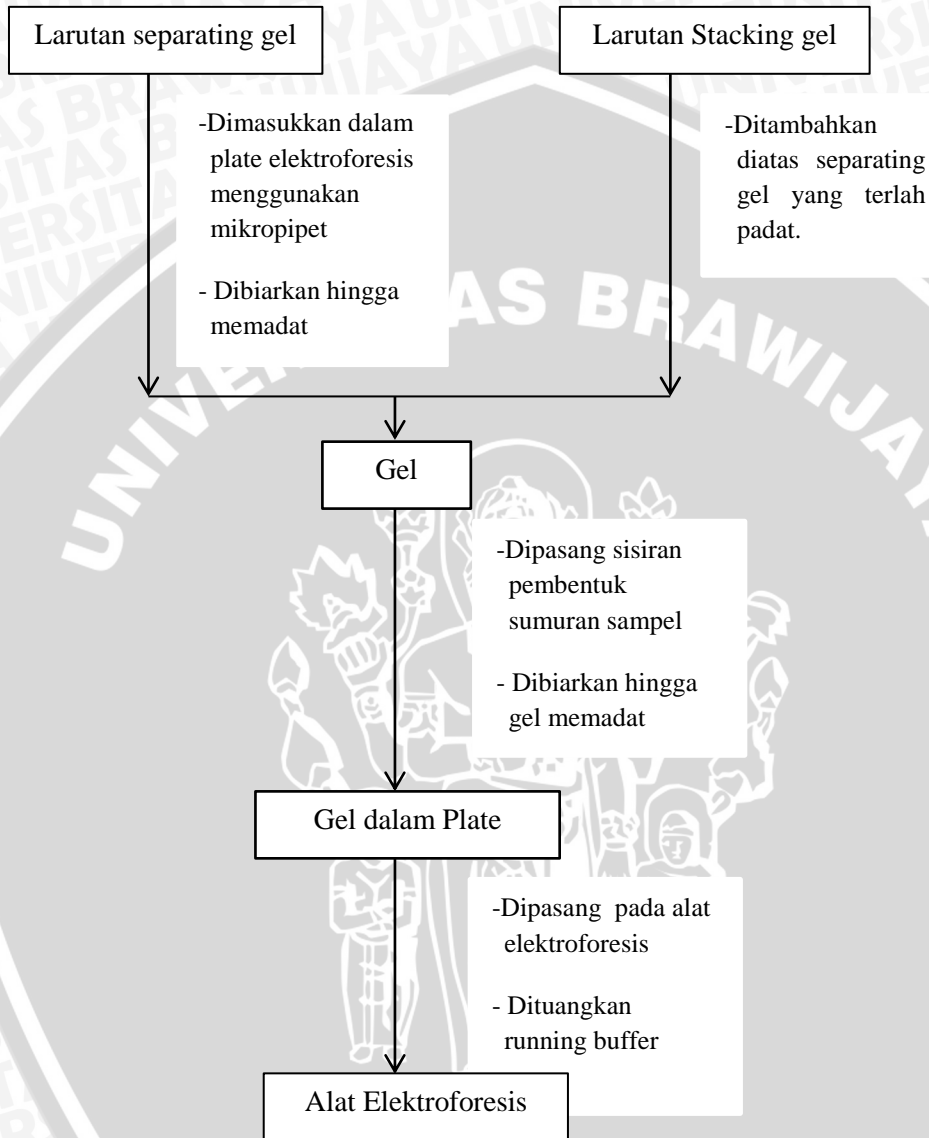
9.1 Tabel Komposisi larutan dalam isolasi protein dan SDS PAGE

No.	Larutan	Komposisi
1.	Larutan PBS pH 7,4	0,2 g KCl, KH ₂ PO ₄ 0,2 g, 8 g NaCl, 2,16 g Na ₂ HPO ₄ H ₂ O
2.	Larutan NaCl fisiologis	9 g NaCl dan 250 mL akuades
2.	Larutan Tris-HCl	0,63 Tris-HCl dan 100 mL akuades steril
4.	Larutan RSB	0,125 µL UGB, 0,2 mL gliserol, 0,2 µL SDS, 0,05 µL merkaptoetanol dan 0,025 µL Bromophenol Blue, 400 µL akuades steril
5.	Larutan UGB	0,75 g Tris-base, 0,0401 g SDS, 5 mL akuades steril
6.	Larutan LGB	0,75 Tris-base, 0,4 g SDS, dan 10 mL akuades
7.	APS 10%	0,1 g amonium persulfat dan 1 mL akuades steril
8.	Larutan PBST	250 mL PBS pH 7,4 dan 1 tetes larutan <i>Tween</i>
9.	Larutan poliakrilamid	2,92 g akrilamida, 0,0801 g bisakrilamida, 7 akuades steril
10.	Larutan <i>separating gel</i> 12%	1300 µL LGB, 2000 µL poliakrilamid, 1700 µL dd-H ₂ O, 80 µL APS 10%, 8 µL TEMED
11.	Larutan <i>stacking gel</i> 3%	LGB 415 µL, 267 µL poliakrilamid, 975 µL dd-H ₂ O, 20 µL APS 10%, 2 µL TEMED
12.	Larutan <i>Staining Comassie Blue</i>	0,25 g <i>Comassie Brilliant Blue R-250</i> , 45,4 mL methanol absolut, 9,2 mL asam asetat glasial, akuades 100 mL

Lampiran 10. Isolasi Protein



Lampiran 11. Penentuan Profil Pita Protein dengan SDS PAGE



Lampiran 12. Penentuan Berat Molekul

Berat Molekul diukur menggunakan perbandingan antara pola pita protein dengan pola pita marker yang sudah memiliki ukuran berdasarkan jenis proteinnya. Selanjutnya dilakukan perhitungan nilai *Retardation factor* (Rf) pada setiap pita dengan rumus :

$$Rf = \frac{\text{Jarak pergerakan protein dari tempat awal (cm)}}{\text{Jarak pergerakan warna dari tempat awal (cm)}}$$

Perhitungan dilanjutkan dengan membuat kurva standar dengan Rf sebagai sumbu X dan berat molekul sebagai sumbu Y. Kemudian diperoleh persamaan regresi linier $Y=ax+b$. Persamaan diperlukan untuk memperoleh masa relatif sari sampel protein sampel dan berat molekul diperoleh dari rumus $BM= \text{antilog } Mr$ protein sampel.

Lampiran 13. Perhitungan Berat Molekul Hasil SDS-PAGE

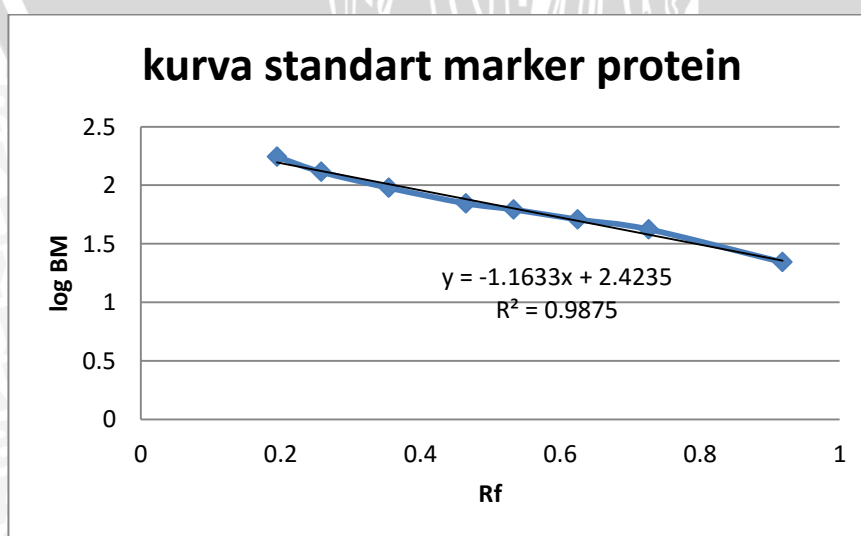
13.1 Tabel Harga R_f dan Berat Molekul (BM) Protein Marker

A	B	R _f (x)	BM	Log BM (y)
1,17	6	0.195	175	2.243038
1,55	6	0.258333	130	2.113943
2,13	6	0.355	95	1.977724
2,79	6	0.465	70	1.845098
3,2	6	0.533333	62	1.792392
3,75	6	0.625	51	1.70757
4,36	6	0.726667	42	1.623249
5,51	6	0.918333	22	1.342423

Keterangan:

- a = Jarak batas atas gel hingga pita (cm)
- b = Jarak batas atas gel hingga batas bawah gel (cm)
- R_f = Reterdation factor
- BM = Berat molekul marker
- log BM = Logaritma berat molekul marker

13.2 Grafik Berat Molekul (BM) Protein Marker



13.3 Tabel Harga R_f dan Berat Molekul (BM) Protein Sampel

Sampel	a	B	R_f	log BM	BM (kDa)
Kontrol Negatif	2.36	6	0.393	1.965935	92.46
	3	6	0.500	1.84185	69.48
	3.63	6	0.605	1.719704	52.44
	5.18	6	0.863	1.419184	26.25
Kontrol Positif	2.36	6	0.393	1.965935	92.46
	3	6	0.500	1.84185	69.48
	3.63	6	0.605	1.719704	52.44
	5.18	6	0.863	1.419184	26.25
Perlakuan I 10mg/200gr BB	2.36	6	0.393	1.965935	92.46
	3	6	0.500	1.84185	69.48
	3.63	6	0.605	1.719704	52.44
	5.18	6	0.863	1.419184	26.25
Perlakuan II 20mg/200gr BB	2.36	6	0.393	1.965935	92.46
	3	6	0.500	1.84185	69.48
	3.63	6	0.605	1.719704	52.44
	5.18	6	0.863	1.419184	26.25
Perlakuan III 30mg/200gr BB	2.36	6	0.393	1.965935	92.46
	3	6	0.500	1.84185	69.48
	3.63	6	0.605	1.719704	52.44
	5.18	6	0.863	1.419184	26.25

Lampiran 14. Hasil Uji Statistika sel leydig

Tabel L.14.1 Uji Normalitas Data

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test		
		selleydig
N		20
Normal Parameters ^a	Mean	74.7000
	Std. Deviation	2.61254E1
Most Extreme Differences	Absolute	.155
	Positive	.155
	Negative	-.134
Kolmogorov-Smirnov Z		.695
Asymp. Sig. (2-tailed)		.719

a. Test distribution is Normal.

Hasil Pengujian normalitas pada tabel *One-Sample Kolmogorov-sMirnov Test* dengan nilai signifikansi (p) sebesar 0,719. Jika nilai $P > 0,05$, maka H_0 diterima yang menandakan data yang digunakan memiliki distribusi yang tersebar normal.

Tabel L.14.2 Uji Homogenitas Data

Test of Homogeneity of Variances				
Selleydig				
Levene Statistic	df1	df2	Sig.	
2.653	4	15	.074	

Tabel L.14.3 Uji Statistik ANOVA

ANOVA					
Selleydig	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	12340.700	4	3085.175	73.749	.000
Within Groups	627.500	15	41.833		
Total	12968.200	19			

Tabel L.14.4 Uji Lanjutan Beda Nyata Jujur (BNJ)

Multiple Comparisons

Selleydig

Tukey HSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol -	Kontrol +	67.25000*	4.57347	.000	53.1275	81.3725
	10	52.00000*	4.57347	.000	37.8775	66.1225
	20	33.25000*	4.57347	.000	19.1275	47.3725
	30	11.50000	4.57347	.139	-2.6225	25.6225
Kontrol +	Kontrol -	-67.25000*	4.57347	.000	-81.3725	-53.1275
	10	-15.25000*	4.57347	.031	-29.3725	-1.1275
	20	-34.00000*	4.57347	.000	-48.1225	-19.8775
	30	-55.75000*	4.57347	.000	-69.8725	-41.6275
10	Kontrol -	-52.00000*	4.57347	.000	-66.1225	-37.8775
	Kontrol +	15.25000*	4.57347	.031	1.1275	29.3725
	20	-18.75000*	4.57347	.007	-32.8725	-4.6275
	30	-40.50000*	4.57347	.000	-54.6225	-26.3775
20	Kontrol -	-33.25000*	4.57347	.000	-47.3725	-19.1275
	Kontrol +	34.00000*	4.57347	.000	19.8775	48.1225
	10	18.75000*	4.57347	.007	4.6275	32.8725
	30	-21.75000*	4.57347	.002	-35.8725	-7.6275
30	Kontrol -	-11.50000	4.57347	.139	-25.6225	2.6225
	Kontrol +	55.75000*	4.57347	.000	41.6275	69.8725
	10	40.50000*	4.57347	.000	26.3775	54.6225
	20	21.75000*	4.57347	.002	7.6275	35.8725

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Tabel L.14.5 Pemberian Notasi pada Uji BNJ

Selleydig

Tukey HSD

Kelompok	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
Kontrol +	4	40.2500			
10	4		55.5000		
20	4			74.2500	
30	4				96.0000
Kontrol -	4				1.0750E2
Sig.		1.000	1.000	1.000	.139

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

