

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL DAUN
SEMANGGI AIR (*Marsilea crenata*) TERHADAP JENIS-JENIS
ABNORMALITAS MORFOLOGI SPERMATOZOA TIKUS
JANTAN (*Rattus norvegicus*)**

SKRIPSI

oleh
FEBBY DIOVANY
155090101111041



**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2019**

repository.ub.ac.id

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL DAUN
SEMANGGI AIR (*Marsilea crenata*) TERHADAP JENIS-JENIS
ABNORMALITAS MORFOLOGI SPERMATOZOA TIKUS
JANTAN (*Rattus norvegicus*)**

SKRIPSI

**Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains
dalam Bidang Biologi**

oleh

FEBBY DIOVANY

155090101111041



**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2019**

UNIVERSITAS
BRAWIJAYA

HALAMAN PENGESAHAN SKRIPSI

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL DAUN
SEMANGGI AIR (*Marsilea crenata*) TERHADAP JENIS-JENIS
ABNORMALITAS MORFOLOGI SPERMATOZOA TIKUS
JANTAN (*Rattus norvegicus*)**

FEBBY DIOVANY
155090101111041

Telah diseminarkan di depan Majelis Penguji pada 25 Juni 2019 dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains dalam Bidang Biologi

Menyetujui
Pembimbing

Dr. Sri Rahayu, M.Kes.
NIP 196205281987012001

Mengetahui
Ketua Program Studi S1 Biologi
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya

Rodiyati Azrianingsih, S.Si., M.Sc., Ph.D
NIP. 197001281994122001

HALAMAN PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Febby Diovany
NIM : 155090101111041
Jurusan : Biologi

Penulis Skripsi berjudul : Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Daun Semanggi Air (*Marsilea crenata*) terhadap Jenis-Jenis Abnormalitas Morfologi Spermatozoa Tikus Jantan (*Rattus norvegicus*)

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Skripsi ini adalah benar-benar karya saya sendiri dan bukan hasil plagiat dari karya orang lain. Karya-karya yang tercantum dalam Daftar Pustaka Skripsi ini semata-mata digunakan sebagai acuan/referensi
2. Apabila kemudian hari diketahui bahwa isi Skripsi saya merupakan hasil plagiat, maka saya bersedia menanggung akibat hukum dari keadaan tersebut

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran

Malang, 11 Juli 2019
Yang Menyatakan

Febby Diovany
155090101111041

PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

Skripsi ini tidak dipublikasikan namun terbuka untuk umum dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada penulis. Daftar Pustaka diperkenankan untuk dicatat, tetapi pengutipan hanya dapat dilakukan seizin penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutkannya.



repository.ub.ac.id

**Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Daun Semanggi Air
(*Marsilea crenata*) terhadap Jenis-Jenis Abnormalitas Morfologi
Spermatozoa Tikus Jantan (*Rattus norvegicus*)**

Febby Diovany, Sri Rahayu
Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,
Universitas Brawijaya, Malang
2019

ABSTRAK

Tujuan penelitian ini yaitu untuk mengetahui pengaruh ekstrak etanol daun semanggi air (*Marsilea crenata*) terhadap jenis-jenis abnormalitas morfologi spermatozoa tikus jantan (*Rattus norvegicus*). Penelitian ini menggunakan 24 ekor tikus jantan berusia 3-4 bulan dengan berat badan 200-300 yang dibagi menjadi 4 kelompok. Kelompok kontrol (K), adalah kelompok yang tidak diberi ekstrak etanol semanggi air. Kelompok PS1, PS2, dan PS3 adalah kelompok yang diberi ekstrak etanol semanggi air dengan dosis 0,216 mg/gBB, 0,432 mg/gBB dan 0,648 mg/gBB. Ekstrak etanol semanggi air diberikan secara oral, setiap hari selama 30 hari. Pada hari ke-31, hewan coba dibedah untuk diambil organ kauda epididimisnya. Suspensi sperma yang didapatkan dari kauda epididymis digunakan untuk analisis jenis-jenis abnormalitas sperma menggunakan mikroskop cahaya perbesaran 400x. Data yang didapatkan, dianalisis dengan uji *one-way ANOVA* dan dilanjutkan dengan Uji Tukey dengan taraf uji 5%, menggunakan program SPSS 24 *for windows*. Pemberian perlakuan ekstrak etanol semanggi air tidak berpengaruh secara signifikan terhadap jenis-jenis abnormalitas spermatozoa tikus. Pada kelompok perlakuan ekstrak etanol semanggi air dosis 2 (0,432 mg/gBB) ditemukan lebih sedikit jenis-jenis abnormalitas morfologi spermatozoa dibandingkan kelompok perlakuan ekstrak etanol semanggi air dosis 1, 3, dan kelompok kontrol. Jenis abnormalitas spermatozoa primer yang terdapat pada penelitian ini antara lain ekor ganda, kepala ganda, leher bengkok, dan *abaxial midpiece*. Sedangkan, abnormalitas sekunder yang ditemukan pada penelitian ini antara lain *cytoplasmic droplet*, ekor melingkar, ekor pendek, ekor bengkok, tanpa ekor, dan tanpa kepala.

Kata Kunci : abnormalitas spermatozoa, *Marsilea crenata*, tikus

repository.ub.ac.id

Effect of Water Clover (*Marsilea crenata*) Leaves Extracted by Ethanol to The Types of Morphological Abnormality of Spermatozoa Male Rats (*Rattus norvegicus*)

Febby Diovany, Sri Rahayu
Biology Department, Mathematics and Natural Sciences Faculty,
Brawijaya University, Malang
2019

ABSTRACT

The aim of this study are to the effect of water clover (*Marsilea crenata*) ethanol extract on morphological abnormalities of spermatozoa in male rats (*Rattus norvegicus*). This study used 24 male rats aged 3-4 months with a body weight of 200-300 divided into four group. A control group (K) is a group that is not given ethanol extract of water clover. PS1, PS2 and PS3 were the groups that given ethanol extract of the water clover with doses 0.216 mg/gBW, 0.432 mg/gBW and 0.648 mg/gBW, respectively. Ethanol extract of water clover were administered orally for 30 days. On the 31st day, the cauda epididymis organ was removed. Epidydymal Sperm were collected from cauda epididymis for morphology sperm analysis by using a light microscope with a magnification of 400x. The data were analyzed using one-way ANOVA test and continued with the Tukey Test with a test level of 5%, by using the SPSS 24 for windows program. The result showed that extract ethanol of water clover not significantly affected the types of spermatozoa abnormalities in rats. The treatment of ethanol extract of water clover dosage 2 (0.432 mg/gBW) has a find less of spermatozoa morphological abnormalities more than the treatment group of water clover extract ethanol dosage 1 and 3, and the control group. The types of morphological primary abnormalities of spermatozoa found in this study included double tails, double heads, bent necks, and abaxial midpiece. Meanwhile, the secondary abnormalities of spermatozoa morphology found in this study include, cytoplasmic droplet, coiled tail, short tail, bent tail, no tail, and no head.

Keywords: abnormalities of spermatozoa, *Marsilea crenata*, rat

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat Tuhan yang Maha Esa karena atas berkat dan rahmat-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan skripsi yang merupakan syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains dalam bidang Biologi di Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang.

Penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Dr. Sri Rahayu, M.Kes selaku Dosen Pembimbing yang telah membimbing dan mendampingi, serta memberikan motivasi dalam menyelesaikan penyusunan skripsi di Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang.
2. Drs. Aris Soewondo, M.Si dan Dr. Agung Pramana W.M., M.Si selaku Dosen Penguji yang telah memberikan saran dan motivasi dalam menyelesaikan penyusunan skripsi ini.
3. Orang tua penulis, Bapak Kristiadi, dan Ibu Vrisca Yunita yang telah memberikan doa, kasih sayang, dukungan, dan motivasi dalam menyelesaikan penyusunan skripsi ini.
4. Bapak Harmadji, Bambang P., M.Si, dan Mulya Dwi W., S.Si yang telah membantu kelancaran penelitian.
5. Luthfiana H., Ivakhul Anzila S.Si, dan Riska Annisa S.Si selaku teman dalam tim penelitian Semanggi 2018.
6. Teman-teman yang telah setia menemani, memberikan dukungan dan motivasi dalam menyelesaikan penyusunan skripsi ini.

Penulis menyadari masih terdapat banyak kekurangan baik dari proses penyusunan skripsi ini. Oleh karena itu, penulis sangat mengharapkan kritik dan saran yang bersifat membangun dari semua pihak. Semoga proposal skripsi ini bisa bermanfaat bagi kita semua. Aamiin.

Malang, 11 Juli 2019

(Penulis)

DAFTAR ISI

ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
KATA PENGANTAR.....	vii
DAFTAR TABEL.....	x
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN.....	xiii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah	3
1.3. Tujuan Penelitian.....	3
1.4. Manfaat Penelitian.....	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1 Tanaman Semanggi air (<i>Marsilea crenata</i>).....	4
2.2 Kandungan dan Manfaat Senyawa Kimia Tanaman Semanggi Air.....	5
2.3 Morfologi Spermatozoa.....	6
2.4 Spermatogenesis.....	7
2.5 Spermiogenesis.....	9
2.6 Abnormalitas Spermatozoa	12
2.6.2 Abnormalitas pada leher.....	14
2.6.3 Abnormalitas pada ekor.....	15
2.7 Radikal Bebas.....	16
2.8 Antioksidan	17
BAB III METODE PENELITIAN	19
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	19
3.2 Pengelompokan Hewan Coba	19
3.3 Pembuatan ekstrak Etanol 70 % Daun Semanggi Air.....	19
3.4 Pembuatan Dosis Perlakuan	20
3.5 Perlakuan Hewan Coba	20
3.6 Pengukuran Parameter.....	20
3.6.1 Kualitas sperma	20
3.6.2 Abnormalitas sperma.....	20
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	22
4.1 Abnormalitas Spermatozoa	22

4.2. Jenis-jenis Abnormalitas Spermatozoa	24
4.3 Abnormalitas Primer dan Sekunder	30
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	33
5.1 Kesimpulan.....	33
5.2 Saran.....	33
DAFTAR PUSTAKA	34
LAMPIRAN.....	40



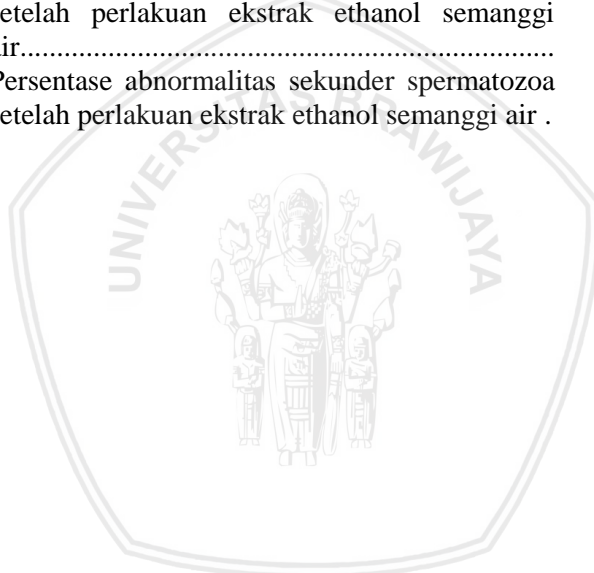
DAFTAR TABEL

Nomor		Halaman
LT1	Jenis Abnormalitas Spermatozoa pada Setiap Perlakuan.....	26



DAFTAR GAMBAR

Nomor		Halaman
1	Semangi air (<i>Marsilea crenata</i>)	4
2	Morfologi Spermatozoa	6
3	Proses Spermatogenesis	8
4	Tahapan Spermiogenesis	10
5	Morfologi Sperma Abnormal	13
6	Persentase abnormalitas spermatozoa setelah perlakuan ekstrak ethanol semangi air	23
7	Jenis-jenis abnormalitas pada spermatozoa	25
8	Persentase abnormalitas primer spermatozoa setelah perlakuan ekstrak ethanol semangi air.....	30
9	Persentase abnormalitas sekunder spermatozoa setelah perlakuan ekstrak ethanol semangi air .	31



DAFTAR LAMPIRAN

Nomor		Halaman
1	Perhitungan Dosis Ekstrak Semanggi	39
2	Penentuan Volume Sonde	41
3	Analisis Data	42
4	Ethical Clearance	53
5	Surat Keterangan Hewan Coba	54



DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN

Simbol/Singkatan	Keterangan
ABP	<i>Andogen Binding Protein</i>
ATP	<i>Adenosin triphosphate</i>
BB	Berat Badan
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
e ⁻	Elektron
FSH	<i>Follicle Stimulating Hormone</i>
FSHR	<i>Follicle Stimulating Hormone Receptor</i>
GnRH	<i>Gonadotropin Releasing Hormone</i>
H	Hidrogen
H ₂ O	Air
H ₂ O ₂	Hidrogen Peroksida
LH	<i>Luteinizing Hormone</i>
LHR	<i>Luteinizing Hormone Receptor</i>
LPO	<i>Lipid Peroxidase</i>
MDA	<i>Malondialdehyde</i>
O ₂	Oksigen
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
SOD	Superoksia Dismutase

Simbol/Singkatan	Nama unit
β	Betta
°C	derajat celcius
cm	Centimeter
g	Gram
mg	Milligram
mL	Milliliter

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Kualitas sperma sangat berkaitan dengan keberhasilan fertilisasi sehingga penting untuk mengetahui kualitas sperma yang baik. Parameter-parameter yang digunakan dalam menilai kualitas sperma antara lain motilitas, viabilitas, konsentrasi, serta morfologi spermatozoa (Pugh & Baird, 2012). Morfologi spermatozoa memiliki bagian kepala, leher, dan ekor, dimana pada bagian-bagian tersebut mengandung materi genetik, membran sel, enzim, serta protein-protein sehingga sel spermatozoa dapat bekerja dan membuahi sel telur (Schatten & Constantinescu, 2007). Morfologi spermatozoa yang mengalami kelainan (tidak normal) akan mempengaruhi kemampuan spermatozoa dalam membuahi sel telur yang dinamakan abnormalitas spermatozoa (Yulnawati dkk., 2015).

Abnormalitas spermatozoa dapat terjadi karena adanya kegagalan pada proses spermatogenesis pada tubulus seminiferus terutama pada tahap spermiogenesis. Tahap Spermiogenesis merupakan suatu proses dimana spermatid haploid akan bertransformasi secara sempurna menjadi spermatozoa yang mampu melakukan motilitas (O'Donnell, 2014). Proses ini mencakup pembentukan akrosom, pepadatan dan pemanjangan inti, pembentukan *flagellum*, serta perkembangan *acrosome cap* (Susilawati, 2011). Pada saat proses spermiogenesis, berbagai protein terfosforilasi dan terjadi interaksi antara sel Sertoli dan sperma (O'Donnell, 2014). Hal tersebut dapat memicu terbentuknya radikal bebas dari dalam tubuh. Salah satu sumber terbentuknya radikal bebas berasal dari senyawa-senyawa yang ada di dalam tubuh sendiri melalui proses biologis yang normal (Winarsi, 2007).

Reactive Oxygen Species (ROS) memiliki kemampuan mengambil elektron dari komponen sel sehingga menyebabkan gangguan fungsi dan merusak komponen sel tersebut, salah satunya membran sel terutama pada bagian fosfolipid, molekul protein – protein penting (enzim, reseptor, antibodi, sitoskeleton, dan pembentuk matriks) (Mayes dkk., 2003). Keseluruhan proses spermiogenesis terjadi sangat kompleks, serta diperlukan beragam struktur dan protein yang kompleks untuk menjalani proses

remodelling akhir dan pelepasan spermatozoa yang telah matang. Gangguan-gangguan yang terjadi pada proses ini yang berasal dari radikal bebas yang terbentuk dapat menyebabkan abnormalitas sperma (O'Donnell, 2014). Kadar ROS yang tinggi dapat menyebabkan morfologi sperma abnormal juga tinggi, sehingga kualitas sperma menurun dan keberhasilan sperma dalam membuahi juga rendah (Venkatesh dkk., 2009). Berdasarkan penelitian Saba dkk. (2009) pada tikus normal memiliki jumlah abnormalitas sebesar 31 %.

Radikal bebas (ROS) dapat dihambat dengan adanya antioksidan didalam tubuh (Pham-Huy dkk., 2008). Kerusakan yang merupakan hasil gangguan radikal bebas ini merupakan akibat dari rendahnya antioksidan dalam tubuh sehingga tidak dapat mengimbangi reaktivitas senyawa oksidan dalam tubuh (Syafi'i, 2010). Hal ini menunjukkan bahwa perlu adanya antioksidan tambahan yang diperoleh dari asupan bahan makanan dari luar (Hamid dkk., 2017).

Indonesia merupakan negara dengan tingkat keanekaragaman hayati yang melimpah. Pemanfaatan tanaman sebagai media pengobatan masih belum banyak dikembangkan. Semanggi air (*Marsilea crenata*) merupakan salah satu tanaman yang dapat digunakan sebagai bahan pangan dan bahan pengobatan alami (Nurjanah dkk., 2012). Tanaman semanggi air ini banyak dimanfaatkan sebagai bahan pangan, serta menjadi salah satu kuliner tradisional khas kota Surabaya, yaitu Pecel Semanggi (Saleh & Moses, 2017).

Semanggi air (*M. crenata*) merupakan salah satu jenis tumbuhan air yang termasuk ke dalam paku-pakuan. Tumbuhan ini banyak ditemukan pada pematang sawah, kolam, danau, rawa, dan sungai (Nurjanah dkk., 2012). Semanggi air (*M. crenata*) diketahui memiliki kandungan senyawa flavonoid, isoflavons jenis genistein dan daidzein, dan vitamin C yang dapat berperan sebagai antioksidan (Erguder dkk., 2007; Jacoeb dkk., 2010; Kumar dkk., 2009). Antioksidan merupakan senyawa yang dapat menghambat reaksi oksidasi, dengan cara mengikat radikal bebas (Carocho & Ferreira, 2013).

Maka dari itu antioksidan yang terkandung pada semanggi air dimungkinkan dapat mengurangi efek negatif radikal bebas yang terbentuk akibat proses-proses yang terjadi pada spermiogenesis

sehingga abnormalitas spermatozoa menjadi menurun. Berdasarkan penelitian sebelumnya, diketahui bahwa pemberian ekstrak etanol daun semanggi air dapat meningkatkan kualitas sperma, termasuk rendahnya nilai abnormalitas spermatozoa pada tikus (Khairina, 2018). Hal tersebut merupakan salah satu pemicu diperlukan adanya penelitian mengenai jenis-jenis abnormalitas yang terdapat pada sperma tikus setelah pemberian ekstrak etanol daun semanggi air (*M. crenata*).

1.2. Rumusan Masalah

Rumusan masalah pada penelitian ini adalah bagaimana pengaruh pemberian ekstrak etanol daun semanggi air (*M. crenata*) terhadap jenis-jenis abnormalitas spermatozoa tikus jantan (*R. norvegicus*).

1.3. Tujuan Penelitian

Tujuan pada penelitian ini adalah mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol daun semanggi air (*M. crenata*) terhadap jenis-jenis abnormalitas spermatozoa tikus jantan (*R. norvegicus*).

1.4. Manfaat Penelitian

Manfaat pada penelitian ini adalah dapat mengetahui pengaruh dari tanaman semanggi air untuk peningkatan kualitas sperma, serta dapat dikembangkan pengetahuan lebih lanjut pada penelitian-penelitian selanjutnya sehingga dapat diaplikasikan ke masyarakat.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tanaman Semanggi air (*Marsilea crenata*)

Semanggi air (*M. crenata*) merupakan salah satu jenis tumbuhan air yang termasuk ke dalam tanaman paku-pakuan. Semanggi air memiliki bentuk daun yang khas, yaitu bentuk daun yang menyerupai payung dengan 4 kelopak anak daun yang saling berhadapan. Tumbuhan ini banyak ditemukan pada pematang sawah, kolam, danau, rawa, dan sungai (Afriastini dalam Nurjanah dkk., 2012). Semanggi air memiliki tunas yang tumbuh dari simpul batang. Tumbuhan ini memiliki daun berwarna hijau muda. Tanaman ini memiliki tangkai yang panjang dan tegak. Tumbuhan semanggi air dapat tumbuh hingga ketinggian kurang lebih 25 cm (Gambar 1) (Maisyaroh, 2014).



(Ma'arif dkk., 2009)

Gambar 1. Semanggi Air (*Marsilea crenata*)

Menurut Maisyaroh (2014), semanggi air diklasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Subkingdom	: Tracheobionta
Divisi	: Pteridophyta
Kelas	: Filicopsida
Ordo	: Hydropteridales

Famili : Marsileaceae
Genus : *Marsilea* L.
Spesies : *Marsilea crenata* C. Presl

2.2 Kandungan dan Manfaat Senyawa Kimia Tanaman Semanggi Air

Semanggi air (*M. crenata*) merupakan salah satu tanaman yang dapat digunakan sebagai bahan pangan dan bahan pengobatan alami (Nurjanah dkk., 2012). Semanggi air (*M. crenata*) memiliki kandungan fitokimia, diantaranya gula pereduksi, steroid, kandungan karbohidrat, flavonoid, Isoflavon terdiri dari genistein dan daidzein. Daun dan tangkai semanggi air memiliki kandungan yaitu pottasium, fosfor, besi, sodium, kalsium, seng, tembaga, vitamin C, karoten, natrium, dan kalium (Jacob dkk., 2010; Sulistiono, 2009; Kumar dkk., 2009; Titisari dkk., 2016).

Berdasarkan penelitian Prayadsub & Pimsamarn (2011) diketahui bahwa tanaman semanggi memiliki kemampuan tertinggi untuk menghambat radikal bebas. Semanggi air (*M. crenata*) memiliki kandungan senyawa flavonoid yang bekerja sebagai antioksidan yang dapat menghambat peningkatan radikal bebas dalam tubuh dan mampu meningkatkan viabilitas spermatozoa. Radikal bebas dalam tubuh dapat berpengaruh pada kualitas spermatozoa, baik pada motilitas, viabilitas, dan abnormalitas pada spermatozoa (Palupi, 2006).

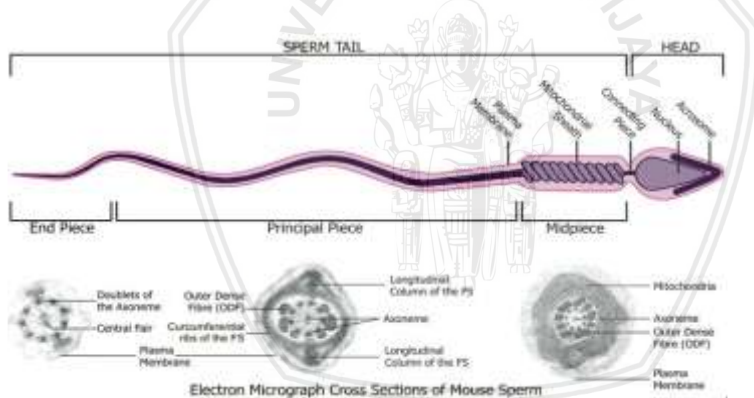
Berdasarkan penelitian Ma'arif (2016), juga diketahui bahwa semanggi air memiliki kandungan asam lemak dan volatile antara lain monoterpenoid dan diterpenoid. Komponen *diterpenoid* seperti *neophytadiene* dan *phytol* memiliki fungsi sebagai antioksidan, antiinflamasi, dan antimikrobia. Asam lemak yang diduga terkandung pada semanggi air yang berperan sebagai antioksidan adalah asam palmitat.

Berdasarkan penelitian Ahmadi dkk. (2016) vitamin C merupakan antioksidan yang larut dalam air yang dapat berfungsi sebagai faktor kunci dalam berbagai proses hidroksilasi, sintesis kolagen, proteoglikan, dan komponen matriks antar sel. Kandungan vitamin C juga dapat meningkatkan konsentrasi seminal plasma meningkat dan berkurangnya kerusakan DNA (Colagar dkk., 2009). Seng merupakan logam yang memainkan peran penting dalam

perkembangan testis dan pematangan sperma (Elgazar dkk., 2005). Kandungan seng diketahui dapat melindungi spermatozoa dari bakteri dan juga mencegah kerusakan kromosom (Ahmadi dkk., 2016).

2.3 Morfologi Spermatozoa

Spermatozoa merupakan sel sperma yang dibentuk dalam tubulus seminiferus, yang memiliki bentuk memanjang, terdiri atas kepala yang tumpul yang didalamnya terdapat inti, dan ekor yang digunakan untuk pergerakan sel sperma (Gambar 2). Bagian kepala spermatozoa mengandung nukleus dengan kromatin yang padat yang membawa material genetik spermatozoa. Kepala spermatozoa berbentuk oval, dan tumpul. Bagian kepala spermatozoa diselubungi oleh tudung (*cap*). Bagian anterior dari kepala spermatozoa terdapat akrosom. Akrosom memiliki enzim hidrolitik yang dibutuhkan untuk proses fertilisasi. Akrosom ini akan mengawali penggabungan dengan membran oosit pada proses fertilisasi (Susilawati, 2011).



(Borg dkk., 2010)

Gambar 2. Morfologi spermatozoa

Menurut Schatten & Constantinescu (2007) bagian ekor spermatozoa terdiri dari leher (*neck piece*), pangkal (*middle piece*), ekor utama (*principal piece*), dan ujung ekor (*end piece*). Leher sperma merupakan bagian yang menghubungkan kepala sperma dengan ekor sperma. Leher sperma mengandung mitokondria yang berfungsi dalam metabolisme spermatozoa untuk menghasilkan

energi berupa ATP (*Adenosin triphosphate*) melalui proses respirasi, sehingga sel dapat beraktivitas. Ekor sperma (*end piece*) merupakan bagian yang berfungsi sebagai alat mekanik untuk pergerakan spermatozoa. Ekor sperma tersusun atas serat protein yang memiliki pergerakan seperti gelombang, sehingga sperma dapat melewati cairan seminal.

2.4 Spermatogenesis

Spermatogenesis adalah proses pembentukan sel spermatozoa (n) dari yang terjadi di tubulus seminiferus di bawah kontrol hormon gonadotropin dari hipofisis (pituitari bagian depan). Tubulus seminiferus terdiri atas sel sertoli, dan sel germinal, seperti spermatogonia, spermatosit, serta spermatid. Fase spermatogenesis ini terjadi dalam tiga fase, yaitu fase spermatositogenesis, fase meiosis, dan fase spermiogenesis.

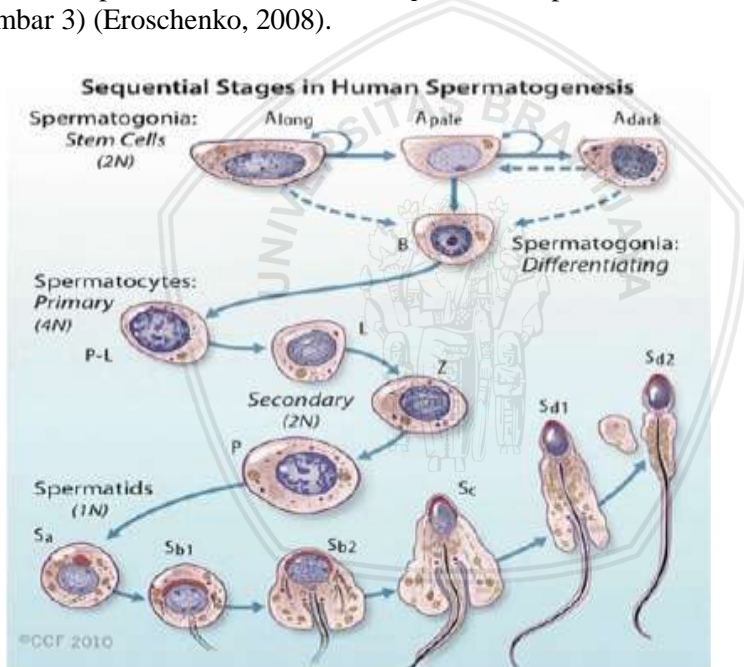
Proses spermatogenesis (Gambar 3) diawali dengan spermatositogenesis yang merupakan proliferasi sel induk spermatogonia yang membelah secara mitosis menghasilkan spermatosit primer. Spermatosit primer mengalami pembelahan meiosis I menjadi spermatosit sekunder. Pembelahan meiosis I terdiri dari profase, metafase, anafase dan telofase (Yuwanta, 2004). Pembelahan meiosis II spermatosit sekunder membelah menjadi spermatid (Hafez, 2000). Spermatid mengalami perubahan morfologi dari bentuk bulat menjadi oval dan berekor yaitu spermatozoa yang melalui proses spermiogenesis (Pineda & Faulkner, 2003).

Spermatogonia merupakan sel pada tubulus seminiferus yang letaknya melekat dengan membrane basal yang memiliki ukuran yang lebih kecil dari sel spermatosit. Spermatogonia terbagi menjadi dua tipe yaitu spermatogonia A dan spermatogonia B. Spermatogonia tipe A terbagi menjadi dua yaitu *pale* dan *dark spermatogonia*. *Pale spermatogonia* merupakan spermatogonia yang memiliki sitoplasma berwarna terangan dan kromatin yang lebih tipis. Sedangkan, *dark spermatogonia* merupakan spermatogonia yang memiliki sitoplasma berwarna gelap karena memiliki kromatin yang lebih tebal (Eroschenko, 2008).

Sel spermatosit merupakan sel yang memiliki bentuk yang bulat dan besar, terletak di bagian tengah epitel germinal memiliki warna

yang pekat. Sel spermatosit memiliki warna yang pekat karena ciri utama yaitu memiliki kromatin yang lebih tebal. Sel ini memiliki nukleus yang besar yang berfungsi sebagai persiapan untuk membelah. Spermatosit merupakan hasil pembelahan meiosis dari sel spermatogonia tipe B (Eroschenko, 2008).

Spermatosit primer memiliki 2 set kromosom (2n) dan spermatosit sekunder memiliki jumlah set kromosom setengah (n) dari spermatosit primer. Spermatosit sekunder akan mengalami pembelahan meiosis II menjadi spermatid. Spermatid merupakan sel yang memiliki bentuk yang kecil. Spermatid terletak dibagian ujung epitel germinal. Spermatid memiliki dua bentuk yaitu *round spermatid* (spermatid bulat) dan *late spermatid* (spermatid berekor) (Gambar 3) (Eroschenko, 2008).



(Desai dkk., 2013)

Gambar 3. Proses spermatogenesis

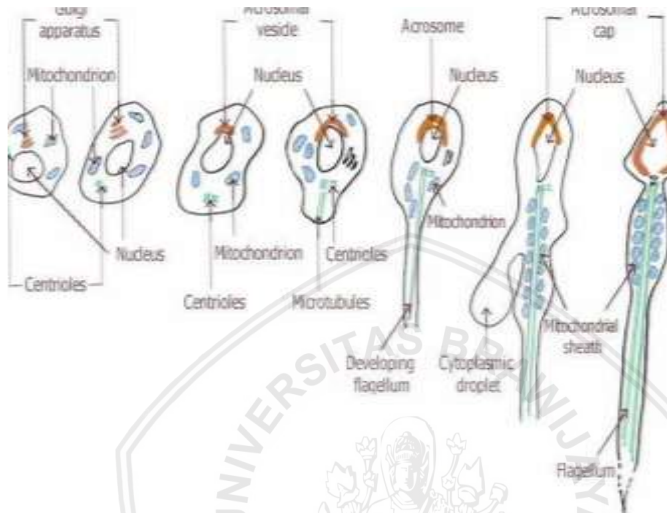
Regulasi hormonal spermatogenesis berada di bawah kendali aksis hipotalamus-hipofisis-gonad (HPG). Mekanisme kontrol hormonal diawali dari neuron (kiss-1 neurons) pada otak yang

mensekresikan kisspeptin. Sekresi *kisspeptin* merupakan awal pubertas yang terjadi pada mamalia. *Kisspeptin* berikatan dengan reseptor GPR54 yang ada pada hipotalamus melalui *G protein cascade* sehingga merangsang hipotalamus untuk mensekresikan GnRH (*Gonadotropin Realizing Hormon*) (Wistuba dkk., 2007). Hipotalamus mensekresikan *gonadotropin releasing hormone* (GnRH) yang akan bekerja pada kelenjar pituitari anterior untuk merangsang produksi hormon gonadotropin, yaitu FSH (*Follicle Stimulating Hormon*) dan LH (*Luteinizing Hormon*). Produksi GnRH yang terus menerus akan menyebabkan desensitisasi (*down regulation*) gonadotropin, yang akan mengurangi pelepasan LH dan FSH. LH dan FSH bekerja pada testis untuk menghasilkan testosteron dan inhibin. LH akan berikatan dengan LHR (*Luteinizing Hormon Receptor*) pada sel Leydig dan akan merangsang produksi hormon testosteron. Ketika kadar testosteron terakumulasi, hormon testosteron akan memberi efek umpan balik negatif pada hipofisis untuk menekan pelepasan LH dan hipotalamus akhirnya menekan produksi GnRH dan dengan demikian mengatur kadar testosteron. FSH akan berikatan dengan FSHR (*Folikel Stimulating Hormon Receptor*) pada sel sertoli untuk merangsang proses spermatogenesis, sekresi inhibin dan *Androgen Binding Protein* (ABP). Kadar inhibin yang terakumulasi akan memberikan efek umpan balik negatif di hipofisis untuk menekan pelepasan FSH, sehingga mengatur kadar inhibin (Sharma dkk., 2015). ABP (*Androgen Binding Protein*) berperan untuk menghambat kerja pituitari anterior dalam mensekresi LH dan FSH (Snyder & Matsumoto, 2013; Wistuba dkk., 2007).

2.5 Spermiogenesis

Spermiogenesis merupakan suatu proses dimana spermatid haploid akan bertransformasi secara sempurna menjadi spermatozoa yang mampu melakukan motilitas (O'Donnell, 2014). Proses ini mencakup pembentukan akrosom, pepadatan dan pemanjangan inti, pembentukan *flagellum*, serta pengurangan sebagian besar sitoplasmanya (Gambar 4). Proses spermiogenesis ini dimulai setelah melewati dua fase spermatogenesis, yaitu spermatositogenesis, dan pembelahan meiosis. Proses spermiogenesis ini akan menghasilkan spermatozoa yang matang, yang nantinya akan dilepaskan ke dalam

lumen *tubulus seminiferus* (Iswara, 2009). Proses spermatogenesis yang terhambat dapat mempengaruhi proses spermiogenesis sehingga dapat mempengaruhi terjadinya abnormalitas atau kelainan pada spermatozoa.



(Susilawati, 2011)

Gambar 4. Tahapan Spermiogenesis

Proses spermiogenesis umumnya terjadi atas 4 fase, yaitu :

1) Fase Golgi

Fase ini ditandai dengan adanya pembentukan granul proakrosomal (*proacrosomal granules*) berasal dari apparatus golgi, pelepasan granul kedalam *single granul acrosome* yang akan menghasilkan *nuclear envelope*, serta tahap awal pertumbuhan ekor pada bagian ujung lain dari akrosom yang ditandai dengan hilangnya sentriol pada bagian proksimal dari inti. Pembentukan granul proakrosomal (*proacrosomal granules*) untuk menyatukan beberapa enzim proteolitik pada akrosom. Protein-protein tersebut antara lain, seperti *proacrosin*, *hyaluronidase*, *esterase*, dan *asam hidrolase* (Susilawati, 2011; Bergmann, 2011).

2) Fase Cap

Fase cap diawali dengan tersebarnya granul ke permukaan nukleus spermatid, dimana proses ini akan terus berlanjut menuju 2/3 bagian anterior pada masing-masing inti spermatid yang tertutup oleh lapisan tipis *double layer*. Pada fase ini juga dimulainya proses kondensasi nukleus dan perkembangan *flagel*. (Bergmann, 2011). Perkembangan *flagel* yang terjadi, yaitu adanya perkembangan komponen axonema pada bagian ekor yang dibentuk dari elemen-elemen pada distal sentriol yang mengalami pemanjangan dibagian sitoplasma sel. Selama awal perkembangan, struktur axoneme ini memiliki struktur yang mirip dengan silia, dimana didalamnya terdapat sepasang tubulus dibagian tengah yang dikelilingi 9 pasang tubulus pada bagian tepinya (O'Donnell, 2014).

3) Fase akrosom

Fase akrosom ini ditandai dengan adanya perubahan inti, akrosom, dan pertumbuhan ekor spermatid. Pertumbuhan ini difasilitasi dengan pemutaran pada masing-masing spermatid, dimana akrosom menuju kebagian ujung dan ekornya menuju kebagian lumen. Perubahan inti yang terjadi yaitu kondensasi kromosom pada butiran tebal dibagian kepala yang menjadi pipih. Perubahan bentuk kepala dan akrosom ini terjadi disekitar sel sertoli. Perubahan morfologi inti ini diiringi dengan hilangnya sitoplasma pada bagian kepala, bagian *cauda*, dan pada bagian proximal tumbuh ekor yang bagian sitoplasmanya tumbuh *silinder sheat*. Mitokondria yang pada awalnya hanya terdistribusi di spermatid mulai terkonsentrasi pada bagian axoneme yang membentuk *sheat* pada bagian leher (Susilawati, 2011).

4) Fase maturasi

Fase ini merupakan fase akhir dari proses pemanjangan dan akan menuju lumen tubulus seminiferus. Pada fase ini terjadi perbedaan bentuk spesifik akrosom dan kepala sperma, penyelesaian proses kondensasi nukleus, dan pengurangan sitoplasma (Bergmann, 2011). Pemanjangan spermatid terjadi dengan proses yang bervariasi sehingga bentuk pada berbagai spesies menjadi berbeda. Pada inti terdapat granula kromatin

repository.ub.ac.id

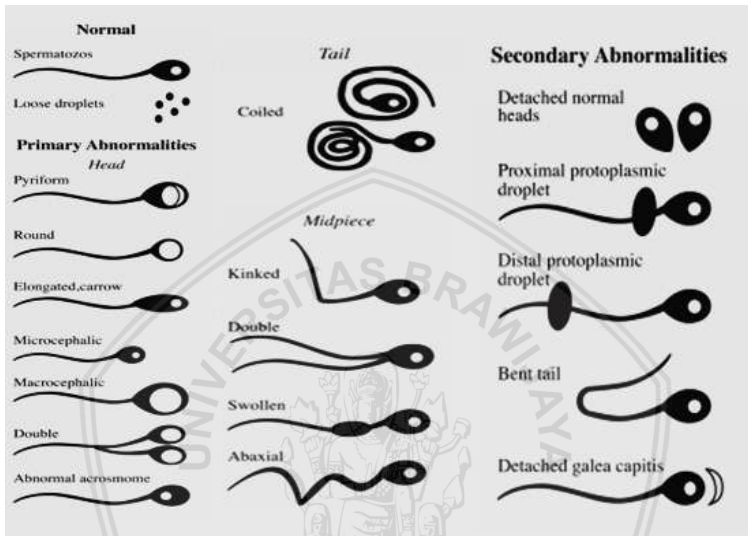
yang secara progresif mengalami kondensasi. Kromatin spermatozoa memiliki struktur yang sangat padat dan teratur. Kromatin dikemas menjadi nukleosom dan digulung menjadi solenoid. Selama proses spermiogenesis, kromatin mengalami serangkaian modifikasi di mana histon digantikan dengan protein transisi dan selanjutnya, protamin. Protamines memfasilitasi pemadatan DNA menjadi padat. Untaian DNA terkondensasi oleh protamin dan membentuk unit pengemasan dasar kromatin sperma yang disebut toroid. Toroid selanjutnya dipadatkan oleh ikatan silang disulfida intra dan antar molekul (O'Donnell, 2014). Pada fase ini, terdapat pematangan *fibrous sheath* dan sembilan serabut kasar membentuk lingkaran axonema secara terus menerus membentuk leher. Sembilan serabut kasar yang dikelilingi axonema terbentuk dari leher sampai ujung ekor. Sel spermatid mengalami perubahan bentuk dari sel dan terjadi perpindahan lokasi dari masing-masing organel tersebut, sehingga terbentuk spermatozoa yang lengkap (Susilawati, 2011).

2.6 Abnormalitas Spermatozoa

Abnormalitas spermatozoa merupakan kelainan yang terjadi pada struktur spermatozoa. Presentase abnormalitas yang tinggi pada spermatozoa dapat mempengaruhi terjadinya infertilitas. Spermatozoa yang memiliki struktur sel abnormal dapat menjadi salah faktor penghambat dalam proses fertilisasi. Penilaian abnormalitas spermatozoa sangat berkaitan erat dengan kemampuan spermatozoa dalam membuahi sel telur, serta terjadinya kemandulan (Yulnawati dkk., 2015).

Jenis abnormalitas dapat terbagi menjadi abnormalitas primer dan sekunder (Gambar 5). Abnormalitas primer merupakan abnormalitas spermatozoa yang terjadi karena adanya kegagalan pada proses spermatogenesis pada tubulus seminiferus. Faktor yang mempengaruhi terjadinya abnormalitas primer diantaranya adalah faktor keturunan dan pengaruh dari lingkungan. Abnormalitas primer dapat berupa kepala spermatozoa besar atau kecil, kepala spermatozoa pendek, kepala spermatozoa lebar, kepala spermatozoa ganda, serta ekor ganda (Susilawati, 2011). Abnormalitas sekunder merupakan abnormalitas yang terjadi selama proses perlakuan

pembuatan preparat ulas, terutama pada proses pewarnaan. Abnormalitas sekunder juga dapat terjadi selama proses pematangan spermatozoa di epididimis (Vashishat dkk., 2012). Abnormalitas sekunder dapat berupa bagian ekor yang terlipat, adanya butiran-butiran sitoplasmik, terdapatnya kepala tanpa ekor atau ekor tanpa kepala spermatozoa (Garner & Hafez, 2000).



(Whittier & Bailey, 2009)

Gambar 5. Morfologi sperma abnormal

2.6.1 Abnormalitas pada kepala

Abnormalitas yang terjadi pada kepala, yaitu kepala spermatozoa besar atau kecil, kepala spermatozoa pendek, kepala spermatozoa lebar, kepala spermatozoa ganda (Susilawati, 2011). Bagian kepala spermatozoa terdapat nukelus (inti sel) dan juga akrosom. Nukleus membawa material genetik spermatozoa, serta akrosom memiliki enzim yang berfungsi untuk mendegradasi membran sel telur, sehingga sperma dapat masuk, dapat mencerna filamen proteoglikan dari jaringan, dan enzim proteolitik yang sangat kuat.

Menurut O'Donnell (2014) terdapat dua struktur utama yang berhubungan dengan pembentukan kepala sperma, yaitu acroplaxome dan manchette, yang berkaitan erat satu sama lain

ketika spermatid akan melanjutkan menuju fase elongasi. Acroplaxome berperan dalam pembentukan kepala sperma yang berfungsi sebagai perancah mekanik yang dapat mentransmisikan energi ke nukleus dan berpartisipasi dalam pembentukan kepala sperma. Manchette adalah susunan mikrotubulus yang akan mengelilingi kepala spermatid yang terdapat pada fase elongasi selama spermiogenesis (Lehti & Sironen, 2016). Manchette berperan dalam pembentukan kepala sperma, serta dalam pengembangan ekor sperma. Kelainan pada manchette dapat menyebabkan adanya perubahan bentuk kepala sperma.

Saat pembentukan manchette dan pembentukan inti spermatid pada spermiogenesis juga terjadi *remodelling* dari kromatin sperma. Kromatin spermatozoa memiliki struktur yang sangat padat dan teratur. Kromatin dikemas menjadi nukleosom dan digulung menjadi solenoid. Selama proses spermiogenesis, kromatin mengalami serangkaian modifikasi di mana histon digantikan dengan protein transisi dan selanjutnya, protamin. Protamines memfasilitasi pemadatan DNA menjadi padat. Untaian DNA terkondensasi oleh protamin dan membentuk unit pengemasan dasar kromatin sperma yang disebut toroid. Toroid selanjutnya dipadatkan oleh ikatan silang disulfida intra dan antar molekul (O'Donnell, 2014).

Proses dari pemadatan kromatin disertai dengan pemutusan dan perbaikan untai DNA. Gangguan yang terjadi saat proses pemadatan DNA dapat berdampak pada morfologi nukleus sperma. Berdasarkan penelitian Tanaka, dkk. (2005) diketahui bahwa tikus yang kekurangan protein seperti histone yang terlibat dalam pemadatan kromatin menunjukkan morfologi nukleus yang abnormal yang abnormal. Berdasarkan penelitian Maetnerr, dkk. (2013) diketahui bahwa pembentukan kepala sperma ditentukan pada saat proses pengaturan kromatin DNA sperma. Proses kondensasi DNA sperma yang terganggu pada saat proses spermiogenesis dapat mempengaruhi terjadinya abnormalitas kepala.

2.6.2 Abnormalitas pada leher

Abnormalitas yang terjadi pada leher, yaitu leher bengkok, leher ganda, *abaxial midpiece* (Whittier & Bailey, 2009). Menurut Schatten & Constantinescu (2007) Leher sperma merupakan bagian yang menghubungkan kepala sperma dengan ekor sperma. Leher

sperma mengandung membrane mitokondria yang berfungsi dalam metabolisme spermatozoa untuk menghasilkan energi berupa ATP (Adenosin Tri Phosphate) melalui proses respirasi, sehingga sel dapat beraktivitas. Membrane sel pada spermatozoa memiliki kadar fosfolipid yang tinggi. Senyawa lipid ini mengandung asam lemak tak jenuh yang rentan mengalami oksidasi (Sanocka & Kurpisz, 2004).

Membran mitokondria yang terdapat pada leher spermatozoa memiliki senyawa lipid yang sangat sensitif terhadap oksidasi dan radikal bebas. Tingginya tingkat radikal bebas atau adanya agent lain yang menyerang membran mitokondria dapat menyebabkan terjadinya abnormalitas pada leher sperma. Hal ini dikarenakan serangan radikal bebas yang tinggi dapat meningkatkan pembentukan peroksidasi lipid. Abnormalitas yang terjadi karena adanya membran dengan tingkat peroksidasi tinggi dapat mempengaruhi pertukaran ion yang penting untuk mempertahankan motilitas sperma, serta peroksidasi dapat menyebabkan hilangnya enzim / koenzim yang penting untuk metabolisme dan perlindungan terhadap radikal bebas sehingga sel dapat mengalami stress oksidatif dan menyebabkan abnormalitas (Rao dkk., 1989).

2.6.3 Abnormalitas pada ekor

Abnormalitas pada ekor, yaitu ekor ganda (Susilawati, 2011), ekor bengkok, adanya butiran-butiran sitoplasmik, dan terdapatnya ekor tanpa kepala spermatozoa (Garner & Hafez, 2000). Pada proses spermiogenesis, bagian ekor terjadi pada fase cap. Fase cap merupakan fase di mana terjadi perkembangan komponen axonema pada bagian ekor yang dibentuk dari elemen-elemen pada distal sentriol yang mengalami pemanjangan di bagian sitoplasma sel.

Selama awal perkembangan, struktur axoneme ini memiliki struktur yang mirip dengan silia, di mana di dalamnya terdapat sepasang tubulus di bagian tengah yang dikelilingi sembilan pasang tubulus pada bagian tepinya dan protein dynein yang menghasilkan gerakan flagel. Axoneme dibentuk di dalam centrosome spermatid, terdiri dari sepasang centriole, karena spermatid tidak mengalami mitosis, centrosome sekarang disebut *basal body*. Ketika akrosom mulai terbentuk pada satu kutub pada nukleus, pasangan sentriol

bergerak menuju kutub yang berlawanan untuk memulai pembentukan axoneme.

Axoneme muncul dari sentriol distal dan secara bertahap meluas ke dalam sitoplasma. Banyak gen yang terlibat dalam pembentukan axoneme yang mengatur pembentukan silia dan flagela. Mikrotubulus dalam axoneme sperma dimodifikasi secara luas setelah diterjemahkan termasuk modifikasi asetat, tirosinat, dan modifikasi poliglutamatisasi. Cacat dalam modifikasi tubulin, seperti tidak adanya enzim pengubah tubulin, dapat menyebabkan pembentukan aksonem abnormal. Kegagalan pada tahap awal pembentukan aksonem terjadi karena abnormalitas pada susunan mikrotubulus aksonemal $9 + 2$, seperti tidak adanya pasangan mikrotubulus sentral dan atau hilangnya doublet luar (O'Donnell, 2014).

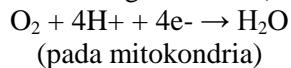
Saat spermiogenesis terjadi inisiasi pembentukan axoneme, serta perkembangan *flagell* agar spermatozoa dapat motil. Proses ini bergantung pada *protein and vesicle-mediated trafficking pathways*. Adanya gangguan terhadap *trafficking protein* dapat menyebabkan terjadinya abnormalitas saat proses perkembangan *flagell*. Adanya agent atau modifikasi genetik yang mengganggu pengembangan atau fungsi dari manchette juga dapat menyebabkan kerusakan pada pembentukan *flagell* sehingga terjadi abnormalitas pada ekor sperma (O'Donnell, 2014).

2.7 Radikal Bebas

Radikal bebas (*Free Radicals*) merupakan atom atau molekul yang memiliki satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan sehingga cenderung berikatan bersama-sama dengan molekul yang ada disekitarnya. Elektron yang tidak berpasangan ini akan menarik elektron dari senyawa lainnya untuk dapat berpasangan sehingga membentuk radikal baru. Apabila reaksi ini terjadi secara terus menerus, maka dapat terjadi reaksi rantai sampai radikal bebas dihilangkan oleh radikal bebas lainnya (Yomes, 2006). Sumber terbentuknya radikal bebas, antara lain berasal dari dalam tubuh sendiri melalui biologis yang normal, seperti adanya proses inflamasi, atau berasal dari luar tubuh contohnya konsumsi obat-obatan dan senyawa-senyawa polutan, serta adanya paparan dari radiasi (Mayes dkk., 2003; Winarsi, 2007).

repository.ub.ac.id

Senyawa radikal bebas yang berasal dari dalam tubuh yaitu adanya reaksi redoks biokimia yang melibatkan senyawa oksigen. Senyawa yang dihasilkan dari reaksi redoks ini disebut senyawa oksigen reaktif yang sebagian berbentuk radikal (hidroksil, peroksil dan superoksida) dan sebagian lainnya berbentuk non radikal (asam hipoklorit dan H₂O₂). Senyawa oksigen reaktif dibentuk dari hasil reduksi senyawa oksigen (O₂) menjadi H₂O yang diperlukan oleh semua organisme aerobik untuk menghasilkan ATP yang secara sederhana dapat dinyatakan sebagai berikut (Yomes, 2006):



Reduksi oksigen memerlukan pengalihan empat electron (*electrotransfer*) yang tidak dapat dilakukan sekaligus, tetapi dalam empat tahapan yang setiap tahapan hanya melibatkan pengalihan satu elektron yang dapat menyebabkan terbentuknya senyawa-senyawa oksigen reaktif. Kemampuan *Reactive Oxygen Species* (ROS) untuk mengambil elektron dari komponen sel menyebabkan terjadinya gangguan-gangguan fungsi dan merusak komponen sel tersebut, salah satunya membran sel terutama pada bagian fosfolipid, molekul protein – protein penting (enzim, reseptor, antibodi, sitoskeleton, dan pembentuk matriks). Bagian fosfolipid mengandung asam lemak tak jenuh yang paling rentan terhadap ROS yang mengakibatkan rapuhnya dinding sel yang dikenal dengan *Lipid peroxidation* (Sanocka & Kurpisz, 2004).

2.8 Antioksidan

Antioksidan merupakan senyawa yang mampu menangkal radikal bebas dalam tubuh dengan cara mendonorkan satu elektronnya pada senyawa yang bersifat oksidan sehingga kerja senyawa oksidan tersebut dapat dihambat (Winarsi, 2007). Tubuh manusia dalam kondisi normal mempunyai sistem antioksidan yang dapat menangkal adanya radikal bebas, yaitu sistem enzimatik dan non enzimatik. Sistem enzimatik, yaitu dengan adanya glutatión peroksidase, superoksida dismutase (SOD) dan katalase. Sedangkan, sistem non enzimatik dengan adanya antioksidan larut lemak (α -tokoferol, β -karoten, kuinon, flavonoid) dan antioksidan larut air (vitamin C dan Vitamin E, Se, Zn) (Yomes, 2006; Syafi'i, 2010).

Berdasarkan mekanisme kerjanya, antioksidan digolongkan menjadi tiga kelompok yaitu antioksidan primer yang dapat memberikan atom hidrogen secara cepat pada senyawa radikal sehingga dapat mengubah menjadi senyawa yang lebih stabil. Senyawa ini terdiri atas SOD dan katalase. Antioksidan sekunder yang bekerja dengan cara memotong atau menangkap reaksi oksidasi berantai dari radikal bebas, sehingga radikal bebas tidak akan bereaksi dengan komponen seluler. Antioksidan sekunder terdiri atas β -karoten, bilirubin, albumin, vitamin C, E dan flavonoid. Antioksidan tersier terdiri atas sistem enzim *DNA-repair* dan metionin sulfoksida reduktase yang berperan dalam perbaikan biomolekuler yang rusak akibat reaktivitas radikal bebas (Winarsi, 2007; Yomes, 2006).



BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan November- Januari 2018. Daun semanggi didapatkan dari petani semanggi lokal di Jalan Sememi, Jaya baru VII, Benowo, Surabaya. Proses penggilingan daun semanggi menjadi serbuk di lakukan di Matera Medika, Batu. Ekstraksi semanggi di Laboratorium Biokimia, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Universitas Brawijaya Malang. Tikus strain *Wistar* didapatkan dari Biosains Universitas Brawijaya Malang. Pemeliharaan, pemberian perlakuan, pembedahan mencit, dan pengukuran parameter penelitian di Laboratorium Fisiologi Struktur dan Perkembangan Hewan, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya Malang.

3.2 Pengelompokan Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan adalah 24 ekor tikus (*Rattus norvegicus*) strain Wistar dengan jenis kelamin jantan, umur 3-4 bulan dan berat badan rata-rata 200 gram. Tikus diaklimatisasi selama dua minggu di Animal House Laboratorium Fisiologi Struktur dan Perkembangan Hewan, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya Malang. Tikus di tempatkan pada wadah (bak plastik) berukuran 32 x 28 cm yang beralaskan sekam dan berpenutup kawat sebanyak 16 wadah yang dilabel sesuai dengan perlakuan yaitu K, PS1, PS2, dan PS3. Tiap kelompok ditempatkan pada 2 wadah yang berisi 2-3 ekor tikus per wadah. Tikus tersebut dimasukkan dalam masing-masing wadah secara acak. Setiap wadah disediakan pakan pelet dan satu botol minum mineral yang tidak dibatasi pemberiannya. Setiap hari diberi pakan dan minum ad libitum serta berat badan tikus ditimbang dengan timbangan analitik. Sekam diganti setiap dua hari sekali.

3.3 Pembuatan Ekstrak Etanol 70 % Daun Semanggi Air

Daun semanggi air segar sebanyak 8 kg dibersihkan, dicuci dan dikeringkan. Daun semanggi air yang sudah kering kemudian digiling hingga menjadi serbuk. 1.400 gram serbuk daun semanggi

air dimaserasi dengan 12 liter pelarut etanol 70 % selama 24 jam dengan sesekali diaduk hingga mendapatkan meserat yang lebih bening. Maserat disaring dengan kertas saring *Wismen* hingga mendapatkan filtrat daun semanggi air. Filtrat dipekatkan dengan *vacuum rotary evaporator* sampai diperoleh ekstrak kental (Hutasuhut, 2014).

3.4 Pembuatan Dosis Perlakuan

Ekstrak etanol daun semanggi air dilarutkan pada aquades dengan dosis 0,216 mg/gBB (18 mg ekstrak daun semanggi air dalam 1 ml akuades), dosis 0,432 mg/gBB (36 mg ekstrak daun semanggi air dalam 1 ml akuades), dan dosis 0,648 mg/gBB (54 mg ekstrak daun semanggi air dalam 1 ml akuades). Larutan ekstrak semanggi dibuat stok sebanyak 100 ml dan di simpan dalam lemari pendingin.

3.5 Perlakuan Hewan Coba

Berat badan masing-masing tikus ditimbang terlebih dahulu menggunakan timbangan analitik. Setelah itu, diberi perlakuan secara oral yaitu K (hanya diberi air mineral), PS1 (diberi larutan ekstrak semanggi air dosis 0,216 mg/gBB), PS2 (diberi larutan ekstrak semanggi air dosis 0,432 mg/gBB), PS3 (diberi larutan ekstrak semanggi air dosis 0,648 mg/gBB). Semua treatment diberikan selama 30 hari. Semua hewan coba didislokasi leher pada hari ke 31. Tikus yang sudah didislokasi leher, dibedah untuk diambil organ kauda epididimis. Organ kauda epididimis dicacah pada gelas arloji untuk diambil cairan semennya.

3.6 Pengukuran Parameter

3.6.1 Kualitas sperma

Organ kauda epididimis dalam 1,5 ml PBS suhu 37 °C dicacah pada gelas arloji untuk mendapatkan cairan semen.

3.6.2 Abnormalitas sperma

10µl cairan semen diteteskan pada slide glass, kemudian diteteskan sedikit eosin negrosin kemudian di aduk dengan tusuk gigi secara perlahan. Slide glass disentuhkan pada cairan semen dari sisi kanan, kemudian obyek glas pengapus ditarik ke arah kanan dengan sudut 45°. Sediaan apus tersebut kemudian langsung diamati dan

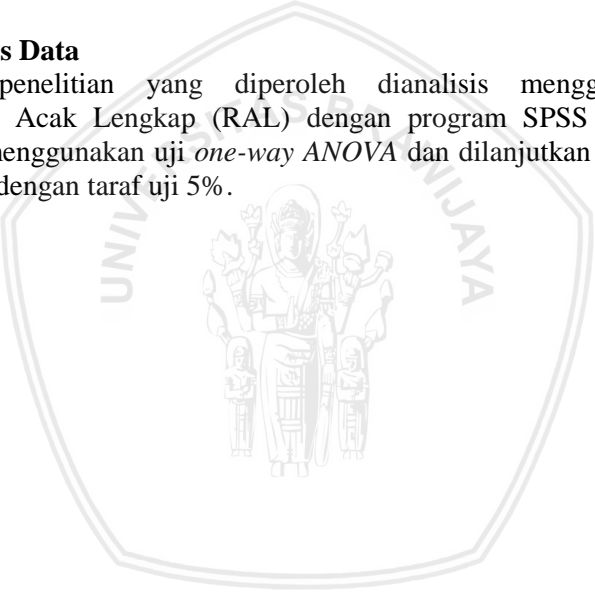
repository.ub.ac.id

dihitung abnormalitas sperma menggunakan mikroskop cahaya perbesaran 400x. Sperma yang abnormal dan sperma total dihitung sebanyak 3 kali ulangan dengan 5 bidang pandang tiap ulangan (atau hingga jumlah sel sperma setiap ulangan minimal 200 sel), kemudian ditentukan persentase sperma abnormal. Sperma yang abnormal juga diamati jenis-jenis abnormalitasnya. Selanjutnya dihitung Abnormalitas spermatozoa sesuai dengan rumus berikut ini:

$$\begin{aligned} \text{Abnormalitas (\%)} \\ &= \frac{\text{jumlah sperma Abnormal}}{\text{jumlah sperma total}} \times 100\% \end{aligned}$$

3.7 Analisis Data

Hasil penelitian yang diperoleh dianalisis menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan program SPSS 24 *for windows* menggunakan uji *one-way ANOVA* dan dilanjutkan dengan Uji Tukey dengan taraf uji 5%.



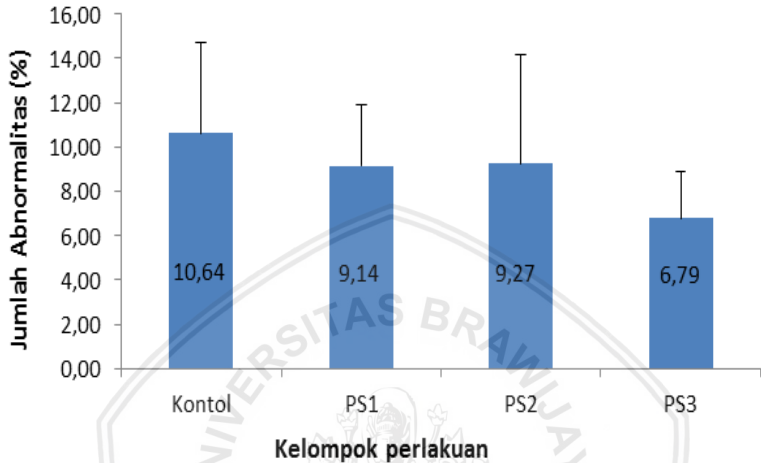
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Abnormalitas Spermatozoa

Berdasarkan hasil penelitian diketahui bahwa jumlah rata-rata abnormalitas spermatozoa antar kelompok perlakuan tidak memiliki perbedaan yang signifikan. Hasil analisis menunjukkan bahwa abnormalitas spermatozoa memiliki variasi nilai yang kecil antar kelompok perlakuan. Jumlah rata-rata abnormalitas spermatozoa kelompok kontrol sebesar 10,64 %, perlakuan kelompok PS1 (0,216 mg/gBB) sebesar 9,14 %, perlakuan kelompok PS2 (0,432 mg/gBB) sebesar 9,27 %, dan perlakuan kelompok PS3 (0,648 mg/gBB) sebesar 6,79 %. Berdasarkan hasil ini diketahui bahwa jumlah abnormalitas spermatozoa pada setiap kelompok masih termasuk dalam jumlah normal. Hal ini dikarenakan menurut WHO (2010) persentase nilai normal untuk pria subur yaitu, memiliki abnormalitas antara 0–30%. Berdasarkan hasil ini diketahui bahwa jumlah abnormalitas spermatozoa pada kelompok yang diberikan ekstrak etanol daun semanggi air semakin mengalami penurunan dibandingkan dengan kelompok kontrol (Gambar 6). Jumlah abnormalitas yang paling rendah terdapat pada perlakuan pemberian ekstrak etanol daun semanggi air pada dosis yang lebih tinggi, yaitu 0,648 mg/gBB. Hasil ini menunjukkan bahwa kandungan antioksidan yang terdapat pada ekstrak etanol daun semanggi air dapat mengurangi jumlah abnormalitas spermatozoa pada tikus yang sehat.

Abnormalitas spermatozoa dapat disebabkan karena adanya gangguan-gangguan yang terjadi selama proses spermiogenesis yang berasal dari adanya radikal bebas yang terbentuk dari dalam tubuh melalui proses biologis yang normal (Mayes dkk., 2003; O'Donnell, 2014). Radikal bebas (ROS) dapat dihambat dengan adanya antioksidan (Pham-Huy, dkk. 2008). Antioksidan eksogen yang diperoleh dari semanggi air (*M. crenata*) dapat mengikat radikal bebas yang terbentuk selama proses spermiogenesis (Carocho & Ferreira, 2013) sehingga dapat mengurangi efek negatif dari radikal bebas. Antioksidan bekerja menangkalkan adanya serangan oksigen reaktif sehingga menghentikan reaksi rantai radikal bebas, serta

dapat melindungi membran sel dari serangan radikal bebas, baik dari dalam sel atau dari luar sel (Yomes, 2006).



Gambar 6. Persentase Abnormalitas spermatozoa setelah perlakuan ekstrak ethanol semanggi air. Data merupakan rata-rata ulangan \pm SD dari jumlah abnormalitas total spermatozoa. Ket. Kontrol = tikus tanpa perlakuan, PS1 = tikus perlakuan ekstrak semanggi dosis 1 (0,216 mg/gBB), PS2 = tikus perlakuan ekstrak semanggi dosis 2 (0,432 mg/gBB), dan PS3 = tikus perlakuan ekstrak semanggi dosis 3 (0,648 mg/gBB).

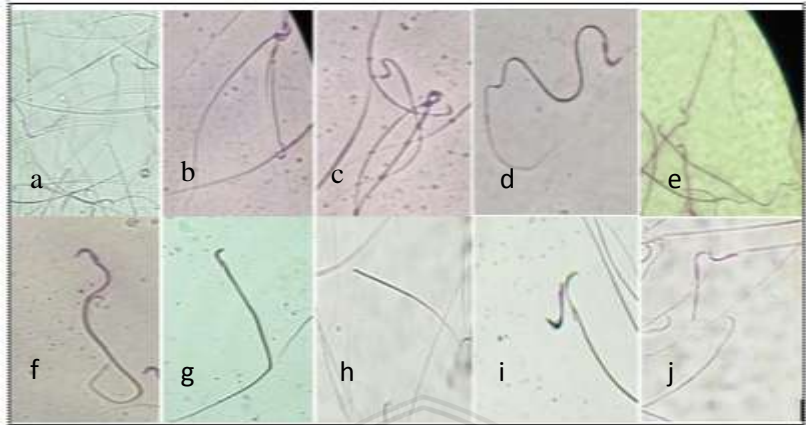
Antioksidan yang terdapat pada tanaman Semanggi air merupakan antioksidan sekunder yang disebut juga antioksidan eksogenous atau nonenzimatis. Antikosisidan eksogenous ini bekerja menghambat radikal bebas dengan cara pengikatan logam, memotong reaksi oksidasi berantai dari radikal bebas atau secara langsung *mencavenging* radikal bebas atau ROS yang dihasilkan oleh sel-sel di dalam organ secara normal, sehingga radikal bebas tidak akan bereaksi dengan komponen seluler lainnya (Ifeanyi, 2018; Devasagayam dkk., 2004). Hal ini menyebabkan radikal bebas yang

dihasilkan oleh sel didalam organ menjadi lebih rendah, sehingga gangguan-gangguan yang terjadi selama proses spermiogenesis akibat adanya radikal bebas semakin sedikit dan abnormalitas spermatozoa menjadi berkurang.

Semanggi air (*M. crenata*) diketahui memiliki kandungan senyawa flavonoid, isoflavons jenis genistein dan daidzein, dan vitamin C yang dapat berperan sebagai antioksidan eksogen (Erguder dkk., 2007; Jacob dkk., 2010; Kumar dkk., 2009). Berdasarkan penelitian Khaki dkk. (2011) kandungan flavonoid memiliki kemampuan sebagai antioksidan yang dapat mencegah terjadinya stres oksidatif yang disebabkan adanya radikal bebas, serta menjaga toksisitas pada sel germinal. Antioksidan bekerja dengan cara berikatan dengan radikal bebas sehingga radikal bebas tersebut tidak sampai merusak membran fosfolipid dan DNA sel spermatogenik maupun sel lainnya. Hal ini juga didukung dengan penelitian sebelumnya yang menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol daun semanggi air dapat menurunkan nilai abnormalitas spermatozoa pada tikus dibandingkan dengan kontrol (Khairina, 2018).

4.2. Jenis-jenis Abnormalitas spermatozoa

Berdasarkan hasil penelitian diketahui bahwa jenis abnormalitas yang ditemukan pada penelitian ini antara lain ekor ganda, kepala ganda, leher bengkok, dan *abaxial midpiece* yang termasuk kedalam abnormalitas primer. Sedangkan, yang termasuk kedalam abnormalitas sekunder, yaitu *cytoplasmic droplet*, ekor melingkar, ekor pendek, ekor bengkok, tanpa ekor, dan tanpa kepala (Gambar 7). Whittier dan Bailey (2009) mengatakan yang termasuk dalam abnormalitas primer antara lain *pyriform head*, *round head*, *microcephalic*, *macrocephalic*, kepala ganda, akrosom abnormal, leher bengkok, leher ganda, dan leher *abaxial*. Sedangkan yang termasuk dalam abnormalitas sekunder antara lain *proximal protoplasmic droplet*, *distal protoplasmic droplet*, ekor bengkok, dan ekor melingkar.



Gambar 7. Jenis-jenis abnormalitas pada spermatozoa; a) ekor ganda (Perbesaran 200x), b) kepala ganda, c) leher bengkok, d) *abaxial midpiece*, e) *cytoplasmic droplet*, f) ekor melingkar, g) ekor bengkok, h) tanpa kepala, i) tanpa ekor, j) ekor pendek (Perbesaran 400x)

Berdasarkan hasil penelitian diketahui bahwa terdapat jenis-jenis abnormalitas spermatozoa pada masing-masing perlakuan (Tabel 1). Perlakuan kontrol diketahui terdapat jenis-jenis abnormalitas antara lain, leher bengkok (*bent neck*) sebesar 4,98 %, ekor bengkok (*bent tail*) sebesar 1,80 %, ekor melingkar (*coiled tail*) sebesar 0,37%, tanpa ekor (*no tail*) sebesar 2,28 %, dan tanpa kepala (*no head*) sebesar 1,22 %. Perlakuan Semanggi dosis 1 (0,216 mg/gBB) diketahui terdapat jenis-jenis abnormalitas antara lain, ekor ganda (*double tail*) sebesar 0,10 %, kepala ganda (*double head*) sebesar 0,10 %, *abaxial midpiece* sebesar 0,69 %, leher bengkok (*bent neck*) sebesar 2,62 %, ekor melingkar (*coiled tail*) sebesar 0,58 %, ekor bengkok (*bent tail*) sebesar 3,72 %, tanpa ekor (*no tail*) sebesar 1,33 %, tanpa kepala (*no head*) sebesar 0,58 %, dan ekor pendek (*short tail*) sebesar 0,18 %. Perlakuan Semanggi dosis 2 (0,432 mg/gBB) diketahui terdapat jenis-jenis abnormalitas antara lain, kepala ganda (*double head*) sebesar 0,19 %, leher bengkok (*bent neck*) sebesar 2,33%, ekor melingkar (*coiled tail*) sebesar 0,9 %, ekor bengkok (*bent tail*) sebesar 2,41 %, tanpa ekor (*no tail*) sebesar 1,38 %, dan tanpa kepala (*no head*) sebesar 0,44 %. Perlakuan Semanggi dosis 3

(0,648 mg/gBB) diketahui terdapat jenis-jenis abnormalitas antara lain, kepala ganda (*double head*) sebesar 0,09 %, leher bengkok (*bent neck*) sebesar 2,15 %, *abaxial midpiece* sebesar 0,10 %, *cytoplasmic droplet* sebesar 0,29 %, ekor bengkok (*bent tail*) sebesar 2,61 %, ekor melingkar (*coiled tail*) sebesar 0,09 %, tanpa ekor (*no tail*) sebesar 0,98 %, ekor pendek (*short tail*) sebesar 0,20 %, dan tanpa kepala (*no head*) sebesar 0,39 %.

Tabel 1. Jenis Abnormalitas spermatozoa pada setiap perlakuan

Jenis Abnormalitas	Abnormalitas (%)± SD			
	K	PS1	PS2	PS3
Kepala Ganda	-	0,10 ± 0,21	0,19 ± 0,42	0,09 ± 0,19
Leher Bengkok	4,98 ± 1,49	2,62 ± 1,50	2,33 ± 1,37	2,15 ± 1,90
<i>Abaxial Midpiece</i>	-	0,69 ± 0,83	-	0,10 ± 0,22
Ekor Ganda	-	0,10 ± 0,22	-	-
Ekor Bengkok	1,80 ± 2,74	3,72 ± 2,35	2,41 ± 2,22	2,61 ± 1,62
Ekor Melingkar	0,37 ± 0,60	0,58 ± 0,53	0,9 ± 1,37	0,09 ± 0,19
Ekor Pendek	-	0,18 ± 0,40	-	0,20 ± 0,27
<i>Droplet</i>	-	-	-	0,29 ± 0,44
Tanpa Ekor	2,28 ± 3,60	1,33 ± 1,03	1,38 ± 0,78	0,98 ± 0,73
Tanpa Kepala	1,22 ± 1,80	0,58 ± 0,21	0,44 ± 0,44	0,39 ± 0,40

Berdasarkan hasil penelitian diketahui bahwa ekstrak etanol daun semanggi air tidak berpengaruh secara nyata terhadap jenis-jenis abnormalitas spermatozoa tikus (Tabel 1). Namun, hasil penelitian menunjukkan pada dosis perlakuan kelompok PS2 (0,432 mg/gBB) memiliki jumlah jenis abnormalitas spermatozoa yang lebih sedikit dibandingkan dengan dosis perlakuan kelompok PS1 dan PS3. Hal ini mungkin dikarenakan penambahan level ekstrak semanggi air pada dosis 2 cukup optimal sehingga dapat menekan radikal bebas yang terjadi. Kerja dari antioksidan pada dosis 2 cukup efektif untuk menekan radikal bebas yang terjadi pada saat proses spermiogenesis spermatozoa sehingga kerusakan sel spermatozoa (abnormalitas) yang dihasilkan menjadi lebih rendah.

Abnormalitas spermatozoa biasanya terjadi pada saat proses spermiogenesis dimana proses ini akan menghasilkan spermatozoa yang matang, yang nantinya akan dilepaskan ke dalam lumen *tubulus seminiferus* (Iswara, 2009). Berdasarkan hasil penelitian dapat diketahui bahwa abnormalitas terjadi pada bagian kepala, leher, dan ekor spermatozoa (Tabel 1). Abnormalitas primer yang terjadi pada bagian kepala, yang ditemukan pada penelitian ini, yaitu adanya abnormalitas kepala ganda (*double head*) yang ditemukan pada setiap kelompok tikus dengan perlakuan pemberian ekstrak etanol semangi air (Tabel 1).

Bagian kepala spermatozoa terdiri dari nukleus dengan kromatin. Kromatin ini terdiri dari DNA yang kompleks dan protein. Selama proses spermiogenesis, kromatin mengalami serangkaian modifikasi sehingga terjadi pepadatan DNA (O'Donnell, 2014). Apabila terjadi gangguan pada kondensasi DNA sperma dapat menyebabkan terjadinya abnormalitas pada kepala (O'Donnell, 2014). Kromatin yang terdapat dalam inti sperma rentan terhadap kerusakan oksidatif (Ashok, 2014). Kandungan antioksidan yang terdapat pada semangi air (*M. crenata*) dapat mencegah stress oksidatif, terjadinya kerusakan DNA, dan menjaga toksisitas pada sel germinal. Antioksidan bekerja dengan cara berikatan dengan radikal bebas, sehingga radikal bebas tidak sampai merusak membran fosfolipid dan DNA sel spermatogenik maupun sel lainnya (Khaki dkk., 2011).

Berdasarkan hasil penelitian dapat diketahui bahwa abnormalitas primer yang terjadi pada bagian leher, yang ditemukan pada penelitian ini, yaitu adanya abnormalitas leher bengkok (*bent neck*), dan *Abaxial midpiece* yang ditemukan pada kelompok tikus tanpa perlakuan (kontrol) dan kelompok tikus dengan perlakuan pemberian ekstrak semangi air (Tabel 1).

Bagian leher spermatozoa mengandung mitokondria yang berfungsi dalam metabolisme spermatozoa untuk menghasilkan energi berupa ATP (*Adenosin triphosphate*) melalui proses respirasi, sehingga sel dapat beraktivitas. Membrane sel, seperti mitokondria pada spermatozoa memiliki bagian fosfolipid mengandung asam lemak tak jenuh yang paling rentan terhadap ROS yang mengakibatkan rapuhnya dinding sel yang dikenal dengan *Lipid peroxidation* (Sanockaa & Kurpisz, 2004). Hal ini juga didukung oleh penelitian Rao dkk. (1989) yang menyatakan adanya korelasi

yang tinggi antara potensi *Lipid Peroksidase* (LPO) dan persentase kelainan spermatozoa pada bagian leher (*midpiece*). Membran sperma sangat sensitif terhadap oksidasi dan radikal bebas, dapat menyebabkan penipisan agen *anti peroksidans* pelindung intraseluler atau ekstraseluler yang ada dalam sperma dan lingkungannya atau susunan membran yang berbeda yang dapat menyebabkan abnormalitas pada bagian leher (*midpiece*). Perbedaan-perbedaan ini dapat terjadi selama spermatogenesis atau selama pematangan dalam epididimis.

Berdasarkan hasil penelitian, diketahui abnormalitas pada bagian leher yang ditemukan pada kelompok tikus tanpa perlakuan (kontrol) lebih tinggi dibandingkan kelompok tikus dengan perlakuan pemberian ekstrak etanol daun semanggi air. Hal ini menunjukkan bahwa kandungan antioksidan pada tanaman semanggi air dapat mencegah terjadi stress oksidatif yang bekerja dengan cara memotong atau menangkap reaksi oksidasi berantai dari radikal bebas, sehingga radikal bebas tidak akan bereaksi dengan komponen seluler. Hal ini dapat mengurangi terjadinya adanya gangguan-gangguan fungsi dan merusak komponen sel tersebut, salah satunya membran sel terutama pada bagian fosfolipid, DNA, molekul protein – protein penting seperti enzim, reseptor, antibodi, sitoskeleton, dan pembentuk matriks (Sanockaa & Kurpisz, 2004).

Berdasarkan hasil penelitian dapat diketahui bahwa abnormalitas primer yang terjadi pada bagian ekor, yang ditemukan pada penelitian ini, yaitu adanya abnormalitas ekor ganda (*double tail*) (Tabel 1). Abnormalitas pada ekor kemungkinan terjadi pada fase cap dimana terjadi perkembangan komponen aksonema pada bagian ekor. Pembentukan aksonema ini melibatkan banyak gen, dan protein dan enzim dimana hal ini sangat rentan terhadap serangan radikal bebas (O'Donnell, 2014; Yomes, 2006).

Abnormalitas ekor ganda (*double tail*) ditemukan pada kelompok tikus dengan perlakuan pemberian ekstrak semanggi air dengan dosis yang paling rendah yaitu 0,216 mg/gBB (Tabel 1). Hal ini kemungkinan terjadi karena antioksidan pada dosis yang rendah kurang mampu menangkal serangan radikal bebas yang terjadi pada ekor sehingga terjadi abnormalitas.

Berdasarkan hasil penelitian dapat diketahui bahwa abnormalitas sekunder yang terjadi pada bagian ekor, yang ditemukan pada

penelitian ini, yaitu adanya abnormalitas *cytoplasmic droplet* yang ditemukan pada kelompok tikus dengan perlakuan pemberian ekstrak semanggi air dengan dosis yang paling tinggi yaitu 0,648 mg/gBB. Hal ini kemungkinan disebabkan karena dosis ekstrak semanggi air yang terlalu tinggi, sehingga menyebabkan antioksidan yang terdapat pada ekstrak semanggi air menjadi pro-oksidan. Berdasarkan penelitian Wahjuningsih & Rachmawati (2012) konsentrasi antioksidan yang tinggi dapat menyebabkan antioksidan kehilangan efektivitasnya bahkan menjadi pro-oksidan yang menghasilkan radikal bebas. Peningkatan produksi ROS ini akan menyebabkan terjadinya abnormalitas pada spermatozoa.

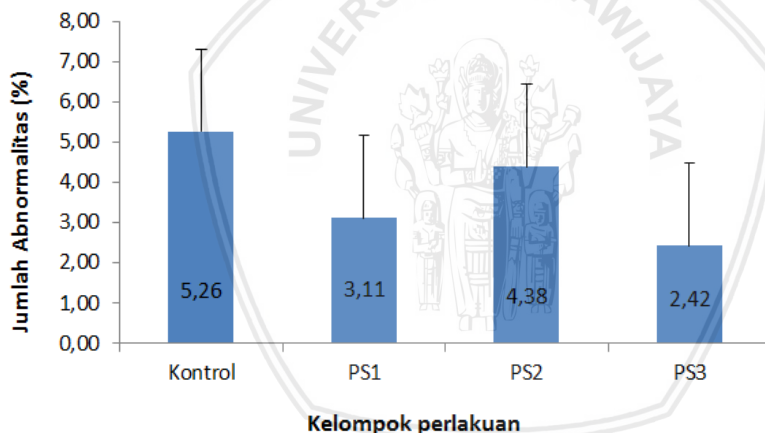
Cytoplasmic droplet tersusun atas residu sitoplasmik yang biasanya terdapat dalam epididimis (Herdis dkk., 2016). Berdasarkan penelitian Malik (2017) adanya residu sitoplasma berlebih atau terdapatnya *cytoplasmic droplet* menunjukkan adanya hubungan relatif antara peningkatan produksi ROS dan kualitas sperma yang buruk. Bahkan, penelitian telah menunjukkan bahwa *cytoplasmic droplet* (butiran sitoplasma) karena cacat pada spermiogenesis adalah sumber utama adanya radikal bebas (ROS). Selama spermatogenesis, proses ekstrusi sitoplasma yang rusak menghasilkan pelepasan spermatozoa dari epitel germinal disertai dengan sisa sitoplasma yang berlebih. Spermatozoa yang dilepaskan sebagian besar belum matang dan cacat secara fungsional.

Berdasarkan hasil penelitian dapat diketahui bahwa terdapat abnormalitas sekunder yang lain yang ditemukan pada penelitian ini, yaitu adanya abnormalitas ekor melingkar, ekor pendek, ekor bengkok, tanpa kepala, dan tanpa ekor (Tabel 1). Abnormalitas sekunder tertinggi terdapat pada perlakuan dengan pemberian ekstrak etanol daun semanggi air dosis 1 (0,216 mg/g BB) dengan nilai sebesar 6,69 %. Hal ini kemungkinan karena kurang optimalnya pemberian ekstrak semanggi air pada dosis 1 sehingga kerja antioksidannya kurang efektif dan menyebabkan terjadinya abnormalitas sekunder. Hal ini juga sesuai dengan penelitian Adinda dkk. (2016) yang menyatakan bahwa kurang optimalnya pemberian dosis perlakuan dapat menyebabkan kurang efektifnya kerja antioksidan dan dapat menyebabkan toksis pada spermatozoa. Putusnya ekor spermatozoa merupakan dampak dari kerusakan

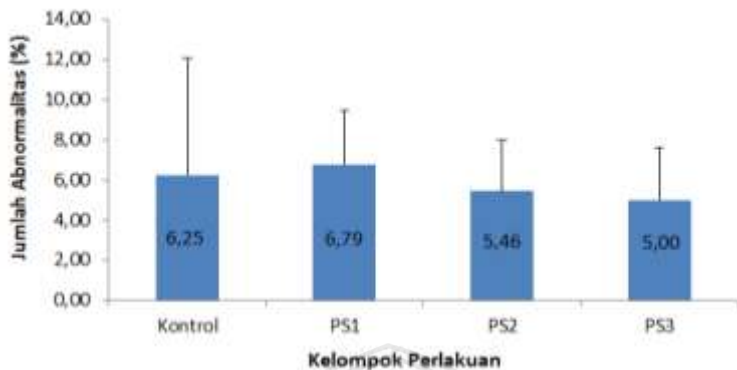
membran spermatozoa yang disebabkan oleh sifat toksik dari pemberian antioksidan yang kurang optimal atau berlebihan.

4.3 Abnormalitas primer dan sekunder

Berdasarkan hasil penelitian diketahui bahwa jenis-jenis abnormalitas yang terdapat pada penelitian ini, yaitu abnormalitas primer dan sekunder. Berdasarkan hasil penelitian diketahui bahwa pemberian ekstrak etanol semanggi air tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap jenis abnormalitas primer dan sekunder. Abnormalitas primer yang terdapat pada penelitian ini, yaitu abnormalitas kepala ganda (*double head*), leher bengkok (*bent neck*), *abaxial midpiece*, dan ekor ganda (*double tail*). Abnormalitas sekunder yang terdapat pada penelitian ini, yaitu ekor bengkok, ekor melingkar, ekor pendek, *droplet cytoplasmic*, tanpa kepala, dan tanpa ekor.



Gambar 8. Persentase Abnormalitas primer spermatozoa setelah perlakuan ekstrak ethanol semanggi air. Data merupakan rata-rata ulangan \pm SD dari jumlah abnormalitas primer spermatozoa. Ket. Kontrol = tikus tanpa perlakuan, PS1 = tikus perlakuan ekstrak semanggi dosis 1 (0,216 mg/gBB), PS2 = tikus perlakuan ekstrak semanggi dosis 2 (0,432 mg/gBB), dan PS3 = tikus perlakuan ekstrak semanggi dosis 3 (0,648 mg/gBB).



Gambar 9. Persentase Abnormalitas sekunder spermatozoa setelah perlakuan ekstrak ethanol semanggi air. Data merupakan rata-rata ulangan \pm SD dari jumlah abnormalitas sekunder spermatozoa. Ket. Kontrol = tikus tanpa perlakuan, PS1 = tikus perlakuan ekstrak semanggi dosis 1 (0,216 mg/gBB), PS2 = tikus perlakuan ekstrak semanggi dosis 2 (0,432 mg/gBB), dan PS3 = tikus perlakuan ekstrak semanggi dosis 3 (0,648 mg/gBB).

Berdasarkan hasil penelitian dapat diketahui jumlah abnormalitas primer (Gambar 8) yang tertinggi terdapat pada perlakuan kontrol dengan nilai 5,26 %, dan perlakuan semanggi dosis 2 (0,432 mg/gBB) dengan nilai 4,38 %. Sedangkan, abnormalitas primer yang terendah terdapat pada perlakuan semanggi dosis 3 (0,648 mg/gBB) dengan nilai 2,42 %. Hasil penelitian juga menunjukkan bahwa jumlah abnormalitas sekunder (Gambar 9) yang tertinggi terdapat pada perlakuan semanggi dosis 1 (0,216 mg/gBB) dengan nilai 6,79% dan pada perlakuan kontrol dengan nilai 6,25 %. Sedangkan, abnormalitas primer yang terendah terdapat pada perlakuan semanggi dosis 3 (0,648 mg/gBB) dengan nilai 5 %.

Abnormalitas primer merupakan abnormalitas spermatozoa yang terjadi karena adanya kegagalan pada proses spermatogenesis pada tubulus seminiferus (Susilawati, 2011). Abnormalitas sekunder merupakan abnormalitas yang terjadi selama proses pematangan

spermatozoa di epididimis, serta selama proses perlakuan pembuatan preparat, terutama pada proses pewarnaan (Vashishat dkk., 2012). Hasil penelitian menunjukkan abnormalitas sekunder memiliki variasi nilai yang lebih tinggi dibandingkan dengan abnormalitas primer.

Morfologi spermatozoa yang abnormal salah satunya dapat disebabkan karena adanya ROS yang mempengaruhi membran plasma spermatozoa yang mengandung fosfolipid dan asam lemak tak jenuh yang sangat rentan terhadap ROS, terutama pada radikal hidroksil. Radikal hidroksil ini akan menimbulkan reaksi rantai peroksidasi lipid yang mengakibatkan rantai asam lemak terputus dan memberikan sifat toksik terhadap sel spermatozoa (Tremallen, 2008). Hal ini dapat menyebabkan sel mengalami stress oksidatif dan terjadinya kerusakan sel sehingga morfologi spermatozoa menjadi abnormal.

Proses peroksidasi yang terjadi diawali dengan terbentuknya *carbon centered radical* pada lapisan fosfolipid yang akan bereaksi dengan oksigen membentuk radikal baru, yaitu radikal peroksil yang akan menyerang asam lemak yang ada disekitarnya sehingga terbentuk lipid hidroperoksida dan *carbon centered radical* yang baru. Lipid hidroperoksida yang tertimbun pada membran spermatozoa akan menyebabkan gangguan pada fungsi sel sehingga morfologi spermatozoa menjadi abnormal (Ammikhalid, 2010).

BAB V

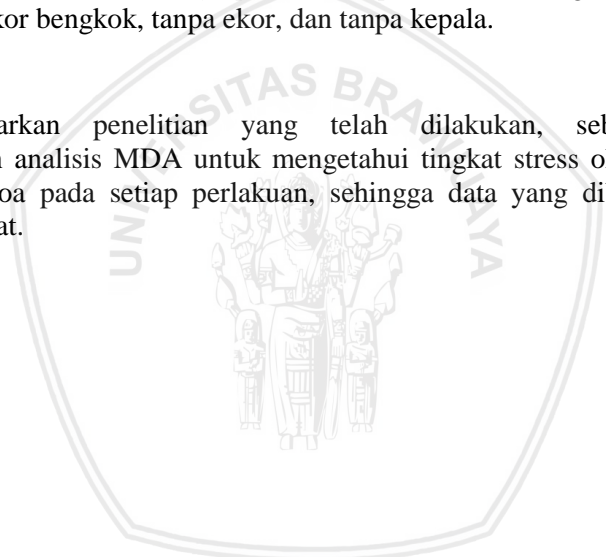
KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Pemberian perlakuan ekstrak etanol semanggi air tidak berpengaruh secara signifikan terhadap jenis-jenis abnormalitas spermatozoa tikus. Pemberian perlakuan ekstrak etanol semanggi air dosis 2 (0,432 mg/gBB) memiliki jumlah jenis-jenis abnormalitas morfologi spermatozoa yang lebih sedikit. Jenis abnormalitas spermatozoa primer yang terdapat pada penelitian ini antara lain ekor ganda, kepala ganda, kepala kecil, leher bengkok, dan *abaxial midpiece*. Sedangkan, abnormalitas sekunder yang terdapat pada penelitian ini antara lain, *cytoplasmic droplet*, ekor melingkar, ekor pendek, ekor bengkok, tanpa ekor, dan tanpa kepala.

5.2 Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, sebaiknya diperlukan analisis MDA untuk mengetahui tingkat stress oksidatif spermatozoa pada setiap perlakuan, sehingga data yang diberikan lebih akurat.



DAFTAR PUSTAKA

- Adinda, L. P., S. Darodjah & R. Setiawan. 2016. **Pengaruh Level Glutathione dalam Pengencer Tris-Sitrat Kuning Telur terhadap Motilitas dan Abnormalitas Sperma Kambing Peranakan Etawah *Post Thawing***. Fakultas Peternakan Universitas Padjadjaran. Bandung. Skripsi.
- Afriastini JJ. 2003. *Marsilea crenata* C.Presl. dalam Nurjanah dkk. (Ed.). **Aktivitas Antioksidan dan Komponen Bioaktif Semanggi Air (*Marsilea Crenata*)**. Institut Pertanian Bogor. Bogor
- Ahmadi S., R. Bashiri, A. Ghadiri-Anari & A. Nadjarzadeh. 2016. Antioxidant supplements and semen parameters: An evidence based review. *Int J Reprod BioMed*. 14(12): 729-736.
- Ammikhalid. 2010. Analisis Tingkat Peroksidasi Lipid dengan MDA.http://analisis_tingkat_peroksidasi_lipid_wordpress.com Diakses 17 Mei 2019.
- Ashok, A., G. Virk, C. Ong, & S.S. Plessis. 2014. Effect of Oxidative Stress on Male Reproduction. *World J Mens Health*. 32(1): 1-17.
- Borg, C.L., K.M. Wolski, G.M. Gibbs & M.K. O'Bryan. 2010. Phenotyping male infertility in the mouse: how to get the most out of a 'non-performer'. *Human Reproduction Update*. 16(2): 205–224.
- Bergmann, M. 2011. **Physiology of Spermatogenesis**. Springer. New York.
- Carocho, M. & Ferreira, I.C.F.R. 2013. A Review on Antioxidants, Pro-Oxidants and Related Controversy: Natural and Synthetic Compounds, Screening and Analysis Methodologies and Future Perspectives. *Food and Chemical Toxicology*. 51: 15-25.
- Colagar AH & Marzony ET. 2009. Ascorbic acid in human seminal plasma: determination and its relationship to sperm quality. *J Clin Biochem Nutr*. 45: 144-149.
- Desai, N., J. Lidgin, R. Sharma, R. K. Anirudh, A. Agarwal. 2013. **Female and male gametogenesis. Clinical reproductive medicine and surgery: A Practical Guide**. Springer Science. New York.

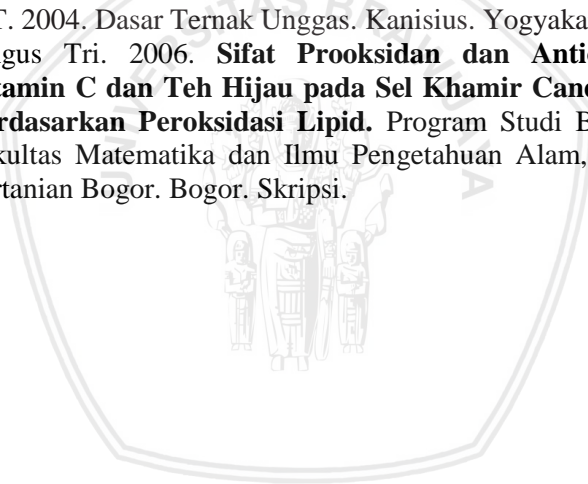
- Devasagayam TPA, J.C Tilak, K.K Boloor, K.S Sane, S.S Ghaskadbi & R.D Lele. 2004. Free Radicals and Antioxidants in Human Health: Current Status and Future Prospects. *The Journal of the Association of Physicians of India*. 52(794804): 794-804.
- Elgazar V., Razanov V., Stoltenberg M., Hershinkel M., Huleihel M. & Nitzan YB. 2005. Zinc-regulating proteins, ZnT-1, and metallothionein I/II are present in different cell populations in the mouse testis. *J Histochem Cytochem*. 53: 905-912.
- Erguder BI, Avci A, Devrim E, Durak I. 2007. Effects of cooking techniques on antioxidantenzyme activities of some fruits and vegetables. *Turk J Med Sci*. 37(3): 151-156.
- Eroschenko, Victor P. 2008. **Difiore's Atlas of Histology With Functionl Correlations Eleventh Edition**. Baltimore. Lippincott Williams & Wilkins.
- Garner DL & Hafez ESE. 2000. Spermatozoa and seminal plasma. Dalam Hafez ESE (Ed.). **Reproduction in Farm Animals. Ed. 7**. Lea and Febiger. Philadelphia (US).
- Hafez ESE. 2000. **Reproduction in Farm Animals. Ed ke-7**. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia.
- Hamid, M.A., S.R. Galaly, R.R. Ahmed & H.M. Hamdalla. 2017. Monosodium Glutamat as a Food Additive: Toxic Implications and the Protective Role of Quercetin. *Merit Research Journals*. 5(8): 384-402.
- Hutasuhut, R. 2014. **Uji Aktivitas Ekstrak Etanol 70% Herba Kemangi (*Ocimum americanum* L.) terhadap Kualitas Sperma dan Densitas Sel Spermatogenesis Tikus Sprague – Dawley Jantan secara in vivo**. Program Studi Farmasi Fakultas Kedokteran dan Kesehatan, UIN Syarif Hidayatullah. Jakarta. Skripsi.
- Herdis & M. Rizal. 2016. Penambahan Beberapa Jenis Gula dapat Meningkatkan Kualitas Spermatozoa Beku Asal Epididimis Ternak Domba. *Jurnal Kedokteran Hewan*. 10(2): 2502-5600.
- Ifeanyi, O.E. 2018. A Review on Free Radicals and Antioxidants. *Int. J. Curr. Res. Med. Sci*. 4(2): 123-133
- Iswara, A. 2009. **Pengaruh Pemberian Antioksidan Vitamin C dan E terhadap Kualitas Spermatozoa Tikus Putih**

- Terpapar Allethrin.** Universitas Negeri Semarang. Semarang. Skripsi.
- Jacob AM, Nurjanah, Arifin M, Sulistiono W, Kristiono SS. 2010. Deskripsi histologis dan perubahan komposisi kimia daun dan tangkai semanggi (*Marsilea crenata* Presl., Marsileaceae) akibat perebusan. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia* XII(2): 81-95.
- Khairina, H. 2018. **Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Daun Semanggi Air (*Marsilea crenata*) terhadap Kualitas Sperma Tikus Jantan (*Rattus norvegicus*).** Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya. Malang. Skripsi.
- Khaki, Arash., F. Fathiazed., M. Nouri., A. A. Khaki., Z. Ghanbari., M. Ghanbari., E. Ouladsahebmaderek., L. Javadi., L. Farzadi. 2011. Full length research paper anti-oxidative effect of citro flavonoids on spermatogenesis in rat. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 5(6): 721-725.
- Kumar A, R. Ilavarasan, T. Jayachanran, M. Decaraman, P. Arivindha, N. Padmanabhan & M.V.R Krishman. 2009. Phytochemical investigation on a tropical plan, *Syzgium cumini* from Kattuppalayam, Erode District, Tamil Nadu, South India. *Journal of Nutrition Pakistan*. 8(1): 83-85.
- Lehti MS & Sironen A. 2016. Formation and function of the manchette and flagellum during spermatogenesis. *Reproduction*. 151(4): R43-54.
- Ma'arif B., M. Agil & H. Laswati. 2016. Phytochemical Assessment on N-Hexane Extract and Fractions of *Marsilea crenata* Presl. Leaves Through GC-MS. *Trad. Med*. 21(2): 77-85.
- Maettner R, Sterzik K, Isachenko V, Strehler E, Rahimi G, Alabart JL, Sanchez R, Mallmann P, Isachenko E. 2013. Quality of human spermatozoa: relationship between high-magnification sperm morphology and DNA integrity. *Andrologia*. 46: 547-55.
- Mayes, PA, Murray RK, Granner, DK., Rodwell, VW. 2003. **Harper's Illustrated Biochemistry 26th edition.** McGraw-Hill Companies. United States.
- Maisyaroh, Wiwin. 2014. **Pemanfaatan Tumbuhan Liar dalam Pengendalian Hayati.** UB Press. Malang.

- Malik A, M. Ibrahim, Roszaman, M. Lokman, Mat Alewi, A.A.A Rafa & M. Anuar. 2017. Male Infertility: The effect of natural antioxidants and phytochemicals on seminal oxidative stress. *Diseases*. 5(9): 1-26.
- Nurjanah, Aulia A. & Asadatun A. 2012. Aktivitas Antioksidan dan Komponen Bioaktif Semanggi Air (*Marsilea Crenata*). *Jurnal Inovasi dan Kewirausahaan*. 1(3): 152-158.
- O'Donnell, Liza. 2014. Mechanisms of spermiogenesis and spermiation and how they are disturbed. *Spermatogenesis*. Vol 4(2): e979623
- Palupi, H. D., 2006. **Pengaruh pemberian jus buah tomat (*Lycopersicum esculentum Mill*) terhadap viabilitas spermatozoa mencit Balb/c jantan yang diberi paparan asap rokok.** *Artikel karya tulis ilmiah*. Universitas Diponegoro, Semarang.
- Pham-Huy, Lien Ai, Hua He, Chuong Pham-Huy. 2008. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *Int J Biomed Sci*. 4(2): 89-96.
- Pineda MH & Faulkner LC. 2003. **The biology of sex :Veterinary Endocrinology and Reproduction**. Lea & Febiger. London.
- Pugh, D.G. & A.N. Baird. 2012. **Sheep and Goat Medicine**. Elsevier. Missouri.
- Prayadsub N. & Pimsamarn. 2011. The Antioxidant activity from selected Ferns. *TICHE International Conference*. Hatyai, Songkhla Thailand.
- Rao, B.J.C. Soufir, M. Martin & G. David. 1989. Lipid peroxidation in human spermatozoa as related to midpiece abnormalities and motility. *Gamete Research*. 24:127-134.
- Saba, A.B., Olayinka A.O., M.O. Oyeyemi, & O.D Osanyigbe. 2009. Spermatozoa morphology and characteristics of male wistar rats administered with ethanolic extract of *Lagenaria breviflora roberts*. *African Journal of Biotechnology*. 8 (7):1170-1175.
- Saleh, N.J. & M. Soediro. 2017. Creating clover powder herbal drink. *Teknobuga*. Volume 4(1): 24-29.
- Sanocka, D. & Kurpisz M. 2004. Reactive oxygen species and sperm cells. *Reproductive Biology and Endocrinology*. Vol.2(12): 1-7.

- Schatten H & Constantinescu GM. 2007. *Comparative Reproductive Biology*. Ames: Blackwell Publishing.
- Sharma, K.R., Damayanthi, D., Anil, R. & Ashok, A. 2015. Sperm biology from production to ejaculation. *Unexplained Infertility*. 29-42.
- Sulistiono, W. 2009. **Analisis Mikroskopis dan Vitamin Semanggi air *Marsilea crenata* presl. (Marsileaceae)**. Institut Pertanian Bogor. Bogor. Skripsi.
- Susilawati T. 2011. **Spermatologi**. UB Press. Malang.
- Snyder PJ & Matsumoto AM. 2013. *Male reproductive physiology*. www.uptodate.com. Di akses 2 Mei 2019.
- Syafi'i, R. F. 2010. **Aktivitas Antioksidan dan Antimikroba Fraksi Polar Ekstrak Kulit Kacang Tanah (*Arachis hypogaea*)**. Universitas Muhamadiyah. Surakarta. Skripsi.
- Tanaka H, Iguchi N, Isotani A, Kitamura K, Toyama Y, Matsuoka Y, Onishi M, Masai K, Maekawa M & Toshimori K. 2005. HANP1H1T2, a novel histone H1-like protein involved in nuclear formation and sperm fertility. *Mol Cell Biol*. 25: 7107-19.
- Titisari N, A. Fauzi, A. Adyana & Trisunuwati. 2016. The Effects of Water Clover (*Marsilea Crenata*) Extract against Estrogen, Progesterone And Uterine Histology on Rat (*Rattus norvegicus*). *International Journal of PharmTech Research*. 9(6): 165-171.
- Tremallen, K. 2008. **Oxidative Stress and Male Infertility – A Clinical Perspective**. Human Reproduction.
- Vashishat, Nisha, C. K. Dhanju, Ranjna S. Cheema. 2012. Morphology and morphometry of cauda epididymal spermatozoa in *Rattus rattus* L. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 82(2): 285–290.
- Venkatesh, Singh, N.P. Gupta, Kumar. Deecaraman & R. Dada. 2009. Correlation of sperm morphology and oxidative stress in infertile men. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*. 7(1): 29-34.
- Wahjuningsih, S. & Rachmawati, A., 2012. The effect of α -tocopherol on plasma membrane integrity of goat spermatozoa. *Journal of Basic and Applied Science Research*. 2(9): 8857-8860.

- Winarsi, H. 2007. **Antioksidan alami dan Radikal bebas**. Yogyakarta: Kanisius.
- Wistuba, J, J. B. Stukenborg. & C.M Luetjens. 2007. Mammalian Spermatogenesis. *Functional Development and Embryology* 1(2): 99-117.
- Whittier, W. Dee & Bailey. 2009. **Predicting Bull Fertility**. Virginia Cooperative Extension. Department of Large Animal Clinical Sciences, Virginia-Maryland Regional College of Veterinary Medicine, Virginia Tech.
- World Health Organization. 2010. **WHO laboratory manual for the Examination and Processing of human semen fifth edition**. WHO Pres. Switzerland.
- Yulnawati F.A, M. Riyadi , R.I Arifiantini. 2015. Spermatozoa abnormality with different semen collection frequency in ram. *PROS SEM NAS MASY BIODIV INDON*. 1(4): 930-934.
- Yuwanta, T. 2004. Dasar Ternak Unggas. Kanisius. Yogyakarta.
- Yomes, Agus Tri. 2006. **Sifat Prooksidan dan Antioksidan Vitamin C dan Teh Hijau pada Sel Khamir Candida sp. Berdasarkan Peroksidasi Lipid**. Program Studi Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor. Bogor. Skripsi.



LAMPIRAN

Lampiran 1. Perhitungan Dosis Ekstrak Semanggi

Konsentrasi ekstrak semanggi tiap – tiap dosis yang dilarutkan dalam pelarut, ditentukan menggunakan rumus berikut ini:

$$\text{Konsentrasi } \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}}\right) = \frac{\text{Dosis } \left(\frac{\text{mg}}{\text{gBB}}\right) \times \text{BB (g)}}{V \text{ (ml)}}$$

1. Dosis 1 (0,216 mg/gBB)

$$\text{Konsentrasi } \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}}\right) = \frac{\text{Dosis } \left(\frac{\text{mg}}{\text{gBB}}\right) \times \text{BB (g)}}{\text{Volume lambung (ml)}}$$

$$\text{Konsentrasi } \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}}\right) = \frac{0,216 \times 200}{3} = 14,4 \text{ mg/ml}$$

2. Dosis 2 (0,432 mg/gBB)

$$\text{Konsentrasi } \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}}\right) = \frac{\text{Dosis } \left(\frac{\text{mg}}{\text{gBB}}\right) \times \text{BB (g)}}{\text{Volume lambung (ml)}}$$

$$\text{Konsentrasi } \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}}\right) = \frac{0,432 \times 200}{3} = 28,8 \text{ mg/ml}$$

3. Dosis 3 (0,648 mg/gBB)

$$\text{Konsentrasi } \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}}\right) = \frac{\text{Dosis } \left(\frac{\text{mg}}{\text{gBB}}\right) \times \text{BB (g)}}{\text{Volume lambung (ml)}}$$

$$\text{Konsentrasi } \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}}\right) = \frac{0,648 \times 200}{3} = 43,2 \text{ mg/ml}$$



Lampiran 2. Penentuan Volume Sonde

Volume yang disondekan pada setiap mencit ditentukan dengan rumus berikut ini:

$$\text{Volume sonde (ml)} = \frac{\text{BB tikus}}{\text{BB acuan}} \times V \text{ (ml)}$$

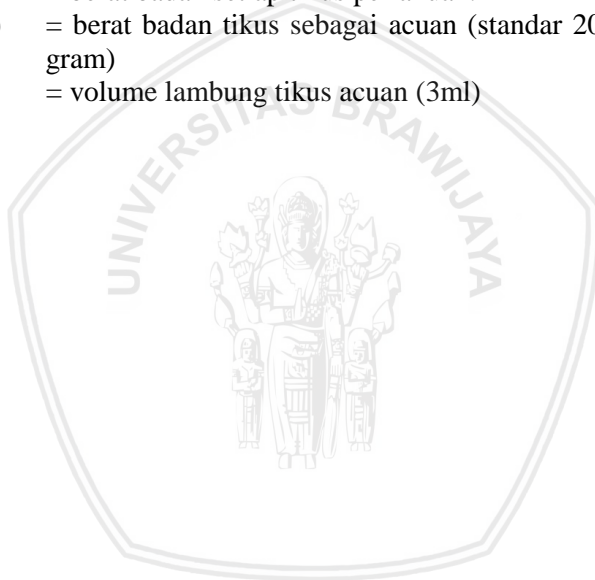
Keterangan :

Volume sonde (ml) = volume larutan ekstrak kemangi yang harus disondekan pada masing-masing tikus perlakuan.

BB tikus (gram) = berat badan setiap tikus perlakuan.

BB acuan (gram) = berat badan tikus sebagai acuan (standar 200 gram)

V (ml) = volume lambung tikus acuan (3ml)



Lampiran 3. Analisis data

3.1 Abnormalitas Tanpa Kepala

Uji Kruskal Wallis

Ranks			
	Dosis	N	Mean Rank
Tanpa_kepala	0	5	11,60
	0,216	5	11,80
	0,432	5	9,10
	0,648	5	9,50
	Total	20	

Test Statistics^{a,b}

Tanpa_kepala	
Chi-Square	,864
Df	3
Asymp. Sig.	,834

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Dosis

3.2 Abnormalitas Kepala Ganda

Uji Kruskal Wallis

	Dosis	N	Mean Rank
Kepala_ganda	0	5	9,00
	0,216	5	11,00
	0,432	5	11,20
	0,648	5	10,80
	Total	20	

Test Statistics(a,b)

Kepala_ganda	
Chi-Square	1,139
Df	3
Asymp. Sig.	,768

a Kruskal Wallis Test

b Grouping Variable: Dosis

3.3 Abnormalitas Leher Bengkok

Uji Anova

leher_bengkok

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	26,097	3	8,699	3,491	,040
Within Groups	39,870	16	2,492		
Total	65,967	19			

Uji Tukey HSD

Multiple Comparisons						
Dependent Variable: leher_bengkok						
Tukey HSD						
(I)	(J)	Mean	Std.		95% Confidence Interval	
Dosis	Dosis	Difference (I-J)	Error	Sig.	Lower Bound	Upper Bound
0	0,216	2,35400	,99838	,126	-,5024	5,2104
	0,432	2,65000	,99838	,074	-,2064	5,5064
	0,648	2,82400	,99838	,053	-,0324	5,6804
0,216	0	-2,35400	,99838	,126	-5,2104	,5024
	0,432	,29600	,99838	,991	-2,5604	3,1524
	0,648	,47000	,99838	,964	-2,3864	3,3264
0,432	0	-2,65000	,99838	,074	-5,5064	,2064
	0,216	-,29600	,99838	,991	-3,1524	2,5604

	0,648	,17400	,99838	,998	-2,6824	3,0304
0,648	0	-2,82400	,99838	,053	-5,6804	,0324
	0,216	-,47000	,99838	,964	-3,3264	2,3864
	0,432	-,17400	,99838	,998	-3,0304	2,6824

leher_bengkok		
Tukey HSD ^a		
Dosis	N	Subset for alpha = 0.05 1
0,648	5	2,1520
0,432	5	2,3260
0,216	5	2,6220
0	5	4,9760
Sig.		,053

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5,000.

3.4 Abnormalitas Abaxial Midpiece

Uji Kruskal-Wallis

Ranks			
			Rank
<i>Abaxial Midpiece</i>		5	8,50
		5	14,70
		5	8,50
		5	10,30
		20	

Test Statistics(a,b)

	abaxial_midpiece
Chi-Square	7,518
Df	3
Asymp. Sig.	,057

a Kruskal Wallis Test

b Grouping Variable: Dosis

3.5 Abnormalitas Ekor Bengkok

Uji ANOVA

ANOVA					
ekor_bengkok					
	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	9,639	3	3,213	,624	,610
Within Groups	82,389	16	5,149		
Total	92,028	19			

Descriptives								
ekor_bengkok								
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
0	5	1,8040	2,73986	1,22530	-1,5980	5,2060	,00	6,45

0,216	5	3,740	2,35093	1,05137	,8049	6,6431	,00	5,86
0,432	5	2,410	2,22088	,99321	-,3476	5,1676	,00	5,50
0,648	5	2,610	1,62214	,72544	,5958	4,6242	,50	4,58
Total	20	2,6370	2,20081	,49212	1,6070	3,6670	,00	6,45

3.6 Abnormalitas Ekor Ganda Uji Kruskal-Wallis Ranks

	Dosis	N	Mean Rank
ekor_ganda	0	5	10,00
	0,216	5	12,00
	0,432	5	10,00
	0,648	5	10,00
	Total	20	

Test Statistics(a,b)

	ekor_ganda
Chi-Square	3,000
Df	3
Asymp. Sig.	,392

- a Kruskal Wallis Test
 b Grouping Variable: Dosis

3.7 Abnormalitas *Droplet Cytoplasma*

Uji Kruskal-Wallis

Ranks

	Dosis	N	Mean Rank
droplet_cytoplasmic	0	5	9,50
	0,216	5	9,50
	0,432	5	9,50
	0,648	5	13,50
	Total	20	

Test Statistics(a,b)

	droplet_cytoplasmic
Chi-Square	6,316
Df	3
Asymp. Sig.	,097

- a Kruskal Wallis Test
 b Grouping Variable: Dosis

3.8 Abnormalitas Ekor Melingkar

Uji Anova

ekor_melingkar

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1,771	3	,590	,919	,454
Within Groups	10,283	16	,643		
Total	12,054	19			

Descriptives

ekor_melingkar

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Upper Bound	Lower Bound		
0	5	,3660	,59940	,26806	-,3783	1,1103	,00	1,38
0,216	5	,5780	,53481	,23917	-,0861	1,2421	,00	1,46
0,432	5	,9000	1,37425	,61458	-,8064	2,6064	,00	3,29
0,648	5	,0860	,19230	,08600	-,1528	,3248	,00	,43
Total	20	,4825	,79652	,17811	,1097	,8553	,00	3,29

3.9 Abnormalitas Ekor Pendek Uji Kruskal-Wallis Ranks

	Dosis	N	Mean Rank
ekor_pedek	0	5	9,00
	0,216	5	11,20
	0,432	5	9,00
	0,648	5	12,80
	Total	20	

Test Statistics(a,b)

	ekor_pedek
Chi-Square	3,800
Df	3
Asymp. Sig.	,284

a Kruskal Wallis Test

b Grouping Variable: Dosis

3.10 Abnormalitas Tanpa Ekor

Uji Anova

tanpa_ekor

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4,596	3	1,532	,405	,751
Within Groups	60,526	16	3,783		
Total	65,122	19			

Uji Brown-Forsythe

Robust Tests of Equality of Means

tanpa_ekor

	Statistic(a)	df1	df2	Sig.
Brown-Forsythe	,405	3	5,414	,756

a Asymptotically F distributed.

Descriptives

tanpa_ekor

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	
					Upper Bound	Lower Bound			
0	5	2,2760	3,59702	1,60863	-	2,1903	6,7423	,46	8,70
0,216	5	1,3300	1,02567	,45869	,0565	2,6035	,00	2,40	
0,432	5	1,3820	,78436	,35078	,4081	2,3559	,47	2,50	
0,648	5	,9760	,72511	,32428	,0757	1,8763	,43	2,00	

Total	20	1,491 0	1,851 35	,413 97	,6245	2,357 5	,00	8,70
-------	----	------------	-------------	------------	-------	------------	-----	------

3.11 Abnormalitas Primer Uji Anova

ANOVA					
primer					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	24,740	3	8,247	1,875	,174
Within Groups	70,369	16	4,398		
Total	95,109	19			

Descriptives								
primer								
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
0	5	5,2580	1,62252	,72561	3,2434	7,2726	2,48	6,37
0,216	5	3,0140	1,29237	,57797	1,4093	4,6187	1,85	4,71
0,	5	4,38	3,00102	1,342	,6537	8,1063	,91	8,67

4		00		10				
3								
2								
0	5	2,	2,069	,92	-	5,001	,48	4,7
,		43	63	55	,1378	8		1
6		20		7				
4								
8								
T	20	3,	2,237	,50	2,723	4,818	,48	8,6
o		77	35	02	9	1		7
t		10		9				
a								
l								

3.12 Abnormalitas Sekunder
Uji Kruskal-Wallis

Ranks			
	Dosis	N	Mean Rank
Sekunder	0	5	10,40
	0,216	5	12,50
	0,432	5	10,50
	0,648	5	8,60
	Total	20	

Test Statistics ^{a,b}	
	sekunder
Chi-Square	1,089
Df	3
Asymp. Sig.	,780

- a. Kruskal Wallis Test
- b. Grouping Variable: Dosis

3.13 Abnormalitas Total

Uji Anova

abnormalitas_total

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	38,346	3	12,782	,967	,433
Within Groups	211,592	16	13,224		
Total	249,938	19			

Descriptives

abnormalitas_total

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Upper Bound	Lower Bound		
0	5	10,6380	4,10342	1,83511	5,5429	15,7331	6,07	15,46
0,216	5	9,1400	2,75075	1,23017	5,7245	12,5555	4,39	11,00
0,432	5	9,2680	4,90309	2,19273	3,1800	15,3560	4,50	16,43
0,648	5	6,7860	2,11022	,94372	4,1658	9,4062	3,91	9,45
Total	20	8,9580	3,62693	,81101	7,2605	10,6555	3,91	16,43

Lampiran 4. Ethical Clearance



Lampiran 5. Surat Keterangan Hewan Coba


UNIVERSITAS GADJAH MADA
LABORATORIUM PENELITIAN DAN PENGUJIAN TERBUKA

SURAT KETERANGAN
Nomor : 06.41/IA/UN/LPPT-UGM/2018

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : drh. Dwi Liliek Kusudana, MP, PhD
NIP : 19680526199512 1 001
Jabatan : Kabid Unit Pra Klinik – LPPT UGM

Menerangkan bahwa :

Nama : Ivakhtul Anzika, S.Si
NIM : 176090100111003
Instansi : Fakultas MIPA Jurusan Biologi UNIBRAW Malang

Pada bulan Juli 2018 esembek Tikus putih (*Rattus norvegicus L.* Galur Wistar) jantan usia 3 bulan sejumlah 45 (Empat Puluh Lima) ekor dari Unit Pra-Klinik LPPT Universitas Gadjah Mada.

Hewan tersebut dalam keadaan masih sehat dan tidak terinfeksi penyakit sehingga tidak menularkan penyakit. Menurut keterangan dari yang bersangkutan hewan tersebut akan dibawa ke Fakultas MIPA Jurusan Biologi Universitas Brawijaya Malang Jawa Timur dan akan digunakan sebagai hewan percobaan Penelitian.

Demiikian surat keterangan ini dibuat, agar dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

Atas kerjasama yang baik diucapkan banyak terima kasih

Yogyakarta, 06 Juli 2018
Kabid Unit Pra- Klinik LPPT UGM


drh. Dwi Liliek Kusudana, MP, PhD
NIP : 19680526199512 1 001

Temp. Utan, Jl. Sekeloa No. 1 Yogyakarta 55281 - Telp. (0271) 580000-580005 - Fax (0271) 580004
E-mail : gdm_irta@mail.ugm.ac.id - Website : www.ugm.ac.id