



UNIVERSITAS INDONESIA

**PENGARUH PEMBERIAN INFUS SIMPLISIA ROSELLA
(*Hibiscus sabdariffa* L.) SECARA ORAL TERHADAP
KUALITAS SPERMATOZOA MENCIT (*Mus musculus* L.)
JANTAN GALUR DDY**

SKRIPSI

**VINDA RATNA SETYANINGSIH
0606070384**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
DEPARTEMEN BIOLOGI
DEPOK
JUNI 2011**



UNIVERSITAS INDONESIA

**PENGARUH PEMBERIAN INFUS SIMPLISIA ROSELLA
(*Hibiscus sabdariffa* L.) SECARA ORAL TERHADAP
KUALITAS SPERMATOZOA MENCIT (*Mus musculus* L.)
JANTAN GALUR DDY**

SKRIPSI

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains

**VINDA RATNA SETYANINGSIH
0606070384**

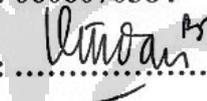
**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
DEPARTEMEN BIOLOGI
DEPOK
JUNI 2011**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri,
dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk
telah saya nyatakan dengan benar

Nama : Vinda Ratna Setyaningsih

NPM : 0606070384

Tanda tangan : 

Tanggal : 27 Juni 2011

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Vinda Ratna Setyaningsih
NPM : 0606070384
Program Studi : S1 Biologi
Judul Skripsi : Pengaruh pemberian infus simplisia rosella
(*Hibiscus sabdariffa* L.) secara oral terhadap
kualitas spermatozoa mencit (*Mus musculus* L.)
jantan galur DDY

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Sains pada program studi Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia.

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Dr. Dadang Kusmana, M.S. (.....)
Pembimbing II : Dra. Setiorini, M.Kes. (.....)
Penguji I : Dr. Anom Bowolaksono, M.Sc. (.....)
Penguji II : Dr. Nisyawati (.....)

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 27 Juni 2011

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, puji syukur kepada Allah SWT yang selalu melimpahkan rahmatNya hingga saya dapat menyelesaikan penelitian hingga akhir penulisan skripsi. Penulisan skripsi dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Sains Departemen Biologi pada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia. Saya menyadari bahwa tanpa bantuan, bimbingan, dan dukungan semua pihak saya tidak akan mampu menyelesaikan studi, mulai dari perkuliahan hingga akhir penulisan skripsi. Oleh karena itu, saya mengucapkan banyak terima kasih kepada:

1. Dr. Dadang Kusmana, M.S. selaku pembimbing I dan Dra. Setiorini, M.Kes. selaku pembimbing II atas bimbingan selama penelitian hingga tersusunnya skripsi.
2. Dr. rer. nat. Mufti Petala Patria, M.Sc., Dra. Nining Betawati Prihantini, M.Sc., dan Dra. Titi Soedjiarti, S.U. selaku Ketua, Sekretaris, dan Koordinator Pendidikan Departemen Biologi FMIPA UI.
3. Dr. rer. nat. Yasman, M.Sc. selaku Penasehat Akademik atas perhatian, dukungan, dan doanya.
4. Dr. Abinawanto dan Dr. Anom Bowolaksono, M.Sc. selaku penguji I serta Dr. Nisyawati selaku penguji II atas saran dan masukan yang diberikan.
5. Seluruh staf pengajar Departemen Biologi FMIPA UI atas bekal ilmu yang penulis terima.
6. Seluruh karyawan Departemen Biologi FMIPA UI, terutama Ir. Rusmalina, Mbak Asri, Mas Arif, serta Pak Surya dari Departemen Farmasi FMIPA UI atas semua bantuannya.
7. Sembah sujud untuk orang tua (Bapak Narto dan Ibu Maryatun S.E.), atas cinta, kasih sayang, do'a, dukungan, dan pengertiannya selama ini.
8. Kedua adikku, Febri dan Dewi, atas dukungan, kasih sayang, dan kebersamaan yang selalu menjadi motivasi bagi saya.
9. Teman seperjuangan di jalan Allah, bang Chakra, ibu Wiji, mba Tia, kak Irya, Sarah, Nia, kak Didit, bang Er, bang Iyus, mas Dwi, mba Yati, mas Agus, akhwat SMART, serta ummahat Sukamaju Baru dan Tapos atas do'a kalian.

10. Teman seperjuangan Vita “Viyang”, atas dukungan, do’a, dan ukhuwah yang telah terjalin selama ini.
11. Teman-teman di Laboratorium Biologi Reproduksi dan Perkembangan, terutama, Fitri, Septi, Elly, Dini, dan Imey, atas semua support moril kalian, serta kak Wienda, kak Yesi, dan kak Maryam.
12. Teman-teman “Lima tahun”, terutama Asma, Ida, Anggi, Sholia, Rika, Betty, Henny, Fido, Eva, Kresna, Qumil, Iqbal, Adit, dan Ade atas kebersamaan selama ini, serta Eka, Nina, Nana, Ratna, dan Ana.
13. Teman-teman Biologi khususnya FELIX (Federation of Biology O’Six) atas bantuan, persahabatan, dan semangat yang telah diberikan selama ini.
14. Semua pihak yang telah membantu penulis dalam menyelesaikan skripsi.

Akhir kata, penulis berharap agar skripsi ini dapat berguna dan bermanfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan, serta menjadi berkah untuk umat.

Depok, Juni 2011

Penulis

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Vinda Ratna Setyaningsih
NPM : 0606070384
Program Studi : S1
Departemen : Biologi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis Karya : Skripsi

demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty-Free Right*)** atas karya ilmiah saya yang berjudul:

Pengaruh pemberian infus simplisia rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) secara oral terhadap kualitas spermatozoa mencit (*Mus musculus* L.) jantan galur DDY

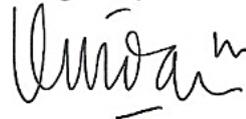
berserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya tanpa meminta izin dari saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok

Pada tanggal : 27 Juni 2011

Yang menyatakan



(Vinda Ratna Setyaningsih)

ABSTRAK

Nama : Vinda Ratna Setyaningsih
Program Studi : Biologi
Judul : Pengaruh pemberian infus simplisia rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) secara oral terhadap kualitas spermatozoa mencit (*Mus musculus* L.) jantan galur DDY

Telah dilakukan penelitian tentang pengaruh pemberian infus simplisia rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) secara oral terhadap kualitas spermatozoa mencit (*Mus musculus* L.) jantan galur DDY di Laboratorium Biologi Reproduksi dan Perkembangan Departemen Biologi FMIPA UI pada bulan Juni 2010--Maret 2011. Mencit dikelompokkan menjadi lima kelompok. Kelompok kontrol normal (KK1) diberi akuades selama 14 hari berturut-turut. Kelompok kontrol perlakuan (KK2) diberi akuades secara oral selama 14 hari berturut-turut, serta induksi etanol (dosis 2,8 g/kg bb) pada hari ke 8--14 secara intraperitoneal (i.p). Kelompok perlakuan (KP1, KP2, dan KP3) diberi infus simplisia *H. sabdariffa* L. secara oral dengan dosis 1,5%; 3%; dan 6% selama 14 hari berturut-turut serta induksi etanol pada hari ke 8--14 secara i.p. Hasil uji anava 1-faktor ($P < 0,05$) menunjukkan bahwa pemberian infus simplisia *H. sabdariffa* L. dapat meningkatkan motilitas dan menurunkan abnormalitas spermatozoa pada semua kelompok perlakuan. Peningkatan motilitas dan penurunan abnormalitas spermatozoa terbaik dicapai oleh kelompok perlakuan dosis 3% dengan nilai mendekati kelompok kontrol normal.

Kata kunci : *Hibiscus sabdariffa* L., kualitas spermatozoa, *Mus musculus* L.
xii + 93 hlm.; 21 gambar; 18 lampiran; 5 tabel
Daftar acuan : 118 (1976--2011)

ABSTRACT

Name : Vinda Ratna Setyaningsih
Study Program : Biology
Title : Effect of crude roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) infusion orally on the quality of spermatozoa of male mouse (*Mus musculus* L.) DDY strain

The research on the influence of crude roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) infusion orally on the quality of spermatozoa DDY strain male mice (*Mus musculus* L.) was conducted in the Laboratory of Reproductive and Developmental Biology, Department of Biology, Faculty of Mathematics and Sciences University of Indonesia on June 2010-March 2011. Mice were divided into 5 groups. The normal control group (KK1) was given distilled water for 14 consecutive days. The treatment control group (KK2) were given distilled water orally for 14 consecutive days and induced ethanol (dose 2.8 g/kg bw) on day 8-14 by intraperitoneal (i.p). The treatment groups (KP1, KP2, and KP3) were given a crude *H. sabdariffa* L. infusion orally with doses of 1.5%, 3% and 6% for 14 consecutive days and induced ethanol on day 8-14 by i.p. The results of one-way anova ($P < 0.05$) showed that crude *H. sabdariffa* L. infusion significantly increases spermatozoa motility and decreases abnormalities in all treatment groups. The best enhancement of increased motility and decreased abnormalities of spermatozoa was achieved by treatment group with dose of 3% *H. sabdariffa* L., with a value approaching the normal control group.

Keywords: *Hibiscus sabdariffa* L., spermatozoa quality, *Mus musculus* L.
xii + 93 pages; 21 pictures; 18 appendixs; 5 tables
Bibliography: 118 (1976-2011)

DAFTAR ISI

| | Halaman |
|--|-----------|
| HALAMAN JUDUL | i |
| HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS | ii |
| LEMBAR PENGESAHAN | iii |
| KATA PENGANTAR | iv |
| LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH | vi |
| ABSTRAK | vii |
| DAFTAR ISI | ix |
| DAFTAR GAMBAR | xi |
| DAFTAR TABEL | xi |
| DAFTAR LAMPIRAN | xii |
| | |
| 1. PENDAHULUAN | 1 |
| | |
| 2. TINJAUAN PUSTAKA | 5 |
| 2.1 Rosella (<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.) | 5 |
| 2.1.1 Deskripsi rosella (<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.) | 5 |
| 2.1.2 Kandungan kimia | 8 |
| 2.1.3 Manfaat | 9 |
| 2.2 Radikal Bebas | 10 |
| 2.3 Etanol sebagai Penginduksi Radikal Bebas | 11 |
| 2.4 Antioksidan | 14 |
| 2.5 Mencit (<i>Mus musculus</i> L.) Jantan | 16 |
| 2.6 Sistem Reproduksi Jantan | 18 |
| 2.6.1 Testis | 18 |
| 2.6.2 Sistem duktus | 20 |
| 2.6.3 Kelenjar aksesori | 21 |
| 2.6.4 Alat kelamin luar (penis) | 21 |
| 2.7 Spermatogenesis | 22 |
| 2.8 Spermatozoa dan Proses Pematangan di Epididimis | 24 |
| 2.8.1 Spermatozoa | 24 |
| 2.8.2 Proses pematangan di epididimis | 25 |
| 2.9 Analisis Semen | 25 |
| 2.9.1 Motilitas spermatozoa | 26 |
| 2.9.2 Viabilitas spermatozoa | 26 |
| 2.9.3 Konsentrasi spermatozoa | 27 |
| 2.9.4 Morfologi spermatozoa | 27 |
| | |
| 3. METODE PENELITIAN | 28 |
| 3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian | 28 |
| 3.2 Bahan | 28 |
| 3.2.1 Bahan uji | 28 |
| 3.2.2 Hewan uji | 28 |
| 3.2.3 Makanan dan minuman hewan uji | 28 |
| 3.2.4 Bahan-bahan kimia | 29 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 3.3 | Peralatan | 29 |
| 3.3.1 | Pemeliharaan mencit | 29 |
| 3.3.2 | Pembuatan infus simplisia rosella (<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.) | 29 |
| 3.3.3 | Pemberian pencekokan dan penyuntikan mencit | 30 |
| 3.3.4 | Pengambilan data kualitas spermatozoa | 30 |
| 3.4 | Cara Kerja | 30 |
| 3.4.1 | Rancangan penelitian | 30 |
| 3.4.2 | Pemeliharaan mencit (<i>Mus musculus</i> L.) | 31 |
| 3.4.3 | Pembuatan larutan | 31 |
| 3.4.4 | Pembuatan simplisia rosella (<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.) | 32 |
| 3.4.5 | Pembuatan infus simplisia rosella (<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.) | 32 |
| 3.4.6 | Perlakuan terhadap mencit | 33 |
| 3.4.7 | Pengambilan data | 33 |
| 3.4.8 | Rancangan cara pengolahan dan analisis data | 36 |
| 4. | HASIL DAN PEMBAHASAN | 37 |
| 4.1 | Hasil | 37 |
| 4.1.1 | Persentase motilitas spermatozoa | 37 |
| 4.1.2 | Persentase viabilitas spermatozoa | 39 |
| 4.1.3 | Konsentrasi spermatozoa | 41 |
| 4.1.4 | Persentase abnormalitas spermatozoa | 43 |
| 4.2 | Pembahasan | 45 |
| 5. | KESIMPULAN DAN SARAN | 61 |
| 5.1 | Kesimpulan | 61 |
| 5.2 | Saran | 61 |
| | DAFTAR REFERENSI | 62 |

DAFTAR GAMBAR

| | | |
|----------------|---|----|
| Gambar 2.1.1.1 | Tanaman <i>Hibiscus sabdariffa</i> L. | 6 |
| Gambar 2.1.1.2 | Daun, bunga, dan kelopak bunga <i>Hibiscus sabdariffa</i> L. | 7 |
| Gambar 2.3.1 | Struktur kimia etanol | 12 |
| Gambar 2.3.2 | Metabolisme etanol | 13 |
| Gambar 2.4 | Bagan arus pengaruh ROS terhadap fertilitas | 16 |
| Gambar 2.5 | Mencit (<i>Mus musculus</i> L.) jantan galur DDY | 17 |
| Gambar 2.6 | Sistem reproduksi mencit (<i>Mus musculus</i> L.) jantan | 19 |
| Gambar 2.7 | Spermatogenesis | 23 |
| Gambar 2.8 | Spermatozoa mencit (<i>Mus musculus</i> L.) jantan | 23 |
| Gambar 4.1.1 | Diagram batang rerata persentase motilitas spermatozoa mencit kelompok kontrol dan kelompok perlakuan | 38 |
| Gambar 4.1.2 | Diagram batang rerata persentase viabilitas spermatozoa mencit kelompok kontrol dan kelompok perlakuan | 40 |
| Gambar 4.1.3 | Diagram batang rerata konsentrasi (juta per ml ejakulat) spermatozoa mencit kelompok kontrol dan kelompok perlakuan | 42 |
| Gambar 4.1.4 | Diagram batang rerata persentase abnormalitas spermatozoa mencit kelompok kontrol dan kelompok perlakuan | 44 |
| Gambar 4.2.1 | Reaksi peroksidasi lipid | 47 |
| Gambar 4.2.2 | Struktur kimia flavon | 51 |
| Gambar 4.2.3 | Reaksi flavonoid dengan ROS | 51 |
| Gambar 4.2.4 | Struktur kimia <i>quercetine</i> | 52 |
| Gambar 4.2.5 | Struktur kimia antosianin, <i>cyanidin</i> , dan <i>delphinidin</i> | 54 |
| Gambar 4.2.6 | Mekanisme perbaikan vitamin C pada membran lipid yang teroksidasi | 55 |
| Gambar 4.2.7 | Reaksi β -karoten dengan radikal peroksil | 56 |
| Gambar 4.2.8 | Hasil pengamatan spermatozoa abnormal | 59 |

DAFTAR TABEL

| | | |
|-------------|--|----|
| Tabel 3.4.7 | Faktor koreksi untuk hemasitometer <i>Improved Neubauer</i> | 35 |
| Tabel 4.1.1 | Data rerata persentase motilitas spermatozoa mencit kelompok kontrol dan kelompok perlakuan | 37 |
| Tabel 4.1.2 | Data rerata persentase viabilitas spermatozoa mencit kelompok kontrol dan kelompok perlakuan | 39 |
| Tabel 4.1.3 | Data rerata konsentrasi (juta per ml ejakulat) spermatozoa mencit kelompok kontrol dan kelompok perlakuan | 41 |
| Tabel 4.1.4 | Data rerata abnormalitas spermatozoa mencit kelompok kontrol dan kelompok perlakuan | 43 |

DAFTAR LAMPIRAN

| | | |
|-------------|--|----|
| Lampiran 1 | Cara perhitungan dosis infus simplisia <i>Hibiscus sabdariffa</i> L. untuk mencit (<i>Mus musculus</i> L.) | 72 |
| Lampiran 2 | Cara perhitungan dosis induksan etanol untuk mencit (<i>Mus musculus</i> L.) | 74 |
| Lampiran 3 | Surat identifikasi oleh Herbarium Bogoriense | 76 |
| Lampiran 4 | Cara penghitungan motilitas spermatozoa metode WHO 1980 | 77 |
| Lampiran 5 | Uji normalitas Shapiro-Wilk terhadap data persentase motilitas spermatozoa mencit (<i>Mus musculus</i> L.) jantan | 78 |
| Lampiran 6 | Uji homogenitas Levene terhadap data persentase motilitas spermatozoa mencit (<i>Mus musculus</i> L.) jantan | 79 |
| Lampiran 7 | Uji analisis variansi (anava) 1-faktor terhadap data persentase motilitas spermatozoa mencit (<i>Mus musculus</i> L.) jantan | 80 |
| Lampiran 8 | Uji perbandingan berganda LSD terhadap data persentase motilitas spermatozoa mencit (<i>Mus musculus</i> L.) jantan | 81 |
| Lampiran 9 | Uji normalitas Shapiro-Wilk terhadap data persentase viabilitas spermatozoa mencit (<i>Mus musculus</i> L.) jantan..... | 83 |
| Lampiran 10 | Uji homogenitas Levene terhadap data persentase viabilitas spermatozoa mencit (<i>Mus musculus</i> L.) jantan | 84 |
| Lampiran 11 | Uji analisis variansi (anava) 1-faktor terhadap data persentase viabilitas spermatozoa mencit (<i>Mus musculus</i> L.) jantan | 85 |
| Lampiran 12 | Uji normalitas Shapiro-Wilk terhadap data konsentrasi spermatozoa mencit (<i>Mus musculus</i> L.) jantan | 86 |
| Lampiran 13 | Uji homogenitas Levene terhadap data konsentrasi spermatozoa mencit (<i>Mus musculus</i> L.) jantan | 87 |
| Lampiran 14 | Uji analisis variansi (anava) 1-faktor terhadap data konsentrasi spermatozoa mencit (<i>Mus musculus</i> L.) jantan | 88 |
| Lampiran 15 | Uji normalitas Shapiro-Wilk terhadap data persentase abnormalitas spermatozoa mencit (<i>Mus musculus</i> L.) jantan | 89 |
| Lampiran 16 | Uji homogenitas Levene terhadap data persentase abnormalitas spermatozoa mencit (<i>Mus musculus</i> L.) jantan | 90 |
| Lampiran 17 | Uji analisis variansi (anava) 1-faktor terhadap data persentase abnormalitas spermatozoa mencit (<i>Mus musculus</i> L.) jantan | 91 |
| Lampiran 18 | Uji perbandingan berganda LSD terhadap data persentase abnormalitas spermatozoa mencit (<i>Mus musculus</i> L.) jantan | 92 |

BAB 1 PENDAHULUAN

Gangguan kesuburan atau infertilitas merupakan salah satu masalah kesehatan reproduksi yang dapat dialami manusia. Infertilitas adalah tidak terjadinya kehamilan pada pasangan yang telah menikah, setelah satu tahun dengan hubungan seks (*intercourse*) secara teratur tanpa memakai alat kontrasepsi. Infertilitas dapat dialami oleh pria dan wanita. Faktor penyebab infertilitas pada pria antara lain gangguan hormonal, gangguan seksual (ereksi dan ejakulasi), dan gangguan pada organ reproduksi (McLachlan 2007: 1).

Gangguan kesuburan pada organ reproduksi dapat disebabkan oleh radikal bebas (McLachlan 2007: 1). Radikal bebas adalah suatu atom atau molekul yang mempunyai satu elektron atau lebih tidak berpasangan pada lapisan terluarnya (Halliwell & Gutteridge 1984: 1). Sumber radikal bebas berasal dari dalam tubuh, contohnya autooksidasi, atau luar tubuh, contohnya polusi udara, bahan kimia, dan sinar ultraviolet (Arief 2006: 2, 4, & 5). Radikal bebas bersifat tidak stabil dan memiliki daya reaktifitas tinggi sehingga mengakibatkan terjadi reaksi berantai yang menghasilkan senyawa radikal baru. Reaksi berantai tersebut seringkali mengakibatkan terjadi peroksidasi lipid. Kerusakan lipid yang terjadi pada organ reproduksi pria dapat mengganggu spermatogenesis dan proses pematangan spermatozoa (Emanuele & Emanuele 1998: 200).

Pencegahan radikal bebas dapat dilakukan oleh enzim dalam tubuh, contohnya katalase, dan zat gizi yang masuk ke dalam tubuh, contohnya antioksidan (Muhilal 1991: 9; Sumampouw 2003: 1; Arief 2006: 7). Antioksidan merupakan senyawa yang dapat melindungi sel dari serangan radikal bebas. Hal tersebut dikarenakan senyawa antioksidan dapat memberikan elektronnya kepada senyawa radikal bebas sehingga menghambat reaksi oksidasi (Percival 1996: 1). Selain itu, antioksidan juga dapat memperlambat reaksi oksidasi (Suherman 2001: 15) bahkan dapat mengurangi dan memperbaiki kerusakan oksidatif akibat radikal bebas (Usuh *dkk.* 2005: 135; Winarsi 2007: 20).

Indonesia yang terkenal kaya dengan jenis tanaman mempunyai kesempatan untuk memperoleh bahan antioksidan. Menurut Nurhuda *dkk.* tahun

1995 (*lihat* Rusmiati 2007: 64), tanaman masih merupakan sumber utama dalam pencarian bahan antioksidan. Oleh sebab itu, pemanfaatan bahan tanaman masih merupakan prioritas untuk diteliti. Kelebihan bahan antioksidan berupa obat tradisional antara lain memiliki efek samping yang kecil bila dibandingkan dengan obat sintetik (Direktorat Pengawasan Obat Tradisionil 1983: 4--6). Selain itu, obat tradisional dipilih sebagai obat untuk menyembuhkan karena harganya terjangkau dan mudah diperoleh (Subramanian *dkk.* 2006: 178).

Tanaman yang diketahui memiliki potensi sebagai antioksidan antara lain *Ocimum basilicum* atau kemangi dan *Orthosiphon stamineus* atau kumis kucing (Zakaria *dkk.* 2008: 4). Selain itu, *Cornus mas* atau ceri (Pantelidis *dkk.* 2007: 777) dan *Zingiber officinale* atau jahe (Rai *dkk.* 1999: 79; Amin *dkk.* 2008: 291) juga telah diketahui memiliki potensi antioksidan. Tanaman tersebut memiliki komponen utama senyawa polifenol, asam askorbat (vitamin C), dan karotenoid. Ketiga senyawa tersebut diketahui dapat bersifat sebagai antioksidan (Percival 1996: 2 & 3).

Contoh tanaman lain yang dapat memiliki potensi sebagai antioksidan adalah *Hibiscus sabdariffa* L. atau rosella. Kelopak bunga *H. sabdariffa* L. mengandung beberapa komponen antara lain alkaloid, eugenol, sterol, asam sitrat, vitamin C, asam tartarat, pektin, dan polifenol. Senyawa yang bersifat antioksidan antara lain polifenol yang berupa asam fenolik dan flavonoid (Ali *dkk.* 2005: 370; Hirunpanich *dkk.* 2005: 481; Mahadevan *dkk.* 2009: 78). Selain itu, vitamin C dan β -carotene dalam kelopak bunga *H. sabdariffa* L. juga bersifat sebagai antioksidan (Siemonsma & Piluek 1994: 178; Ali *dkk.* 2005: 370).

Penelitian tentang *H. sabdariffa* L. sebagai bahan uji yang memiliki potensi antioksidan terhadap radikal bebas telah dilakukan oleh beberapa peneliti. Dahiru *dkk.* (2005: 31) membuktikan bahwa fraksi ekstrak etanol *H. sabdariffa* L. dapat menurunkan kadar *thiobarbituric acid* (TBA) sebagai hasil peroksidasi lipid pada tikus yang diinduksi CCl₄ sehingga dapat memperbaiki kerusakan hati. Penelitian Usuh *dkk.* (2005: 137) membuktikan bahwa fraksi etanol *H. sabdariffa* L. juga dapat menurunkan kadar *malondialdehyde* (MDA) dalam hati sebagai hasil peroksidasi lipid. Hirunpanich *dkk.* (2005: 482) juga membuktikan bahwa *H. sabdariffa* L. dapat menurunkan kadar *low density*

lipoprotein (LDL) yang diinduksi CuSO_4 secara *in vitro*. Berdasarkan beberapa penelitian tersebut yang membuktikan potensi antioksidan *H. sabdariffa* L., maka penelitian tentang uji potensi antioksidan *H. sabdariffa* L. terhadap kualitas spermatozoa juga perlu dilakukan.

Penelitian mengenai pengaruh zat antioksidan terhadap spermatozoa tikus galur Wistar telah dilakukan oleh Ganaraja *dkk.* (2008: 1). Penelitian tersebut dilakukan dengan menggunakan etanol dosis 2 g/kg bb untuk menginduksi terbentuknya radikal bebas, dan vitamin C dosis 250 mg/kg bb sebagai zat antioksidan. Penelitian dilakukan selama 14 hari berturut-turut, yaitu tujuh hari pertama hanya pemberian vitamin C dan tujuh hari kedua pemberian vitamin C dan induksi etanol. Penelitian tersebut menunjukkan bahwa vitamin C dapat memperbaiki kualitas spermatozoa yang diinduksi oleh etanol.

Etanol atau $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ bersifat toksik dan mengalami metabolisme menjadi asetaldehida yang lebih bersifat toksik dibandingkan etanol itu sendiri (Shakhashiri 2009: 1). Metabolisme tersebut juga dapat menghasilkan senyawa radikal bebas, antara lain radikal hidroksil ($\cdot\text{OH}$), radikal hidroksietil ($\text{CH}_3\text{C}\cdot\text{HOH}$), dan radikal metil karbonil ($\text{CH}_3\text{C}\cdot=\text{O}$) yang dapat mengakibatkan kerusakan pada sel bahkan organ (Albano 2000: 240). Penelitian El-Sokkary (1999: 842), Kasdallah-Grissa *dkk.* (2006: 236), dan Ganaraja *dkk.* (2008: 2) menunjukkan bahwa metabolisme etanol dapat meningkatkan peroksidasi lipid di organ testis. Penelitian Maneesh *dkk.* (2005: 63) juga menunjukkan hasil bahwa induksi etanol dapat menurunkan berat testis dan mengganggu proses spermatogenesis.

Penelitian pendahuluan mengenai pengaruh infus simplisia *H. sabdariffa* L. terhadap kualitas spermatozoa mencit (*Mus musculus* L.) jantan galur DDY menggunakan dosis 1,5%; 3%; 6%; dan 12%. Dosis tersebut dihitung berdasarkan jumlah kelopak kering yang umum dikonsumsi masyarakat adalah 5 kelopak per hari (Duke 2002: 629). Jumlah tersebut ditimbang dan didapat berat sekitar 3,9 g yang dibulatkan menjadi 4 g. Dosis dikonversi terhadap mencit sehingga diperoleh dosis 3 %. Dosis diturunkan dan dinaikkan sehingga dosis yang digunakan yaitu 1,5%; 3%; 6%; dan 12%. Hasil penelitian pendahuluan menunjukkan bahwa perbaikan kualitas spermatozoa parameter motilitas dan

abnormalitas spermatozoa yang mendekati normal terjadi pada dosis 1,5%; 3%; dan 6%. Dosis 12% menunjukkan tidak adanya perbaikan kualitas spermatozoa bahkan dapat menurunkan kualitas spermatozoa lebih dibandingkan induksi etanol. Berdasarkan hal tersebut, maka dosis yang digunakan dalam penelitian adalah 1,5%; 3%; dan 6%.

Pengamatan kualitas spermatozoa dilakukan terhadap parameter motilitas, viabilitas, konsentrasi, dan abnormalitas spermatozoa mencit jantan galur DDY. Hewan uji terlebih dahulu diberikan bahan uji infus simplisia *H. sabdariffa* L. kemudian diturunkan kualitas spermatozoanya dengan memberikan bahan kimia yang dapat menyebabkan penurunan kualitas spermatozoa. Bahan kimia yang diberikan berupa senyawa yang bersifat radikal bebas sehingga aktivitas antioksidan *H. sabdariffa* L. dapat diuji. Salah satu jenis bahan kimia yang diketahui sebagai radikal bebas adalah etanol. Dosis penelitian untuk induksi etanol dihitung berdasarkan hasil penelitian Ganaraja *dkk.* (2008: 2) terhadap tikus galur Wistar yaitu 2 g/kg bb yang dikonversi terhadap mencit sehingga diperoleh dosis 2,8 g/kg bb.

Penelitian dilakukan bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian infus simplisia rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) secara oral dengan dosis 1,5%; 3%; dan 6% selama 14 hari berturut-turut pada mencit (*Mus musculus* L.) jantan galur DDY terhadap kualitas spermatozoa. Hipotesis penelitian adalah dosis 3% merupakan dosis optimum pemberian infus simplisia rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) secara oral selama 14 hari berturut-turut untuk dapat memperbaiki kualitas spermatozoa mencit (*Mus musculus* L.) jantan galur DDY.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.)

Hibiscus sabdariffa L. adalah salah satu tanaman yang banyak terdapat di daerah tropis dan subtropis (Loebis 1970: 18). Tanaman tersebut diduga berasal dari Afrika yang dimanfaatkan biji, daun, dan bunganya untuk dimakan (Brink & Escobin 2003: 162). Pemanfaatan daun dan kelopak bunga sebagai sayuran dimulai di Amerika dan Asia yang kemudian disusul dengan produksi serat batang tanaman tersebut di daerah Asia (Siemonsma & Piluek 1994: 178). *Hibiscus sabdariffa* L. banyak ditanam di daerah tropis, seperti Hawaii, Florida, Karibia, Brazil, India, Filipina, dan Indonesia (Mahadevan dkk. 2009: 77).

Penanaman tanaman *H. sabdariffa* L. di Indonesia dimulai pada tahun 1921--1923. Pada saat itu, Indonesia sangat bergantung pada impor karung goni dari India sedangkan kebutuhan alat pembungkus gula, beras, dan kopi sangat mendesak. Selain itu, jute (*Hibiscus cannabinus* L.) yaitu serat untuk membuat karung pada saat itu hasilnya kurang memuaskan dibandingkan serat *H. sabdariffa* L. Oleh karena itu, usaha pengembangan *H. sabdariffa* L. mulai ditingkatkan di Indonesia (Musa 1983: 5 & 6).

2.1.1. Deskripsi rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.)

Hibiscus sabdariffa L. dikenal dengan nama Rosella di Indonesia. Di daerah Jawa, *H. sabdariffa* L. dikenal dengan *Rameh*, sedangkan di daerah Ternate dikenal dengan nama *Kasturi roriha*. Rosella juga terkenal di berbagai negara dengan nama lain, seperti *Roselle* atau *Sorrel* (Inggris); *Karkade* atau *Carcadé* (Afrika Utara); *Gongura* atau *Patwa* (India); *Pundibija* (Kanada); dan *Oseille* (Perancis) (Loebis 1970: 7; Mahadevan dkk. 2009: 77).

Hibiscus sabdariffa L. merupakan tanaman yang termasuk suku Malvaceae dan marga *Hibiscus* (Tjitrosoepomo 2005: 251 & 254). Tanaman tersebut merupakan tanaman semak tahunan dan dapat hidup di tanah yang

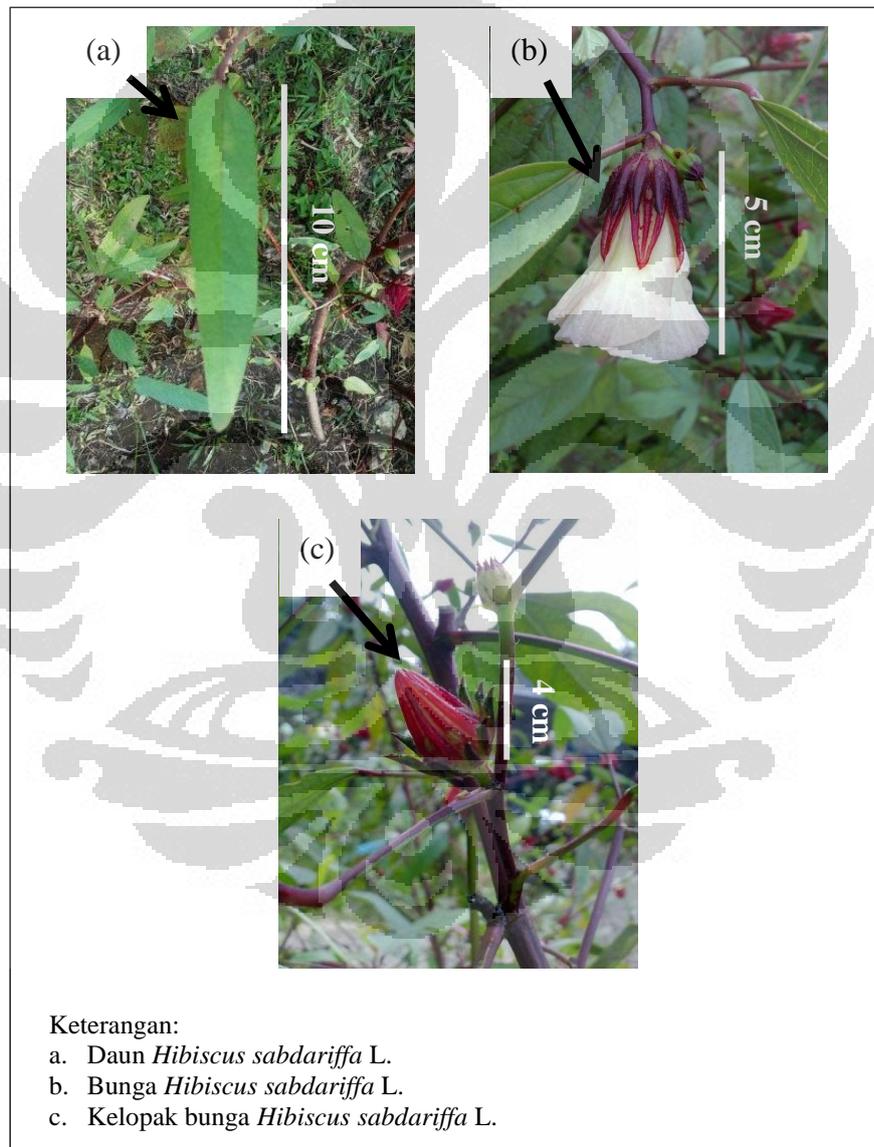
mendapat pengairan dan sinar matahari yang cukup. Tanaman *H. sabdariffa* L. (Gambar 2.1.1.1) memiliki akar (*radix*) tunggang dengan panjang 18--30 cm, cabang akar (*radix lateralis*) yang sedikit, dan sesekali dengan serabut akar (*fibrilla radicalis*). Tanaman tersebut memiliki batang (*caulis*) tegak (*erectus*) berbentuk bulat (*teres*) dengan tinggi 0,5--5 m (Brink & Escobin 2003: 163; van Steenis 2003: 282). Batang *H. sabdariffa* L. pada umumnya berbulu (*pilosus*) seluruhnya dan berduri tempel (*aculeus*), baik sedikit maupun banyak. Warna batang *H. sabdariffa* L. dapat berupa merah, hijau, atau merah kehijauan (Loebis 1970: 23).



Gambar 2.1.1.1. Tanaman *Hibiscus sabdariffa* L.
[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

Menurut van Steenis (2003: 282) dan Siemonsma & Piluek (1994: 178), tanaman *H. sabdariffa* L. memiliki daun (*folium*) bertangkai dengan panjang daun 6--15 cm (Gambar 2.1.1.2.a). Daun *H. sabdariffa* L. merupakan daun tunggal

(*folium simplex*), berselang-seling (*alternatio*), berbentuk lanset (*lanceolatus*), ujung tumpul-meruncing (*obtusus-acuminatus*), tepi bergerigi (*serratus*), pangkal daun pasak-rompang (*cuneatus-truncatus*), berwarna hijau atau hijau kemerahan, dan terdapat kelenjar yang terlihat jelas pada pangkal ibu tulang daun (Brink & Escobin 2003: 163; van Steenis 2003: 282). Ukuran dan bentuk daun dari tangkai bawah menuju ke atas semakin membesar (Loebis 1970: 19).



Gambar 2.1.1.2. Daun, bunga, dan kelopak bunga
Hibiscus sabdariffa L.

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

Tanaman *H. sabdariffa* L. memiliki bunga (*flos*) yang terletak di ketiak daun (*flos lateralis*) dan pada umumnya berdiri sendiri atau bunga tunggal (*planta uniflora*). Bunga *H. sabdariffa* L. (Gambar 2.1.1.2.b) disebut bunga duduk, karena bertangkai pendek dengan panjang 4--6 mm, sehingga hampir melekat pada batang. Bunga *H. sabdariffa* L. pada awalnya tumbuh memiliki daun kelopak (*calyx*) berdaging tebal yang kemudian membesar dan memanjang sehingga melindungi buah (Loebis 1970: 30 & 32). Kelopak tersebut berwarna merah tua atau kuning muda dengan tulang daun merah (van Steenis 2003: 282). Selain itu, juga terdapat daun kelopak tambahan (*epicalyx*) yang terdiri dari 8--12 segmen dan bersatu pada pangkalnya (Brink & Escobin 2003: 163; van Steenis 2003: 282; Gambar 2.1.1.2.c).

Hibiscus sabdariffa L. termasuk ke dalam divisi Spermatophyta atau tanaman yang memiliki biji (Tjitrosoepomo 2005: 251). Biji *H. sabdariffa* L. berwarna coklat kehitaman yang terdapat dalam kantong biji (Musa 1983: 16). Kantong biji *H. sabdariffa* L. terdiri dari lima ruang yang memiliki sekat sempurna (*septum completus*) dan masing-masing ruang terdapat 3--4 biji (van Steenis 2003: 282).

2.1.2. Kandungan kimia

Menurut Siemonsma & Piluek (1994: 179), daun *Hibiscus sabdariffa* L. per 100 gramnya mengandung 85 g air; 3,3 g protein; 0,3 g lemak; 9 g karbohidrat; 1,6 g serat; 213 mg kalsium; 93 mg fosfor; 4,8 mg zat besi; 4,1 mg β -karoten; 0,17 mg vitamin B₁; 0,45 mg vitamin B₂; 1,2 mg niasin; dan 54 mg asam askorbat (vitamin C). Bunga *H. sabdariffa* L. mengandung antara lain antosianin dan flavonol (Ali *dkk.* 2005: 369 & 370). Biji *H. sabdariffa* L. mengandung protein, mineral, dan lemak (Mahadevan *dkk.* 2009: 78).

Kelopak bunga *H. sabdariffa* L. mengandung protein (7,9%) (Duke 1983: 1); beberapa mineral, seperti zat besi, fosfor, dan kalsium (Mahadevan *dkk.* 2009: 78 & 79); alkaloid, sterol, eugenol, asam sitrat (4%) (Siemonsma & Piluek 1994: 178), vitamin C, asam tartarat, pektin, dan polifenol (Ali *dkk.* 2005: 370; Hirunpanich *dkk.* 2005: 481; Mahadevan *dkk.* 2009: 78). Senyawa polifenol yang

terkandung dalam *H. sabdariffa* L. adalah asam fenolik (*protocatechoic acid*); flavonoid seperti antosianin (*cyanidin* dan *delphinidin*) (Ali *dkk.* 2005: 370; Hirunpanich *dkk.* 2005: 481; Mahadevan *dkk.* 2009: 78); flavonol (*quercetin*, *gossipetine*, *hibiscetine*, dan *sabdaretine*) (Morton 1987: 1; Ali *dkk.* 2005: 370); dan flavon (*luteolin*) (Siemonsma & Piluek 1994: 178; Ali *dkk.* 2005: 370). Senyawa kimia β -*carotene* juga terdapat dalam kelopak *H. sabdariffa* L. (Siemonsma & Piluek 1994: 178; Ali *dkk.* 2005: 370).

2.1.3. Manfaat

Hibiscus sabdariffa L. memiliki manfaat sebagai antiseptik, antikejang (*antipasmodik*), mengobati cacingan (*antelmintik*), zat afrodisiaka, dan dapat merangsang keluarnya zat empedu dari hati (*choloretic*). Selain itu, tanaman tersebut dapat menurunkan tekanan darah, meningkatkan peristaltik usus, dan melembutkan kulit (*emollient*). Kelopak *H. sabdariffa* L. juga dapat menurunkan absorpsi alkohol, sehingga dapat mengurangi efek yang ditimbulkan akibat minum alkohol (Farooqi & Sreeramu 2001: 629; Duke *dkk.* 2002: 222; Maryani & Kristiana 2008: 25--27).

Beberapa penelitian menunjukkan manfaat dari *H. sabdariffa* L. Manfaat tersebut antara lain sebagai antivirus (Sunday *dkk.* 2010: 295), antibakteri (Olaleye & Tolulope 2007: 11), dan antipiretik (Reanmongkol & Itharat 2007: 36). Menurut Hirunpanich *dkk.* (2005: 482), *H. sabdariffa* L. juga dapat menurunkan kadar *low density lipoprotein* (LDL) yang diinduksi CuSO_4 secara *in vitro*. Selain itu, penelitian Dahiru *dkk.* (2005: 31) membuktikan bahwa fraksi ekstrak etanol *H. sabdariffa* L. (polifenol dan vitamin C) dapat memperbaiki kerusakan hati yang diinduksi CCl_4 . Penelitian Usuh *dkk.* (2005: 137) juga membuktikan bahwa fraksi etanol *H. sabdariffa* L. (polifenol) dapat menurunkan kadar *malondialdehyde* (MDA) dalam hati sebagai hasil peroksidasi lipid atau *lipid peroxidation* (LPO) akibat induksi sodium arsenik. Hasil beberapa penelitian tersebut menunjukkan bahwa *H. sabdariffa* L. memiliki potensi sebagai antioksidan terhadap organ yang diinduksi radikal bebas.

2.2. Radikal Bebas

Radikal bebas adalah suatu atom atau molekul yang mempunyai satu elektron atau lebih tidak berpasangan pada lapisan terluarnya (Halliwell & Gutteridge 1984: 1). Hal tersebut menyebabkan radikal bebas dapat mengambil elektron dari senyawa lain untuk membentuk pasangan elektron. Terambilnya elektron tersebut menyebabkan senyawa target teroksidasi. Senyawa yang sering diserang radikal bebas adalah biomakromolekul, seperti protein, lipid, dan DNA (Wu & Cederbaum 2003: 277).

Mekanisme radikal bebas dalam menyerang sel sehingga mengakibatkan kerusakan pada sel tersebut antara lain terbentuknya ikatan kovalen antara radikal bebas dengan komponen membran sel, seperti enzim dan reseptor. Hal tersebut dapat mengubah struktur membran sehingga memengaruhi aktivitas dan fungsi membran, misalnya proses transpor ion. Selain itu, radikal bebas juga dapat menginisiasi terjadinya peroksidasi lipid, yaitu penguraian asam lemak terutama asam lemak tidak jenuh majemuk atau *polyunsaturated fatty acid* (PUFA) pada membran. Hal tersebut menyebabkan kerusakan struktur membran dan menurunkan fluiditas membran (Slater 1984: 3).

Reaksi oksidasi pada senyawa target terjadi secara berantai dan terus menerus akibat tidak stabilnya dan tingginya reaktifitas radikal bebas. Reaksi secara terus menerus tersebut dapat menghasilkan senyawa radikal baru yang terus bertambah dan kemudian akan merusak sel bahkan organ. Kerusakan tersebut dapat menyebabkan berbagai macam penyakit dan kondisi degeneratif, misalnya aterosklerosis dan *aging* atau penuaan (Winarsi 2007: 11, 12, & 15).

Sumber radikal bebas dapat berasal dari dalam tubuh (endogen) dan luar tubuh (eksogen) (Suyatna 2001: 8). Sumber endogen antara lain autooksidasi dan oksidasi enzimatik. Sumber eksogen antara lain sinar ultraviolet, polusi udara, asap rokok, obat-obatan, dan bahan-bahan kimia (Wu & Cederbaum 2003: 280; Arief 2006: 2, 4, & 5). Contoh bahan kimia yang bersifat radikal bebas antara lain karbon tetraklorida atau CCl_4 (Dahiru *dkk.* 2005: 28) dan etanol atau $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (Ganaraja *dkk.* 2008: 1). Karbon tetraklorida merupakan contoh radikal bebas

yang mengandung radikal karbon ($\text{CCl}_3\cdot$) sedangkan etanol merupakan radikal bebas yang mengandung radikal oksigen ($\cdot\text{OH}$) (Arief 2006: 3).

Salah satu senyawa kimia yang banyak terlibat dalam pembentukan radikal bebas adalah oksigen (O_2). Hal tersebut dikarenakan molekul oksigen berperan banyak dalam reaksi biokimia yang terjadi pada respirasi seluler. Reaksi biokimia tersebut menghasilkan beberapa senyawa radikal oksigen sebagai senyawa antaranya. Sebelum senyawa-senyawa tersebut merusak sel, senyawa-senyawa tersebut diubah menjadi molekul H_2O . Namun perubahan tersebut tidak seluruhnya terjadi pada senyawa antara tersebut. Menurut Chance *dkk.* pada tahun 1979, terdapat 2--3% senyawa antara bersifat radikal yang tidak mengalami perubahan menjadi molekul H_2O . Kelompok senyawa oksigen yang bersifat radikal bebas tersebut disebut senyawa oksigen reaktif atau *reactive oxygen species* (ROS) (Wu & Cederbaum 2003: 278).

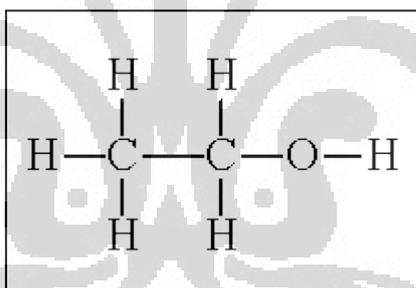
Contoh senyawa ROS antara lain radikal superoksida ($\text{O}_2^{\cdot-}$) dan radikal peroksil ($\cdot\text{OOH}$). Selain itu, terdapat senyawa hidroksil ($\cdot\text{OH}$) yang merupakan senyawa paling reaktif (Halliwell 1989: 747; Suherman 2001: 15). Senyawa-senyawa reaktif tersebut dapat dihasilkan ketika sel berada dalam kondisi tidak stres, yaitu terjadi keseimbangan antara proses pembentukan dan pemusnahan ROS. Sementara pada kondisi stres oksidatif atau *oxidative stress* (OS), pembentukan ROS lebih tinggi dibandingkan pemusnahannya (Zakhari 2006: 250). Kondisi stres oksidatif dapat mengakibatkan gangguan pada organ tubuh termasuk organ reproduksi. Radikal bebas yang menginduksi terjadinya stress oksidatif pada organ reproduksi dapat mengakibatkan infertilitas atau gangguan kesuburan (Gambar 2.4). Akibatnya, sistem pertahanan tubuh harus bekerja lebih keras untuk memusnahkan senyawa ROS tersebut. Sistem pertahanan tubuh tersebut disebut antioksidan (Sutarni 2007: 27).

2.3. Etanol sebagai Penginduksi Radikal Bebas

Etil alkohol atau dikenal dengan etanol merupakan senyawa kimia yang sering digunakan untuk kebutuhan manusia. Kegunaan dari etanol antara lain sebagai pelarut, antiseptik, dan bahan utama minuman beralkohol (Sutarni 2005:

51). Etanol berwujud cair pada suhu ruangan dan memiliki massa jenis 0,79 g/ml (Koolman & Roehm 2005: 320). Cairan etanol tidak berwarna, memiliki bau, dan terasa membakar pada mulut maupun tenggorokan bila tertelan (Shakhashiri 2009: 1). Ukuran molekul etanol sangat kecil dan bersifat polar sehingga mudah larut dalam air. Hal tersebut menyebabkan etanol cepat diabsorpsi oleh sel-sel tubuh (Riveros-Rosas *dkk.* 1997: 454; Koolman & Roehm 2005: 320; Sutarni 2005: 51).

Etanol adalah alkohol alifatik monohidroksil dengan rumus kimia CH_2OH dan terdiri atas satu gugus hidroksil (-OH), satu gugus metilen (- CH_2 -), dan satu gugus metil (- CH_3). Etanol termasuk ke dalam kelompok alkohol primer karena gugus hidroksilnya terikat pada atom C primer yaitu atom C yang hanya terikat pada satu atom C lainnya (Fessenden & Fessenden 1995: 261 & 264; Gambar 2.3.1). Gugus hidroksil pada etanol bersifat toksik setelah mengalami metabolisme di dalam tubuh dan berubah menjadi radikal bebas (Sutarni 2005: 50).



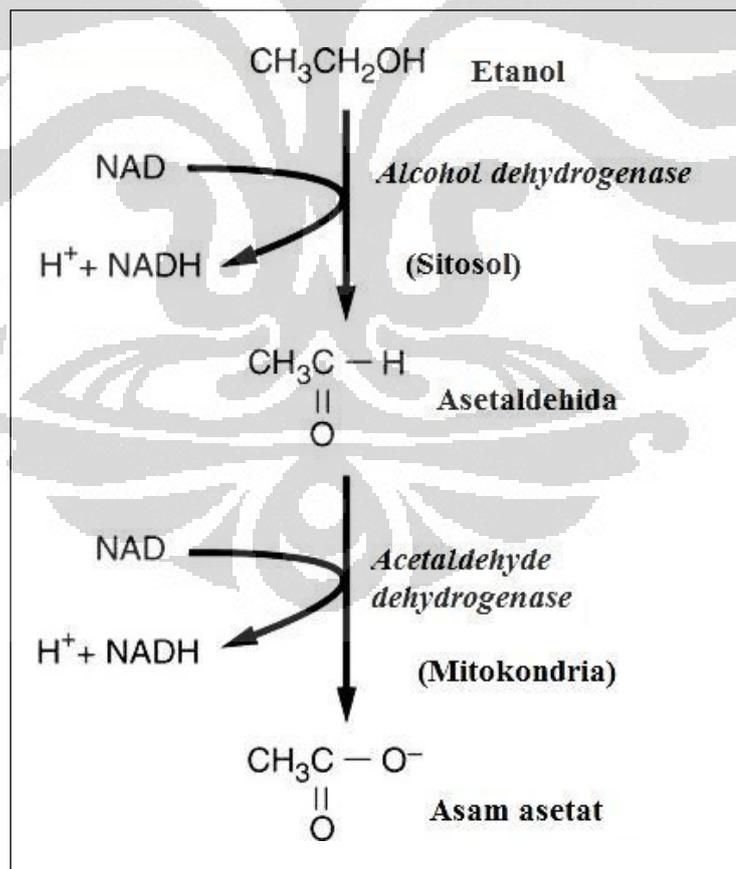
Gambar 2.3.1. Struktur kimia etanol

[Sumber: Cotton 2006: 1.]

Etanol diserap oleh usus halus setelah masuk ke dalam tubuh. Menurut Riveros-Rosas *dkk.* (1997: 455), setelah diabsorpsi oleh usus halus, etanol akan disalurkan menuju hati melalui vena portalis dan kemudian menuju jantung, paru-paru, dan pembuluh arteri melalui vena cava inferior. Etanol disebar ke cairan tubuh secara menyeluruh. Molekul-molekul etanol dengan cepat dapat menembus sawar darah-otak menuju susunan saraf pusat. Kurang dari 10% dari etanol yang masuk ke dalam tubuh akan dikeluarkan seperti bentuk semula melalui hembusan

napas, keringat, air seni, dan feses. Sisanya mengalami metabolisme dalam tubuh (Barry 1977: 94).

Tahap pertama metabolisme etanol (Gambar 2.3.2) dalam tubuh yaitu etanol dioksidasi menjadi asetaldehida oleh enzim *alcohol dehydrogenase* (ADH) dengan kofaktor *nicotinamide adenine dinucleotide* (NAD^+). Pada tahap kedua, asetaldehida diubah menjadi asam asetat yang kemudian menjadi CO_2 dan H_2O oleh enzim *acetaldehyde dehydrogenase* (ALDH) (Wu & Cederbaum 2003: 279; Koolman & Roehm 2005: 320; Sutarni 2005: 57). Hati merupakan tempat pembentukan enzim *alcohol dehydrogenase* sehingga reaksi oksidasi etanol menjadi asetaldehida hanya terjadi di dalam hati. Namun, oksidasi asetaldehida menjadi asam asetat tidak terjadi hanya di dalam hati, tetapi juga pada organ-organ lainnya di seluruh tubuh seperti otak (Barry 1977: 95).



Gambar 2.3.2. Metabolisme Etanol

[Sumber: Gramenzi *dkk.* 2006: 1, diterjemahkan sesuai aslinya.]

Metabolisme etanol dalam tubuh dapat menghasilkan senyawa radikal bebas, antara lain radikal hidroksil ($\cdot\text{OH}$), radikal hidroksietil ($\text{CH}_3\text{C}\cdot\text{HOH}$), dan radikal metil karbonil ($\text{CH}_3\text{C}\cdot=\text{O}$). Senyawa-senyawa radikal bebas tersebut dapat mengakibatkan kerusakan pada sel bahkan organ tubuh (Albano 2000: 240). Kerusakan tersebut dapat mengganggu sistem-sistem dalam tubuh, misalnya sistem endokrin antara lain hipotalamus, hipofisis, dan gonad (Emanuele & Emanuele 1998: 199 & 200).

Metabolisme etanol dapat memengaruhi sistem reproduksi jantan, seperti pada organ testis dan epididimis. Penelitian El-Sokkary *dkk.* (1999: 842) membuktikan bahwa pemberian etanol (dosis 3 g/kg bb) selama 30 hari berturut-turut dapat meningkatkan peroksidasi lipid (MDA) di organ testis pada tikus jantan. Sementara itu, penelitian Kasdallah-Grissa *dkk.* (2006: 236) juga menunjukkan bahwa metabolisme etanol dapat meningkatkan peroksidasi lipid (TBA) di organ testis setelah pemberian etanol (dosis 3 g/kg bb) selama enam minggu berturut-turut pada tikus jantan. Hal tersebut dikarenakan membran testis mengandung banyak asam lemak yang rentan teroksidasi (El-Sokkary *dkk.* 1999: 846).

Gangguan akibat metabolisme etanol pada organ-organ reproduksi dapat mengganggu proses yang terjadi didalam organ-organ tersebut. Penelitian Maneesh *dkk.* (2005: 63) menunjukkan hasil bahwa induksi etanol selama empat minggu berturut-turut pada tikus jantan dapat mengganggu proses spermatogenesis dan menurunkan berat testis. Testis merupakan salah satu organ reproduksi penghasil spermatozoa sehingga gangguan pada testis dapat menurunkan kualitas spermatozoa. Hal tersebut dibuktikan oleh penelitian Ganaraja *dkk.* (2008: 3) bahwa pemberian etanol (dosis 2 g/kg bb) selama 14 hari berturut-turut pada mencit jantan dapat menurunkan jumlah konsentrasi spermatozoa dan meningkatkan abnormalitas spermatozoa.

2.4. Antioksidan

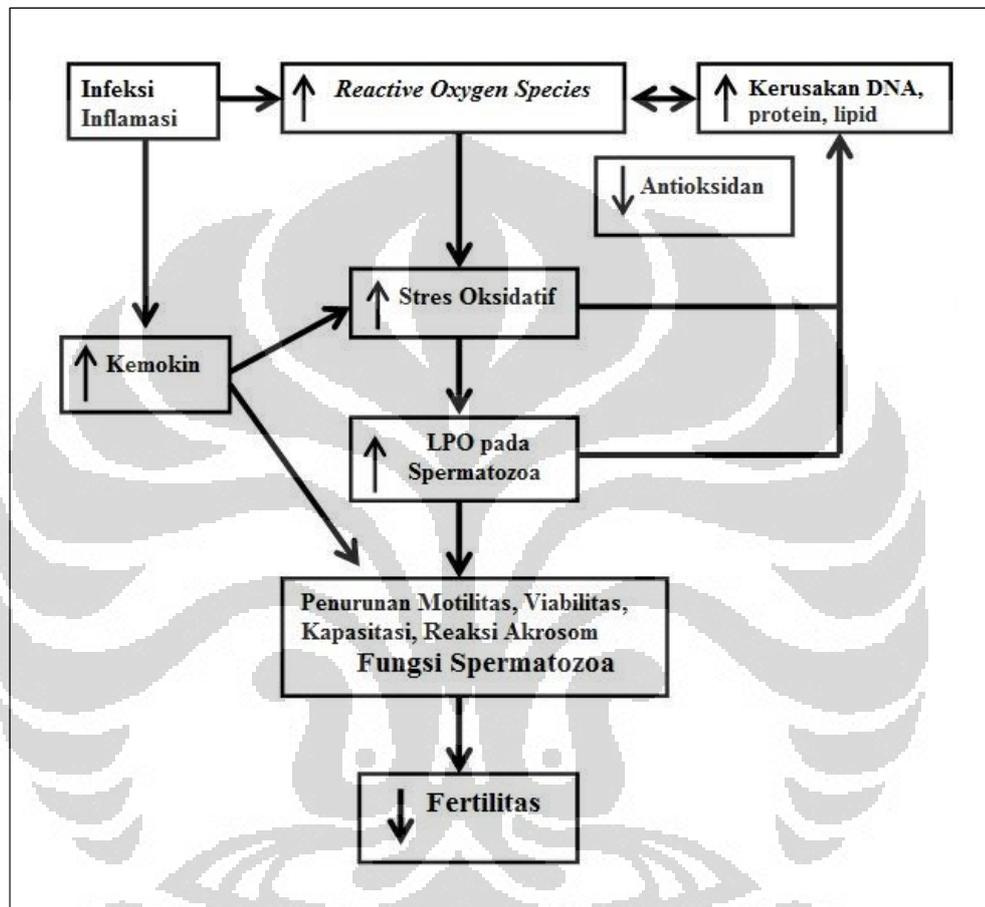
Antioksidan merupakan senyawa yang dapat melindungi sel dari serangan radikal bebas (Percival 1996: 1; Usuh *dkk.* 2005: 135). Hal tersebut dikarenakan

senyawa antioksidan dapat memberikan elektronnya kepada senyawa radikal bebas sehingga menghambat reaksi oksidasi (Percival 1996: 1). Selain dapat mencegah terbentuknya radikal bebas, antioksidan juga dapat memperlambat reaksi oksidasi (Suherman 2001: 15) bahkan dapat mengurangi (*quenching*) dan memperbaiki kerusakan oksidatif akibat radikal bebas (Gutteridge 1995: 1825; Winarsi 2007: 20; Gambar 2.4). Keseimbangan radikal bebas dan antioksidan dalam tubuh sangat penting terutama untuk menjaga integritas dan berfungsinya membran lipid, protein sel, dan asam nukleat (Winarsi 2007: 20).

Berdasarkan sumbernya, antioksidan dapat dibagi menjadi tiga, yaitu antioksidan primer, sekunder, dan tersier. Antioksidan primer adalah antioksidan yang dibuat sendiri oleh tubuh sehingga disebut juga antioksidan internal. Antioksidan tersebut berfungsi mencegah pembentukan senyawa radikal bebas yang baru. Contoh antioksidan primer adalah *superoxide dismutase* (SOD) dan katalase. Antioksidan sekunder merupakan antioksidan yang didapat dari luar tubuh (makanan) sehingga disebut juga antioksidan eksternal. Antioksidan tersebut berfungsi menangkap (*scavenging*) radikal bebas dan menghentikan pembentukan radikal bebas. Contoh antioksidan sekunder adalah vitamin A, C, dan E, mineral (selenium, zink, tembaga, mangan), polifenol, dan antioksidan lain yang banyak ditemukan pada buah dan sayur. Antioksidan tersier merupakan antioksidan yang berfungsi melakukan perbaikan, contohnya *Methionin Supoxide Reductase* (Hidajat 2005: 6; Winarsi 2007: 79--81).

Tanaman masih merupakan sumber utama dalam pencarian bahan antioksidan sehingga pemanfaatan bahan tanaman masih merupakan prioritas untuk diteliti (Nurhuda *dkk.* 1995, lihat Rusmiati 2007: 64). Kelebihan antioksidan dari bahan tanaman sebagai obat tradisional antara lain memiliki efek samping yang kecil bila dibandingkan dengan obat sintetik (Direktorat Pengawasan Obat Tradisionil 1983: 4--6). Selain itu, obat tradisional dipilih sebagai obat untuk menyembuhkan karena harganya terjangkau dan mudah diperoleh (Subramanian *dkk.* 2006: 178). Tanaman yang diketahui memiliki potensi sebagai antioksidan antara lain *Ocimum basilicum* atau kemangi; *Orthosiphon stamineus* atau kumis kucing (Zakaria *dkk.* 2008: 4); *Cormus mas* atau ceri (Pantelidis *dkk.* 2007: 777); dan *Zingiber officinale* atau jahe (Rai *dkk.*

1999: 79; Amin *dkk.* 2008: 291). Tanaman-tanaman tersebut memiliki komponen utama senyawa polifenol, vitamin C, serta karotenoid dan diketahui dapat bersifat sebagai antioksidan (Percival 1996: 2 & 3).



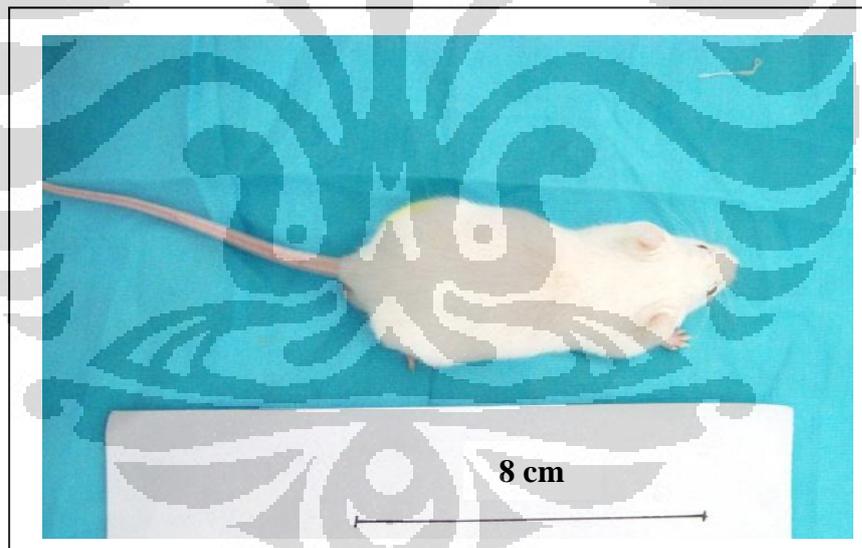
Gambar 2.4. Bagan arus pengaruh ROS terhadap fertilitas
[Sumber: Sikka 1995: 465, diterjemahkan sesuai aslinya dan modifikasi.]

2.5. Mencit (*Mus musculus L.*) Jantan

Mencit (*Mus musculus L.*) adalah hewan pengerat (*rodentia*) yang sering digunakan sebagai hewan percobaan (Tabakoff & Hoffman 2000: 78; Gambar 2.5). Pemilihan mencit sebagai hewan percobaan karena cepat berkembang biak, memiliki masa kehamilan yang singkat (19--21 hari), mudah dipelihara dalam

jumlah banyak, variasi genetiknya cukup besar, serta sifat anatomis dan fisiologisnya telah terkarakterisasi dengan baik. Organ reproduksi mencit jantan hampir sama dengan manusia. Hormon yang berperan dalam sistem reproduksi mencit jantan sama seperti pada pria dewasa (Smith & Mangkoewidjojo 1988: 10-12 & 20; Malole & Pramono 1989: 94, 96, & 102). Selain itu, mencit lebih sensitif terhadap efek farmakologis alkohol (etanol) dibandingkan hewan pengerat yang lain (Tabakoff & Hoffman 2000: 83).

Berat badan mencit jantan dewasa adalah 20--40 gram, sedangkan mencit betina dewasa berkisar antara 18--35 gram. Mencit jantan mencapai kematangan seksual dalam usia lima sampai tujuh minggu, sedangkan pada mencit betina dalam usia tiga minggu. Seekor mencit dewasa membutuhkan 15 gram makanan dan 15 ml minuman dalam satu hari per 100 gram berat badan (Malole & Pramono 1989: 94, 96 & 99).



Gambar 2.5. Mencit (*Mus musculus* L.) jantan galur DDY
[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

2.6. Sistem Reproduksi Jantan

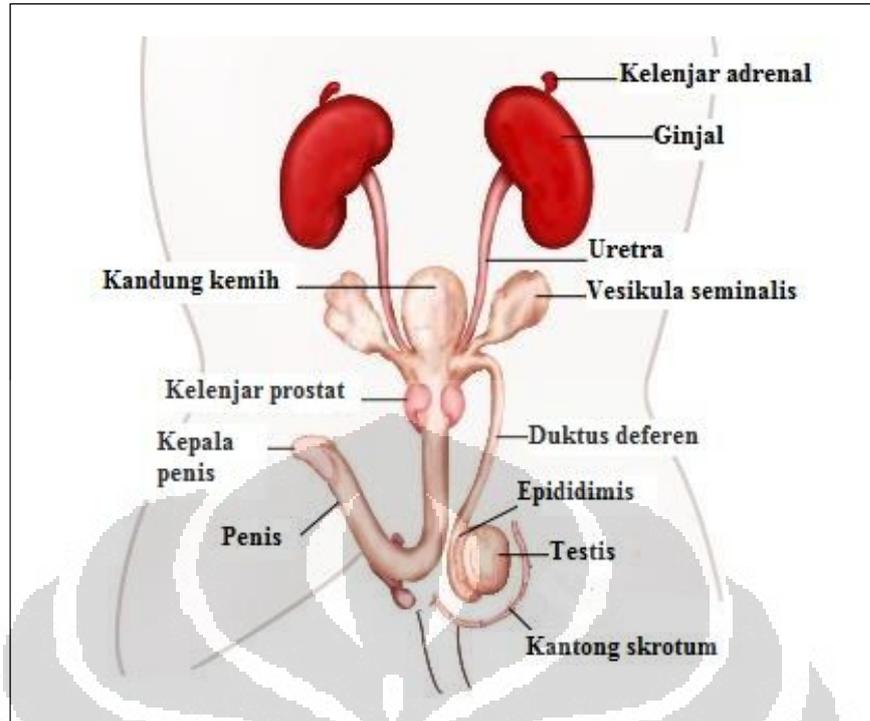
Sistem reproduksi jantan terdiri atas testis, sistem duktus, kelenjar aksesoris, dan penis (Rugh 1968: 7--24; Junquiera & Carneiro 1980: 444; Leeson *dkk.* 1996: 511). Sistem reproduksi tikus dan mencit jantan ditunjukkan oleh Gambar 2.6.

2.6.1. Testis

Testis merupakan kelenjar ganda, karena secara fungsional testis bersifat eksokrin dan endokrin. Testis bersifat eksokrin atau reproduksi karena menghasilkan sel kelamin atau spermatozoa. Testis juga bersifat endokrin atau hormonal karena menghasilkan hormon androgen (Junquiera & Carneiro 1980: 444; Leeson *dkk.* 1996: 511; Nalbandov 1990: 42).

Testis merupakan organ berbentuk oval dan berjumlah dua buah yang berukuran sama besar (Toelihere 1977: 68). Menurut Junquiera & Carneiro (1980: 445), testis manusia dewasa memiliki panjang antara 4,1--5,2 cm dan lebar 2,5--3,3 cm, sedangkan testis tikus dewasa memiliki panjang rerata 4,6 cm dengan diameter 2,6 cm. Testis pada semua jenis (spesies) berkembang di dekat ginjal. Pada mamalia, testis berada dalam kantong skrotum yang terletak diluar abdomen. Kantong tersebut mengandung sel-sel otot yang mampu berkontraksi. Fungsi utama skrotum adalah untuk memberikan kepada testis suatu lingkungan yang memiliki 13,3--17,2 °C lebih dingin dibandingkan temperatur rongga tubuh (Nalbandov 1990: 42--45).

Menurut Leeson *dkk.* (1996: 511), testis terdiri dari tiga lapisan, yaitu tunika vaginalis, tunika albuginea, dan tunika vaskulosa. Tunika vaginalis merupakan lapisan terluar yang menutupi permukaan lateral dan anterior testis (Junquiera & Carneiro 1980: 445). Lapisan tersebut terletak diatas lamina basalis yang memisahkannya dengan tunika albuginea. Tunika albuginea menebal pada permukaan posterior testis dan menjorok masuk kedalam testis sebagai mediastinum testis atau lapisan tengah. Tunika vaskulosa merupakan lapisan terdalam yang terbenam didalam jaringan ikat karang (Leeson *dkk.* 1996: 511).



Gambar 2.6. Sistem reproduksi mencit (*Mus musculus L.*) jantan
[Sumber: TutorVista 2010: 1, diterjemahkan sesuai aslinya.]

Mediastinum testis membagi testis menjadi sekitar 250 ruang-ruang piramidal yang dinamakan lobulus testis. Sekat antara lobulus tersebut tidak sempurna sehingga seringkali terbentuk hubungan antara lobulus-lobulus (Junquiera & Carneiro 1980: 444; Leeson *dkk.* 1996: 511). Tiap-tiap lobulus terdiri dari 1--4 tubulus seminiferus. Tubulus seminiferus merupakan saluran berkelok dengan diameter lebih kurang 150--250 μm dan panjang 30--70 cm. Tubulus seminiferus merupakan tempat terjadinya spermatogenesis. Pada ujung apikal tiap-tiap tubulus terdapat lumen yang menyempit sehingga disebut tubulus rektus. Tubulus tersebut menghubungkan antara tubulus seminiferus dengan rete testis yang kemudian dihubungkan dengan duktus efferen (Junquiera & Carneiro 1980: 444 & 445).

Tubulus seminiferus terdiri atas tunika propria fibrosa, lamina basalis, dan epitel germinativum. Tunika propria fibrosa merupakan lapisan fibroblas yang terletak diatas lamina basalis (Junquiera & Carneiro 1980: 445). Lapisan tersebut terdiri atas sel-sel mioid yang dapat mengubah diameter tubulus seminiferus dan membantu gerakan spermatozoa sepanjang tubulus. Epitel germinativum

memiliki dua jenis sel, yaitu sel spermatogenik dan sel Sertoli. Sel spermatogenik akan mengalami diferensiasi menjadi sel spermatozoa. Sel Sertoli atau sel penyokong berperan dalam memberi nutrisi bagi perkembangan spermatozoa (Leeson *dkk.* 1996: 512).

Selain kedua sel tersebut, terdapat sel interstisial atau sel Leydig yang terdapat di antara tubulus seminiferus. Sel-sel tersebut berukuran besar dengan sitoplasma yang banyak terdapat lipid (Leeson *dkk.* 1996: 523 & 524). Sel Leydig berfungsi sebagai penghasil hormon testosteron, yaitu hormon yang berperan dalam spermatogenesis (Yatim 1988: 32).

2.6.2. Sistem duktus

Sistem duktus terdiri dari rete testis, duktus eferen, epididimis, dan duktus deferens. Rete testis menghubungkan antara tubulus seminiferus dan duktus eferen. Duktus eferen membentuk tiga hingga tujuh saluran menuju epididimis. Duktus tersebut dan bagian awal epididimis membentuk kaput epididimis (Rugh 1968: 22).

Epididimis terletak di bagian dorsolateral testis dan memanjang dari kranial ke kaudal testis. Epididimis terdiri atas dua duktus, yaitu duktus eferen dan duktus epididimis. Panjang duktus pada manusia berkisar antara 5--6 m. Epididimis terdiri dari tiga bagian yaitu kaput (kepala), korpus (badan), dan kauda (ekor). Bagian kaput dan korpus berfungsi sebagai tempat pematangan spermatozoa dan reabsorpsi air, sedangkan bagian kauda berfungsi sebagai tempat penyimpanan spermatozoa (Hafez & Prasad 1976: 33).

Epididimis menyalurkan spermatozoa dan cairan dari testis ke duktus deferens (Holstein 1976: 24). Duktus deferens merupakan saluran yang berfungsi mengangkut spermatozoa dari kauda epididimis ke uretra. Duktus tersebut memiliki dinding yang mengandung otot-otot yang berperan penting dalam mekanisme pengangkutan semen saat ejakulasi (Moeloeck 1994: 13).

2.6.3. Kelenjar aksesori

Kelenjar aksesori terdiri atas kelenjar vesikula seminalis, kelenjar prostat, dan kelenjar bulbouretra (Cowper) (Junquiera & Carneiro 1980: 456; Campbell *dkk.* 2004: 156). Selain itu, terdapat juga kelenjar ampula dan kelenjar preputial. Kelenjar-kelenjar tersebut berfungsi membuat cairan semen agar sperma dapat bergerak aktif dan hidup dalam waktu tertentu (Nalbandov 1990: 52).

Kelenjar vesikula seminalis pada mencit berjumlah sepasang dan terletak di atas kelenjar prostat (Rugh 1968: 22 & 23). Kelenjar tersebut mensekresikan cairan kental berwarna kekuning-kuningan, kental, dan bersifat alkalis (basa). Cairan tersebut mengandung fruktosa yang menyediakan sebagian besar energi untuk sperma (Campbell *dkk.* 2004: 156). Fruktosa juga berfungsi sebagai substrat metabolisme bagi spermatozoa bersama senyawa lainnya seperti glukosa, asam amino, vitamin C, dan prostaglandin (Ross *dkk.* 1995: 662).

Kelenjar prostat pada mencit berjumlah sepasang dan terletak di bawah kelenjar vesikula seminalis (Rugh 1968: 23). Kelenjar tersebut mensekresikan cairan yang mengandung enzim antikoagulan dan asam sitrat (Campbell *dkk.* 2004: 156). Kelenjar Cowper mencit terletak di bawah kulit bagian atas penis (Rugh 1968: 23). Kelenjar tersebut menghasilkan cairan bening dan kental yang mengandung penggumpal yang berperan dalam pembentukan sumbat vagina (Eddy 1988: 57).

2.6.4. Alat kelamin luar (penis)

Alat kelamin luar atau organ kopulasi mencit adalah penis. Penis berfungsi sebagai alat pengeluaran urin dan perletakkan semen ke dalam saluran reproduksi betina (Moeloek 1994: 13). Penis mencit terdiri dari korpus kavernosum, korpus spongiosum, dan kepala penis. Korpus kavernosum diselubungi oleh tunika albuginea, yaitu suatu selaput fibrosa tebal berwarna putih, dan membentuk badan penis. Kepala penis adalah bagian ujung dari penis yang ditutupi oleh preputium (Rugh 1968: 23).

2.7 Spermatogenesis

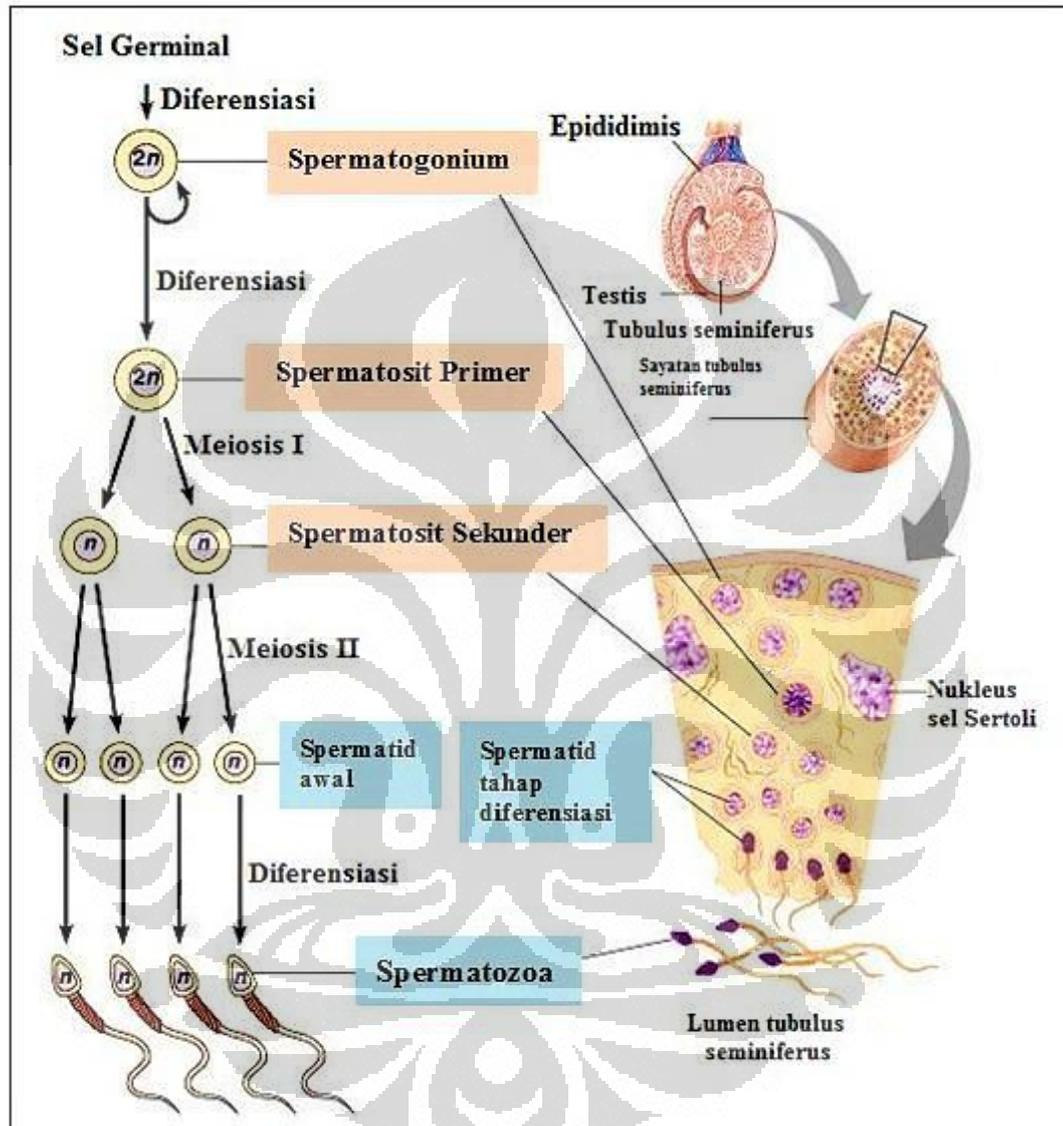
Spermatogenesis merupakan suatu proses proliferasi dan diferensiasi sel spermatogonia menjadi spermatozoa yang terjadi di dalam tubulus seminiferus (Moeloeok 1994: 13). Menurut Rugh (1968: 12 & 22), spermatogenesis mencit berlangsung lebih kurang $8,63 \pm 0,25$ hari untuk satu siklus epitel seminiferus. Spermatogenesis mencit berlangsung selama empat siklus epitel seminiferus, sehingga keseluruhan proses spermatogenesis membutuhkan waktu lebih kurang 35,5 hari. Waktu tersebut terdiri atas 8 hari untuk perubahan sel spermatogonia A menjadi spermatosit primer; 12,5 hari untuk perubahan meiosis spermatosit primer dan sekunder; 9,5 hari untuk fase spermatid; dan 5,5 hari untuk fase pematangan.

Spermatogenesis pada mencit pada dasarnya sama seperti pada mamalia lainnya (Rugh 1968: 21; Gambar 2.7). Spermatogenesis terbagi menjadi tiga tahap utama, yaitu spermatositogenesis, meiosis, dan spermiogenesis. Spermatositogenesis merupakan proses pembelahan mitosis dari sel spermatogonia A menjadi spermatogonia B. Masing-masing spermatogonia B akan bermitosis menjadi spermatosit primer (Burger *dkk.* 1976: 5--7).

Pada tahap kedua, spermatosit primer mengalami pembelahan meiosis menjadi spermatosit sekunder. Spermatosit sekunder segera mengalami pembelahan meiosis membentuk spermatid yang haploid. Maka, tiap spermatosit primer dapat menghasilkan empat spermatid. Tiap spermatid tersebut kemudian masuk menuju tahap spermiogenesis (Johnson & Everitt 2000: 55--57).

Spermiogenesis adalah tahap perkembangan spermatid menjadi spermatozoa. Perkembangan tersebut antara lain perubahan bentuk dan komposisi spermatid, dari bulat menjadi bentuk seperti berudu yang memiliki kepala, leher, dan ekor (Moeloeok 1994: 14). Spermiogenesis pada mencit memiliki 16 tahap berdasarkan perubahan pada akrosom dan nukleus. Tahapan tersebut dibagi menjadi empat fase, yaitu fase golgi (tahap 1--3), fase tudung (tahap 4--7), fase akrosom (tahap 8--12), dan fase pematangan (tahap 13--16) (Rugh 1968: 8--12). Setelah spermiogenesis kemudian dilanjutkan ke tahap spermiasi yaitu proses

dilepaskannya spermatozoa ke dalam lumen tubulus seminiferus (Yatim 1988: 50).



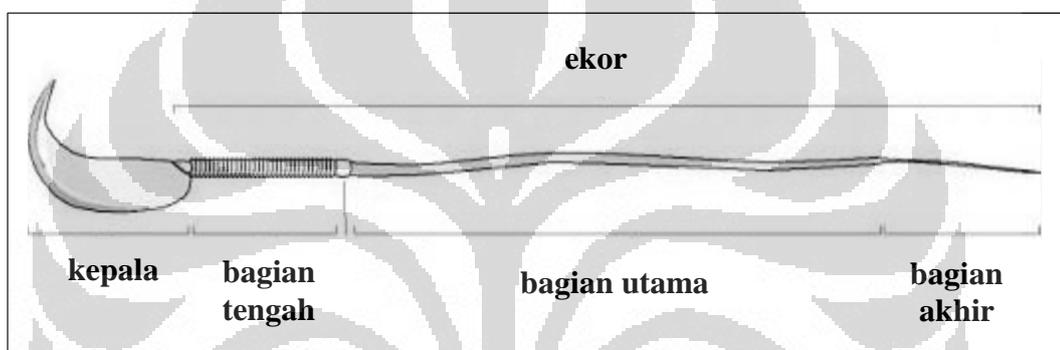
Gambar 2.7. Spermatogenesis

[Sumber: Campbell dkk. 2003: 161, diterjemahkan sesuai aslinya.]

2.8. Spermatozoa dan Proses Pematangan di Epididimis

2.8.1. Spermatozoa

Spermatozoa terdiri atas bagian kepala, leher, dan ekor. Panjang keseluruhan spermatozoa manusia kurang lebih 55 μm dengan bagian kepala berbentuk bulat. Pada mencit, panjang keseluruhan spermatozoa kurang lebih 1,226 μm dengan bagian kepala berbentuk kait (Rugh 1968: 21; Gambar 2.8.1).



Gambar 2.8.1. Spermatozoa mencit (*Mus musculus* L.) jantan
[Sumber: Kwitny, *dkk.* 2010: 670, diterjemahkan sesuai aslinya.]

Bagian kepala spermatozoa diselubungi oleh tudung protoplasmik atau galea kapitis (Nalbandov 1990: 262). Bagian kepala spermatozoa tersebut terdiri atas inti (nukleus) dan akrosom (Browder 1984: 222). Inti dari kepala spermatozoa berisi materi genetik (DNA) yang berupa kromatin padat yang terkondensasi selama tahapan spermatogenesis (*lihat* Ramadhani 2007: 14 & 15).

Akrosom merupakan selubung yang menutupi kurang lebih dua pertiga bagian anterior kepala spermatozoa (Pedersen & Fawcett 1976: 66). Akrosom mengandung sejumlah enzim yang penting untuk fertilisasi, yaitu enzim hialuronidase, *corona penetrating enzyme* (CPE), dan akrosin. Enzim hialuronidase berfungsi untuk menembus *cumulus oophorus* yaitu lapisan terluar ovum. *Corona penetrating enzyme* (CPE) berfungsi untuk menembus *corona radiata* yaitu lapisan tengah ovum. Akrosin berfungsi untuk menembus zona pelusida yaitu lapisan dalam ovum (Zaneveld & Polakoski 1976: 169--171).

2.8.2. Proses pematangan di epididimis

Spermatozoa mengalami pematangan di epididimis baik secara morfologi, fisiologi, biokimia, maupun metabolisme. Perubahan morfologi antara lain proses hilangnya *cytoplasmic droplet* pada spermatozoa. *Cytoplasmic droplet* adalah sisa sitoplasma yang masih berada di spermatozoa (Hafez & Prasad 1976: 31). Menurut Purwaningsih (1996: 58), masih adanya *cytoplasmic droplet* menunjukkan spermatozoa tersebut belum matang dan dapat menyebabkan penurunan fertilitas spermatozoa.

Perubahan fisiologi antara lain pematangan kemampuan spermatozoa dalam memfertilisasi sel telur. Pematangan tersebut ditandai dengan perubahan bentuk permukaan akrosom dan kapasitas motilitas progresif. Sementara itu, perubahan biokimia yaitu sel prinsipal epididimis menyekresikan lipid dalam fosfolipid yang diperlukan untuk proses pematangan spermatozoa (Hafez & Prasad 1976: 33 & 35). Lipid akan dikatabolisme untuk menjadi sumber energi yaitu *adenosin triphosphate* (ATP) yang berperan dalam pergerakan spermatozoa (Yatim 1988: 58).

2.9. Analisis Semen

Spermatozoa dalam tubulus seminiferus bagian proksimal tidak dapat bergerak. Spermatozoa tersebut kemudian dapat bergerak dan menjadi aktif mengadakan metabolisme setelah tersuspensi dalam cairan yang berasal dari kelenjar aksesori. Campuran spermatozoa dan cairan kelenjar aksesori tersebut disebut semen. Semen mempunyai dua fungsi utama, yaitu sebagai medium pelarut dan sebagai pengaktif bagi spermatozoa yang mula-mula tidak dapat bergerak (Nalbandov 1990: 53 & 262).

Analisis semen adalah langkah awal dalam mengevaluasi infertilitas pria (Freund & Peterson 1976: 344). *World Health Organization* (WHO) telah menetapkan bahwa analisis semen digunakan sebagai standar pemeriksaan kualitas semen seorang pria (*lihat* Ramadhani 2007: 22). Menurut Purwaningsih (1997: 78), analisis semen juga dapat digunakan untuk mengetahui kualitas semen

setelah dibekukan, kualitas semen untuk fertilisasi *in vitro*, inseminasi buatan, dan kualitas semen setelah vasektomi.

Analisis semen terdiri atas pemeriksaan makroskopik dan mikroskopik. Pemeriksaan makroskopik antara lain pemeriksaan warna, pengukuran volume, dan pengukuran pH. Pemeriksaan mikroskopik antara lain penghitungan konsentrasi, persentase abnormalitas, persentase motilitas, dan viabilitas spermatozoa (WHO 1988: 5--14).

2.9.1. Motilitas spermatozoa

Motilitas spermatozoa adalah kualitas gerak spermatozoa yang meliputi tipe pergerakan spermatozoa dan kecepatan gerak spermatozoa (Hartanto 1985: 165). Penilaian motilitas berdasarkan WHO (1988: 6 & 7) dilakukan dengan menghitung spermatozoa yang termasuk kategori motil yaitu jika spermatozoa bergerak cepat lurus ke depan, bergerak lambat atau tidak lurus, dan bergerak di tempat. Hasil penilaian tersebut dinyatakan dalam persentase yang menunjukkan jumlah spermatozoa motil. Seorang pria termasuk infertil apabila memiliki persentase motilitas spermatozoa kurang dari 40% atau yang disebut dengan asthenozoospermia (WHO 1988: 7 & 32).

2.9.2. Viabilitas spermatozoa

Viabilitas spermatozoa adalah proporsi spermatozoa hidup dalam semen. Penilaian viabilitas dilakukan dengan prinsip pewarnaan supravital yaitu sel mati memiliki membran sel yang rusak sehingga dapat dimasuki zat warna. Pewarnaan supravital tersebut terdiri dari dua cara yaitu pewarnaan pada sediaan basah dengan menggunakan larutan Eosin dan pewarnaan pada sediaan kering dengan menggunakan larutan kombinasi nigrosin Eosin. Banyaknya spermatozoa hidup tetapi tidak motil dapat menunjukkan adanya kelainan struktur pada flagel spermatozoa (WHO 1988: 10).

2.9.3 Konsentrasi spermatozoa

Menurut Freund & Peterson (1976: 349), semen seorang pria dianggap normal apabila konsentrasi spermatozoa lebih dari 20 juta per ml. Seorang pria dianggap infertil apabila konsentrasi spermatozoa kurang dari 20 juta per ml atau disebut oligozoospermia. Jumlah normal spermatozoa pada mencit yaitu sebesar ± 50 juta/ml (*lihat* Ramadhani 2007: 25 & 26).

2.9.4. Morfologi spermatozoa

Penyimpangan dari spermatozoa normal dianggap sebagai abnormalitas (Nalbandov 1990: 263). Abnormalitas dapat berupa abnormalitas primer dan sekunder. Abnormalitas primer terjadi pada spermatogenesis, antara lain kepala besar, kepala kecil, kepala rangkap, ekor rangkap, dan ekor menggulung. Abnormalitas sekunder terjadi pada proses pematangan di epididimis, antara lain masih terdapatnya *cytoplasmic droplet* pada spermatozoa. Menurut Hartamto (1985: 165), spermatozoa dianggap fertil apabila memiliki spermatozoa abnormal dibawah 40%. Morfologi spermatozoa normal yang kurang dari 50% disebut teratozoospermia (WHO 1988: 33).

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biologi Reproduksi dan Perkembangan Departemen Biologi FMIPA UI, Depok selama lebih kurang 9 bulan dari bulan Juni 2010 sampai bulan Maret 2011.

3.2. Bahan

3.2.1. Bahan uji

Bahan uji yang digunakan yaitu kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) yang diperoleh dari Balai Penelitian Tanaman Obat dan Aromatik (Balitro), Jalan Tentara Pelajar nomor 3A, Bogor. Tanaman *H. sabdariffa* L. diidentifikasi di Laboratorium Herbarium Bogoriense LIPI, Jalan Raya Jakarta-Bogor km. 46, Cibinong, Bogor.

3.2.2. Hewan uji

Hewan uji yang digunakan adalah 25 ekor mencit (*Mus musculus* L.) jantan berumur sekitar 3 bulan dengan berat \pm 30--40 gram. Hewan uji diperoleh dari bagian Nonruminansia dan Satwa Harapan, Institut Pertanian Bogor (IPB), Bogor, Jawa Barat.

3.2.3. Makanan dan minuman hewan uji

Makanan hewan uji berupa pakan berbentuk pelet yang diperoleh dari C.V. Kasman, Jalan Bentengan Komplek Kesehatan Blok C1/8, Sunter Jaya, Jakarta Utara. Bahan dasar pakan hewan uji yaitu bungkil kedelai, bungkil kelapa, susu (*skim milk*), jagung halus, garam, minyak kelapa, tapioka, tepung

ikan, tepung rumput, tepung terigu, CaCO_3 , CaHPO_4 , premix, dan lisin. Persentase komposisi bahan dasar pakan mencit setiap 100 g yaitu protein (23,1680%), abu (7,6850%), lemak (3,8775%), serat kasar (2,1630%), dan fosfor (1,7530%) (Balai Penelitian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan Bogor). Minuman hewan uji adalah air matang yang diberikan melalui botol yang diletakkan di atas kandang mencit.

3.2.4. Bahan-bahan kimia

Bahan kimia yang digunakan antara lain etanol absolut p.a. [Merck], asam pikrat, natrium klorida, natrium trisitat, Eosin-Y, dinatrium hidrogen fosfat dihidrat, larutan Giemsa, larutan George, formalin 40 %, metanol 96 %, dan akuades.

3.3. Peralatan

3.3.1. Pemeliharaan mencit

Alat yang digunakan dalam pemeliharaan mencit antara lain kandang mencit berupa bak plastik berukuran $(35 \times 30 \times 12) \text{ cm}^3$ yang diberi serutan gergaji sebagai alas; tutup kandang terbuat dari anyaman kawat dengan jarak anyaman 0,5 cm; *exhaust fan*; timbangan digital, lampu fluoresens, dan botol minuman.

3.3.2. Pembuatan infus simplisia rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.)

Alat yang digunakan dalam pembuatan infus simplisia *H. sabdariffa* L. antara lain blender, labu takar 100 ml, gelas kimia 500 ml, labu Erlenmeyer 1000 ml, termometer, corong kaca, gelas ukur, *aluminium foil*, penangas air, timbangan digital [Precisa], batang pengaduk, dan kertas saring.

3.3.3. Pemberian pencekokan dan penyuntikan mencit

Alat yang digunakan dalam pemberian suspensi secara oral yaitu jarum cekok (*gavage needle*) dan *disposable syringe* 1 ml [Terumo].

3.3.4. Pengambilan data kualitas spermatozoa

Alat yang digunakan dalam pengambilan data kualitas spermatozoa antara lain papan bedah, hemasitometer *Improved Neubauer*, *dissecting set*, kaca objek, kaca penutup, cawan petri, pipet mikro, gelas kimia, mikroskop medan terang, *counter*, kamera digital [Kodak], tisu, dan alat tulis menulis.

3.4. Cara Kerja

3.4.1. Rancangan penelitian

Penelitian yang dilakukan bersifat eksperimental, menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Rancangan Acak Lengkap digunakan karena unit eksperimental bersifat homogen. Perlakuan dilakukan secara acak dengan 5 perlakuan dan 5 kali ulangan. Jumlah perlakuan dan ulangan dibuat berdasarkan rumus Freederer, yaitu $(t-1)(n-1) \geq 15$, dengan t adalah jumlah perlakuan dan n adalah jumlah ulangan (Hanafiah 1997: 6). Setiap kelompok eksperimen ditempatkan pada kandang berukuran $(35 \times 30 \times 12)$ cm³. Perlakuan terhadap 25 ekor mencit dibagi atas lima perlakuan yaitu:

- a. Kelompok kontrol normal (KK1) hanya diberi perlakuan akuades selama 14 hari berturut-turut
- b. Kelompok kontrol perlakuan (KK2) diberi akuades secara oral selama tujuh hari pertama dan tujuh hari kedua diberi akuades secara oral serta penyuntikan etanol (dosis 2,8 g/kg bb)
- c. Kelompok perlakuan pertama (KP1) diberi infus simplisia *H. sabdariffa* L. 1,5% secara oral selama tujuh hari pertama dan tujuh hari kedua diberi infus simplisia *H. sabdariffa* L. 1,5% secara oral serta penyuntikan etanol

- d. Kelompok perlakuan kedua (KP2) diberi infus simplisia *H. sabdariffa* L. 3% secara oral selama tujuh hari pertama dan tujuh hari kedua diberi infus simplisia *H. sabdariffa* L. 3% secara oral serta penyuntikan etanol
- e. Kelompok perlakuan kedua (KP3) diberi infus simplisia *H. sabdariffa* L. 6% secara oral selama tujuh hari pertama dan tujuh hari kedua diberi infus simplisia *H. sabdariffa* L. 6% secara oral serta penyuntikan etanol

3.4.2. Pemeliharaan mencit (*Mus musculus* L.)

Mencit jantan sebanyak 25 ekor diadaptasikan terlebih dahulu dalam ruang kandang Laboratorium Biologi Reproduksi dan Perkembangan Departemen Biologi FMIPA UI selama lebih kurang satu minggu. Mencit diberi makan dan minum setiap hari secara *ad libitum* (tidak terbatas) dan berat mencit ditimbang setiap hari.

Kandang mencit dibersihkan 1--3 kali seminggu. Serutan gergaji dibuang setelah mencit dipindahkan kemudian kandang direndam dalam desinfektan. Kandang dicuci dengan sabun lalu dibilas dengan air hingga bersih. Alas kandang diganti dengan yang baru kemudian diletakkan pada rak-rak yang terdapat di dalam ruangan kandang Laboratorium Biologi Reproduksi dan Perkembangan Departemen Biologi FMIPA UI. Penerangan ruangan menggunakan cahaya lampu selama 12 jam setiap hari. Pertukaran udara di dalam ruangan dibantu dengan *exhaust fan*.

3.4.3. Pembuatan larutan

- a. Larutan NaCl 0,9%

Natrium klorida (NaCl) padat seberat 0,9 g dimasukkan ke dalam labu takar 100 ml kemudian ditambahkan akuades sampai volume larutan mencapai 100 ml.

- b. Larutan George

Natrium sitrat seberat 3 g dimasukkan ke dalam labu takar dan ditambahkan akuades sampai volume larutan mencapai 100 ml. Larutan

kemudian dicampur dengan 1 ml formalin 40% dan 0,6 g Eosin-Y, lalu disaring.

c. Larutan Eosin-Y 1%

Eosin-Y seberat 1 g dimasukkan ke dalam labu takar 100 ml kemudian ditambahkan akuades sampai volume larutan mencapai 100 ml.

d. Larutan 0,15 M dapar fosfat pH 6,8

Dinatrium hidrogen fosfat dihidrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) sebanyak 26,7 g dimasukkan ke dalam labu takar dan ditambahkan akuades sampai volume larutan mencapai 1000 ml (larutan I). Hal tersebut juga dilakukan terhadap 20,4 g kalium dihidrogen fosfat (KH_2PO_4) (larutan II). Larutan I dan II kemudian dicampur sampai pH mencapai 6,8.

e. Larutan Giemsa

Satu bagian larutan Giemsa dicampur dengan sepuluh bagian larutan 0,15 M dapar fosfat pH 6,8 kemudian disaring.

3.4.4. Pembuatan simplisia rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.)

Simplisia adalah bahan alami yang telah dikeringkan dan dipergunakan sebagai obat (Depkes RI 2000: 3). Kelopak bunga *H. sabdariffa* L. yang masih segar dibersihkan dari kotoran-kotoran kemudian dicuci dengan air mengalir. Pengeringan kelopak bunga dilakukan berdasarkan Maryani & Kristiana (2008: 22) yaitu dijemur tidak dibawah sinar matahari langsung. Hal tersebut bertujuan agar kualitas *H. sabdariffa* L. tetap terjaga. Kelopak bunga tersebut dilakukan proses pembalikan agar pengeringannya merata. Proses pengeringan dilakukan selama tujuh hari, dari pukul 07.00 s.d. 12.00. Kelopak kering bunga *H. sabdariffa* L. dihaluskan dengan blender dan disaring dengan ayakan sehingga diperoleh simplisia dalam bentuk serbuk.

3.4.5. Pembuatan infus simplisia rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.)

Infus adalah sediaan cair yang mengandung partikel terdispensi dalam pembawa cair dan diujikan untuk penggunaan oral (Depkes RI 1995: 18). Infus

H. sabdariffa L. dosis 1,5% dibuat dengan cara memasukkan 1,5 g simplisia *H. sabdariffa* L. ke dalam labu ukur 100 ml kemudian ditambahkan akuades ke dalam labu ukur sampai tanda batas. Larutan dipanaskan pada suhu 90 °C selama 15 menit. Setelah itu penyaringan dilakukan dengan menggunakan kain *flannel* dan kemudian ampas *H. sabdariffa* L. dibuang. Infus simplisia *H. sabdariffa* L. dosis 1,5% dapat disimpan pada suhu 4 °C.

Infus *H. sabdariffa* L. dosis 3% dibuat dengan cara memasukkan 3 g simplisia *H. sabdariffa* L. ke dalam labu ukur 100 ml kemudian ditambahkan akuades ke dalam labu ukur sampai tanda batas. Larutan dipanaskan pada suhu 90 °C selama 15 menit. Setelah itu penyaringan dilakukan dengan menggunakan kain *flannel* dan kemudian ampas *H. sabdariffa* L. dibuang. Infus simplisia *H. sabdariffa* L. dosis 3 % dapat disimpan pada suhu 4 °C.

Infus *H. sabdariffa* L. dosis 6% dibuat dengan cara memasukkan 6 g simplisia *H. sabdariffa* L. ke dalam labu ukur 100 ml kemudian ditambahkan akuades ke dalam labu ukur sampai tanda batas. Larutan dipanaskan pada suhu 90 °C selama 15 menit. Setelah itu penyaringan dilakukan dengan menggunakan kain *flannel* dan kemudian ampas *H. sabdariffa* L. dibuang. Infus simplisia *H. sabdariffa* L. dosis 6% dapat disimpan pada suhu 4 °C.

3.4.6. Perlakuan terhadap mencit

Sebelum diberi perlakuan mencit jantan diadaptasikan selama lebih kurang satu minggu. Mencit ditimbang terlebih dahulu kemudian dicekok dengan menyesuaikan volume suspensi dengan berat badan. Pemberian infus dilakukan secara oral dengan menggunakan jarum cekok sedangkan pemberian induksan dilakukan secara suntik intraperitoneal dengan menggunakan jarum suntik.

3.4.7. Pengambilan data

Mencit dikorbankan pada hari ke-15 dengan cara dislokasi *vertebrae-servicalis*. Bagian bawah kanan dan kiri ujung distal kauda epididimis sampai akhir duktus deferens diisolasi dan diletakkan dalam kaca arloji yang berisi

0,25 ml larutan NaCl 0,9%. Spermatozoa dikeluarkan dengan cara menjepit bagian ujung epididimis kemudian ditekan searah dan menjepit ujung yang lain dan menekannya searah. Proses tersebut dilakukan beberapa kali kemudian diaduk homogen.

a. Motilitas spermatozoa

Penghitungan motilitas spermatozoa dilakukan berdasarkan metode WHO tahun 1988. Sampel yang telah homogen diambil sebanyak 10 μ l dan ditetaskan pada kaca objek kemudian ditutup dengan kaca penutup.

Penghitungan dilakukan dibawah mikroskop dengan perbesaran 400 kali. Lapangan pandang diperiksa secara sistematis dan motilitas spermatozoa yang dijumpai kemudian dicatat. Kategori yang dipakai untuk klasifikasi motilitas spermatozoa yaitu:

- (a) jika spermatozoa bergerak cepat lurus ke depan
- (b) jika spermatozoa bergerak lambat atau tidak lurus
- (c) jika spermatozoa bergerak di tempat
- (d) jika spermatozoa tidak bergerak

Motilitas spermatozoa dapat diketahui dengan menghitung jumlah spermatozoa pada semua kategori dari 100 spermatozoa. Persentase motilitas spermatozoa dihitung dengan cara membagi total jumlah kategori motilitas (a+b+c) dengan total jumlah spermatozoa semua kategori (a+b+c+d) dikalikan dengan 100% (WHO 1988: 6 & 7).

b. Viabilitas spermatozoa

Larutan spermatozoa diambil sebanyak 10 μ l dengan menggunakan pipet mikro dan ditetaskan pada kaca objek. Sampel kemudian ditetesi dengan larutan Eosin-Y sebanyak 10 μ l dan ditutup dengan kaca penutup. Pengamatan dilakukan dibawah mikroskop medan terang dengan perbesaran 400 kali. Persentase jumlah spermatozoa hidup dapat diketahui dengan menghitung jumlah spermatozoa hidup dari 100 spermatozoa untuk setiap ulangan. Spermatozoa hidup tidak harus bergerak tetapi memiliki kepala berwarna hijau sedangkan yang mati berwarna merah (WHO 1988: 10).

c. Konsentrasi spermatozoa

Larutan spermatozoa diambil sebanyak 10 μ l dengan menggunakan pipet mikro. Setelah itu dilakukan pengenceran sebanyak 10 kali dengan menambahkan larutan George sebanyak 90 μ l dalam tabung mikro. Larutan spermatozoa tersebut dikocok kemudian ditetaskan ke dalam kamar hitung hemasitometer *Improved Neubauer* yang telah diberi kaca penutup.

Penghitungan dilakukan di bawah mikroskop medan terang dengan perbesaran 400 kali. Spermatozoa yang berada pada 25 kotak kecil yang digunakan untuk penghitungan sel darah merah dijumlahkan, kemudian dibagi dengan faktor koreksi hemasitometer yang ditunjukkan pada Tabel 3.4.7. Hasil pembagian tersebut merupakan jumlah spermatozoa total dalam juta/ml per ejakulat (WHO 1988: 11 & 12).

Tabel 3.4.7. Faktor koreksi untuk hemasitometer *Improved Neubauer*

| Pengenceran (semen + pengenceran) | Jumlah segi empat besar yang dicacah | | |
|--------------------------------------|--------------------------------------|-----|-----|
| | 25 | 10 | 5 |
| 1 + 9 | 10 | 4 | 2 |
| 1 + 19 | 5 | 2 | 1 |
| 1 + 49 | 2 | 0,8 | 0,4 |

[Sumber: WHO: 1988: 13.]

d. Abnormalitas spermatozoa

Larutan spermatozoa sebanyak 10 μ l diambil dengan menggunakan pipet mikro dan ditetaskan pada kaca objek. Sampel tersebut kemudian diwarnai dengan larutan Eosin-Y dan dibuat sediaan oles dengan menggeserkan kaca objek lain di atasnya dengan sudut 45°. Sediaan oles spermatozoa kemudian dikeringanginkan dan difiksasi dengan metanol 96% selama lima menit serta diwarnai dengan larutan Giemsa selama 30 menit.

Sediaan kemudian dibilas dengan air yang mengalir dan dikeringanginkan. Penghitungan dilakukan di bawah mikroskop dengan perbesaran 400 kali. Jumlah spermatozoa abnormal diketahui dengan

menghitung spermatozoa abnormal dari 100 spermatozoa untuk setiap ulangan (WHO 1988: 13).

3.4.8. Rancangan cara pengolahan dan analisis data

Penelitian yang dilakukan bersifat eksperimental sehingga analisis data dilakukan dengan menggunakan pendekatan statistik. Data-data yang diperoleh dimasukkan ke dalam tabel dan diolah dengan menggunakan program komputer *Statistical Package for Social Science (SPSS) 14.0 for Windows* dengan pendekatan uji nilai probabilitas. Hasil uji disimpulkan dengan membandingkan nilai taraf nyata (α) dengan nilai probabilitas (P) yang diperoleh melalui komputasi SPSS (Santoso 2003: 301--303).

Data tersebut kemudian diuji dengan uji normalitas Shapiro-Wilk dan uji homogenitas Levene. Hasil pengujian menunjukkan bahwa data ke-5 perlakuan tersebut berdistribusi normal dan bervariansi homogen. Analisis data kemudian dilanjutkan dengan uji parametrik analisis variansi (anava) 1-faktor. Uji anava digunakan untuk mengetahui apakah terdapat pengaruh pemberian infus simplisia *Hibiscus sabdariffa* L. terhadap motilitas, viabilitas, konsentrasi, dan abnormalitas spermatozoa mencit pada ke-5 perlakuan (Santoso 2003: 291 & 292). Pengujian kemudian dapat dilanjutkan dengan uji perbandingan berganda *Least Significance Difference (LSD)* untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan antara pasangan kelompok perlakuan (Conover 1980: 370--372).

BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Hasil

4.1.1. Persentase motilitas spermatozoa

Hasil penghitungan terhadap data rerata persentase motilitas spermatozoa dapat dilihat pada Tabel 4.1.1. Diagram batang rerata persentase motilitas spermatozoa dapat dilihat pada Gambar 4.1.1. Rerata persentase motilitas tertinggi sampai terendah berturut-turut, yaitu KK1 ($47,80 \pm 8,56\%$); KP2 ($43,00 \pm 7,45\%$); KP3 ($38,60 \pm 7,16\%$); KP1 ($38,20 \pm 6,87\%$); dan KK2 ($33,00 \pm 5,15\%$). Hasil uji normalitas Shapiro-Wilk ($\alpha = 0,05$) terhadap data persentase motilitas spermatozoa menunjukkan data berdistribusi normal ($P > 0,05$). Hasil uji Levene ($\alpha = 0,05$) terhadap data persentase motilitas spermatozoa menunjukkan data bervariasi homogen ($P > 0,05$).

Tabel 4.1.1. Data rerata persentase motilitas spermatozoa mencit kelompok kontrol dan kelompok perlakuan

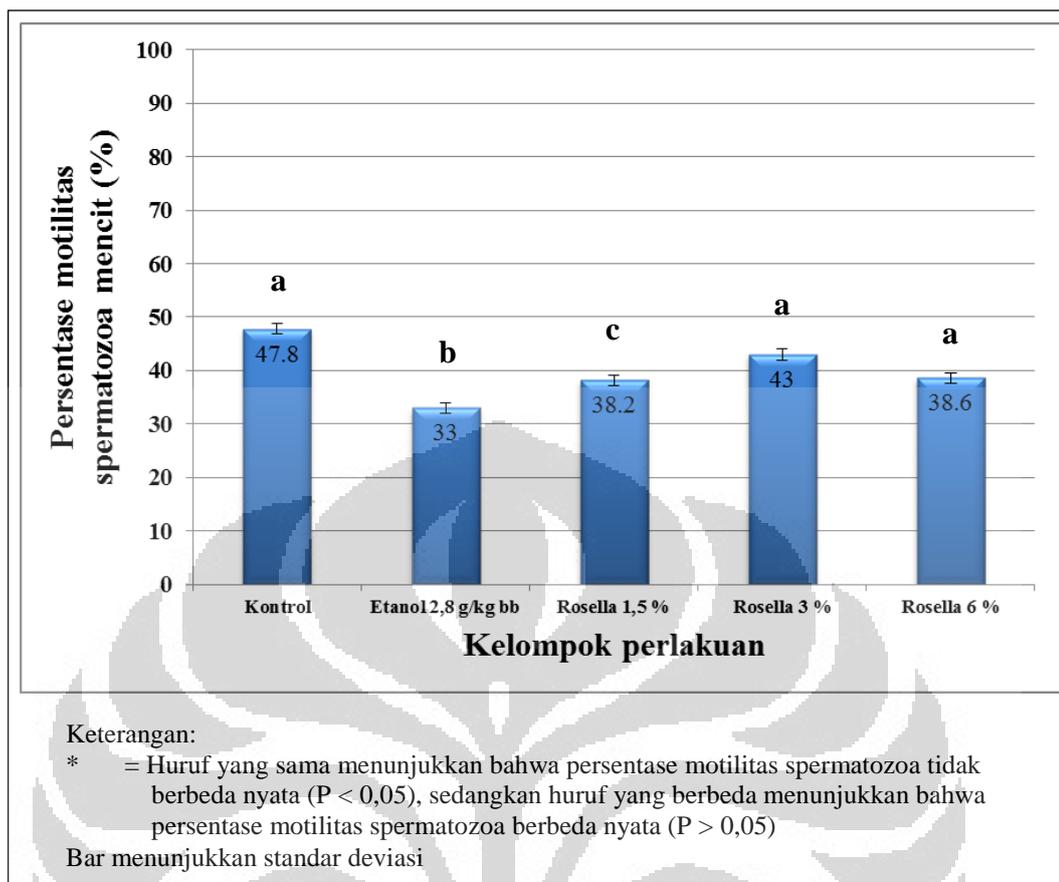
| Ulangan | Kontrol (KK1) | Etanol 2,8 g/kg bb (KK2) | Rosella 1,5% (KP1) | Rosella 3% (KP2) | Rosella 6% (KP3) |
|------------|------------------|--------------------------------|--------------------------|------------------------|------------------------|
| 1 | 58,00 | 39,00 | 41,00 | 47,00 | 45,00 |
| 2 | 42,00 | 31,00 | 32,00 | 38,00 | 33,00 |
| 3 | 54,00 | 38,00 | 46,00 | 53,00 | 42,00 |
| 4 | 37,00 | 28,00 | 30,00 | 34,00 | 29,00 |
| 5 | 48,00 | 29,00 | 42,00 | 43,00 | 44,00 |
| Σx | 239,00 | 165,00 | 191,00 | 215,00 | 193,00 |
| x | 47,80 | 33,00 | 38,20 | 43,00 | 38,60 |
| SD | 8,56 | 5,15 | 6,87 | 7,45 | 7,16 |

Keterangan:

Σx = Jumlah nilai persentase spermatozoa motil

x = Nilai rerata persentase spermatozoa motil

SD = Standar Deviasi



Gambar 4.1.1. Diagram batang rerata persentase motilitas spermatozoa mencit kelompok kontrol dan kelompok perlakuan

Hasil uji anava 1-faktor ($\alpha = 0,05$) menunjukkan terdapat pengaruh terhadap motilitas spermatozoa pada kelima kelompok perlakuan ($P < 0,05$). Pengujian dilanjutkan dengan uji perbandingan berganda (LSD; $\alpha = 0,05$) untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan motilitas antara pasangan perlakuan. Hasil uji LSD tersebut menunjukkan terdapat perbedaan nyata antara KK1 dengan KK2 dan KP1; KK2 dengan KP1, KP2, dan KP3; KP1 dengan KP2 dan KP3, serta tidak ada perbedaan nyata antara KK1 dengan KP2 dan KP3.

4.1.2. Persentase viabilitas spermatozoa

Hasil penghitungan terhadap data rerata persentase viabilitas spermatozoa dapat dilihat pada Tabel 4.1.2. Diagram batang rerata persentase viabilitas spermatozoa dapat dilihat pada Gambar 4.1.2. Rerata persentase viabilitas tertinggi sampai terendah berturut-turut, yaitu KP1 ($81,80 \pm 6,22$)%; KP3 ($80,80 \pm 6,68$)%; KP2 ($77,20 \pm 13,70$)%; KK1 ($74,20 \pm 9,28$)%; dan KK2 ($67,80 \pm 10,57$)%. Hasil uji normalitas Shapiro-Wilk ($\alpha = 0,05$) terhadap data persentase viabilitas spermatozoa menunjukkan data berdistribusi normal ($P > 0,05$). Hasil uji Levene ($\alpha = 0,05$) terhadap data persentase viabilitas spermatozoa menunjukkan data bervariasi homogen ($P > 0,05$). Hasil uji anava 1-faktor ($\alpha = 0,05$) menunjukkan tidak terdapat pengaruh terhadap viabilitas spermatozoa pada kelima kelompok perlakuan ($P > 0,05$).

Tabel 4.1.2. Data rerata persentase viabilitas spermatozoa mencit kelompok kontrol dan kelompok perlakuan

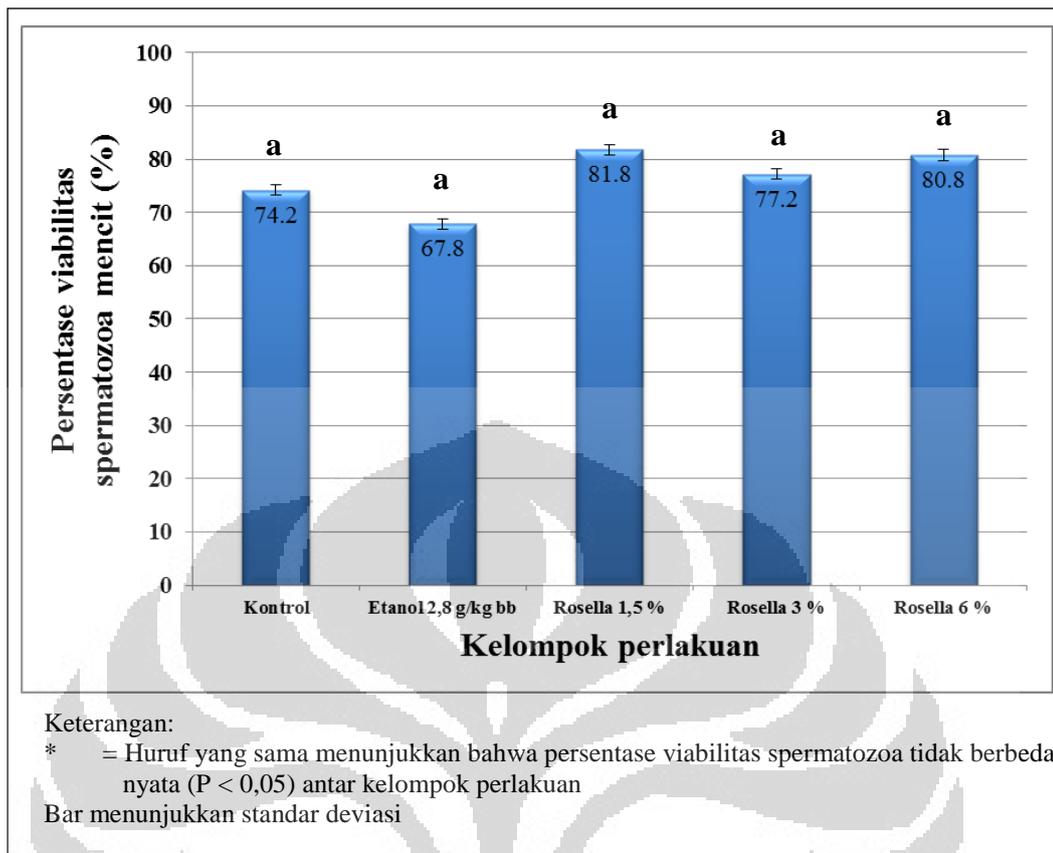
| Ulangan | Kontrol (KK1) | Etanol 2,8 g/kg bb (KK2) | Rosella 1,5% (KP1) | Rosella 3% (KP2) | Rosella 6% (KP3) |
|------------|------------------|--------------------------------|--------------------------|------------------------|------------------------|
| 1 | 66,00 | 67,00 | 78,00 | 56,00 | 76,00 |
| 2 | 83,00 | 85,00 | 81,00 | 72,00 | 75,00 |
| 3 | 84,00 | 56,00 | 89,00 | 91,00 | 78,00 |
| 4 | 64,00 | 65,00 | 74,00 | 85,00 | 84,00 |
| 5 | 74,00 | 66,00 | 87,00 | 82,00 | 91,00 |
| Σx | 371,00 | 339,00 | 409,00 | 386,00 | 404,00 |
| \bar{x} | 74,20 | 67,80 | 81,80 | 77,20 | 80,80 |
| SD | 9,28 | 10,57 | 6,22 | 13,70 | 6,68 |

Keterangan:

Σx = Jumlah nilai persentase spermatozoa hidup

\bar{x} = Nilai rerata persentase spermatozoa hidup

SD = Standar Deviasi



Gambar 4.1.2. Diagram batang rerata persentase viabilitas spermatozoa menciit kelompok kontrol dan kelompok perlakuan

4.1.3. Konsentrasi spermatozoa

Hasil penghitungan terhadap data rerata konsentrasi spermatozoa dapat dilihat pada Tabel 4.1.3. Diagram batang rerata konsentrasi spermatozoa dapat dilihat pada Gambar 4.1.3. Rerata nilai konsentrasi tertinggi sampai terendah berturut-turut, yaitu KK1 ($23,38 \pm 7,05\%$); KP2 ($22,68 \pm 6,70\%$); KP1 ($21,34 \pm 6,54\%$); KP3 ($19,84 \pm 4,98\%$); dan KK2 ($19,62 \pm 5,76\%$). Hasil uji normalitas Shapiro-Wilk ($\alpha = 0,05$) terhadap data konsentrasi spermatozoa menunjukkan data berdistribusi normal ($P > 0,05$). Hasil uji Levene ($\alpha = 0,05$) terhadap data konsentrasi spermatozoa menunjukkan data bervariasi homogen ($P > 0,05$). Hasil uji anava 1-faktor ($\alpha = 0,05$) menunjukkan tidak terdapat pengaruh terhadap konsentrasi spermatozoa pada kelima kelompok perlakuan ($P > 0,05$).

Tabel 4.1.3. Data rerata konsentrasi (juta per ml ejakulat) spermatozoa mencit kelompok kontrol dan kelompok perlakuan

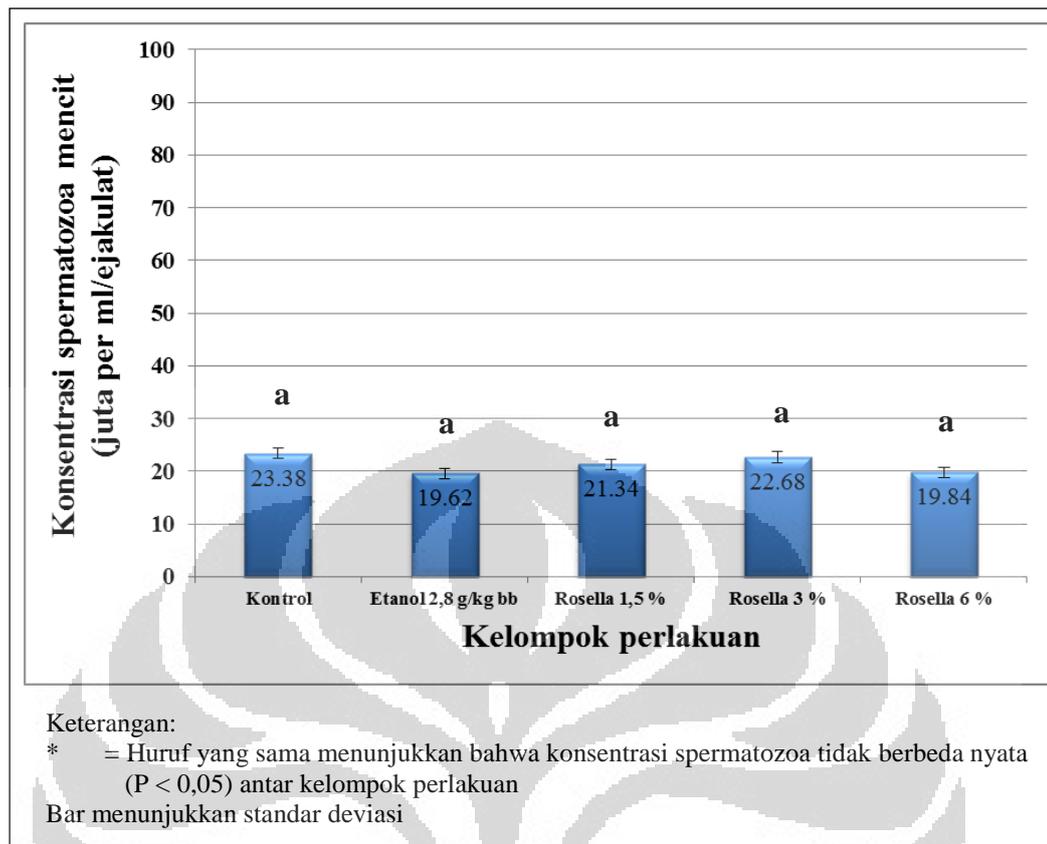
| Ulangan | Kontrol (KK1) | Etanol 2,8 g/kg bb (KK2) | Rosella 1,5% (KP1) | Rosella 3% (KP2) | Rosella 6% (KP3) |
|------------|------------------|--------------------------------|--------------------------|------------------------|------------------------|
| 1 | 17,10 | 14,90 | 13,20 | 17,80 | 20,00 |
| 2 | 28,80 | 25,30 | 27,00 | 29,30 | 23,00 |
| 3 | 30,00 | 23,10 | 25,30 | 26,80 | 22,90 |
| 4 | 26,40 | 22,70 | 25,90 | 26,00 | 22,10 |
| 5 | 14,60 | 12,10 | 15,30 | 13,50 | 11,20 |
| Σx | 116,90 | 98,10 | 106,70 | 113,40 | 99,20 |
| \bar{x} | 23,38 | 19,62 | 21,34 | 22,68 | 19,84 |
| SD | 7,05 | 5,76 | 6,54 | 6,70 | 4,98 |

Keterangan:

Σx = Jumlah nilai konsentrasi spermatozoa

\bar{x} = Nilai rerata konsentrasi spermatozoa

SD = Standar Deviasi



Gambar 4.1.3. Diagram batang rerata konsentrasi (juta per ml ejakulat) spermatozoa menciit kelompok kontrol dan kelompok perlakuan

4.1.4. Persentase abnormalitas spermatozoa

Hasil penghitungan terhadap data rerata persentase abnormalitas spermatozoa dapat dilihat pada Tabel 4.1.4. Diagram batang rerata persentase abnormalitas spermatozoa dapat dilihat pada Gambar 4.1.4. Rerata persentase abnormalitas tertinggi sampai terendah berturut-turut, yaitu KP3 ($37,60 \pm 8,93$)%; KK2 ($30,60 \pm 5,68$)%; KP1 ($30,40 \pm 4,72$)%; KP2 ($26,80 \pm 5,89$)%; dan KK1 ($22,00 \pm 4,30$)%. Hasil uji normalitas Shapiro-Wilk ($\alpha = 0,05$) terhadap data persentase abnormalitas spermatozoa menunjukkan data berdistribusi normal ($P > 0,05$). Hasil uji Levene ($\alpha = 0,05$) terhadap data persentase abnormalitas spermatozoa menunjukkan data bervariasi homogen ($P > 0,05$).

Tabel 4.1.4. Data rerata persentase abnormalitas spermatozoa mencit kelompok kontrol dan kelompok perlakuan

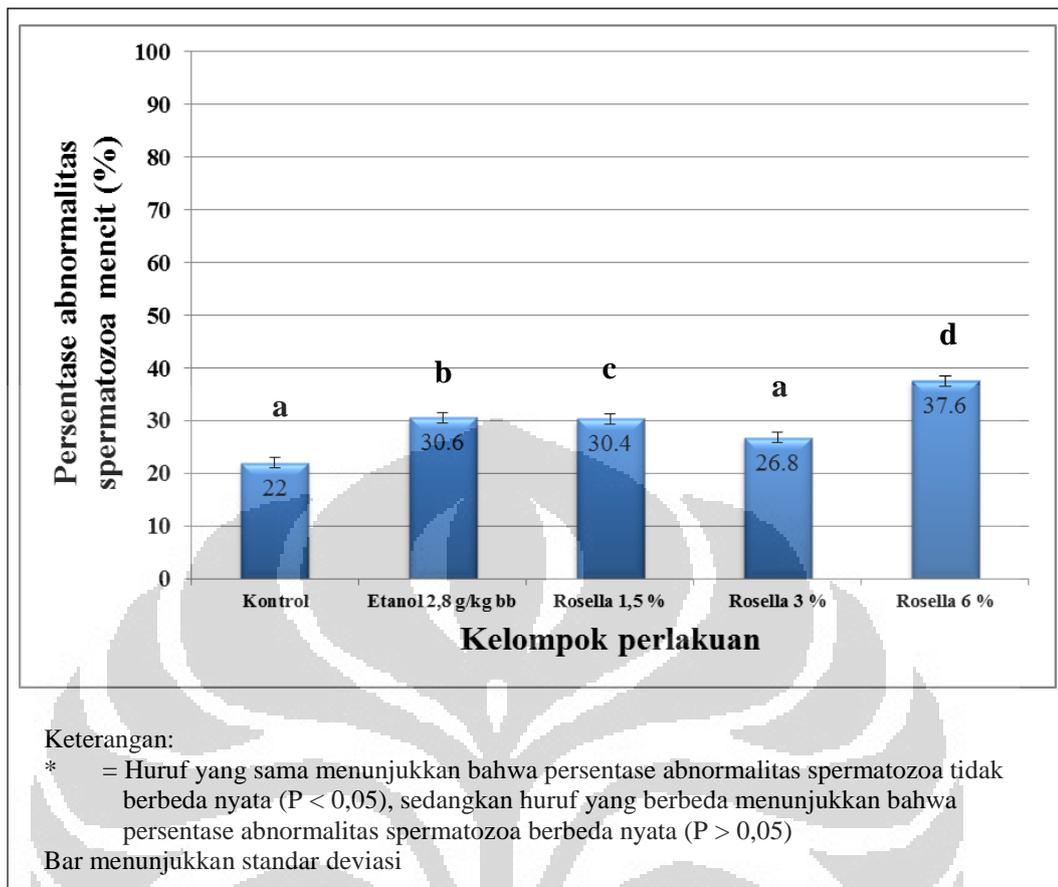
| Ulangan | Kontrol (KK1) | Etanol 2,8 g/kg bb (KK2) | Rosella 1,5% (KP1) | Rosella 3% (KP2) | Rosella 6% (KP3) |
|-----------|------------------|--------------------------------|--------------------------|------------------------|------------------------|
| 1 | 27,00 | 33,00 | 32,00 | 30,00 | 33,00 |
| 2 | 16,00 | 26,00 | 24,00 | 20,00 | 39,00 |
| 3 | 25,00 | 39,00 | 37,00 | 35,00 | 43,00 |
| 4 | 22,00 | 25,00 | 30,00 | 23,00 | 48,00 |
| 5 | 20,00 | 30,00 | 29,00 | 26,00 | 25,00 |
| $\sum x$ | 110,00 | 153,00 | 152,00 | 134,00 | 188,00 |
| \bar{x} | 22,00 | 30,60 | 30,40 | 26,80 | 37,60 |
| SD | 4,30 | 5,68 | 4,72 | 5,89 | 8,93 |

Keterangan:

$\sum x$ = Jumlah nilai persentase spermatozoa abnormal

\bar{x} = Nilai rerata persentase spermatozoa abnormal

SD = Standar Deviasi



Gambar 4.1.4. Diagram batang rerata persentase abnormalitas spermatozoa mencit kelompok kontrol dan kelompok perlakuan

Hasil uji anava 1-faktor ($\alpha = 0,05$) menunjukkan terdapat pengaruh terhadap abnormalitas spermatozoa pada kelima kelompok perlakuan ($P < 0,05$). Pengujian dilanjutkan dengan uji perbandingan berganda (LSD; $\alpha = 0,05$) untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan abnormalitas antara pasangan perlakuan. Hasil uji LSD tersebut menunjukkan terdapat perbedaan nyata antara KK1 dengan KK2, KP1, dan KP3; KK2 dengan KP1, KP2, dan KP3; KP1 dengan KP2 dan KP3; KP2 dengan KP3, serta tidak ada perbedaan nyata antara KK1 dengan KP2.

4.2. Pembahasan

Hasil penelitian yang dilakukan untuk mengetahui pengaruh infus simplisia *Hibiscus sabdariffa* L. terhadap kualitas spermatozoa mencit (*Mus musculus* L.) menunjukkan perbedaan nyata antara mencit yang hanya diberikan akuades dengan mencit yang diinduksi etanol (dosis 2,8 g/kg bb). Perbedaan yang terlihat mengindikasikan adanya penurunan kualitas spermatozoa berupa penurunan motilitas spermatozoa dari mencit yang hanya diberikan akuades yaitu $(47,80 \pm 8,56)\%$ ke mencit yang diinduksi etanol yaitu $(33,00 \pm 5,15)\%$. Selain itu, penurunan kualitas spermatozoa juga ditandai dengan adanya peningkatan abnormalitas spermatozoa dari mencit yang hanya diberikan akuades yaitu $(22,00 \pm 4,30)\%$ ke mencit yang diinduksi etanol yaitu $(30,60 \pm 5,68)\%$.

Etanol merupakan senyawa kimia yang sering digunakan untuk kebutuhan manusia, misalnya sebagai pelarut dan antiseptik (Sutarni 2005: 51). Metabolisme etanol dalam tubuh menghasilkan asetaldehida dan asam asetat (Wu & Cederbaum 2003: 279). Menurut Ellingboe & Varanelli pada tahun 1979 (lihat Emanuele & Emanuele 1998: 198), proses oksidasi etanol menjadi asetaldehida membutuhkan kofaktor yaitu *nicotinamide adenine dinucleotide* (NAD^+) yang juga dibutuhkan dalam produksi testosteron. Hal tersebut menunjukkan bahwa etanol dapat menghambat dan menurunkan produksi testosteron (Eriksson *dkk.* 1983: 31; Maneesh *dkk.* 2006: 293). Turunnya produksi testosteron dapat berakibat pada perubahan komposisi cairan epididimis sehingga menyebabkan penurunan kualitas spermatozoa (Bilinska 1986, lihat Adil 1997: 12).

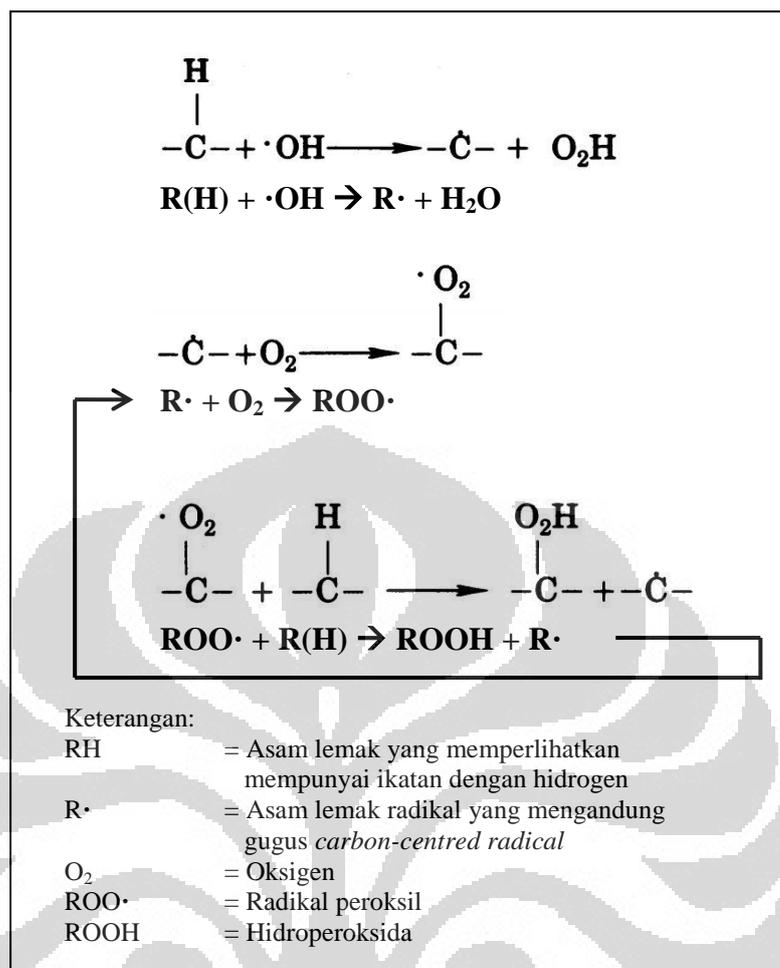
Etanol terdiri atas satu gugus hidroksil ($-\text{OH}$), satu gugus metilen ($-\text{CH}_2-$), dan satu gugus metil ($-\text{CH}_3$) (Fessenden & Fessenden 1995: 261 & 264). Gugus hidroksil pada etanol dapat bersifat toksik setelah etanol mengalami metabolisme dalam tubuh dan berubah menjadi radikal bebas (Sutarni 2005: 50). Radikal bebas yang dihasilkan antara lain senyawa radikal hidroksil ($\cdot\text{OH}$), radikal hidroksietil ($\text{CH}_3\text{C}\cdot\text{HOH}$), dan radikal metil karbonil ($\text{CH}_3\text{C}\cdot=\text{O}$) (Albano 2000: 240).

Senyawa radikal bebas seperti halnya senyawa radikal hidroksil, radikal hidroksietil, dan radikal metil karbonil, dapat meningkatkan peroksidasi lipid.

Peroksidasi lipid diawali dengan serangan radikal bebas pada asam lemak sehingga dapat menarik atom hidrogen dari gugus metilen ($-\text{CH}_2$) pada rantai samping. Semakin banyak jumlah ikatan rangkap pada asam lemak, semakin mudah pula asam lemak tersebut melepaskan atom hidrogennya. Hal tersebut yang menyebabkan asam lemak tak jenuh majemuk atau *polyunsaturated fatty acid* (PUFA) rentan terhadap peroksidasi lipid (Halliwell & Chirico 1993: 717S; Gutteridge 1995: 1821).

Hilangnya satu elektron pada atom hidrogen yang terikat pada gugus metilen dalam asam lemak akan mengubah gugus metilen menjadi *carbon-centred radical* ($-\text{C}\cdot\text{H}-$) dan membuat asam lemak bersifat radikal ($\text{R}\cdot$). *Carbon-centred radical* selanjutnya akan mengalami serangkaian reaksi. Pada sel-sel aerobik, *carbon-centred radical* mengalami penyusunan kembali molekul dan bereaksi dengan oksigen (O_2) sehingga menghasilkan radikal peroksil ($\text{ROO}\cdot$) (Halliwell & Chirico 1993: 717S). Radikal peroksil kemudian bereaksi dengan senyawa asam lemak lain sehingga menyebabkan terbentuknya senyawa hidroperoksida (ROOH) dan asam lemak radikal. Reaksi tersebut terjadi secara berulang sehingga disebut reaksi berantai (Chow 1979: 1067; Kehrer 2000: 46). Reaksi peroksidasi lipid ditunjukkan pada Gambar 4.2.1.

Asam lemak tak jenuh majemuk atau PUFA merupakan komponen utama penyusun membran sel termasuk membran sel pada sistem reproduksi jantan. Menurut Chanmugam *dkk.* (1991: 1173), testis memiliki kandungan tinggi *docosapentanoic acid* atau (22:5) pada senyawa PUFA-nya. Senyawa PUFA *octadecenoid acid* atau *oleic acid* (18:1) juga merupakan komponen utama epididimis (Saether *dkk.* 2007: 473). Selain itu, spermatozoa juga memiliki kandungan *docosahexaenoic acid* (DHA) atau (22:6) yang tinggi pada membran selnya (White *dkk.* 1976: 149; Lenzi *dkk.* 2000: 230). Menurut Halliwell & Chirico (1993: 717S), semakin tinggi kadar PUFA maka semakin rentan sel tersebut untuk mengalami peroksidasi lipid. Oleh karena itu, testis, epididimis, dan spermatozoa merupakan organ dan sel yang rentan terkena kerusakan oksidatif sehingga dapat mengganggu fungsi fisiologis organ dan sel tersebut (Kehrer 2000: 46).



Gambar 4.2.1. Reaksi peroksidasi lipid
[Sumber: Chow 1979: 1067; Halliwell 1989: 747 & 748.]

Pada organ testis, menurut Gavalier *dkk.* pada tahun 1983, hasil metabolisme etanol dapat mengakibatkan kerusakan pada sel Leydig berupa penurunan volume sel (*lihat* Weinberg & Vogl 1988: 267) sehingga mengakibatkan penurunan produksi testosteron, yaitu hormon yang diperlukan dalam proses pematangan spermatozoa dalam epididimis (Moeloeck 1994: 15; Guyton & Hall 1997: 1268). Sel Sertoli juga dapat mengalami pembesaran vakuola atau vakuolasi karena pembengkakan cisternae dalam retikulum endoplasma halus (Creasy 2001: 65). Selain pada kedua sel tersebut, etanol juga dapat menyebabkan mengecilnya diameter tubulus seminiferus (Weinberg & Vogl 1988: 268) dan membesarnya lumen tubulus tersebut (Creasy 2001: 65). Gangguan pada sel Leydig, sel Sertoli, dan tubulus seminiferus tersebut dapat

menyebabkan penurunan jumlah sel-sel germinal dan atrofi testis atau penurunan berat testis (Weinberg & Vogl 1988: 268).

Testis merupakan tempat dihasilkannya spermatozoa sehingga gangguan pada testis oleh radikal bebas, dapat mengganggu proses pembentukan spermatozoa atau spermatogenesis. Hal tersebut dibuktikan oleh penelitian Maneesh *dkk.* (2005: 63 & 64) yang menggunakan etanol (dosis 1,6 g/kg bb) sebagai penginduksi radikal bebas terhadap sel germinal. Induksi etanol tersebut dapat mengakibatkan peningkatan peroksidasi lipid yang ditandai dengan meningkatnya kadar *thiobarbituric acid* (TBA), yaitu produk akhir dari peroksidasi lipid. Selain itu, induksi etanol juga dapat menurunkan berat testis dan enzim-enzim antioksidan dalam testis, seperti SOD dan katalase, dikarenakan etanol dapat melewati sawar darah-testis.

Sel spermatozoa merupakan sel yang memiliki banyak mitokondria (Pedersen & Fawcett 1976: 70) dikarenakan spermatozoa harus aktif bergerak sehingga membutuhkan banyak energi (Choudhary *dkk.* 2010: 54 & 55). Mitokondria merupakan organel sel yang menjadi sumber dihasilkannya senyawa oksigen reaktif atau ROS. Hal tersebut dikarenakan fungsi mitokondria sebagai organ respirasi sel yang memungkinkan terjadinya kebocoran elektron sehingga terdapat senyawa radikal. Selain senyawa radikal yang dihasilkan dari reaksi metabolik normal dalam organ respirasi tersebut, induksi radikal bebas misalnya etanol, mampu meningkatkan kadar ROS dalam mitokondria (Sikka *dkk.* 1995: 466).

Menurut Griveau *dkk.* (1995: 19) dan Sikka *dkk.* (1995: 465), meningkatnya kadar ROS dapat menyebabkan penurunan motilitas spermatozoa. Hal tersebut disebabkan ROS, senyawa yang dapat berdifusi melalui membran sel (Winarsi 2007: 103 & 104), dapat mengakibatkan penurunan potensial membran mitokondria atau *mitochondria membrane potential* (MMP) sehingga mengganggu kerja mitokondria (Wang *dkk.* 2003, lihat Sanocka & Kurpisz 2004: 5). Selain penurunan MMP, ROS juga dapat menyebabkan penurunan kadar antioksidan dalam spermatozoa sehingga dapat dengan mudah terjadi peroksidasi lipid (Kothari *dkk.* 2010: 426). Hasil penelitian Wattanathorn *dkk.* (2000: 14) membuktikan bahwa induksi etanol (dosis 2 g/kg bb) dapat meningkatkan kadar

ROS sehingga menurunkan motilitas spermatozoa. Hal tersebut mendukung hasil penelitian bahwa etanol sebagai penginduksi radikal bebas dapat mengakibatkan penurunan motilitas spermatozoa.

Selain pada motilitas spermatozoa, hasil penelitian juga menunjukkan bahwa induksi etanol dapat meningkatkan abnormalitas spermatozoa. Hal tersebut didukung oleh penelitian Ganaraja *dkk.* (2003: 3) bahwa pemberian etanol (dosis 2 g/kg bb) pada tikus jantan selama tujuh hari berturut-turut dapat meningkatkan jumlah abnormalitas spermatozoa. Hasil penelitian Ganaraja *dkk.* mendukung hasil penelitian bahwa induksi etanol dapat meningkatkan abnormalitas spermatozoa.

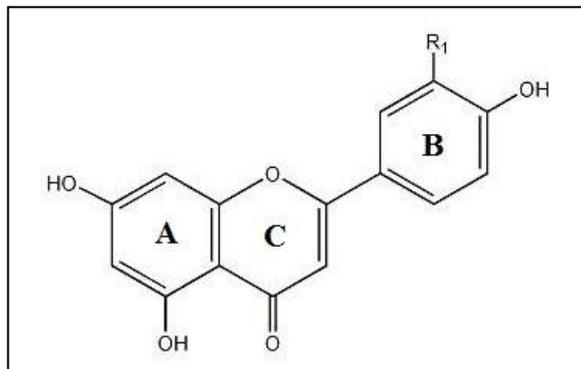
Hasil penelitian menunjukkan bahwa persentase motilitas spermatozoa pada mencit yang diinduksi etanol yaitu $(33,00 \pm 5,15)\%$ mulai meningkat pada mencit yang diberi perlakuan *H. sabdariffa* L. dosis 1,5 % yaitu $(38,20 \pm 6,87)\%$, kemudian dosis 6% yaitu $(38,60 \pm 7,16)\%$, dan mencapai hasil optimum pada dosis 3% yaitu $(43,00 \pm 7,45)\%$. Hasil penelitian juga menunjukkan bahwa persentase abnormalitas spermatozoa pada mencit yang diinduksi etanol yaitu $(30,60 \pm 5,68)\%$ meningkat pada mencit yang diberi perlakuan *H. sabdariffa* L. dosis 6% yaitu $(37,60 \pm 8,93)\%$. Abnormalitas spermatozoa kemudian menurun pada dosis 1,5 % yaitu $(30,40 \pm 4,72)\%$ dan kemudian mencapai hasil optimum 3% yaitu $(26,80 \pm 5,89)\%$.

Peningkatan motilitas dan penurunan abnormalitas spermatozoa dari mencit yang diinduksi etanol ke mencit yang diberi perlakuan *H. sabdariffa* L. dosis 3% diduga berhubungan dengan senyawa yang terkandung dalam infus simplisia *H. sabdariffa* L. Senyawa yang diduga mampu bersifat sebagai antioksidan sehingga mengurangi kerusakan oksidatif akibat radikal bebas adalah polifenol. Senyawa polifenol merupakan hasil metabolit sekunder tanaman yang berfungsi untuk mengurangi efek radiasi sinar ultraviolet dan serangan patogen. Senyawa tersebut dikelompokkan berdasarkan jumlah cincin fenol dan gugus senyawa yang terikat pada cincin fenol tersebut (Manach *dkk.* 2010: 727). Kelopak *H. sabdariffa* L. mengandung senyawa polifenol antara lain asam fenolik dan flavonoid. Senyawa asam fenolik yang terkandung dalam kelopak *H. sabdariffa* L. adalah *protocatechoic acid* (PCA) (Ali *dkk.* 2005: 370).

Senyawa PCA dapat bersifat sebagai antioksidan. Penelitian Hirunpanich *dkk.* (2005: 484) membuktikan bahwa PCA dalam kelopak *H. sabdariffa* L. merupakan senyawa yang menurunkan kadar diena terkonjugasi (*conjugated dienes*) dan TBA sebagai hasil dari adanya peroksidasi lipid akibat induksi CuSO_4 . Mekanisme senyawa PCA yang diduga terjadi dalam penelitian tersebut antara lain inaktivasi ion Cu^{2+} , yaitu ion yang dapat menginisiasi oksidasi dan kemampuan senyawa PCA menjadi donor atom hidrogen. Penelitian Dahiru *dkk.* (2003: 31) juga membuktikan bahwa PCA dalam kelopak *H. sabdariffa* L. dapat menurunkan kadar TBA sebagai hasil dari proses peroksidasi lipid pada tikus yang diinduksi CCl_4 . Kedua hasil penelitian tersebut mendukung hasil penelitian yang dilakukan bahwa kandungan PCA dalam kelopak *H. sabdariffa* L. bersifat antioksidan terhadap radikal bebas sehingga dapat memperbaiki kualitas spermatozoa.

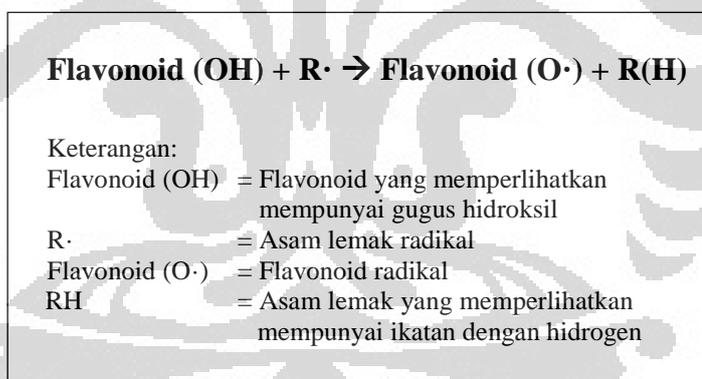
Senyawa polifenol lain yang dapat berfungsi sebagai antioksidan adalah flavonoid. Senyawa flavonoid merupakan senyawa yang tersebar luas dalam berbagai bahan makanan, misalnya buah dan sayuran (Nijveldt 2001: 418). Senyawa tersebut terdiri dari cincin fenol, glikosida, dan gugus yang terikat pada cincin fenol tersebut, seperti gugus hidrogen (-H) dan gugus hidroksil (-OH) (Heim *dkk.* 2001: 573).

Flavonoid memiliki aktivitas penangkapan (*scavenging*) terhadap radikal bebas karena memiliki gugus hidroksil pada cincin B (Heim *dkk.* 2001: 576; Oteiza *dkk.* 2005: 20 & 21). Selain itu, keberadaan gugus tersebut juga membuat flavonoid bersifat polar sehingga dapat berikatan hidrogen dengan kepala lipid pada membran sel. Kemampuan flavonoid dapat berikatan dengan komponen utama membran sel tersebut dapat melindungi sel dari serangan radikal bebas yang dapat mengakibatkan kerusakan sel (Oteiza *dkk.* 2005: 20--25). Hal tersebut ditunjukkan oleh senyawa flavon, salah satu senyawa flavonoid yang terdapat dalam *H. sabdariffa* L., yang memiliki gugus hidroksil pada cincin B sehingga menyebabkan senyawa tersebut bersifat antioksidan (Oteiza *dkk.* 2005: 20; Gambar 4.2.2).



Gambar 4.2.2. Struktur kimia flavon
[Sumber: Heim *dkk.* 2001: 574.]

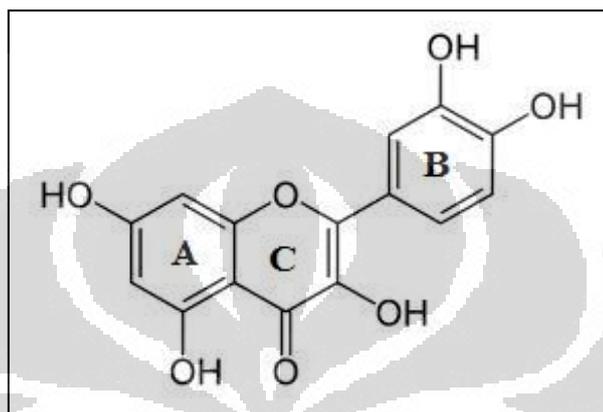
Flavonoid juga dapat menstabilkan ROS dengan cara bereaksi dengan senyawa yang bersifat radikal dalam ROS tersebut. Hal tersebut menyebabkan ROS menjadi tidak stabil dan tidak aktif (Heim *dkk.* 2001: 576). Reaksi kimia yang terjadi antara flavonoid dengan ROS ditunjukkan pada Gambar 4.2.3.



Gambar 4.2.3. Reaksi flavonoid dengan ROS
[Sumber: Heim *dkk.* 2001 : 576.]

Mekanisme lain senyawa flavonoid yang diduga dapat menurunkan pengaruh radikal bebas adalah mengikat (*chelating*) ion Fe^{3+} (Nijveldt *dkk.* 2001 : 420). Senyawa flavonoid *quercetine* (Gambar 4.2.4) dikenal sebagai pengikat dan stabilisator ion Fe^{3+} (Heim *dkk.* 2001: 577). Ion Fe^{3+} dibutuhkan sebagai katalis dalam reaksi Haber-Weiss, yaitu reaksi pembentukan radikal hidroksil ($\cdot\text{OH}$) (Kehrer 2000: 44). Senyawa radikal tersebut merupakan senyawa paling reaktif

dan berbahaya karena dapat bereaksi dengan etanol menjadi radikal hidroksietil. Senyawa radikal hidroksil ($\cdot\text{OH}$) juga dapat bereaksi dengan asetaldehid yaitu hasil dari oksidasi etanol menjadi radikal metil karbonil (Albano 2000: 240). Kemampuan mengikat ion Fe^{3+} tersebut membuktikan bahwa flavonoid bersifat antioksidan.



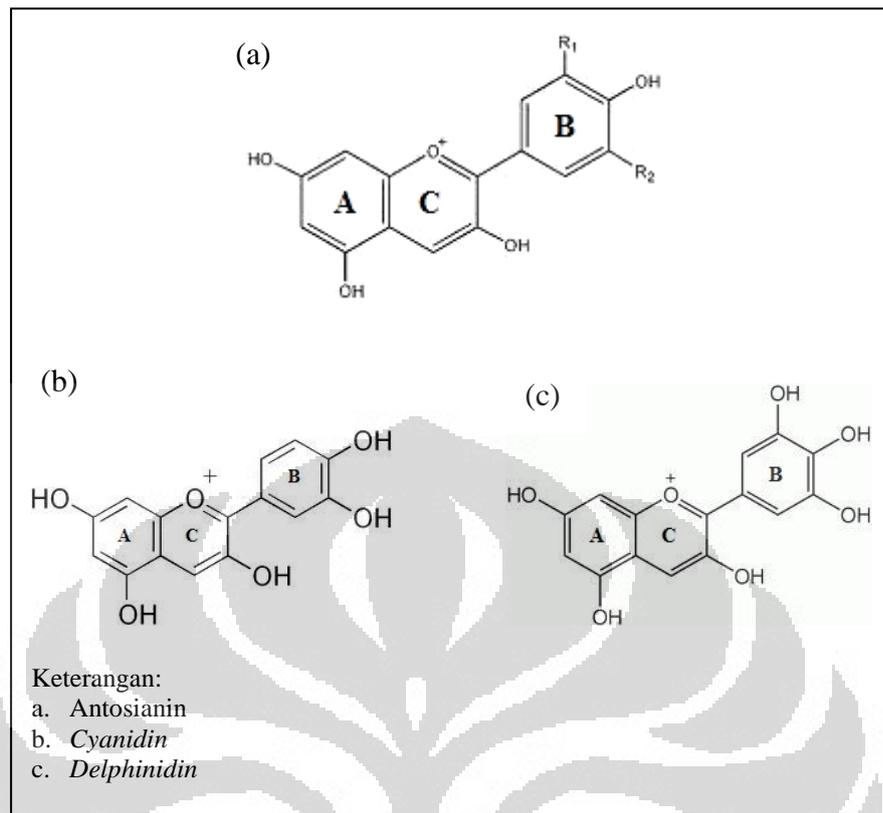
Gambar 4.2.4. Struktur kimia *quercetine*
[Sumber: Manach *dkk.* 2010: 728.]

Senyawa flavonoid lain yang terdapat dalam kelopak *H. sabdariffa* L. antara lain antosianin (Ali *dkk.* 2005: 370; Hirunpanich *dkk.* 2005: 481; Mahadevan *dkk.* 2009: 78). Senyawa antosianin merupakan senyawa yang memberikan zat warna (pigmen) pada kulit buah dan sayuran. Seperti halnya senyawa *quercetine*, senyawa antosianin juga memiliki gugus hidroksil pada cincin B (Gambar 4.2.5.a) sehingga menyebabkan antosianin bersifat antioksidan. Semakin banyak gugus hidroksil pada senyawa antosianin maka semakin tinggi tingkat aktivitas antioksidan senyawa tersebut dikarenakan kemampuan *scavenging* radikal suatu senyawa antioksidan bergantung pada kemampuan untuk membentuk senyawa antioksidan-radikal yang bersifat stabil (Wang *dkk.* 1997: 306).

Aktivitas antioksidan senyawa antosianin dalam *H. sabdariffa* L., terutama *cyanidin* dan *delphinidin* (Gambar 4.2.5.b & c), telah dibuktikan oleh Tsai *dkk.* (2002: 352 & 353) dan menunjukkan bahwa semakin banyak ekstrak *H. sabdariffa* L. yang digunakan, maka semakin tinggi tingkat antioksidan terhadap senyawa radikal oksigen. Menurut hasil penelitian Amin & Hamza

(2006: 611), sifat antioksidan senyawa antosianin dalam *H. sabdariffa* L. dapat berperan dalam melindungi organ reproduksi akibat kerusakan oksidatif yang ditimbulkan oleh radikal bebas. Penelitian tersebut menunjukkan bahwa senyawa antosianin mampu menurunkan kadar MDA akibat peroksidasi lipid dalam testis. Hasil penelitian Amin & Hamza tersebut juga mendukung hasil penelitian bahwa senyawa antosianin dalam *H. sabdariffa* L. dapat meningkatkan motilitas dan menurunkan abnormalitas spermatozoa tikus jantan.

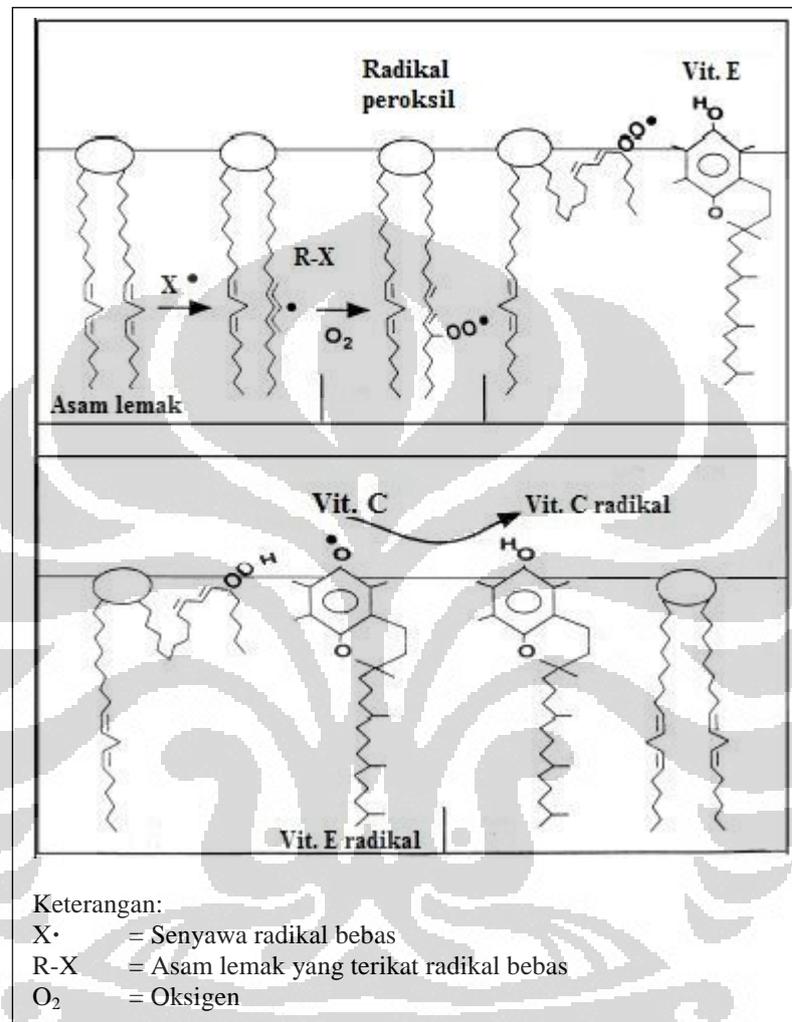
Selain memiliki aktivitas *scavenging* yang tinggi terhadap radikal bebas, senyawa polifenol seperti halnya PCA dan flavonoid, juga dapat meningkatkan kerja enzim antioksidan dalam tubuh seperti *glutathione* (GSH). Enzim GSH berperan sebagai peredam (*quenching*) radikal bebas karena dapat mengubah molekul H_2O_2 dan lipid peroksida menjadi H_2O . Enzim GSH yang berada di sitoplasma akan bekerja pada membran fosfolipid yang teroksidasi radikal bebas (Winarsi 2007: 100--104). Beberapa pernyataan dari hasil penelitian-penelitian tersebut mendukung hasil penelitian bahwa senyawa polifenol dalam *H. sabdariffa* L. dapat bersifat sebagai antioksidan.



Gambar 4.2.5. Struktur kimia antosianin, *cyanidin*, dan *delphinidin*
 [Sumber: Manach *dkk.* 2010: 728.]

Senyawa lain yang diduga berperan dalam perbaikan kualitas spermatozoa adalah asam askorbat. Asam askorbat atau vitamin C merupakan antioksidan larut dalam air yang mampu mereduksi radikal bebas dalam membran sel sehingga meminimalisasi kerusakan sel yang terjadi dalam kondisi stres oksidatif atau *oxidative stress* (OS) (Winarsi 2007: 137--139). Hal tersebut dikarenakan vitamin C dapat bersifat sebagai donor atom hidrogen dan bekerja secara sinergis dengan vitamin E dalam memperbaiki kerusakan membran sel (Buettner 1993: 540; Gambar 4.2.6). Penelitian Ganaraja *dkk.* (2008: 4) menunjukkan bahwa pemberian vitamin C dapat menurunkan abnormalitas spermatozoa tikus jantan. Hewan uji tersebut diinduksi etanol agar terbentuk radikal bebas sehingga aktivitas antioksidan vitamin C dapat diuji. Vitamin C juga diduga merupakan salah satu senyawa yang aktif dalam ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. dalam mengurangi kadar peroksidasi lipid dalam hati akibat induksi CCl_4 (Dahiru *dkk.* 2003: 31). Hasil penelitian Ganaraja *dkk.* dan Dahiru

dkk. mendukung hasil penelitian yang dilakukan bahwa *H. sabdariffa* L. yang mengandung vitamin C dapat menurunkan abnormalitas spermatozoa.

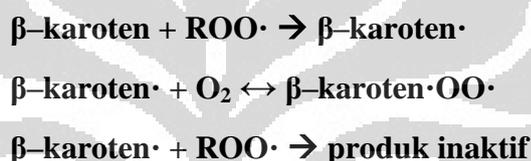


Gambar 4.2.6. Mekanisme perbaikan vitamin C pada membran lipid yang teroksidasi
 [Sumber: Buettner 1993: 540, diterjemahkan sesuai aslinya.]

Penelitian Nugraheni *dkk.* (2003: 15--18) menggunakan vitamin C untuk perbaikan spermatogenesis dan kualitas spermatozoa mencit setelah pemberian ekstrak tembakau. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa vitamin C dapat meningkatkan motilitas spermatozoa karena vitamin C dapat berfungsi sebagai antioksidan dengan cara melindungi membran sitoplasma di kepala spermatozoa sehingga mempertahankan motilitas spermatozoa. Selain meningkatkan motilitas,

vitamin C juga dapat mengurangi abnormalitas spermatozoa, seperti leher dan ekor yang menggulung.

Senyawa lain dalam *H. sabdariffa* L. yang diduga juga turut membantu perbaikan kualitas spermatozoa adalah β -karoten. Seperti halnya polifenol, senyawa β -karoten juga mampu meredam (*quenching*) ROS dan mengurangi peroksidasi lipid pada spermatozoa (Sikka *dkk.* 1995: 467). Hal tersebut dikarenakan β -karoten mampu memotong reaksi berantai yang terjadi pada peroksidasi lipid (Chow 1979: 1067) dengan cara bereaksi dengan senyawa radikal peroksil ($\text{ROO}\cdot$) (Burton 1989: 110). Reaksi tersebut ditunjukkan pada Gambar 4.2.7.



Gambar 4.2.7. Reaksi β -karoten dengan radikal peroksil
[Sumber: Burton 1989: 110.]

Hasil penelitian menunjukkan bahwa dosis 3% merupakan dosis efektif, yaitu dosis minimal obat yang dapat menimbulkan efek yang diinginkan (Siegel 2005: 297) dikarenakan kandungan senyawa kimia dalam dosis tersebut sesuai dengan jumlah yang diperlukan oleh tubuh untuk dapat bertindak sebagai obat (Klaassen & Watkins III 1999: 12). Pada kelompok perlakuan *H. sabdariffa* L. dosis 1,5%, peningkatan motilitas dan penurunan abnormalitas spermatozoa mencit jantan belum menunjukkan perbedaan nyata dengan mencit yang diinduksi etanol. Hal tersebut menunjukkan bahwa dosis 1,5% merupakan dosis yang belum efektif untuk memberikan pengaruh perbaikan kualitas spermatozoa. Hal tersebut diduga karena kandungan senyawa dalam dosis yang rendah tersebut belum cukup menangkap semua senyawa radikal bebas yang dihasilkan dari metabolisme etanol (Devipriya *dkk.* 2007: 317).

Pada parameter motilitas spermatozoa, hasil penelitian menunjukkan terjadi penurunan motilitas dari mencit yang diberi perlakuan *H. sabdariffa* L.

dosis 3% yaitu ($43,00 \pm 7,45$)% ke dosis 6% yaitu ($38,60 \pm 7,16$)%. Hasil penelitian juga menunjukkan bahwa persentase abnormalitas spermatozoa pada mencit yang diberi etanol yaitu ($30,60 \pm 5,68$)% meningkat pada mencit yang diberi perlakuan *H. sabdariffa* L. dosis 6% yaitu ($37,60 \pm 8,93$)%. Hal tersebut menunjukkan bahwa dosis 6% merupakan dosis yang sudah dapat menyebabkan toksik. Semua jenis senyawa kimia yang masuk ke dalam tubuh dapat berpotensi sebagai toksik jika senyawa kimia tersebut dalam jumlah yang berlebihan (Klaassen & Watkins III 1999: 12).

Kandungan senyawa kimia dalam dosis 6%, yaitu dosis yang dapat menyebabkan toksik, diduga bersifat antifertilitas secara sitotoksik. Suatu senyawa antifertilitas bersifat sitotoksik jika pengaruhnya langsung terhadap sel (Sutasurya pada tahun 1989, lihat Rusmiati 2007: 67). Hal tersebut dibuktikan oleh penelitian Orisakwe *dkk.* (2004: 296 & 297) yang menggunakan kelopak *H. sabdariffa* L. dosis 1,15; 2,30; dan 4,60 g/kg bb selama 12 minggu pada tikus galur Wistar. Hasil penelitian tersebut menunjukkan terdapat pengerutan tubulus seminiferus pada dosis 1,15 g/kg bb; terjadi penipisan membran testis pada dosis 2,30 g/kg bb; dan penurunan jumlah spermatozoa epididimis pada dosis 4,60 g/kg bb ekstrak *H. sabdariffa* L. Senyawa yang diduga berperan terhadap efek toksik *H. sabdariffa* L. tersebut adalah senyawa polifenol.

Selain secara sitotoksik, kandungan senyawa kimia dalam dosis 6% juga dapat bersifat antifertilitas secara hormonal (Sutasurya pada tahun 1989, lihat Rusmiati 2007: 67). Menurut Marino & Galluzzo (2008: 241), senyawa polifenol flavonoid, yaitu senyawa yang terdapat dalam *H. sabdariffa* L. dapat bersifat sama seperti antagonis estrogen atau *anti-estrogenic effect*. Estrogen seperti halnya testosteron juga diperlukan untuk fungsi normal reproduktif pada jantan. Menurut Hadley pada tahun 2000, estrogen mengatur reabsorpsi cairan luminal pada epididimis sehingga gangguan pada estrogen dapat menyebabkan reabsorpsi cairan luminal pada epididimis menurun. Hal tersebut mengakibatkan konsentrasi dalam cairan epididimis menurun sehingga spermatozoa yang berada dalam epididimis tersebut menjadi infertil (lihat Rosmilawati 2009: 51).

Mekanisme lain yang diduga terjadi yaitu senyawa polifenol dalam dosis tinggi lebih tertarik untuk bereaksi dengan ligan-ligan sehingga kemudian tidak

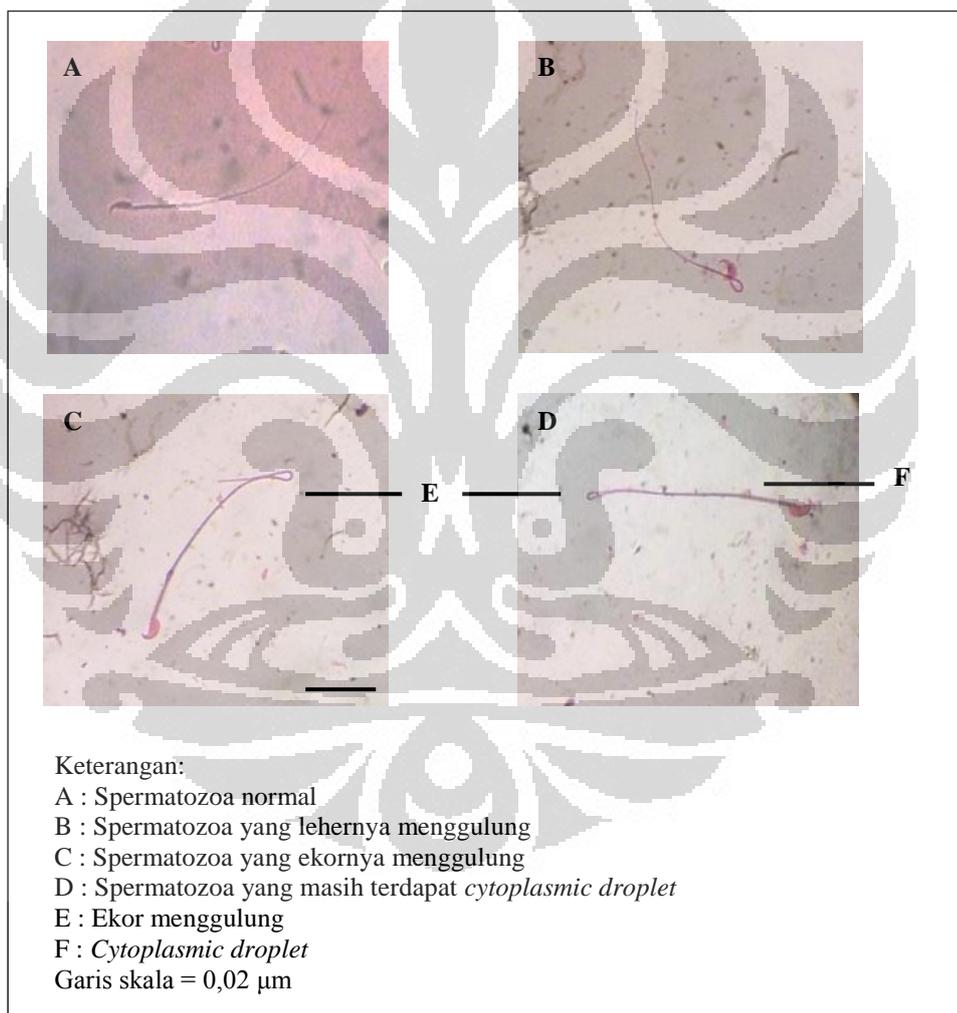
dapat bereaksi dengan senyawa radikal bebas. Hal tersebut dibuktikan oleh penelitian Devipriya *dkk.* (2007: 317) yang menggunakan senyawa polifenol pada tikus yang diinduksi etanol 7,9 g/kg bb. Dosis tinggi senyawa polifenol yang digunakan, yaitu 90 mg/kg bb, ternyata tidak menurunkan kadar TBA hasil peroksidasi lipid akibat radikal bebas yang dihasilkan dari metabolisme etanol. Hal tersebut mendukung hasil penelitian bahwa dosis 6%, yaitu dosis paling tinggi yang digunakan dalam penelitian, tidak dapat memperbaiki kualitas spermatozoa akibat induksi radikal bebas.

Hasil penelitian infus simplisia *H. sabdariffa* L. menunjukkan bahwa rentang dosis yang dimiliki infus simplisia *H. sabdariffa* L. diduga kecil dalam memperbaiki kualitas spermatozoa, yaitu antara 3%--6%. Pemberian *H. sabdariffa* L. dalam bentuk infus menyebabkan senyawa-senyawa yang terkandung didalamnya tidak terpisah. Senyawa tersebut dapat memberikan efek sinergis maupun antagonis. Dalam dosis tertentu, beberapa senyawa mungkin dapat memberikan efek sinergis sehingga dapat memperbaiki kualitas spermatozoa, namun jika dosis dinaikkan, senyawa tersebut mungkin dapat memberikan efek antagonis ataupun efek toksik sehingga perbaikan kualitas spermatozoa tidak optimal (Klaassen & Watkins III 1999: 12).

Penelitian difokuskan pada pengamatan adanya *cytoplasmic droplet* karena perubahan morfologi dalam pematangan spermatozoa di epididimis ditandai dengan hilangnya *cytoplasmic droplet* (Hafez & Prasad 1976: 203). Masih adanya *cytoplasmic droplet* pada spermatozoa berarti proses pematangan belum sempurna atau abnormalitas sekunder dan spermatozoa tersebut merupakan spermatozoa abnormal (Purwaningsih 1996: 58). Dalam pengamatan juga ditemukan bentuk abnormalitas yang lain, yaitu leher dan ekor yang menggulung. Bentuk abnormalitas leher dan ekor menggulung tersebut termasuk ke dalam abnormalitas primer karena terjadi kesalahan pada spermatogenesis di dalam testis yang dapat disebabkan karena penyakit, defisiensi nutrisi makanan, bahan kimia, dan pengaruh lingkungan yang buruk (Nugraheni *dkk.* 2003: 18; Gambar 4.2.8).

Hasil uji statistik menunjukkan bahwa tidak ada pengaruh pemberian infus simplisia *H. sabdariffa* L. terhadap viabilitas dan konsentrasi spermatozoa pada kelompok perlakuan. Hal tersebut kemungkinan dipengaruhi oleh lama waktu

pencekokan. Spermatogenesis mencit membutuhkan waktu lebih kurang 35,5 hari dan proses pematangan spermatozoa mencit saat melewati epididimis yaitu lebih kurang delapan hari (Rugh 1968: 21 & 22), sedangkan waktu pencekokan selama 14 hari. Hal tersebut menunjukkan infus simplisia *H. sabdariffa* L. hanya dapat memengaruhi proses pematangan spermatozoa, yaitu motilitas dan abnormalitas *cytoplasmic droplet*, namun tidak pada spermatogenesis secara keseluruhan, yaitu konsentrasi spermatozoa yang dihasilkan oleh tubulus seminiferus (Hafez & Prasad 1976: 31).



Gambar 4.2.8. Hasil pengamatan spermatozoa abnormal
 [Sumber: Dokumentasi pribadi.]

BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan mengenai pengaruh infus simplisia rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) secara oral terhadap kualitas spermatozoa mencit (*Mus musculus* L.) jantan galur DDY dan diuji secara statistik ($\alpha = 0,05$) dapat disimpulkan:

1. Pemberian induksi etanol (dosis 2,8 g/kg bb) dapat berpengaruh pada penurunan motilitas dan peningkatan abnormalitas spermatozoa mencit (*Mus musculus* L.) jantan galur DDY.
2. Pemberian infus simplisia *Hibiscus sabdariffa* L. secara oral dengan dosis 3% selama 14 hari berturut-turut dapat meningkatkan motilitas dan menurunkan abnormalitas *cytoplasmic droplet* spermatozoa mencit (*Mus musculus* L.) jantan galur DDY mendekati normal.
3. Pemberian infus simplisia *Hibiscus sabdariffa* L. secara oral dengan dosis 1,5%; 3%; dan 6% selama 14 hari berturut-turut tidak berpengaruh dalam meningkatkan viabilitas dan konsentrasi spermatozoa mencit (*Mus musculus* L.) jantan galur DDY di epididimis.
4. Pemberian infus simplisia *Hibiscus sabdariffa* L. secara oral dengan dosis 6% selama 14 hari berturut-turut dapat meningkatkan abnormalitas *cytoplasmic droplet* spermatozoa mencit (*Mus musculus* L.) jantan galur DDY melebihi pemberian induksi etanol.

5.2. Saran

Penelitian lanjutan perlu dilakukan untuk mengetahui efek dari masing-masing kandungan zat aktif *H. sabdariffa* L. serta untuk mengetahui pengaruh pemberian infus simplisia *H. sabdariffa* L. secara oral dengan dosis di bawah atau di atas dosis yang telah digunakan untuk memperoleh dosis optimum terhadap motilitas dan abnormalitas spermatozoa.

DAFTAR REFERENSI

- Adil, E.I.M. 1997. Pengaruh antifertilitas buah tekokak (*Solanum torvum* Swartz.) terhadap mencit (*Mus musculus* L.). *Makara: Jurnal Penelitian Universitas Indonesia* **1**(6): 8--15.
- Agarwal, A. & S.A. Prabakaran. 2005. Oxidative stress and antioxidants in male infertility: a difficult balance. *Iranian Journal of Reproductive Medicine* **3**(1): 1--8.
- Albano, E. 2000. Free radical mechanisms of ethanol toxicity. *Dalam: Rhoades, C.J. 2000. Toxicology of the human environment: The critical role of free radicals.* Taylor & Francais, London: xvi + 494 hlm.
- Ali, B.H., N.A. Wabel, & G. Blunden. 2005. Phytochemical, pharmacological, and toxicological aspects of *Hibiscus sabdariffa* L.: A review. *Phytotherapy Research* **19**: 369--375.
- Amin, A., A.A. Hamza, A. Kambal, & S. Daoud. 2008. Herbal extracts counteract cisplatin-mediated cell death in rat testis. *Asian Journal Andrology* **10**(2): 291--297.
- Arief, S. 2006. Radikal bebas. 24 Februari: 9 hlm.
<http://www.pediatrik.com/buletin/06224113752-x0zu6l.pdf>: 4 Mei 2010.
pk. 07.32 WIB.
- Barry III, H. 1977. Alcohol. *Dalam: Pradhan, S.N. (ed.). 1977. Drug abuse: clinical and basic aspects.* The C.V. Mosby Company, St. Louis: 78--101.
- Brink, M. & R.P. Escobin. 2003. *Plant resources of South-East Asia 17: Fibre plants.* Prosea Foundation, Indonesia: 456 hlm.
- Buettner, G.R. 1993. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, α -tocopherol, and ascorbate. *Biochemistry and Biophysics* **300**(2): 535--543.
- Burger, H.G., D.M. de Kretser, & B. Hudson. 1976. Spermatogenesis and its endocrine control. *Dalam: Hafez, E.S.E. (eds.). 1976. Human semen and fertility regulation in men.* The C.V. Mosby Company, Saint Louis: 3--16.
- Burton, G.W. 1989. Antioxidant action of carotenoids. *The Journal of Nutrition*: 189--111.

- Campbell, N.A., J.B. Reece, & L.G. Mitchell. 2004. *Biologi*. Terj. dari *Biology*, oleh W. Manalu. Penerbit Erlangga, Jakarta: xxi + 501 hlm.
- Chanmugam, P.S., M.D. Boudreau, & D.H. Hwang. 1991. Dietary (n-3) fatty acids alter fatty acid composition and prostaglandin synthesis in rat testis. *American Institute of Nutrition* **91**: 1173--1178.
- Chow, C.K. 1979. Nutritional influence on cellular antioxidant defense system. *The American Journal of Clinical Nutrition* **32**: 1066--1081.
- Coudhary, R., V.K. Chawala, N.D. Soni, J. Kumar, & R.K. Vyas. 2010. Oxidative stress and role of antioxidants in male infertility. *Pakistan Journal of Physiology* **6**(2): 54--59.
- Conover, W.J. 1980. *Practical non parametric statistic*. Ed. ke-2. John Wiley & Sons Incorporation, New York: xiv + 493 hlm.
- Cotton, S. 2006. Ethene. Desember: 1 hlm.
<http://www.chm.bris.ac.uk/motm/ethene/etheneh.htm>: 22 Maret 2011. pk. 11.35 WIB.
- Creasy, D.M. 2001. Pathogenesis of Male Reproductive Physiology. *Toxicologic Pathology* **29**(1): 64--76.
- Dahiru, D., O.J. Obi, & H. Umaru. 2003. Effect of *Hibiscus sabdariffa* calyx extract on carbon tetrachloride induced liver damage. *Biokemistri* **15**(1): 27--33.
- Depkes RI (=Departemen Kesehatan RI). 1995. *Farmakope Indonesia*. Ed. ke-4. Direktorat Jendral Pengawasan Obat dan Makanan, Jakarta: xiii + 1290 hlm.
- Depkes RI (=Departemen Kesehatan RI). 2000. *Parameter standar umum ekstrak tumbuhan obat*. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Jakarta: ii + 68 hlm.
- Devipriya, N., M. Srinivasan, A.R. Sudheer, & V.P. Menon. 2007. Effect of ellagic acid, a natural polyphenol, on alcohol-induced prooxidant and antioxidant imbalance: a drug dose dependent study. *Singapore Medical Journal* **48**(4): 311--318.

- Direktorat Pengawasan Obat Tradisionil. 1983. *TOGA (Tanaman Obat Keluarga)*. Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan Departemen Kesehatan RI, Jakarta: 61 hlm.
- Duke, J.A. 1983. *Hibiscus sabdariffa* L.. 1 hlm.
http://www.hort.purdue.edu/newcrop/duke_energy/Hibiscus_sabdariffa.html: 1 Mei 2010. pk. 15.31 WIB.
- Duke, J.A., M.J. Bogenschutz-Godwin, J. du Cellier, & P.A. K-Duke. 2002. *Handbook of Medicinal Herbs*. 2nd ed. CRC Press. USA: 870 hlm.
- Eddy, E.M. 1988. Duct system and accessory glands of the male reproductive tract. *Dalam*: Lamb, J.C. & P.M.D. Foster (eds.). 1988. *Physiology and toxicology of male reproduction*. Academic Press Incorporation, San Diego: 35--69.
- El-Sokkary, G.M., R.J. Reiter, D. Tan, S.J. Kim, & J. Cabrera. 1999. Inhibitory effect of melatonin on products of lipid peroxidation resulting from chronic ethanol administration. *Alcohol and Alcoholism* **34**(6): 842--850.
- Emanuele, M.A. & N.E. Emanuele. 1998. Alcohol's effect on male reproduction. *Alcohol Research and Health* **22**(3): 195--201.
- Eriksson, C.J.P., T.V. Widenius, R.H. Ylikahri, M. Harkonen, & P. Leionen. 1983. Inhibition of testosterone biosynthesis by ethanol. *Biochemistry Journal* **210**: 29--36.
- Farooqi, A.A. & B.S. Sreeramu. 2001. *Handbook of Medicinal and Aromatic Crops*. Universities Press, India: viii + 518 hlm.
- Fessenden, R.J. & J.S. Fessenden. 1992. Kimia organik. Terj. dari: *Organic chemistry*, oleh A.H. Pudjaatmaka. Penerbit Erlangga, Jakarta: xv + 590 hlm.
- Freund, M. & R.N. Peterson. 1976. Semen evaluation and fertility. *Dalam*: Hafez, E.S.E. (eds.). 1976. *Human semen and fertility regulation in men*. The C.V. Mosby Company, Saint Louis: 344--354.
- Ganaraja, C.D., D' Souza, Vijayalakshmi, Nayanatara, Ramesh Bhat, & Ramaswamy. 2008. Use of vitamin C on effect of ethanol induced lipid peroxidation in various tissues, sperm count, & morphology in the Wistar rats. *Journal of Chinese Clinical Medicine* **11**(3): 1--3.

- Gramenzi, A., F. Caputo, M. Biselli, F. Kuria, E. Loggi, P. Andreone, & M. Bernardi. 2006. Pathogenesis of Alcoholic Liver Disease: the Mechanisms of Liver Damage. 1 hlm.
http://www.medscape.com/viewarticle/545119_4: 23 Maret 2011.
 pk.12.31 WIB.
- Griveau, J.F., E. Dumont, P. Renard, J.P. Callegari, & D. Le Lanmou. 1995. Reactive oxygen species, lipid peroxidation and enzymatic defence systems in human spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility* **193**: 17--26.
- Gutteridge, J.M.C. 1995. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clinical Chemistry* **41**(12): 1819--1828.
- Guyton, A.C. & J.E. Hall. 1997. *Buku ajar fisiologi kedokteran*. 9th ed. Terj. dari: *Textbook of medical physiology*, oleh Irawati, D., L.M.A.K.A. Tenagdi & A. Susanto. Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta: L + 1428 hlm.
- Hafez, E.S.E. & Prasad. 1976. Functional aspects of the epididymis. *Dalam*: Hafez, E.S.E. (ed.). 1976. *Human semen and fertility regulation in men*. The C.V. Mosby Company, Saint Louis: 31--43.
- Halliwell, B. & M.C. Gutteridge. 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemistry Journal* **219**: 1--14.
- Halliwell, B. & S. Chirico. 1993. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *The American Journal of Clinical Nutrition* **57**: 715S--725S.
- Hanafiah, K.A. 1997. *Rancangan percobaan: Teori dan aplikasi*. Ed. ke-2. Penerbit PT Raja Grafindo Persada, Jakarta: xii + 238 hlm.
- Hartanto, H. 1985. Analisis semen. *Dalam*: Moeloek, N. & A. Tjokronegoro (eds.). 1985. *Proses produksi, kesuburan, dan seks dalam perkawinan*. Balai Penerbit FKUI, Jakarta: 161--167.
- Heim, K.E., A.R. Tagliaferro, & D.J. Bobilya. 2001. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry* **13**: 572--584.

- Hidajat, B. 2006. Penggunaan antioksidan pada anak. 20 Februari: 10 hlm.
<http://www.pediatrik.com/pkb/20060220-ienotw-pkb.pdf>: 4 Mei 2010. pk.
 08.12 WIB.
- Hirunpanich, V., A. Utaipat, N.P. Morales, N. Bunyaphatsara, H. Sato, A. Herunsale, & C. Suthisisang. 2005. Antioxidant effects of aqueous extracts from dried calyx of *Hibiscus sabdariffa* Linn. (Roselle) in vitro using rat low-density lipoprotein (LDL). *Biology Pharmacy Buletin* **28**(3): 481--484.
- Johnson, M.H. & B.J. Everitt. 2000. *Essential reproduction*. 5th ed. Blackwell Science, Oxford: xvi + 285 hlm.
- Junquiera, L.C. & J. Carneiro. 1980. *Basic histology*. 3rd ed. Lange Medical Publication, Canada: xiii + 504 hlm.
- Kasdallah-Grissa, A., B. Momagui, E. Aouani, M. Hammami, N. Gharbi, A. Kamoun, & S. El-Fazaa. 2006. Protective effect of resveratrol on ethanol-induced lipid peroxidation in rats. *Alcohol and Alcoholism* **41**(3): 236--239.
- Kehrer, J.P. 2000. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* **149**: 43--50.
- Klassen, C.D. & J.B. Watkins III. 1999. *Casarett and Doull's toxicology: The basic science of poisons*. 5th ed. McGraw-Hill Company, New York: vii + 861 hlm.
- Koolman, J. & K.H. Roehm. 2005. *Color atlas of biochemistry*. 2nd ed. Thieme Stuttgart, New York: x + 476 hlm.
- Kuiper, G.G.J.M., J.G. Lemmen, B.O. Carlsson, J.C. Corton, S.H. Safe, P.T. van deer Saag, B. van der Burg, & J-A. Gustafsson. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor β . *Endocrinology* **139**(10): 4252--4263
- Kwitny, S., A.V. Klaus, & G.R. Hunnicutt. 2010. The Annulus of the Mouse Sperm Tail Is Required to Establish a Membrane Diffusion Barrier That Is Engaged During the Late Steps of Spermiogenesis. *Biology of Reproduction* **82**: 669--678.

- Leeson, C.R., T.S. Leeson, & A.A. Paparo. 1996. *Buku ajar histologi*. Ed. ke-5. Terj. dari *Textbook of Histology*. 5th ed., oleh Tambajong, J. & Wonodirekso (eds.). Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta: ix + 622 hlm.
- Lenzi, A., L. Gandini, V. Maresca, R. Rago, P. Sgro, F. Dondero, & M. Picardo. 2000. Fatty acid composition of spermatozoa and immature germ cells. *Molecular Human Reproduction* **6**(3): 226--231.
- Loebis, A.Th. 1970. *Pengantar bertjojok tanam Rosella*. C.V. Yasaguna, Jakarta: 115 hlm.
- Mahadevan, N. & P. Kamboj. 2009. *Hibiscus sabdariffa* Linn. - An overview. *Natural Product Radiance* **8**(1): 77--83.
- Malole, M.B. & C.S.V. Pramono. 1989. *Penggunaan hewan-hewan percobaan di laboratorium*. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Pusat Antar Universitas Bioteknologi IPB, Bogor: vii + 276 hlm.
- Manach, C., A. Scalbert, C. Morand, C. Remesy, & L. Jimenez. 2010. Polyphenols: food source and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition* **79**: 727--747.
- Maneesh, M., S. Dutta, A. Chakrabarti, & D.M. Vasudevan. 2006. Alcohol abuse-duration dependent decrease in plasma testosterone and antioxidants in males. *Indian Journal Physiology Pharmacology* **50**(3): 291--296.
- Maneesh, M., H. Jayalekshmi, S. Dutta, A. Chakrabarti, & D.M. Vasudevan. 2005. Role of oxidative stress in ethanol induced germ cell apoptosis – an experimental study in rats. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* **20**(2): 62--67.
- Marino, M. & P. Galluzzo. 2008. Are flavonoids agonists or antagonists of the natural hormone 17 β -estradiol? *Life* **60**(4): 241--244.
- Maryani, H. & L. Kristiana. 2005. *Khasiat dan manfaat Rosela*. Agromedia Pustaka, Jakarta: vi + 48 hlm.
- McLachlan, R. 2007. Male infertility. Maret: 2 hlm.
[http://www.andrologyaustralia.org/docs/Factsheet MI 07.pdf](http://www.andrologyaustralia.org/docs/Factsheet_MI_07.pdf): 2
 September 2010. pk. 09.03 WIB.

- Moeloek, N. 1994. Sistem reproduksi jantan/pria. *Dalam: Syahrudin, M.H., Kamaludin, & A. Tjokrenegoro (eds.). 1994. Reproduksi dan embriologi: Dari satu sel menjadi organisme.* Balai Penerbit FKUI, Jakarta: 9--16.
- Muhilal. 1991. Teori radikal bebas dalam gizi dan kedokteran. *Cermin Dunia Kedokteran* **73**: 9--11.
- Musa, M. 1983. *Pedoman pembuatan kebun benih Rosella (Hibiscus sabdariffa L.)*. Direktorat Jenderal Perkebunan dan Jurusan Agronomi Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Bogor: iv + 34 hlm.
- Nalbandov, A.V. 1990. *Fisiologi reproduksi pada mamalia dan unggas*. Ed. ke-3. Terj. dari *Reproductive physiology of mammals and birds*, oleh Keman, S. Penerbit Universitas Indonesia, Jakarta: xx + 378 hlm.
- Nijveldt, R.J., E.V. Nood, D.E.C. van Hoorn, P.G. Boelens, K.V. Norren, & P.A.M. van Leewen. 2001. Flavonoids: A review of probable mechanisms of action and potential applications. *American Journal Clinical Nutrition* **74**: 418--425.
- Nugraheni, T., O.P. Astirin, & T. Widiyanti. 2003. Pengaruh vitamin C terhadap perbaikan spermatogenesis dan kualitas spermatozoa mencit (*Mus musculus L.*) setelah pemberian ekstrak tembakau (*Nicotiana tabacum L.*). *Biofarmasi* **1**(1): 13--19.
- Oteiza, P.I., A.G. Erlejman, S.V. Verstraeten, C.L.Keen, & C.G. Fraga. 2005. Flavonoid-membrane interactions: A protective role of flavonoids at the membrane surface? *Clinical and Developmental Immunology* **12**(1): 19--25.
- Olaleye, M.T. 2007. Cytotoxicity and antibacterial activity of methanolic extract of *Hibiscus sabdariffa*. *Journal of Medicinal Plants Research* **1**(1): 9--13.
- Orisakwe, O.E., D.C. Husaini, & O.J. Afonne. 2004. Testicular effects of sub-chronic administration of *Hibiscus sabdariffa* calyx aqueous extract in rats. *Reproductive Toxicology* **18**: 295--298.
- Pantelidis, G.E., M. Vasilakakis, G.A. Manganaris, & Gr. Diamantidis. 2007. Antioxidant capacity, phenol, anthocyanin, and ascorbic acid contents in raspberries, blackberries, red currants, gooseberries, and Cornelian cherries. *Food chemistry* **102**: 777--783.

- Pedersen, H. & D.W. Fawcett. 1976. Functional anatomy of the human spermatozoon. *Dalam: Hafez, E.S.E. (eds.). 1976. Human semen and fertility regulation in men.* The C.V. Mosby Company, Saint Louis: 65--75.
- Percival, M. 1996. Antioxidants. *Clinical Nutrition Insights* **10**: 1--4.
- Purwaningsih, E. 1996. Morfologi spermatozoa: Adakah kaitannya dengan keberhasilan kehamilan? *Jurnal Kedokteran YARSI* **4**(1): 54--63.
- Ramadhani, D. 2007. Pengaruh pemberian ekstrak *Pimpinella pruatjan* Molkenb. (Purwoceng) fraksi kloroform secara oral terhadap kualitas spermatozoa *Mus musculus* L. (mencit) jantan galur DDY. Skripsi S-1. Departemen Biologi FMIPA-UI, Depok: xi + 93 hlm.
- Rai, S., A.B. Das, & P. Das. 1999. Variations in chlorophylls, carotenoids, protein, and secondary metabolites amongst ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) cultivars and their association with rhizome yield. *Journal of Crop and Horticultural Science* **27**: 79--82.
- Reanmongkol, W. & A. Itharat. 2007. Antipyretic activity of the extracts of *Hibiscus sabdariffa* calyces L. in experimental animals. *Songklanakarin Journal Science Technology* **29**(1): 29--38.
- Riveros-Rosas, H., A. Julian-Sanchez, & E. Pina. 1997. Enzymology of ethanol and acetaldehyde metabolism in mammals. *Archives of Medical Research* **28**(4): 453--471.
- Rosmilawati, M. 2009. Pengaruh pemberian ekstrak etil asetat *Enhalus acoroides* (L.f.) Royle secara oral terhadap kualitas spermatozoa *Mus musculus* L. (mencit) jantan galur DDY. Skripsi S-1. Departemen Biologi FMIPA-UI, Depok: xi + 110 hlm.
- Ross, M.H., L.J. Romrell, & G.I. Kaye. 1995. *Histology: A text and atlas.* 3rd ed. Williams & Wilkins Publisher, Baltimore: xiii + 823 hlm.
- Rugh, R. 1968. *The Mouse: Its reproduction and developmental.* Burgess Publishing Company, Minneapolis: iv + 430 hlm.
- Rusmiati. 2007. Pengaruh ekstrak kayu secang (*Caesalpinia sappan* L.) terhadap viabilitas spermatozoa mencit jantan (*Mus musculus* L.). *Bioscientiae* **4**(2): 63--70.

- Saether, T., T.N. Tran, H. Rootwelt, H.J. Grav, B.O. Christophersen, & T.B. Haugen. 2007. Essential fatty acid and deficiency induces fatty acid desaturase expression in rat epididymis, but not in testis. *Reproduction* **133**: 467--477.
- Sanocka, D. & M. Kurpisz. 2004. Reactive oxygen species and sperm cells. *Reproductive Biology and Endocrinology* **2**(12): 1--7.
- Santoso, S. 2003. *Mengatasi berbagai masalah statistik dengan SPSS 11.5*. PT Alex Media, Jakarta: xi + 591 hlm.
- Shakhasiri. 2009. Ethanol. 1 hlm.
[http://scifun.org/GemChem/Enrichment/Strang\[Jan09\].htm](http://scifun.org/GemChem/Enrichment/Strang[Jan09].htm): 22 September 2010. pk. 08.36 WIB.
- Siegel, S. 2005. Drug tolerance, drug addiction, and drug anticipation. *American Psychological Society* **14**(6): 296--300.
- Siemonsma, J.S. & K. Piluek. 1994. *Plant resources of South-East Asia 8: Vegetables*. Prosea Foundation, Indonesia: 412 hlm.
- Sikka, S.C. 1995. Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. *Frontiers in Bioscience* **1**: 77--86.
- Slater, T.F. 1984. Free-radical mechanisms in tissue injury. *Biochemistry Journal* **222**: 1--15.
- Smith, J.B. & S. Mangkoewidjojo. 1988. *Pemeliharaan, pembiakan, dan penggunaan hewan percobaan di daerah tropis*. Penerbit Universitas Indonesia, Jakarta: xvi + 161 hlm.
- Subramanian, S., D.S. Kumar, & P. Arulselvan. 2006. Wound healing potential of *Aloe vera* leaf gel studied in experimental rabbits. *Asian Journal of Biochemistry* **1**(2): 178--185.
- Suherman, S.K. 2001. Farmakologi antioksidan. *Dalam: Makalah Simposium Peranan Radikal Bebas dan Antioksidan pada sejumlah penyakit*. Bagian Farmakologi dan Terapeutik FKUI, Jakarta: 87 hlm.
- Sumampouw, A.G.O. 2003. Radikal bebas dan antioksidan. 29 Maret: 1 hlm.
http://www.medikaholistik.com/medika.html?xmodule=document_detail&xid=54: 2 September 2010. pk. 09.10 WIB.

- Sunday, O.A., A.B. Munir, O.O. Akeeb, A.A. Bolanle, & S.O. Badaru. 2010. Antiviral effect of *Hibiscus sabdariffa* and *Celosia argentea* on Measles Virus. *African Journal of Microbiology Research* **4**(4): 293--296.
- Sutarni, S. 2007. *Sari Neurotoksikologi*. Pustaka Cendekia Press, Jakarta: iv + 156 hlm.
- Suyatna, F.D. 2001. Patobiologi radikal bebas. *Dalam: Makalah Simposium Peranan Radikal Bebas dan Antioksidan pada sejumlah penyakit. Bagian Farmakologi dan Terapeutik FKUI, Jakarta: 87 hlm.*
- Tabakoff, B. & P.L. Hoffman. 2000. Animal models in alcohol research. *Alcohol Research & Health* **24**(2): 77--84.
- Tjitrosoepomo, G. 2005. *Taksonomi Tumbuhan Obat-obatan*. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta: ix + 447 hlm.
- Toelihere, M.R. 1979. *Fisiologi reproduksi pada ternak*. Penerbit Angkasa, Bandung: 327 hlm.
- Tsai, P-J., J. McIntosh, P. Pearce, B. Camden, & B.R. Jordan. 2002. Anthocyanin and antioxidant capacity in Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extract. *Food Research International* **35**: 351--356.
- TutorVista. 2010. Rat's internal system. 1 hlm.
<http://www.tutorvista.com/content/biology/biology-iii/animal-morphology/respiratory-excretory-nervous-reproductive-system-rat.php>:
 23 Mei 2011. pk. 06.31 WIB.
- Usoh, I.F., E.J. Akpan, E.O. Etim, & E.O. Farombi. 2005. Antioxidant actions of dried flower extracts of *Hibiscus sabdariffa* L. on sodium arsenite-induced oxidative stress in rats. *Pakistan Journal of Nutrition* **4**(3): 135--141.
- van Steenis, C.G.G.J.van. 2003. *Flora ed*. Terj. dari. *Flora*, oleh M. Surjowinoto, dkk. Penerbit PT. Pradnya Paramita, Jakarta : xii + 485 hlm.
- Wang, H., G. Cao, & R.L. Prior. 1997. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *Journal Agricultural Food Chemistry* **45**: 304--309.
- Wattanathorn, J., W.S. Ishida, M. Namking, & L. Taepongsoat. 2000. Subacute toxicity of ethanol on the function of male rat reproductive tract. *Srinagarind Medical Journal* **15**(1): 12--17.

- Weinberg, J. & A. W. Vogl. 1988. Effects of ethanol consumption on the morphology of the rat seminiferous eepithelium. *Journal of Andrology* **9**(4): 261--269.
- White, I.G., A. Darin-Bennett, & A. Poulos. 1976. Lipids of human semen. *Dalam: Hafez, E.S.E.(eds.). 1976. Human semen and fertility regulation in men.* The C.V. Mosby Company, Saint Louis: 144--152.
- WHO (=World Health Organization). 1988. *Penuntun laboratorium WHO untuk pemeriksaan semen manusia dan interaksi semen-getah servik.* Terj. dari *WHO laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction*, oleh Tadjudin, M.K. Balai Penerbit FK UI, Jakarta: xiv + 81 hlm.
- Winarsi, H. 2007. *Antioksidan alami dan radikal bebas.* Penerbit Kanisius, Yogyakarta: 281 hlm.
- Wu, D. & Cederbaum. 2003. Alcohol, oxidative stress, and free radical damage. *Alcohol Research & Health* **27**(4): 277--284.
- Yatim, W. 1988. Efek anti-fertilitas gossipol dan gula berkhlor terhadap tikus jantan (*Rattus novergicus*) dan implikasi prospeknya sebagai kontraseptif pria. Disertasi S3 Universitas Padjajaran, Bandung: xxiii + 432 hlm.
- Zakaria, Z., R. Aziz, Y.L. Lachimanan, S. Sreenivasan, & X. Rathinam. 2008. Antioxidant activity of *Coleus blumei*, *Orthosiphon stamineus*, *Ocimum basilicum*, and *Mentha arvensis* from Lamiaceae family. *International Journal of Natural and Engineering Sciences* **2**(1): 93--95.
- Zakhari, S. 2006. Overview: How is alcohol metabolized by the body? *Alcohol Research & Health* **29**(4): 245--254.
- Zaneveld, L.J.D. & K.L. Polaskoski. 1976. Biochemistry of human spermatozoa. *Dalam: Hafez, E.S.E. (eds.). 1976. Human semen and fertility regulation in men.* The C.V. Mosby Company, Saint Louis: 167--175.

Lampiran 1

Cara perhitungan dosis infus simplisia *Hibiscus sabdariffa* L. untuk mencit (*Mus musculus* L.)

1. Pembuatan infus simplisia *H. sabdariffa* L.

Diketahui:

Dosis pada manusia dewasa (per 70 kg) = 5 kelopak per hari
= 4 g berat kering (dalam 200 ml)
= 2 g (dalam 100 ml)

(Duke 2002: 629).

Faktor konversi dosis dari manusia ke mencit (per 20 g bb) = 0,0026

Ditanya:

Dosis infus simplisia *H. sabdariffa* L. untuk mencit

Perhitungan:

Perhitungan volume bahan uji untuk setiap mencit adalah sebagai berikut:

Dosis untuk mencit (per 20 g bb) = $0,0026 \times 2 \text{ g}$
= 0,0052 g

$\% \text{ b/v} = \frac{0,0052 \text{ g}}{0,2 \text{ ml}} \times 100 \% = 2,6\% \text{ dibulatkan menjadi } 3\%$

Dosis tersebut dinaik-turunkan sehingga dosis yang digunakan dalam penelitian adalah 1,5%; 3%; dan 6%.

(Ngatidjan 1991: 94 & 121).

(lanjutan)

2. Volume pemberian infus simplisia *H. sabdariffa* L. pada mencit**Diketahui:**

100 g berat badan mencit = 1 ml infus simplisia bahan uji

Misalkan berat badan mencit = 20 g

Ditanya:Volume pemberian infus simplisia *H. sabdariffa* L. untuk setiap individu**Perhitungan:**

Perhitungan volume pemberian infus simplisia *H. sabdariffa* L. untuk setiap mencit adalah sebagai berikut:

$$\frac{20 \text{ g}}{100 \text{ g}} \times 1 \text{ ml} = 0,2 \text{ ml}$$

Jadi, setiap mencit dengan berat badan 20 g akan dicekok dengan infus simplisia *H. sabdariffa* L. sebanyak 0,2 ml.

Lampiran 2

Cara perhitungan dosis induksan etanol untuk mencit (*Mus musculus L.*)

1. Pembuatan suspensi etanol

Diketahui:

$$\begin{aligned}\text{Dosis etanol untuk tikus (per 200 g)} &= 2 \text{ g/kg bb} \\ &= 2000 \text{ mg/kg bb} \\ &= 400 \text{ mg/200 g bb tikus}\end{aligned}$$

(Ganaraja *dkk.* 2008: 1)

$$\text{Faktor konversi dosis dari tikus ke mencit (per 20 g bb)} = 0,14$$

Ditanya:

Dosis untuk mencit

Perhitungan:

$$\begin{aligned}\text{Dosis untuk mencit (per 20 g)} &= 0,14 \times 400 \text{ mg/200 g bb} \\ &= 56 \text{ mg/20 g bb} \\ &= 2800 \text{ mg/kg bb} \\ &= 2,8 \text{ g/kg bb}\end{aligned}$$

Jika 1 ml untuk 100 g bb mencit, maka:

$$\frac{1000 \text{ g}}{100 \text{ g}} \times 1 \text{ ml} = 10 \text{ ml}$$

Dosis etanol 2,8 g/kg bb disuspensikan dalam 10 ml akuades. Maka dalam 100 ml akuades disuspensikan etanol sebanyak 28 g/kg bb.

Etanol berbentuk cair, maka:

$$\text{Berat} = \text{Volume} \times \text{Berat jenis (BJ)}$$

$$\text{Volume} = \frac{\text{Berat (g)}}{\text{BJ (g/ml)}}$$

$$= \frac{28 \text{ g}}{0,79 \text{ g/ml}} = 35 \text{ ml}$$

Jadi, 35 ml etanol dilarutkan dengan akuades sampai volume larutan 100 ml.

(lanjutan)

2. Volume pemberian larutan induksi etanol pada mencit

Diketahui:

100 g berat badan mencit = 1 ml larutan induksi

Misalkan berat badan mencit = 20 g

Ditanya:

Volume pemberian larutan induksi etanol untuk setiap individu

Perhitungan:

Perhitungan volume pemberian larutan induksi etanol untuk setiap mencit adalah sebagai berikut:

$$\frac{20 \text{ g}}{100 \text{ g}} \times 1 \text{ ml} = 0,2 \text{ ml}$$

Jadi, setiap mencit dengan berat badan 20 g akan disuntik dengan suspensi etanol sebanyak 0,2 ml.

Lampiran 3

Surat identifikasi *Hibiscus sabdariffa* L. oleh Herbarium Bogoriense



LEMBAGA ILMU PENGETAHUAN INDONESIA
(Indonesian Institute of Sciences)
PUSAT PENELITIAN BIOLOGI
(Research Center for Biology)
Jl. Raya Jakarta - Bogor Km. 46 Cibinong 16911, Indonesia P.O Box 25 Cibinong
Telp. (021) 87907636 - 87907604 Fax. 87907612

Cibinong, 5 Mei 2010

Nomor : 624/IPH.1.02/If.8/V/2010
Lampiran : -
Perihal : Hasil identifikasi/determinasi Tumbuhan

Kepada Yth.
Bpk./Ibu/Sdr(i). Vinda Ratna Setyaningsih
Mhs. Uviversitas Indonesia

Dengan hormat,

Bersama ini kami sampaikan hasil identifikasi/determinasi tumbuhan yang Saudara kirimkan ke "Herbarium Bogoriense", Bidang Botani Pusat Penelitian Biologi-LIPI Bogor, adalah sebagai berikut :

| No. | No. Kol. | Jenis | Suku |
|-----|----------|-------------------------------|-----------|
| 1 | Rosella | <i>Hibiscus sabdariffa</i> L. | Malvaceae |

Demikian, semoga berguna bagi Saudara.


Kepala Bidang Botani
Pusat Penelitian Biologi-LIPI,
Prof. Dr. Eko Baroto Walujo
NIP. 195111041975011001

Lampiran 4

Cara penghitungan motilitas spermatozoa metode WHO 1988

Diketahui:

Dari 100 spermatozoa didapat hasil pengamatan yaitu:

- Jumlah spermatozoa yang bergerak lurus ke depan sebanyak 36 spermatozoa (a)
- Jumlah spermatozoa yang bergerak lambat atau bergerak tidak lurus sebanyak 24 spermatozoa (b)
- Jumlah spermatozoa yang bergerak di tempat sebanyak 10 spermatozoa (c)
- Jumlah spermatozoa yang tidak bergerak sebanyak 30 spermatozoa (d)

Maka:

$$\begin{aligned}\text{Persentase motilitas spermatozoa} &= \frac{(a + b + c)}{(a + b + c + d)} \times 100\% \\ &= \frac{(36 + 24 + 10)}{(36 + 24 + 10 + 30)} \times 100\% \\ &= \frac{70}{100} \times 100\% \\ &= 70\%\end{aligned}$$

(WHO 1988: 6 & 7).

Lampiran 5

Uji normalitas Shapiro-Wilk terhadap data persentase motilitas spermatozoa mencit (*Mus musculus L.*) jantan

Tujuan:

Untuk mengetahui distribusi data motilitas spermatozoa mencit jantan sebagai prasyarat untuk uji analisis variansi (anava)

Hipotesis:

- Ho : Data motilitas spermatozoa mencit jantan berdistribusi normal
Ha : Data motilitas spermatozoa mencit jantan berdistribusi tidak normal

Tarif nyata:

Nilai α yang digunakan pada $\alpha = 0,05$

Kriteria pengujian:

- Jika $P < 0,05$; maka H_0 ditolak
Jika $P > 0,05$; maka H_0 diterima

Hasil perhitungan:

| Motilitas spermatozoa | Shapiro-Wilk | | |
|-----------------------|--------------|----|------------------|
| | Statistik | df | Probabilitas (P) |
| | 0,961 | 25 | 0,435 |

Nilai $P = 0,435$; jika $P > 0,05$; maka H_0 diterima

Kesimpulan:

Data motilitas spermatozoa mencit jantan berdistribusi normal

Lampiran 6

Uji homogenitas Levene terhadap data persentase motilitas spermatozoa mencit (*Mus musculus L.*) jantan

Tujuan:

Untuk mengetahui distribusi data motilitas spermatozoa mencit jantan sebagai prasyarat untuk uji analisis variansi (anova)

Hipotesis:

Ho : Data motilitas spermatozoa mencit jantan bervariasi homogen

Ha : Data motilitas spermatozoa mencit jantan tidak bervariasi

Tarif nyata:

Nilai α yang digunakan pada $\alpha = 0,05$

Kriteria pengujian:

Jika $P < 0,05$; maka Ho ditolak

Jika $P > 0,05$; maka Ho diterima

Hasil perhitungan:

| Uji Levene | df1 | df2 | Probabilitas (P) |
|------------|-----|-----|------------------|
| 0,359 | 4 | 20 | 0,835 |

Nilai $P = 0,835$; jika $P > 0,05$; maka Ho diterima

Kesimpulan:

Data motilitas spermatozoa mencit jantan bervariasi homogen

Lampiran 7

Uji analisis variansi (anava) 1-faktor terhadap data persentase motilitas spermatozoa mencit (*Mus musculus* L.) jantan

Tujuan:

Untuk mengetahui ada atau tidak adanya pengaruh pemberian infus simplisia *Hibiscus sabdariffa* L. terhadap motilitas spermatozoa mencit jantan pada ke-5 perlakuan

Hipotesis:

Ho : Tidak adanya pengaruh pemberian infus simplisia *Hibiscus sabdariffa* L. terhadap motilitas spermatozoa mencit jantan pada ke-5 perlakuan

Ha : Adanya pengaruh pemberian infus simplisia *Hibiscus sabdariffa* L. terhadap motilitas spermatozoa mencit jantan pada ke-5 perlakuan

Tarif nyata:

Nilai α yang digunakan pada $\alpha = 0,05$

Kriteria pengujian:

Jika $P < 0,05$; maka Ho ditolak

Jika $P > 0,05$; maka Ho diterima

Hasil perhitungan:

| | Jumlah kuadrat | df | Kuadrat tengah | F | Probabilitas (P) |
|----------------|----------------|----|----------------|-------|------------------|
| Antar kelompok | 619,840 | 4 | 154,960 | 3,054 | 0,041 |
| Dalam kelompok | 1104,800 | 20 | 50,740 | | |
| Total | 1634,640 | 24 | | | |

Nilai $P = 0,041$; jika $P < 0,05$; maka Ho ditolak

Kesimpulan:

Ada pengaruh pemberian infus simplisia *Hibiscus sabdariffa* L. terhadap motilitas spermatozoa mencit jantan pada ke-5 perlakuan

Lampiran 8

Uji perbandingan berganda LSD terhadap data persentase motilitas spermatozoa mencit (*Mus musculus L.*) jantan

Tujuan:

Untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan motilitas spermatozoa mencit jantan antara pasangan perlakuan

Hipotesis:

H_0 : Tidak adanya perbedaan motilitas spermatozoa mencit jantan antara pasangan perlakuan

H_a : Ada perbedaan motilitas spermatozoa mencit jantan antara pasangan perlakuan

Tarif nyata:

Nilai α yang digunakan pada $\alpha = 0,05$

Kriteria pengujian:

Jika $P < 0,05$; maka H_0 ditolak

Jika $P > 0,05$; maka H_0 diterima

(lanjutan)

Hasil perhitungan:

| Perlakuan (I) | Perlakuan (J) | Selisih mean (I-J) | SE | P | Interval kepercayaan 95% | |
|------------------|------------------|--------------------------|-------|-------|-----------------------------|---------------|
| | | | | | Batas bawah | Batas atas |
| KK1 | KK2 | 14,800* | 4,505 | 0,004 | 5,40 | 24,20 |
| | KP1 | 9,600* | 4,505 | 0,046 | 0,20 | 19,00 |
| | KP2 | 4,800 | 4,505 | 0,299 | -4,60 | 14,20 |
| | KP3 | 9,200 | 4,505 | 0,055 | -0,20 | 18,60 |
| KK2 | KK1 | -14,800* | 4,505 | 0,004 | -24,20 | -5,40 |
| | KP1 | -5,200 | 4,505 | 0,262 | -14,60 | 4,20 |
| | KP2 | -10,000* | 4,505 | 0,038 | -19,40 | -0,60 |
| | KP3 | -5,600 | 4,505 | 0,228 | -15,00 | 3,80 |
| KP1 | KK1 | -9,600* | 4,505 | 0,046 | -19,00 | -0,20 |
| | KK2 | 5,200 | 4,505 | 0,262 | -4,20 | 14,60 |
| | KP2 | -4,800 | 4,505 | 0,299 | -14,20 | 4,60 |
| | KP3 | -0,400 | 4,505 | 0,930 | -9,80 | 9,00 |
| KP2 | KK1 | -4,800 | 4,505 | 0,299 | -14,20 | 4,60 |
| | KK2 | 10,000* | 4,505 | 0,038 | 0,60 | 19,40 |
| | KP1 | 4,800 | 4,505 | 0,299 | -4,60 | 14,20 |
| KP3 | KP3 | 4,400 | 4,505 | 0,340 | -5,00 | 13,80 |
| | KK1 | -9,200 | 4,505 | 0,055 | -18,60 | 0,20 |
| | KK2 | 5,600 | 4,505 | 0,228 | -3,80 | 15,00 |
| | KP1 | 0,400 | 4,505 | 0,930 | -9,00 | 9,80 |
| | KP2 | -4,400 | 4,505 | 0,340 | -13,80 | 5,00 |

Keterangan:

- * : Berbeda Nyata
 SE : Standar Error
 P : Probabilitas

Kesimpulan:

- Ada perbedaan nyata antara KK1 dengan KK2 dan KP1; KK2 dengan KP1, KP2, dan KP3; KP1 dengan KP2 dan KP3
- Tidak ada perbedaan nyata antara KK1 dengan KP2 dan KP3

Lampiran 9

Uji normalitas Shapiro-Wilk terhadap data persentase viabilitas spermatozoa mencit (*Mus musculus* L.) jantan

Tujuan:

Untuk mengetahui distribusi data viabilitas spermatozoa mencit jantan sebagai prasyarat untuk uji analisis variansi (anava)

Hipotesis:

Ho : Data viabilitas spermatozoa mencit jantan berdistribusi normal

Ha : Data viabilitas spermatozoa mencit jantan berdistribusi tidak normal

Tarif nyata:

Nilai α yang digunakan pada $\alpha = 0,05$

Kriteria pengujian:

Jika $P < 0,05$; maka Ho ditolak

Jika $P > 0,05$; maka Ho diterima

Hasil perhitungan:

| Viabilitas spermatozoa | Shapiro-Wilk | | |
|------------------------|--------------|----|------------------|
| | Statistik | df | Probabilitas (P) |
| | 0,946 | 25 | 0,206 |

Nilai $P = 0,206$; jika $P > 0,05$; maka Ho diterima

Kesimpulan:

Data viabilitas spermatozoa mencit jantan berdistribusi normal

Lampiran 10

Uji homogenitas Levene terhadap data persentase viabilitas spermatozoa mencit (*Mus musculus L.*) jantan

Tujuan:

Untuk mengetahui distribusi data viabilitas spermatozoa mencit jantan sebagai prasyarat untuk uji analisis variansi (anava)

Hipotesis:

Ho : Data viabilitas spermatozoa mencit jantan bervariasi homogen

Ha : Data viabilitas spermatozoa mencit jantan tidak bervariasi

Tarif nyata:

Nilai α yang digunakan pada $\alpha = 0,05$

Kriteria pengujian:

Jika $P < 0,05$; maka Ho ditolak

Jika $P > 0,05$; maka Ho diterima

Hasil perhitungan:

| Uji Levene | df1 | df2 | Probabilitas (P) |
|------------|-----|-----|------------------|
| 0,916 | 4 | 20 | 0,474 |

Nilai $P = 0,474$; jika $P > 0,05$; maka Ho diterima

Kesimpulan:

Data viabilitas spermatozoa mencit jantan bervariasi homogen

Lampiran 11

Uji analisis variansi (anava) 1-faktor terhadap data persentase viabilitas spermatozoa mencit (*Mus musculus* L.) jantan

Tujuan:

Untuk mengetahui ada atau tidak adanya pengaruh pemberian infus simplisia *Hibiscus sabdariffa* L. terhadap viabilitas spermatozoa mencit jantan pada ke-5 perlakuan

Hipotesis:

Ho : Tidak adanya pengaruh pemberian infus simplisia *Hibiscus sabdariffa* L. terhadap viabilitas spermatozoa mencit jantan pada ke-5 perlakuan

Ha : Adanya pengaruh pemberian infus simplisia *Hibiscus sabdariffa* L. terhadap viabilitas spermatozoa mencit jantan pada ke-5 perlakuan

Tarif nyata:

Nilai α yang digunakan pada $\alpha = 0,05$

Kriteria pengujian:

Jika $P < 0,05$; maka Ho ditolak

Jika $P > 0,05$; maka Ho diterima

Hasil perhitungan:

| | Jumlah kuadrat | df | Kuadrat tengah | F | Probabilitas (P) |
|----------------|----------------|----|----------------|-------|------------------|
| Antar kelompok | 639,760 | 4 | 159,940 | 1,705 | 0,188 |
| Dalam kelompok | 1876,000 | 20 | 93,800 | | |
| Total | 2515,760 | 24 | | | |

Nilai $P = 0,188$; jika $P > 0,05$; maka Ho diterima

Kesimpulan:

Tidak ada pengaruh pemberian infus simplisia *Hibiscus sabdariffa* L. terhadap viabilitas spermatozoa mencit jantan pada ke-5 perlakuan

Lampiran 12

Uji normalitas Shapiro-Wilk terhadap data konsentrasi spermatozoa mencit (*Mus musculus L.*) jantan

Tujuan:

Untuk mengetahui distribusi data konsentrasi spermatozoa mencit jantan sebagai prasyarat untuk uji analisis variansi (anava)

Hipotesis:

Ho : Data konsentrasi spermatozoa mencit jantan berdistribusi normal

Ha : Data konsentrasi spermatozoa mencit jantan berdistribusi tidak normal

Tarif nyata:

Nilai α yang digunakan pada $\alpha = 0,05$

Kriteria pengujian:

Jika $P < 0,05$; maka Ho ditolak

Jika $P > 0,05$; maka Ho diterima

Hasil perhitungan:

| Konsentrasi spermatozoa | Shapiro-Wilk | | |
|-------------------------|--------------|----|------------------|
| | Statistik | df | Probabilitas (P) |
| | 0,923 | 25 | 0,061 |

Nilai $P = 0,061$; jika $P > 0,05$; maka Ho diterima

Kesimpulan:

Data konsentrasi spermatozoa mencit jantan berdistribusi normal

Lampiran 13

Uji homogenitas Levene terhadap data konsentrasi spermatozoa mencit (*Mus musculus L.*) jantan

Tujuan:

Untuk mengetahui distribusi data konsentrasi spermatozoa mencit jantan sebagai prasyarat untuk uji analisis variansi (anava)

Hipotesis:

Ho : Data konsentrasi spermatozoa mencit jantan bervariasi homogen

Ha : Data konsentrasi spermatozoa mencit jantan tidak bervariasi

Tarif nyata:

Nilai α yang digunakan pada $\alpha = 0,05$

Kriteria pengujian:

Jika $P < 0,05$; maka Ho ditolak

Jika $P > 0,05$; maka Ho diterima

Hasil perhitungan:

| Uji Levene | df1 | df2 | Probabilitas (P) |
|------------|-----|-----|------------------|
| 1,030 | 4 | 20 | 0,416 |

Nilai $P = 0,416$; jika $P > 0,05$; maka Ho diterima

Kesimpulan:

Data konsentrasi spermatozoa mencit jantan bervariasi homogen

Lampiran 14

Uji analisis variansi (anava) 1-faktor terhadap data konsentrasi spermatozoa mencit (*Mus musculus L.*) jantan

Tujuan:

Untuk mengetahui ada atau tidak adanya pengaruh pemberian infus simplisia *Hibiscus sabdariffa L.* terhadap konsentrasi spermatozoa mencit jantan pada ke-5 perlakuan

Hipotesis:

Ho : Tidak adanya pengaruh pemberian infus simplisia *Hibiscus sabdariffa L.* terhadap konsentrasi spermatozoa mencit jantan pada ke-5 perlakuan

Ha : Adanya pengaruh pemberian infus simplisia *Hibiscus sabdariffa L.* terhadap konsentrasi spermatozoa mencit jantan pada ke-5 perlakuan

Tarif nyata:

Nilai α yang digunakan pada $\alpha = 0,05$

Kriteria pengujian:

Jika $P < 0,05$; maka Ho ditolak

Jika $P > 0,05$; maka Ho diterima

Hasil perhitungan:

| | Jumlah kuadrat | df | Kuadrat tengah | F | Probabilitas (P) |
|----------------|----------------|----|----------------|-------|------------------|
| Antar kelompok | 55,802 | 4 | 13,951 | 0,357 | 0,836 |
| Dalam kelompok | 781,828 | 20 | 39,091 | | |
| Total | 837,630 | 24 | | | |

Nilai $P = 0,836$; jika $P > 0,05$; maka Ho diterima

Kesimpulan:

Tidak ada pengaruh pemberian infus simplisia *Hibiscus sabdariffa L.* terhadap konsentrasi spermatozoa mencit jantan pada ke-5 perlakuan

Lampiran 15

Uji normalitas Shapiro-Wilk terhadap data persentase abnormalitas spermatozoa mencit (*Mus musculus L.*) jantan

Tujuan:

Untuk mengetahui distribusi data abnormalitas spermatozoa mencit jantan sebagai prasyarat untuk uji analisis variansi (anava)

Hipotesis:

Ho : Data abnormalitas spermatozoa mencit jantan berdistribusi normal

Ha : Data abnormalitas spermatozoa mencit jantan berdistribusi tidak normal

Tarif nyata:

Nilai α yang digunakan pada $\alpha = 0,05$

Kriteria pengujian:

Jika $P < 0,05$; maka Ho ditolak

Jika $P > 0,05$; maka Ho diterima

Hasil perhitungan:

| Abnormalitas spermatozoa | Shapiro-Wilk | | |
|--------------------------|--------------|----|------------------|
| | Statistik | df | Probabilitas (P) |
| | 0,970 | 25 | 0,655 |

Nilai $P = 0,655$; jika $P > 0,05$; maka Ho diterima

Kesimpulan:

Data abnormalitas spermatozoa mencit jantan berdistribusi normal

Lampiran 16

Uji homogenitas Levene terhadap data persentase abnormalitas spermatozoa mencit (*Mus musculus L.*) jantan

Tujuan:

Untuk mengetahui distribusi data abnormalitas spermatozoa mencit jantan sebagai prasyarat untuk uji analisis variansi (anava)

Hipotesis:

Ho : Data abnormalitas spermatozoa mencit jantan bervariasi homogen

Ha : Data abnormalitas spermatozoa mencit jantan tidak bervariasi

Tarif nyata:

Nilai α yang digunakan pada $\alpha = 0,05$

Kriteria pengujian:

Jika $P < 0,05$; maka Ho ditolak

Jika $P > 0,05$; maka Ho diterima

Hasil perhitungan:

| Uji Levene | df1 | df2 | Probabilitas (P) |
|------------|-----|-----|------------------|
| 0,980 | 4 | 20 | 0,937 |

Nilai $P = 0,937$; jika $P > 0,05$; maka Ho diterima

Kesimpulan:

Data abnormalitas spermatozoa mencit jantan bervariasi homogen

Lampiran 17

Uji analisis variansi (anava) 1-faktor terhadap data persentase abnormalitas spermatozoa mencit (*Mus musculus* L.) jantan

Tujuan:

Untuk mengetahui ada atau tidak adanya pengaruh pemberian infus simplisia *Hibiscus sabdariffa* L. terhadap abnormalitas spermatozoa mencit jantan pada ke-5 perlakuan

Hipotesis:

Ho : Tidak adanya pengaruh pemberian infus simplisia *Hibiscus sabdariffa* L. terhadap abnormalitas spermatozoa mencit jantan pada ke-5 perlakuan

Ha : Adanya pengaruh pemberian infus simplisia *Hibiscus sabdariffa* L. terhadap abnormalitas spermatozoa mencit jantan pada ke-5 perlakuan

Tarif nyata:

Nilai α yang digunakan pada $\alpha = 0,05$

Kriteria pengujian:

Jika $P < 0,05$; maka Ho ditolak

Jika $P > 0,05$; maka Ho diterima

Hasil perhitungan:

| | Jumlah kuadrat | df | Kuadrat tengah | F | Probabilitas (P) |
|----------------|----------------|----|----------------|-------|------------------|
| Antar kelompok | 655,840 | 4 | 163,960 | 4,370 | 0,011 |
| Dalam kelompok | 750,400 | 20 | 37,520 | | |
| Total | 1406,240 | 24 | | | |

Nilai $P = 0,011$; jika $P < 0,05$; maka Ho ditolak

Kesimpulan:

Ada pengaruh pemberian infus simplisia *Hibiscus sabdariffa* L. terhadap abnormalitas spermatozoa mencit jantan pada ke-5 perlakuan

Lampiran 18

Uji perbandingan berganda LSD terhadap data persentase abnormalitas spermatozoa mencit (*Mus musculus L.*) jantan

Tujuan:

Untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan abnormalitas spermatozoa mencit jantan antara pasangan perlakuan

Hipotesis:

Ho : Tidak adanya perbedaan abnormalitas spermatozoa mencit jantan antara pasangan perlakuan

Ha : Ada perbedaan abnormalitas spermatozoa mencit jantan antara pasangan perlakuan

Tarif nyata:

Nilai α yang digunakan pada $\alpha = 0,05$

Kriteria pengujian:

Jika $P < 0,05$; maka Ho ditolak

Jika $P > 0,05$; maka Ho diterima

(lanjutan)

Hasil perhitungan:

| Perlakuan (I) | Perlakuan (J) | Selisih mean (I-J) | SE | P | Interval kepercayaan 95% | |
|------------------|------------------|--------------------------|--------|-------|-----------------------------|---------------|
| | | | | | Batas bawah | Batas atas |
| KK1 | KK2 | -8,6000* | 3,8740 | 0,038 | -16,681 | -0,519 |
| | KP1 | -8,4000* | 3,8740 | 0,042 | -16,481 | -0,319 |
| | KP2 | -4,8000 | 3,8740 | 0,230 | -12,881 | 3,281 |
| KK2 | KP3 | -15,6000* | 3,8740 | 0,001 | -23,681 | -7,519 |
| | KK1 | 8,6000* | 3,8740 | 0,038 | 0,519 | 16,681 |
| | KP1 | 0,2000 | 3,8740 | 0,959 | -7,881 | 8,281 |
| KP1 | KP2 | 3,8000 | 3,8740 | 0,338 | -4,281 | 11,881 |
| | KP3 | -7,0000 | 3,8740 | 0,086 | -15,081 | 1,081 |
| | KK1 | 8,4000* | 3,8740 | 0,042 | 0,319 | 16,481 |
| KP2 | KK2 | -0,2000 | 3,8740 | 0,959 | -8,281 | 7,881 |
| | KP2 | 3,6000 | 3,8740 | 0,364 | -4,481 | 11,681 |
| | KP3 | -7,2000 | 3,8740 | 0,078 | -15,281 | 0,881 |
| KP3 | KK1 | 4,8000 | 3,8740 | 0,230 | -3,281 | 12,881 |
| | KK2 | -3,8000 | 3,8740 | 0,338 | -11,881 | 4,281 |
| | KP1 | -3,6000 | 3,8740 | 0,364 | -11,681 | 4,481 |
| KP3 | KP3 | -10,8000* | 3,8740 | 0,011 | -18,881 | -2,719 |
| | KK1 | 15,6000* | 3,8740 | 0,001 | 7,519 | 23,681 |
| | KK2 | 7,0000 | 3,8740 | 0,086 | -1,081 | 15,081 |
| KP2 | KP1 | 7,2000 | 3,8740 | 0,078 | -0,881 | 15,281 |
| | KP2 | 10,8000* | 3,8740 | 0,011 | 2,719 | 18,881 |

Keterangan:

* : Berbeda Nyata

SE : Standar Error

P : Probabilitas

Kesimpulan:

- Ada perbedaan nyata antara KK1 dengan KK2, KP1, dan KP3; KK2 dengan KP1, KP2, dan KP3; KP1 dengan KP2 dan KP3; KP2 dengan KP3
- Tidak ada perbedaan nyata antara KK1 dengan KP2