

PERBEDAAN EFEK PEMBERIAN SECARA KOMBINASI DAN TUNGGAL EKSTRAK BIJI ANGGUR (*Vitis vinifera* L.) DAN GLUTATION TERHADAP MOTILITAS, JUMLAH, DAN MORFOLOGI SPERMA TIKUS WISTAR YANG DIBERI PAPARAN ASAP ROKOK

*DIFFERENT EFFECTS OF COMBINATION AND SINGLE OF GRAPE SEED (*Vitis vinifera* L.) AND GLUTATION EXTRACTS ON WISTAR RATS SPERM MOTILITY, AMOUNT, AND MORPHOLOGY THAT CIGARETTE SMOKE EXPOSED*

Conita Yuniarifa, Atina Husaana, Mohamad Riza

Departemen Farmakologi Fakultas Kedokteran, Universitas Islam Sultan Agung
Korespondensi : Conita Yuniarifa. Email : conitayuniarifa@gmail.com

ABSTRAK

Asap rokok menyebabkan peningkatan stres oksidatif dan menimbulkan infertilitas. Ekstrak biji anggur dan glutathione dapat mencegah stres oksidatif. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek pemberian secara kombinasi dan tunggal ekstrak biji anggur dan glutathione terhadap motilitas, jumlah dan morfologi sperma pada tikus yang dipapar asap rokok. Penelitian ini eksperimental dengan post test only control group design. Subyek berjumlah 30 ekor tikus dibagi acak menjadi 5 kelompok. K(-) tidak diberikan asap rokok dan perlakuan, K(+) hanya diberi paparan asap rokok, PI diberi kombinasi ekstrak biji anggur dan glutathione, PII diberi ekstrak biji anggur, PIII diberi glutathione. Dosis ekstrak biji anggur 5,4 mg/ekor/hari dan glutathione 1,8 mg/hari. Paparan asap rokok diberikan 3 batang/hari dilanjutkan perlakuan dilakukan selama 21 hari. Hari ke-22 dilakukan pengambilan sperma untuk menilai motilitas, jumlah dan morfologi. Data dianalisis parametrik dengan tingkat signifikansi $p < 0,05$. Uji One Way Anova menunjukkan ada perbedaan bermakna yaitu pada morfologi sperma ($p = 0,000$). Uji kruskal wallis menunjukkan ada perbedaan bermakna yaitu pada jumlah sperma ($p = 0,000$) dan motilitas sperma ($p = 0,000$). Rerata tertinggi pada morfologi sperma yaitu PI ($37,6 \pm 1,23\%$), jumlah sperma yaitu PIII ($49,3 \pm 1,06$ sel/ml) dan motilitas sperma yaitu ($64,2 \pm 0,52\%$). Pemberian kombinasi ekstrak biji anggur dan glutathione berefek paling baik terhadap motilitas dan morfologi sperma, dan pemberian glutathione secara tunggal berefek paling baik terhadap jumlah sperma.

Kata Kunci : ekstrak biji anggur, glutathione, motilitas, jumlah dan morfologi sperma.

ABSTRACT

Cigarette smoke causes an increase in oxidative stress and causes infertility. Grape seed extract and glutathione can prevent oxidative stress. This study to determined the effect of the combined and single administration of grape seed extract and glutathione on motility, number and morphology of sperm in rats exposed to cigarette smoke. This study was experimental with post test only control group design. Subjects totaling 30 rats were randomly divided into 5 groups. K(-) was not given cigarette smoke and treatment, K(+) was only given exposure to cigarette smoke, PI was given a combination of grape seed extract and glutathione, PII was given grape seed extract alone, and PIII was given glutathione alone. The dose of grape seed extract was 5.4 mg/head/day and glutathione 1.8 mg/day. Exposure to cigarette smoke was given 3 sticks/day followed by treatment for 21 days. On the 22nd day, sperm were collected to assess motility, number and morphology. The data were analyzed parametrically with a significance level of $p < 0.05$. One Way Anova test showed that there was a significant difference in sperm morphology ($p = 0.000$). Kruskal Wallis test showed that there was a significant difference in sperm count ($p = 0.000$) and sperm motility ($p = 0.000$). The highest mean in sperm morphology was PI ($37.6 \pm 1.23\%$), sperm count was PIII (49.3 ± 1.06 cells/ml) and sperm motility was ($64.2 \pm 0.52\%$). The combination of grape seed extract and glutathione had the best effect on sperm motility and morphology, and the glutathione administration alone had the best effect on sperm count.

Keywords: grape seed extract, glutathione, motility, sperm count and morphology.

How To Cite: Yuniarifa, C., Husaana, A., & Riza, M. (2022). PERBEDAAN EFEK PEMBERIAN SECARA KOMBINASI DAN TUNGGAL EKSTRAK BIJI ANGGUR (*Vitis vinifera* L.) DAN GLUTATION TERHADAP MOTILITAS, JUMLAH, DAN MORFOLOGI SPERMA TIKUS WISTAR YANG DIBERI PAPARAN ASAP ROKOK. *Biomedika*, 14(1), 20-32. doi:<https://doi.org/10.23917/biomedika.v14i1.13449>

DOI: <https://doi.org/10.23917/biomedika.v14i1.13449>

PENDAHULUAN

Merokok adalah salah satu kebiasaan yang ditemui dalam kehidupan sehari-hari yang menimbulkan masalah kesehatan (Promkes, 2010). Perokok memerlukan antioksidan untuk menurunkan *stres oksidatif*. Antioksidan alami banyak terkandung dalam buah-buahan. Mengonsumsi buah diharapkan mampu menurunkan stres oksidatif di dalam sperma. Salah satu sumber antioksidan yang memiliki efektivitas tinggi terkandung dalam biji anggur. Biji anggur mengandung fenol, terutama proanthocyanidins (proanthocyanidins oligomer). Penelitian ilmiah telah menunjukkan bahwa kekuatan antioksidan proanthocyanidins adalah 20% lebih besar dari vitamin E dan 50% lebih besar dari vitamin C (Shi John, Yu Jianmei, 2003). Antioksidan glutathion juga bagus diberikan karena secara kimia dapat bereaksi dengan singlet oksigen, radikal superoksida, hidroksil, dan langsung bisa berperan menjadi *scavenger* radikal bebas. Glutathion juga berperan sebagai agen pereduksi yang mampu memanfaatkan kembali asam askorbat dari bentuk teroksidasi menjadi bentuk tereduksi oleh enzim dehidroaskorbat reduktase (Winarsi, 2011). Antioksidan Vitamin E juga dapat menetralkan ROS sehingga perlu diberikan,

dimana kemampuan tocopherol dalam menetralkan ROS lebih cepat dibandingkan lipid. Terjadinya peroksidasi lipid pada membran sel dapat dicegah dan dikurangi oleh vitamin E (Jungwirth, A, et al, 2016). Penelitian mengenai kombinasi dan pemberian secara tunggal ekstrak biji anggur (*vitis vinifera l.*) dan glutathion terhadap motilitas, jumlah dan morfologi sperma pada tikus putih jantan galur wistar yang diberi paparan asap rokok belum pernah dilakukan sehingga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui manfaatnya.

METODE

Penelitian dilakukan di PAU UGM, Yogyakarta. Penelitian ini telah mendapat surat kelayakan etik dari Komisi Bioetika Penelitian Kedokteran/Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang Nomor 392/XI/2021/Komisi Bioetik. Jenis penelitian ini adalah eksperimental laboratorium dengan pendekatan *post test only control group design* dengan menggunakan 30 ekor tikus putih jantan galur wistar yang dikelompokkan secara random. Kandang dalam penelitian ini telah memenuhi syarat. Tikus yang digunakan yaitu berumur 8 minggu, berat badan 150-200 gram. Jumlah kelompok pada penelitian ini adalah 5 kelompok yang terdiri

dari 2 kelompok kontrol yaitu K(-) dan K(+) dan 3 kelompok perlakuan yaitu P I, P II, dan P III. K(-) merupakan kelompok kontrol yang hanya diberikan pelet+air, kelompok K(+) hanya diberikan paparan asap rokok, kelompok P I diberikan kombinasi ekstrak biji anggur 5,4 mg/ekor/hari dan glutatation 1,8 mg/hari, P II diberi ekstrak biji anggur 5,4 mg/ekor/hari, P III diberi glutatation 1,8 mg/hari. Dosis ekstrak biji anggur hijau yang digunakan dosis 5,4 mg/ekor/hari. Metode pembuatan ekstrak biji anggur yaitu dengan cara simplisia biji anggur dicampur dengan aquades kemudian ditanggas dengan suhu 80°C selama 5 jam, setelah itu disaring sampai didapatkan ekstrak biji anggur. Pemberian ekstrak biji anggur diberikan secara sonde per oral setiap pagi hari selama 21 hari . Glutatation yang digunakan adalah glutatation sintetik. Dosis glutatation didapatkan dari konversi berat badan manusia dewasa (70 kg) ke berat badan tikus (200 g), yaitu 0,018. Dosis kebutuhan glutatation pria dewasa per orang per hari adalah 100 mg/hari. Perhitungan dosis glutatation untuk tikus dengan berat 200 g yaitu $100 \text{ mg/hari} \times 0,018 = 1,8 \text{ mg/hari}$. Pemberian glutatation (1,8 mg/hari) melalui sonde yang diberikan ± 60 menit setelah pemaparan asap rokok (Kardi, 2015). Semua kelompok diberi

paparan asap rokok 3 batang/hari selama 21 hari. Berdasarkan penelitian paparan asap rokok 3 batang/hari sudah dapat menurunkan motilitas spermatozoa (Kardi, 2015).

Penelitian dilakukan dengan cara seluruh tikus dibagi 5 kelompok, sehingga tiap kelompok terdiri dari 6 ekor tikus. Tiap ekor diletakkan dalam kandang tersendiri. Kelompok K(-) tidak diberi paparan asap rokok. Kelompok K(+), P I, P II, dan P III diberikan paparan asap rokok 3 batang perhari selama 21 hari setelah dilakukan uji pendahuluan/adaptasi selama 7 hari. Kelompok K(+), P I, P II, dan P III pada waktu pemberian paparan asap rokok, perkelompok tikus dipindahkan ke dalam 1 kandang khusus untuk pemberian paparan masing-masing 3 rokok. Kandang tersebut kemudian ditutup menggunakan plastik dan dibuat satu lubang untuk aliran udara dan satu lubang lagi dari bawah kandang untuk memasukkan asap rokok. Asap rokok diambil dengan menghisap rokok menggunakan spuit injeksi berukuran 30 ml yang ujungnya diberi selang sebagai tempat pangkal rokok. Setelah itu asap rokok didapatkan dengan cara membakar 3 rokok secara berurutan yang dimasukkan kedalam lubang pada bagian bawah kandang. Dilakukan pada kelompok

K(+), P I, P II, dan P III. Kemudian ditunggu dulu selama \pm 60 menit lalu kelompok P I, P II, dan P III diberikan perlakuan. Tikus diberi makanan pelet merk AD II produksi PT. Japfa Comfeed Indonesia, Tbk dan diberi minum air mineral. Perlakuan dilakukan selama 21 hari. Pada hari ke 22 setelah perlakuan kemudian dilakukan pengambilan semen dengan pemotongan cauda epididimis hingga ampulla vas deferens. Epididimis yang sudah dipotong kemudian diletakkan dalam cawan petri yang telah diberi 0,5 cc larutan NaCl fisiologis 0,9%. Epididimis diurut dengan menggunakan spatula untuk mengeluarkan semen. Setelah itu sampel semen yang berisi sperma diperiksa motilitas, jumlah, dan morfologi spermatozoa. Pemeriksaan kualitas sperma dianalisis melalui motilitas spermatozoa, jumlah spermatozoa, dan morfologi spermatozoa.

Motilitas Spermatozoa

Motilitas spermatozoa adalah persentase spermatozoa motil yang didapatkan tiap 200 spermatozoa pada 5 lapang pandang, dihitung dengan menggunakan rumus (WHO, 2010):

$$\frac{PR + NP \times 100\%}{200}$$

PR = *Progressive motility* (Spermatozoa bergerak aktif, baik dengan arah linier atau dalam lingkaran besar, tanpa melihat kecepatan)

NP = *Non-progressive motility* (Spermatozoa bergerak namun tidak progresif, misalnya berenang di lingkaran yang kecil, ekor spermatozoa bergerak namun tidak dapat mendorong kepala, atau hanya bagian ekor spermatozoa yang tampak bergerak).

Jumlah Spermatozoa

Pemeriksaan jumlah spermatozoa dengan cara semen yang telah diaduk dengan baik, diencerkan dengan pipet leukosit dengan larutan George (100 ml Natrium sitrat 3%, 1 ml formalin 40% dan 0,6 g eosin B) 1:20, kemudian semen dipindahkan ke hemositometer standar yaitu kamar hitung Neubauer yang telah ditutup dengan menggunakan gelas penutup selama 15-20 menit agar semua sel mengendap. Jumlah spermatozoa (n) dihitung dalam kamar hitung seluas 1 mm², di bawah mikroskop cahaya dengan menggunakan pembesaran 400 kali. Jumlah spermatozoa (juta/ml) dihitung dengan rumus : $n \times 20 \times 10^4$ (WHO, 2010)

Morfologi Spermatozoa

Morfologi spermatozoa diperiksa dengan menghitung persentase morfologi spermatozoa

yang memenuhi kriteria normal. Persentase diperoleh dengan cara dihitung dari 200 spermatozoa sesuai dengan bentuknya, di bawah mikroskop cahaya dengan menggunakan pembesaran 400 kali. Penilaian morfologi spermatozoa, nilainya tidak boleh lebih rendah dari 4%. Penilaian morfologi segera setelah apusan semen kering dilakukan fiksasi dan pengecatan supaya bisa melihat spermatozoa secara detail. Pengecatan yang direkomendasikan adalah Papanicolaou, Shorr atau Diff-Quick. Ketiga pengecatan tersebut apabila dilihat dengan mikroskop hasilnya yaitu kepala spermatozoa akan berwarna biru pucat pada regio akrosomal dan berwarna biru tua pada regio post akrosomal, pada bagian tengah berwarna kemerahan sedangkan bagian ekor akan berwarna biru atau kemerahan (WHO, 2010). Sperma normal memiliki beberapa kriteria yaitu: bentuk kepala oval dengan garis bentuk halus, dan ukuran panjang kepala kira-kira 4-5 μm dan lebar 2,5-3 μm . Total ratio panjang dan lebar

harus 1,5-1,75. Selain itu, harus memiliki wilayah akrosom yang terdefinisi dengan baik yang terdiri dari 40% -70% dari daerah kepala. Ekor harus lurus, seragam, tidak bergulung dan memiliki panjang sekitar 45 μm (Franken and Oehninger, 2012).

Analisis Statistik

Semua data dilakukan uji normalitas *Shapiro Wilk* dan uji homogenitas menggunakan uji *Levene test* ($p > 0,05$). Data morfologi sperma mempunyai distribusi normal dan homogen, kemudian dianalisis uji *one way anova* $p < 0,05$. Data motilitas sperma dan jumlah sperma hasilnya tidak normal dan atau tidak homogen dilakukan uji *kruskal wallis* $p < 0,05$.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Morfologi spermatozoa

Morfologi spermatozoa (normal) yang diamati menggunakan mikroskop pembesaran 1000 x setelah 21 hari intervensi pada tiap kelompok ditunjukkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil Uji Deskriptif, Normalitas, Homogenitas Varian Dan Uji Beda Rerata Morfologi Spermatozoa Dengan One Way Anova

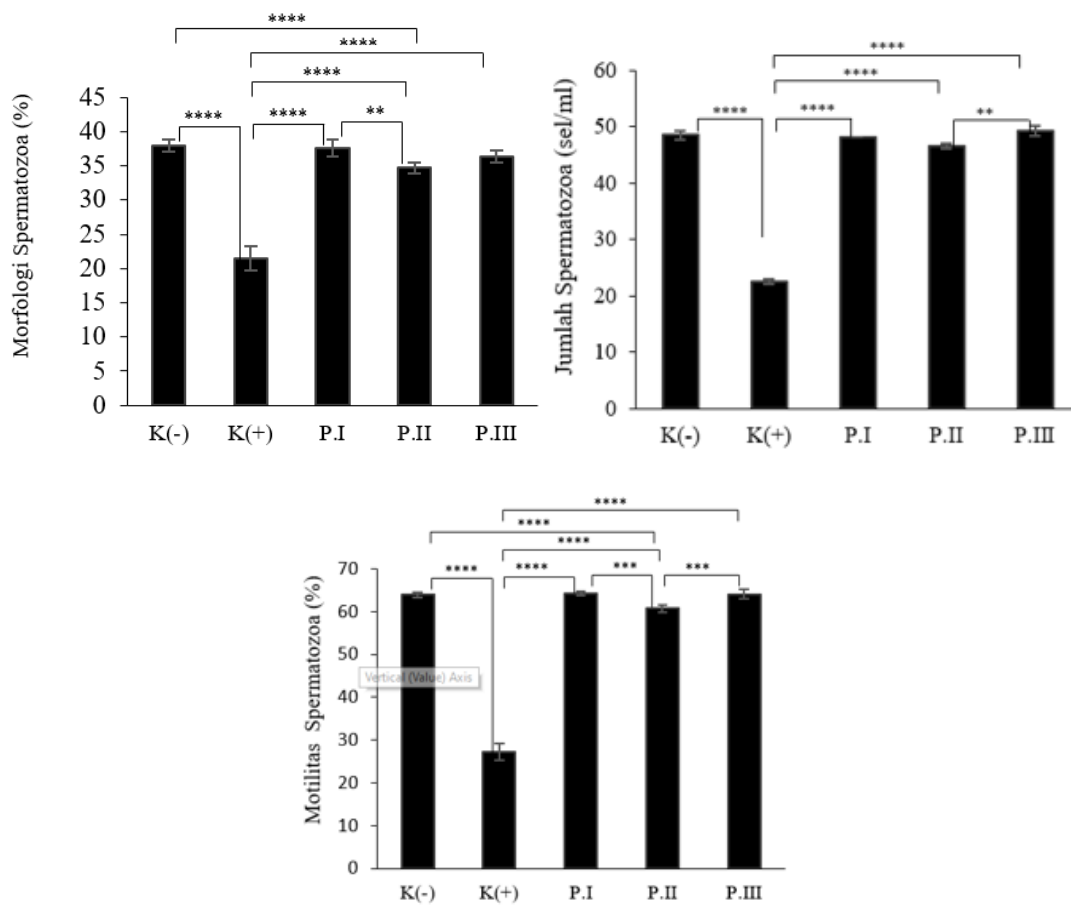
Kelompok	n	Mean \pm SD (%)	p-value	
			Shapiro-Wilk	One Way Anova
K(-)	6	37,9 \pm 0,86	0,454	0,000
K(+)	6	21,4 \pm 1,77	0,452	
P I	6	37,6 \pm 1,23	0,209	
P II	6	34,7 \pm 0,75	0,269	
P III	6	36,3 \pm 0,90	0,437	

Hasil uji homogenitas dengan *Levene test* ($p = 0,184 > 0,05$)

Berdasarkan Tabel 1 diketahui bahwa rerata morfologi spermatozoa tertinggi ($37,9 \pm 0,86\%$) terdapat pada kelompok K (-), sedangkan yang terendah pada K (+) yaitu sebesar $21,4 \pm 1,77\%$. Rerata morfologi spermatozoa di kelompok P I ($37,6 \pm 1,23\%$), P II ($34,7 \pm 0,75\%$) dan P III ($36,3 \pm 0,90\%$) terlihat lebih tinggi daripada di K (+) dan cenderung lebih tinggi daripada K (-).

Uji Shapiro Wilk pada tiap kelompok dan homogenitas varian kelima kelompok diperoleh nilai $p > 0,05$ menunjukkan bahwa distribusi data

morfologi spermatozoa tiap kelompok adalah normal dan varian data kelima kelompok homogen. Perbedaan rerata morfologi spermatozoa pada kelima kelompok diuji dengan *one way anova* dan diperoleh nilai p sebesar 0,000 ($p < 0,05$) artinya terdapat perbedaan rerata morfologi spermatozoa yang signifikan pada kelima kelompok. Uji lanjut untuk mengetahui kelompok mana yang menunjukkan perbedaan rerata morfologi spermatozoa dilakukan dengan uji *post hoc LSD* dan diperoleh hasil sebagaimana ditampilkan pada Grafik 1a.



Grafik 1. a. Perbandingan morfologi spermatozoa antar kelompok. b. Perbandingan jumlah spermatozoa antar kelompok. c. Perbandingan motilitas spermatozoa antar kelompok. Ket: **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$; ****= $p < 0,0001$

Perbandingan morfologi spermatozoa antar 2 (dua) kelompok yang signifikan ($p < 0,05$) ditunjukkan antara K (-) dengan K (+) dan P II, antara K (+) dengan P I, P II dan P III, serta antara P I dengan P II. Morfologi spermatozoa di kelompok K (-) secara signifikan lebih tinggi daripada kelompok K (+) menunjukkan bahwa paparan asap rokok selama 21 hari menurunkan persentase morfologi spermatozoa yang normal. Morfologi spermatozoa di kelompok P I, P II, dan P III secara signifikan lebih tinggi daripada di kelompok K (+) menunjukkan bahwa pemberian ekstrak biji anggur dan glutathione masing-masing secara tunggal maupun kombinasi berpengaruh meningkatkan persentase morfologi spermatozoa yang normal pada tikus yang dipapar asap rokok. Morfologi spermatozoa di P I secara signifikan lebih tinggi daripada P II menunjukkan bahwa efek kombinasi ekstrak biji anggur dan glutathione terhadap peningkatan persentase morfologi spermatozoa normal pada tikus yang dipapar asap rokok lebih baik daripada efek pemberian ekstrak biji anggur saja. Efek peningkatan morfologi spermatozoa normal oleh P II masih di bawah kondisi normal (K (-)). Perbandingan morfologi spermatozoa antar 2 (dua) kelompok yang tidak signifikan ($p > 0,05$) ditunjukkan antara K (-) dengan P I dan P III, antara P I dengan P III, dan

antara P II dengan P III. Pemberian kombinasi ekstrak biji anggur dan glutathione, atau pemberian glutathione saja efektif meningkatkan persentase morfologi spermatozoa normal hingga setara dengan kondisi normal. Efektifitas keduanya relatif serupa (P I dan P III).

Kelompok yang berpengaruh paling baik dalam meningkatkan morfologi sperma adalah kombinasi ekstrak biji anggur dan glutathione (P I) dibandingkan dengan kelompok lainnya. Hal ini sesuai dengan penelitian Pramesemara (2015) yang menyebutkan bahwa pemberian *Growth Hormone* meningkatkan jumlah sel Spermatogenesis, sel Leydig, dan sel Sertoli pada mencit (*Mus Musculus*) tua (Pramesemara, 2015). Kombinasi P I sebagai antioksidan mampu bekerja lebih baik dibandingkan kombinasi lain dalam menghambat terbentuknya ROS sehingga apoptosis sel tersebut dapat dicegah sehingga tidak terjadi kerusakan morfologi spermatozoa pada saat proses spermatogenesis (Tremallen, 2008).

Jumlah spermatozoa

Jumlah spermatozoa yang dihitung dengan *hemocytometer Neubauer*, dengan pengenceran 20 X dan dilihat di bawah mikroskop pada perbesaran 400 kali setelah 21 hari intervensi pada tiap kelompok ditunjukkan pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil uji deskriptif, normalitas, homogenitas varian dan uji beda rerata jumlah spermatozoa dengan uji *Kruskal Wallis*

Kelompok	n	Mean ± SD (sel/ml)	p-value	
			Shapiro-Wilk	Kruskal Wallis
K(-)	6	48,5 ± 1,17	0,745	0,000
K(+)	6	22,6 ± 1,55	0,456	
P.I	6	48,1 ± 1,49	0,029	
P.II	6	46,5 ± 0,33	0,394	
P.III	6	49,3 ± 1,06	0,893	
Hasil uji homogenitas dengan <i>Levene test</i> ($p=0,047 < 0,05$)				

Berdasarkan Tabel 2 diketahui bahwa rerata jumlah spermatozoa tertinggi ($49,3 \pm 1,06$ sel/ml) terdapat pada kelompok P III, sedangkan terendah pada K (+) yaitu sebesar $22,6 \pm 1,55$ sel/ml. Rerata jumlah spermatozoa di kelompok P I ($48,1 \pm 1,49$ sel/ml), P II ($46,5 \pm 0,33$ sel/ml), P III dan K(-) ($48,5 \pm 1,17$ sel/ml) terlihat lebih tinggi daripada di K (+).

Uji Shapiro Wilk data jumlah spermatozoa pada kelompok P I tidak berdistribusi normal ($p < 0,05$) dan homogenitas varian data jumlah spermatozoa kelima kelompok juga tidak homogen ($p < 0,05$). Perbedaan rerata jumlah spermatozoa pada kelima kelompok diuji secara nonparametrik dengan uji *Kruskal Wallis* dan diperoleh nilai p sebesar 0,000 ($p < 0,05$) artinya terdapat perbedaan rerata jumlah spermatozoa yang signifikan pada kelima kelompok. Uji lanjut untuk mengetahui kelompok mana yang menunjukkan perbedaan rerata jumlah spermatozoa dilakukan dengan uji *Mann Whitney* dan diperoleh hasil sebagaimana ditampilkan pada Grafik 1 b.

Perbandingan jumlah spermatozoa antar 2 (dua) kelompok yang signifikan ($p < 0,05$) ditunjukkan antara K (-) dengan K (+) dan P II, antara K (+) dengan P I, P II, dan P III, serta antara P II dengan P III. Jumlah spermatozoa di kelompok K (-) secara signifikan lebih tinggi daripada kelompok K (+) menunjukkan bahwa paparan asap rokok selama 21 hari menurunkan jumlah spermatozoa. Jumlah spermatozoa di kelompok P I, P II dan P III secara signifikan lebih tinggi daripada di kelompok K (+) menunjukkan bahwa pemberian ekstrak biji anggur dan glutathione masing-masing secara tunggal maupun kombinasi berpengaruh meningkatkan jumlah spermatozoa pada tikus yang dipapar asap rokok. Jumlah spermatozoa di P.II secara signifikan lebih rendah daripada di P.III menunjukkan bahwa efek pemberian glutathione terhadap peningkatan jumlah spermatozoa pada tikus yang dipapar asap rokok lebih baik daripada efek pemberian ekstrak biji anggur.

Perbandingan jumlah spermatozoa antar 2 (dua) kelompok yang tidak signifikan antara K(-) dengan P I dan P III artinya pemberian kombinasi ekstrak biji anggur dan glutathion, atau pemberian glutathion saja efektif meningkatkan jumlah spermatozoa hingga setara dengan kondisi normal. Perbandingan jumlah spermatozoa antara P I dengan P II dan P III yang tidak signifikan ($p > 0,05$) artinya efektifitas ketiga jenis pemberian (ekstrak biji anggur atau glutathion saja atau kombinasinya) dalam meningkatkan jumlah spermatozoa pada tikus yang dipapar asap rokok adalah serupa.

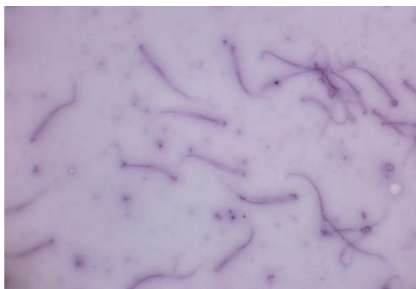
Kelompok yang berpengaruh paling baik dalam meningkatkan jumlah sperma adalah pemberian glutathion secara tunggal (P III) dibandingkan dengan kelompok lainnya. Hal ini sesuai dengan penelitian Kardi (2015) yang menyebutkan bahwa pemberian glutathion pada mencit jantan dewasa yang terpapar asap rokok dapat meningkatkan motilitas progresif

spermatozoa (Kardi, 2015). Pemberian glutathion pada kelompok P III sebagai antioksidan terbukti lebih baik dibandingkan pemberian yang lain dalam fungsinya bekerja menekan terbentuknya ROS sehingga *stres oksidatif* berkurang dan kerusakan membran DNA spermatozoa dapat dicegah dan tidak terjadi penurunan jumlah spermatozoa. Antioksidan ini mampu berperan dalam pertumbuhan dan replikasi sel, kematangan organ seks, fertilitas dan reproduksi sehingga bisa memperbaiki jumlah sel spermatozoa yang rusak akibat paparan asap rokok (Nugroho, 2010).

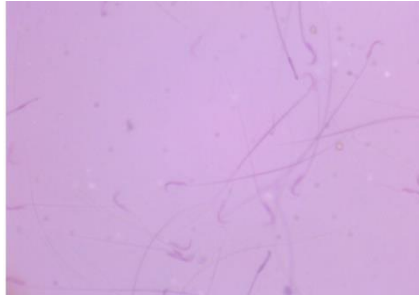
Motilitas spermatozoa

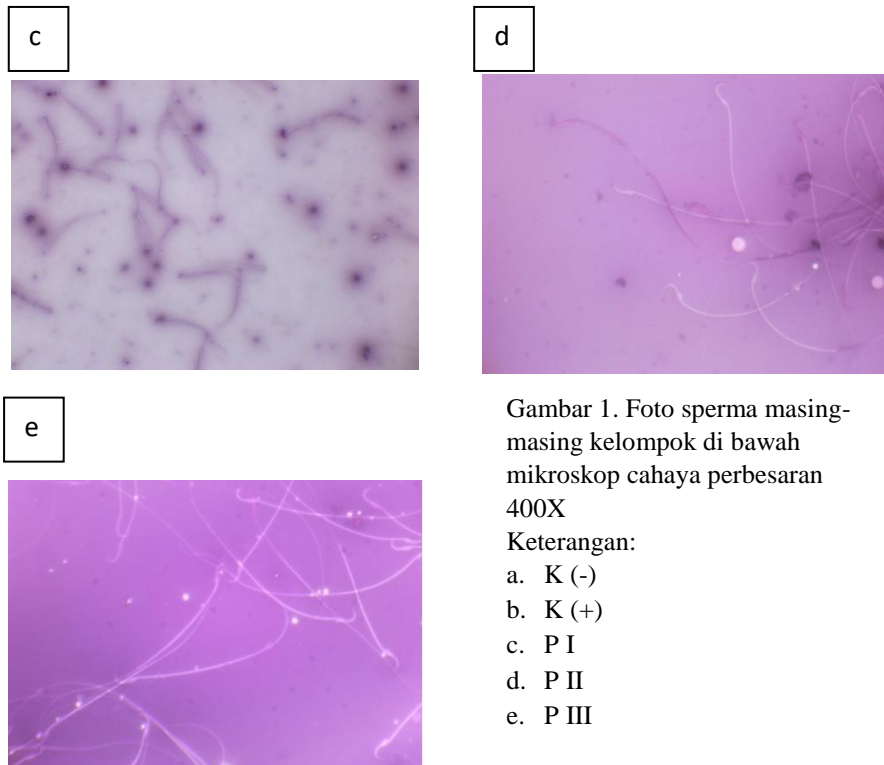
Motilitas spermatozoa yang dihitung dari persentase *progressive* dan *nonprogressive motility* terhadap total spermatozoa yang diamati menggunakan mikroskop pada perbesaran 400 X (Gambar 1) setelah 21 hari intervensi pada tiap kelompok ditunjukkan pada Tabel 3.

a



b





Gambar 1. Foto sperma masing-masing kelompok di bawah mikroskop cahaya perbesaran 400X

Keterangan:

- a. K (-)
- b. K (+)
- c. P I
- d. P II
- e. P III

Tabel 3. Hasil uji deskriptif, normalitas, homogenitas varian dan uji beda rerata motilitas spermatozoa dengan uji *Kruskal Wallis*

Kelompok	n	Mean ± SD (%)	p-value	
			<i>Shapiro-Wilk</i>	<i>Kruskal Wallis</i>
K(-)	6	63,9 ± 0,52	0,126	0,000
K(+)	6	27,3 ± 1,93	0,614	
P.I	6	64,2 ± 0,52	0,941	
P.II	6	60,7 ± 0,82	0,597	
P.III	6	64,1 ± 1,11	0,031	

Hasil uji homogenitas dengan *Levene test* (p: 0,137>0,05)

Berdasarkan Tabel 3 diketahui bahwa rerata motilitas spermatozoa tertinggi (64,2 ± 0,52%) terdapat pada kelompok P I, sedangkan terendah pada K (+) yaitu sebesar 27,3 ± 1,93%. Rerata motilitas spermatozoa di kelompok P II, K (-) dan P III secara berturut-turut adalah 60,7 ± 0,82%, 63,9 ± 0,52% dan 64,1 ± 1,11%.

Uji Shapiro Wilk data motilitas spermatozoa pada kelompok P III tidak berdistribusi normal (p< 0,05), sedangkan pada keempat kelompok lainnya berdistribusi normal

(p> 0,05). Homogenitas varian data motilitas spermatozoa kelima kelompok diperoleh varian homogen (p> 0,05). Perbedaan rerata motilitas spermatozoa pada kelima kelompok diuji secara nonparametrik dengan uji *Kruskal Wallis* dan diperoleh nilai p sebesar 0,000 (p< 0,05) artinya terdapat perbedaan rerata motilitas spermatozoa yang signifikan pada kelima kelompok. Uji lanjut untuk mengetahui kelompok mana yang menunjukkan perbedaan rerata motilitas spermatozoa dilakukan dengan uji *Mann Whitney*

dan diperoleh hasil sebagaimana ditampilkan pada Grafik 1 c.

Perbandingan motilitas spermatozoa antar 2 (dua) kelompok yang signifikan ($p < 0,05$) ditunjukkan antara K (-) dengan K (+) dan P II, antara K (+) dengan P I, P II dan P III, serta antara P II dengan P I dan P III. Motilitas spermatozoa di kelompok K (-) secara signifikan lebih tinggi daripada kelompok K (+) menunjukkan bahwa paparan asap rokok selama 21 hari menurunkan motilitas spermatozoa. Motilitas spermatozoa di kelompok P I, P II dan P III secara signifikan lebih tinggi daripada di kelompok K (+) menunjukkan bahwa pemberian ekstrak biji anggur dan glutathion masing-masing secara tunggal maupun kombinasi berpengaruh meningkatkan motilitas spermatozoa pada tikus yang dipapar asap rokok. Motilitas spermatozoa di P II secara signifikan lebih rendah daripada di P I dan P III menunjukkan bahwa efek pemberian ekstrak biji anggur terhadap peningkatan motilitas spermatozoa pada tikus yang dipapar asap rokok lebih rendah daripada efek pemberian glutathion.

Perbandingan motilitas spermatozoa antar 2 (dua) kelompok yang tidak signifikan antara K (-) dengan P I dan P III artinya pemberian kombinasi ekstrak biji anggur dan glutathion, atau

pemberian glutathion saja efektif meningkatkan motilitas spermatozoa hingga setara dengan kondisi normal. Perbandingan motilitas spermatozoa antara P I dengan P III yang tidak signifikan ($p > 0,05$) artinya efektifitas kombinasi ekstrak biji anggur dan glutathion atau glutathion saja dalam meningkatkan motilitas spermatozoa pada tikus yang dipapar asap rokok adalah serupa.

Kelompok yang berpengaruh paling baik dalam meningkatkan motilitas sperma adalah kombinasi ekstrak biji anggur dan glutathion (P I) dibandingkan dengan kelompok lainnya. Hal ini sesuai dengan penelitian Kardi (2015) yang menyebutkan bahwa pemberian glutathion pada mencit jantan dewasa yang terpapar asap rokok dapat meningkatkan motilitas progresif spermatozoa (Kardi, 2015). Kombinasi P.I. dapat melindungi spermatozoa dari kerusakan oleh stres oksidatif dengan cara menetralkan hidroksil, superoksida dan radikal hidrogen peroksida dan mencegah aglutinasi spermatozoa. Vitamin C mampu melindungi lipid sperma yang mudah teroksidasi dari reaksi oksidasi yang akan menurunkan motilitas spermatozoa sedangkan vitamin E dapat menurunkan kadar MDA pada spermatozoa dan dapat meningkatkan motilitas spermatozoa. Glutathion dan zink mampu

melindungi spermatozoa dari kerusakan radikal bebas. Kombinasi ini mampu meningkatkan motilitas spermatozoa dan berperan dalam mengurangi fragmentasi DNA spermatozoa (Costa, 2010).

Vitamin C, vitamin E yang ada di dalam ekstrak biji anggur (*vitis vinifera l.*) saling berhubungan. Vitamin E sendiri diubah menjadi radikal. Radikal ini segera beregenerasi menjadi vitamin aktif melalui proses biokimia yang melibatkan vitamin C dan glutathion. Vitamin E melindungi asam lemak tak jenuh pada membran fosfolipid. Radikal peroksil bereaksi 1000 kali lebih cepat dengan vitamin E dari pada dengan asam lemak tak jenuh dan membentuk radikal tokoferoksil. Radikal ini selanjutnya berinteraksi dengan antioksidan yang lain seperti vitamin C (Almatsier, 2010).

Vitamin C merupakan antioksidan yang berasal dari luar tubuh (eksogen) yang dapat langsung menetralkan radikal bebas yang berasal dari asap rokok dengan cara vitamin C merubah radikal tokoferol menjadi tokoperol dan radikal vitamin C, kemudian radikal vitamin C akan dioksidasi dengan glutathion yang menghasilkan vitamin C kembali dan glutathion teroksidasi (GSSG), kemudian enzim glutathion reduktase akan mereduksi GSSG menjadi glutathion

tereduksi (GSH). GSH adalah radikal yang sudah tidak reaktif lagi (Robert K. Murray, Daryl K. Granner, 2014).

SIMPULAN

Pemberian kombinasi ekstrak biji anggur dan glutathion berefek paling baik terhadap motilitas dan morfologi sperma, serta pemberian glutathion secara tunggal berefek paling baik terhadap jumlah sperma pada tikus putih jantan galur wistar yang diberi paparan asap rokok.

DAFTAR PUSTAKA

- Almatsier. 2010. *Prinsip Dasar Ilmu Gizi*. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta
- Harris MP, Williamson S, Fallon JF, Meinhardt H, and Prum RO. 2005. Molecular evidence for an activator-inhibitor mechanism in development of embryonic feather branching. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102(33). Pp: 11734-9. doi: 10.1073/pnas.0500781102.
- Franken DR and Oehninger S. Semen analysis and sperm function testing. *Asian J Androl*. 2012;14(1):6-13. doi:10.1038/aja.2011.58
- Jungwirth, A., Diemer, T., Dohle, G., Kopa, Z., Krausz, C., Tournaye, H. 2016. *Guidelines on Male Infertility*. *Eur. Assoc. Urol*. 46, 1–24. <https://doi.org/10.1007/978-1-60761-193-6>
- Kardi. 2016. Pemberian Glutathion pada Mencit Jantan Dewasa yang Terpapar Asap Rokok dapat Meningkatkan Motilitas Progresif Spermatozoa. *Jurnal Sangkareang Mataram*. Volume 2. Nomor 2. Pp: 23-8
- Nugroho, C. A. 2009. Pengaruh Minuman Beralkohol Terhadap Jumlah Lapisan Sel Spermatogenik dan Berat Vesikula Seminalis Mencit. *Widya Warta Jurnal Ilmiah*. Volume 33. Nomor 1.

- Pramesemara, I. G. N. (2015). Pemberian Growth Hormone Meningkatkan Jumlah Sel Spermatogenesis, Sel Leydig, dan Sel Sertoli pada Mencit (*Mus Musculus*) Tua. *Program Pascasarjana Universitas Udayana Denpasar*.
- Promkes, T. 2010. *Masalah Merokok di Indonesia*.
<http://www.promkes.depkes.go.id>.
- Robert K. Murray, Daryl K., and Granner, V. W. R. 2014. *Biokimia Harper*. Edisi 29. EGC.Jakarta
- Shi John, Yu Jianmei, P. J. 2003. Optimization of the Extraction of Polyphenols from Grape Seed Meal by Aqueous Ethanol Solution. *Food, Agriculture & Environment*. 1(2). Pp: 42–7.
- Tremallen, K. (2008). *Oxidative Stress and Male Infertility – A Clinical Perspective*. *Human Reproduction Update*.
- WHO. 2010. *WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen*. 5th edition. World Health Organization.
- Winarsi. 2011. *Antioksidan alami dan radikal bebas*. Edisi 7. Kanisius.