
POTENSI FRAKSI n-HEKSAN EKSTRAK ETANOL RIMPANG LENGKUAS [*Alpinia galanga* (L.) Swartz.] DALAM MENINGKATKAN KUALITAS SPERMA DAN SPERMATOGENESIS

Yance Anas¹⁾, Imam Faozi²⁾ dan Suharjono³⁾

¹⁾Bagian Farmakologi dan Farmasi Klinik Fakultas Farmasi Universitas Wahid Hasyim Semarang

²⁾Program S-1 Fakultas Farmasi Universitas Wahid Hasyim Semarang

³⁾Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang

e-mail: yance.apt@gmail.com

ABSTRACT

Flavonoids and steroid's compounds have been identifying in the galangal rhizome [*Alpinia galanga* (L.) Swartz.]. This compound has hormonal and antioxidant effects and can improve the spermatogenesis and quality of spermatozoa. The purpose of this study is to find out the effects of the n-hexane fractions from galangal rhizome ethanol extract (HFGREE) on male Swiss mice spermatogenesis and quality of spermatozoa. This research is a laboratory experimental with randomized matched post test only controls group design. Twenty-four male Swiss mice (8-weeks old) divided among four groups: control groups (mice treated with CMC 1.0% 10 mL.kg⁻¹.day⁻¹), and three groups of mice treated with HFGREE (1.29; 2.58 and 5.16) mg.kg⁻¹.day⁻¹ for 30 days. All mice sacrificed at day 31. Furthermore, testicular tissue sections are used to calculate the score of spermatogenesis. Spermatozoa in the epididymis were used to assess the quality of spermatozoa. The results showed the HFRGEE (2.58 and 5.16) mg.kg⁻¹.day⁻¹ for 30 days, significantly elevate spermatogenesis score, and improve the spermatozoa count, spermatozoa motility, healthy and normal spermatozoa of male Swiss mice (p<0.05). Further studies can focus on the identification of active compounds in HFGREE that play a role in improving spermatogenesis and quality of spermatozoa.

Key words: n-hexane fraction, galangal rhizome ethanol extract, spermatogenesis, quality of spermatozoa

PENDAHULUAN

Salah satu penyebab kegagalan pasangan suami istri untuk memperoleh keturunan adalah infertilitas pada pria (Miyamoto dkk., 2012). Di Indonesia, diperkirakan sekitar 20% pria mengalami gangguan infertilitas. Menurut Stuart dan Howard (1995), penyebab pasti infertilitas pada pria masih belum banyak diketahui. Oleh karena itu, rencana pengobatan yang rasional untuk memperbaiki patologi infertilitas pada pria masih sulit untuk dikembangkan. WHO pada tahun 2010 mengatakan bahwa pada beberapa banyak kasus yang terjadi, penyebab infertilitas pada pria diakibatkan oleh keadaan azoospermia non-obstruktif. Keadaan ini merupakan sedikitnya volume sperma yang diproduksi dan terjadinya penurunan sekresi *Folicle Stimulating Hormone* (FSH) (Kobayashi dkk., 2012).

Indonesia merupakan negara kaya akan berbagai jenis tumbuhan, termasuk rempah-rempah. Salah satunya adalah rimpang lengkuas [*Alpinia galanga* (L.) Swartz.] yang sering digunakan masyarakat Indonesia sebagai bumbu masakan. Rimpang lengkuas telah dimanfaatkan secara tradisional untuk mengobati infeksi jamur pada kulit. Tanaman familia *Zingiberaceae* ini diketahui memiliki zat aktif yang berfungsi mengobati gangguan pencernaan, meredakan kolik, sebagai penawar keracunan, antikejang (Sudarsono dkk., 2006) serta memiliki aktivitas sebagai antiarthritis (Chandur dkk., 2010). Ekstrak rimpang lengkuas juga dilaporkan memiliki aktivitas sebagai antikanker (Verma dkk., 2011) dan antituberkulosis (Warit, 2009). Rimpang lengkuas juga dilaporkan berpotensi untuk dikembangkan sebagai afrodisiak (Singh dkk., 2010). Rimpang lengkuas memiliki kandungan senyawa aktif berupa senyawa saponin, flavonoid, glikosida, senyawa fenolik, minyak atsiri terpinen-4-ol (monoterpen), 1'-asetoksikafikol asetat (ACA), dan

steroid/triterpenoid yang pada gilirannya akan dapat dimanfaatkan untuk pengobatan penyakit (Chandur dkk., 2010; Gholib dan Darmono, 2008; Verma dkk., 2011).

Penelitian yang dilakukan Darminto (2012) menyimpulkan bahwa pemberian ekstrak etanol rimpang lengkuas [*Alpinia galanga* (L.) Swartz.] (100, 200 dan 400) mg/KgBB/hari selama 21 hari belum memberikan pengaruh yang signifikan terhadap spermatogenesis dan kualitas spermatozoa mencit jantan galur Swiss. Penelitian tersebut juga menyimpulkan bahwa pemberian ekstrak etanol rimpang lengkuas (100 dan 400) mg/KgBB/hari menunjukkan motilitas progresif spermatozoa lebih rendah dibanding mencit kelompok kontrol negatif. Akan tetapi, ekstrak etanol rimpang lengkuas 200 mg/KgBB/hari mampu meningkatkan jumlah spermatozoa mencit jantan galur Swiss ($p < 0,05$). Efek ekstrak etanol rimpang lengkuas terhadap spermatogenesis dan spermatozoa sangat berkaitan dengan kandungan senyawa aktif yang terdapat di dalamnya, baik yang bersifat polar maupun non-polar. Senyawa-senyawa tersebut kemungkinan memiliki efek saling berlawanan terhadap sistem reproduksi mencit jantan. Oleh sebab itu, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut menggunakan ekstrak etanol rimpang lengkuas yang telah difraksinasi untuk melihat pengaruhnya terhadap sistem reproduksi mencit jantan.

Fraksinasi ekstrak etanol rimpang lengkuas dapat dilakukan dengan menggunakan larutan n-heksan. Fraksi n-heksan ekstrak etanol rimpang lengkuas (FHEERL) diharapkan mengandung senyawa aktif non-polar yang diketahui mampu mempengaruhi sistem reproduksi mamalia jantan, seperti senyawa golongan flavonoid dan steroid. Penelitian sebelumnya melaporkan bahwa pemberian ekstrak kulit jeruk *Citrus sinensis* yang mengandung flavonoid mampu meningkatkan *Total Antioxidant Capacity* (TCA), viabilitas, dan motilitas spermatozoa tikus jantan galur Wistar karena aktivitasnya sebagai antioksidan (Khaki dkk., 2011).

METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan rancangan *randomized matched post test only control group*, menggunakan hewan coba sebagai subjek penelitian. Tempat penelitian dilakukan di Laboratorium Farmakologi dan Toksikologi Fakultas Farmasi Universitas Wahid Hasyim Semarang

Bahan Penelitian

Hewan percobaan yang digunakan adalah mencit jantan galur Swiss yang diperoleh dari Laboratorium Biologi Jurusan Biologi FMIPA, Universitas Negeri Semarang. Kriteria inklusi mencit yang digunakan dalam penelitian ini adalah galur Swiss, umur ± 2 bulan, berat badan 20-30 gram dan dalam kondisi sehat; dan kriteria eksklusi: terdapat abnormalitas fisik pada mencit dan mencit mati selama percobaan karena kesalahan perlakuan. Rimpang lengkuas berasal dari daerah Karangawen, Demak, Jawa Tengah. Tinggi batang tanaman lengkuas saat dipanen antara 2,0 - 2,5 meter. Bahan lain yang digunakan adalah etanol 70% dan larutan n-heksan (PT. Brataco Chemical) larutan CMC 1%, kloroform 99,0 % (PT. Brataco Chemical), NaCl fisiologis (Otsuka), reagen giemsa, dan larutan etanol 70%, formalin 10%, etanol bertingkat, xilol, parafin, *albumin meyer* dan *haematoxylin-eosin* (HE).

Alat yang digunakan

Blender (*philips*), timbangan elektrik (*cook master*), jarum oral, seperangkat alat gelas, rotary evaporator (Heildolph), waterbath, seperangkat alat bedah, pipet mikro serta *yellow tip*, kamar hitung *haemocytometer* (Neubauer), *objek glass*, *deck glass*, *hand counter*, laptop, vial, alat potong mikrotom (Shandon finesse 325), dan mikroskop trinokuler (N-400 M).

Ekstraksi dan Fraksinasi Rimpang Lengkuas

Rimpang lengkuas dicuci bersih dengan air mengalir kemudian dipotong tipis. Rimpang lengkuas dikeringkan langsung di bawah sinar matahari dengan cara ditutup kain hitam selama tiga hari. Setelah kering, semua rimpang diserbuk dengan blender dan diayak dengan ayakan ukuran 25 Mesh. Serbuk simplisia rimpang lengkuas direndam dengan etanol 70% di dalam wadah kaca selama tiga hari dan diaduk sesering mungkin pada hari pertama dan sesekali pada hari berikutnya. Pengambilan maserat dilakukan dengan cara disaring dengan menggunakan kertas

saring (Whatman no. 3). Maserat diuapkan menggunakan *vaccum rotary evaporator* pada suhu 60°C hingga didapatkan ekstrak kental rimpang lengkuas. Selanjutnya, ekstrak kental difraksinasi menggunakan pelarut n-heksan.

Fraksinasi dilakukan dengan mencampurkan 30 g ekstrak etanol (kental) rimpang lengkuas dengan 30 mL aquadestilata dingin dalam mortir. Campuran dimasukkan ke dalam corong pisah dan ditambahkan 30 mL larutan n-heksan. Campuran tersebut digojok keras dan didiamkan hingga memisah menjadi dua fraksi. Masing-masing fraksi n-heksan dan fraksi air yang terbentuk ditampung terpisah dalam gelas ukur. Fraksi air yang telah diukur volumenya dimasukkan kembali ke dalam corong pisah dan ditambah dengan larutan n-heksan sesuai volume fraksi air (1:1). Cara ini diulang-ulang hingga campuran menghasilkan fraksi n-heksan yang tidak berwarna. Fraksi n-heksan dipekatkan dengan *waterbath* (suhu <50°C).

Perlakuan Hewan Uji

Sebanyak 24 ekor mencit jantan galur Swiss dikelompokkan secara acak ke dalam empat kelompok perlakuan. Sebelum perlakuan, mencit diadaptasikan terlebih dahulu dalam suasana laboratorium selama satu minggu. Pemberian pakan dilakukan tiga kali setiap hari (pagi, siang dan sore) hari menggunakan pakan standar BR2 dan minum *ad libitum*. Tiga peringkat dosis FHEERL (1,29; 2,58 dan 5,16) mg/kgBB/hari; dan CMC 1,0% 10,0 mL/KgBB/hari diberikan secara oral satu kali sehari selama 30 hari. Pemejanaan sediaan uji dilakukan pada pagi hari sekitar pukul 09.00 WIB.

Pengambilan Testis dan Epididimis

Pada hari ke 31, mencit dikorbankan dengan cara disklokasi tulang belakang. Bagian bawah perut mencit dibasahi dengan kapas alkohol 70%, dan selanjutnya dipotong melintang hingga terlihat epididimis dan testis. Selanjutnya, satu buah organ testis dimasukkan ke dalam larutan formalin 10% untuk keperluan pemeriksaan spermatogenesis. Epididimis diurut/diplirrit menggunakan pinset untuk mengeluarkan spermatozoa sehingga tersuspensi ke dalam larutan NaCl 0,9%. Pengamatan mikroskopis terhadap kualitas sperma dilakukan dalam jangka waktu yang tidak melebihi dari 60 menit (WHO, 2010). Pemeriksaan kualitas sperma yang dilakukan meliputi jumlah, motilitas dan morfologi sperma

Pemeriksaan Jumlah Sperma

Sebanyak 10 µL sampel sperma, ditetaskan di sisi kamar hitung Neubauer yang sudah ditutup dengan kaca penutup, dan dibiarkan selama 5 menit (agar sel-sel spermatozoa mengendap) untuk memudahkan perhitungan. Jumlah spermatozoa dihitung di bawah mikroskop trinokuler dengan perbesaran 400 x.

Pengamatan Motilitas Sperma

Satu tetes sampel sperma ditetaskan di atas *objek glass*, kemudian ditutup dengan *deg glass*. Pengamatan motilitas dilakukan di bawah mikroskop trinokuler dengan perbesaran 200x. Pengamatan dilakukan sedikitnya pada lima lapang pandang. Setiap satu lapang pandang direkam selama 20 detik. Motilitas sperma selanjutnya dikelompokkan berdasarkan *motilitas progesif* (sperma bergerak cepat dan lurus), *non-progesif* (sperma bergerak ditempat) dan *immotil* (sperma tidak bergerak/mati).

Pengamatan Morfologi Sperma

Satu tetes sampel sperma dan giemsa dibuat dalam bentuk hapusan pada obyek glass, kemudian dikering anginkan. Selanjutnya, sediaan hapusan ditetesi dengan etanol 70% dan dibiarkan selama 15 menit hingga kering. Pengamatan dilakukan terhadap 100 sperma di bawah mikroskop trinokuler dengan pembesaran 400x. Selanjutnya, dilakukan perhitungan persentase sperma normal dan abnormal, sesuai dengan protokol penelitian yang dilakukan oleh Suparni (2009).

Pengamatan Viabilitas Sperma

Pengamatan viabilitas merupakan kelanjutan dari pemeriksaan morfologi spermatozoa. Pengamatan dilakukan terhadap 100 spermatozoa, dihitung persentase antara spermatozoa yang hidup (kepala tidak berwarna) dan yang mati (kepala berwarna merah). Pengamatan dilakukan di bawah mikroskop Trinokuler dengan perbesaran 200x.

Pemeriksaan Spermatogenesis

Testis difiksasi dengan larutan formalin 10% dan direndam selama 24 jam, kemudian dicuci dengan air dan didehidrasi menggunakan pelarut etanol bertingkat. Tahap selanjutnya adalah mengeluarkan cairan pembening dari testis dan diganti dengan parafin. Pengecoran testis dilakukan dengan membuat blok parafin agar mudah dipotong dengan mikrotom. Hasil potongan tersebut kemudian dipindahkan ke dalam penangas air dengan suhu 60 °C dan diletakkan di atas *objek glass* yang telah diolesi albumin meyer. Preparat jaringan testis hasil irisan diwarnai dengan Heatoksilin-Eosin (HE) dan diamati di bawah mikroskop trinokuler. *Hematoxylin* akan mewarnai inti sel sedangkan eosin mewarnai sitoplasma (Zulham, 2009). Penilaian spermatogenesis dilakukan berdasarkan penilaian skor spermatogenesis yang mengacu pada skor spermatogenesis Johnsen.

Analisa Data

Hasil perhitungan jumlah sperma kemudian dimasukkan ke dalam rumus berdasarkan sesuai penelitian yang dilakukan oleh Suparni (2009), persamaan 1. Sementara itu, perhitungan % motilitas sperma progresif, non-progresif dan imotil dilakukan sesuai dengan persamaan 2-4.

$$\text{Jumlah sperma} = \frac{N}{5} \div 2 \times 10^5 \text{ sperma/mL} \dots\dots (1)$$

$$\% \text{ sperma progresif} = a/n \times 100\% \dots\dots\dots (2)$$

$$\% \text{ sperma non-progresif} = b/n \times 100\% \dots\dots\dots (3)$$

$$\% \text{ sperma imotil} = c/n \times 100\% \dots\dots\dots (4)$$

Keterangan :

- N : Jumlah sperma yang dihitung pada 25 kotak
- a : Jumlah sperma dengan motilitas *progresif*
- b : Jumlah sperma dengan motilitas *non-progresif*
- c : Jumlah sperma dengan motilitas *imotil*
- n : Jumlah sperma pada lima lapang pandang

Data skor spermatogenesis dinilai menggunakan Skor Johnsen (Skala 1-10). Semua data penelitian dianalisa menggunakan Anova satu jalan yang dilanjutkan dengan uji LSD (*least difference significance*) atau uji Kruskal-Wallis dan dilanjutkan dengan uji Mann-Whitney pada taraf kepercayaan 95%. Adanya perbedaan yang signifikan ditandai dengan nilai signifikansi kurang dari 0,05 ($p < 0,05$).

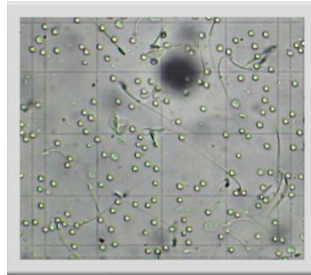
HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Efek Fraksi n-Heksan Ekstrak Etanol Rimpang Lengkuas Terhadap Jumlah Sperma Mencit Jantan Galur Swiss

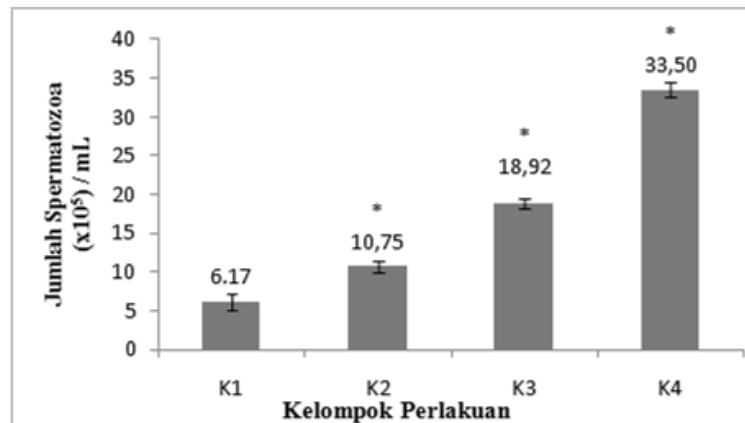
Jumlah spermatozoa merupakan salah satu indikator yang penting di dalam penilaian kualitas spermatozoa mamalia jantan (Dohle, dkk., 2004). Gambaran sebaran sperma dalam kamar hitung *Neubaur* dapat dilihat pada gambar 1. Hasil penghitungan rata-rata jumlah spermatozoa mencit jantan galur Swiss setelah mendapatkan perlakuan dengan CMC 1% 10,0 mL/KgBB/hari dan FHEERL (1,29; 2,58; dan 5,16) mg/KgBB/hari selama 30 hari tersaji pada Gambar 2.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa jumlah spermatozoa mencit yang mendapatkan perlakuan FHEERL lebih tinggi daripada mencit kelompok kontrol negatif ($p < 0,05$). Rata-rata

jumlah spermatozoa mencit galur Swiss paling tinggi diperlihatkan oleh kelompok FHEERL 5,16 mg/KgBB/hari dengan jumlah spermatozoa $(33,50 \pm 0,91) \times 10^5/\text{mL}$. Hasil uji LSD ini juga memperlihatkan perbedaan yang signifikan pada antar kelompok perlakuan fraksi uji ($p < 0,05$). Selain itu, hasil uji korelasi Pearson juga menunjukkan adanya korelasi positif antara dosis fraksi uji dengan jumlah spermatozoa ($p < 0,05$) dengan nilai koefisien korelasi sebesar 0,996. Oleh sebab itu, dapat disimpulkan bahwa peningkatan jumlah spermatozoa akibat perlakuan FHEERL mengikuti pola tergantung dosis.



Gambar 1. Sebaran jumlah pada kamar hitung Neubeur



Keterangan : K1 (kelompok kontrol negatif, perlakuan CMC 1% 10,0 mL/KgBB/hari)

K2 (Kelompok FHEERL 1,29mg/KgBB/hari)

K3 (Kelompok FHEERL 2,58 mg/KgBB/hari)

K4 (Kelompok FHEERL 5,16 mg/KgBB/hari)

* Hasil uji LSD menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna dengan kelompok kontrol negatif ($p < 0,05$).

Gambar 2. Perbandingan jumlah spermatozoa mencit jantan galur Swiss setelah mendapatkan perlakuan dengan CMC 1% 10,0 mL/KgBB/hari, FHEERL (1,29; 2,58; dan 5,16) mg/KgBB/hari selama 30 hari. Data disajikan dalam bentuk (rata-rata \pm SE) melalui 6 percobaan independen.

Efek Fraksi n-Heksan Ekstrak Etanol Rimpang Lengkuas Terhadap Motilitas Sperma Mencit Jantan Galur Swiss

Motilitas spermatozoa diklasifikasikan menjadi tiga yaitu: motilitas progresif, non-progresif serta imotil (WHO, 2010). Pergerakan spermatozoa secara progresif merupakan indikator paling penting dalam menilai motilitas spermatozoa dibandingkan motilitas non-progresif dan imotil. Perbandingan rata-rata motilitas progresif, non-progresif dan imotil mencit jantan galur Swiss kelompok perlakuan CMC 1% 10,0 mL/KgBB/hari dengan kelompok perlakuan dosis FHEERL (1,29; 2,58; dan 5,16) mg/KgBB/hari selama 30 hari dapat dilihat pada tabel I.

Pergerakan spermatozoa secara progresif merupakan indikator paling penting dalam menilai motilitas spermatozoa dibandingkan motilitas non-progresif dan imotil. Secara umum, kemampuan motilitas spermatozoa progresif berkorelasi positif dengan kemampuan spermatozoa

dalam membuahi sel telur (Firman, 2012). Hasil penelitian menunjukkan bahwa persentase motilitas spermatozoa progresif pada kelompok mencit yang diberikan perlakuan dengan FHEERL (1,29; 2,58 dan 5,16) mg/KgBB/hari selama 30 hari lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol negatif ($p < 0,05$). Selain itu, hasil uji korelasi Pearson menyimpulkan adanya korelasi positif antara dosis fraksi uji dengan spermatozoa progresif ($p < 0,05$). Nilai koefisien korelasi yang dihasilkan adalah sebesar 0,917 sehingga peningkatan spermatozoa progresif akibat perlakuan FHEERL mengikuti pola tergantung dosis.

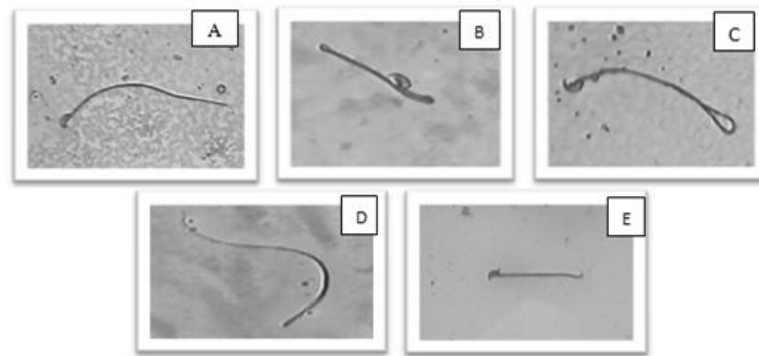
Tabel I. Perbandingan rata-rata persentase motilitas sperma mencit setelah mendapatkan perlakuan dengan FHEERL (1,29; 2,58; dan 5,16) mg/KgBB/hari selama 30 hari. Motilitas sperma merupakan nilai rata-rata (%) ($n=6$). *Hasil uji LSD menunjukkan perbedaan yang bermakna dengan kelompok kontrol negatif (CMC) ($P < 0,05$).

Parameter Motilitas Sperma	Kelompok Perlakuan	% Motilitas Sperma	Signifikansi (p)*
Progresif	CMC 1% 10,0 mL/KgBB/hari	4,24	
	fraksi n-heksan rimpang lengkuas 1,29 mg/KgBB/hari	14,24	0,000
	fraksi n-heksan rimpang lengkuas 2,58 mg/KgBB/hari	29,89	0,000
	fraksi n-heksan rimpang lengkuas 5,16 mg/KgBB/hari	41,92	0,000
Non-Progresif	CMC 1% 10,0 mL/KgBB/hari	12,37	
	fraksi n-heksan rimpang lengkuas 1,29 mg/KgBB/hari	15,17	0,235
	fraksi n-heksan rimpang lengkuas 2,58 mg/KgBB/hari	10,82	0,140
	fraksi n-heksan rimpang lengkuas 5,16 mg/KgBB/hari	10,33	0,258
Immotil	CMC 1% 10,0 mL/KgBB/hari	83,40	
	fraksi n-heksan rimpang lengkuas 1,29 mg/KgBB/hari	70,59	0,102
	fraksi n-heksan rimpang lengkuas 2,58 mg/KgBB/hari	59,30	0,020
	fraksi n-heksan rimpang lengkuas 5,16 mg/KgBB/hari	47,76	0,000

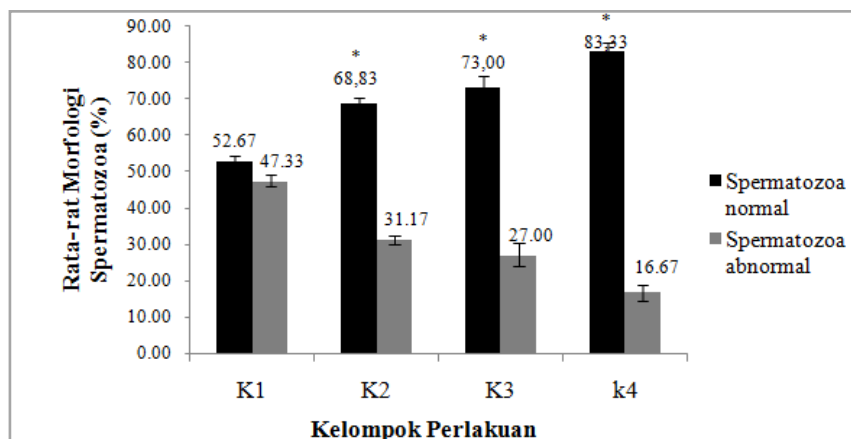
Efek Fraksi n-Heksan Ekstrak Etanol Rimpang Lengkuas Terhadap Morfologi Sperma Mencit Jantan Galur Swiss

Morfologi spermatozoa dapat dibedakan menjadi spermatozoa normal dan abnormal. Morfologi spermatozoa abnormal dapat diketahui berdasarkan kecacatan bentuk pada kepala, leher dan atau ekor spermatozoa, seperti kepala terputus dari leher spermatozoa, leher spermatozoa melipat, ekor spermatozoa melipat, serta ekor spermatozoa pendek (WHO, 2010). Morfologi spermatozoa normal dan abnormal dapat dilihat pada Gambar 3. Persentase rata-rata morfologi spermatozoa normal dan abnormal pada mencit jantan galur Swiss yang mendapat perlakuan CMC 1% 10,0 mL/KgBB/hari dan FHEERL (1,29; 2,58; dan 5,16) mg/KgBB/hari selama 30 hari dapat dilihat pada Gambar 4.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa persentase morfologi spermatozoa normal mencit yang mendapatkan perlakuan FHEERL (1,29; 2,58 dan 5,16) mg/KgBB/hari selama 30 hari lebih tinggi daripada kelompok kontrol negatif ($p < 0,05$). Semakin tinggi dosis FHEERL yang diberikan pada mencit mengakibatkan persentase spermatozoa normal yang lebih tinggi ($p < 0,05$). Hasil uji korelasi Spearman menunjukkan bahwa adanya korelasi positif antara dosis fraksi uji dengan persentase spermatozoa normal ($p < 0,05$) dengan nilai koefisien korelasi sebesar 0,888. Oleh karena itu, penelitian ini menyimpulkan bahwa pemberian FHEERL pada mencit jantan galur Swiss akan meningkatkan persentase spermatozoa normal dengan pola tergantung dosis.



Gambar 3. Bentuk-bentuk spermatozoa mencit jantan galur Swiss dengan perbesaran 200x.
A (spermatozoa normal), B (leher spermatozoa melipat), C (ekor spermatozoa melipat), D (kepala spermatozoa putus), E (ekor spermatozoa pendek).



Keterangan : K1 (kelompok kontrol negatif, perlakuan CMC 1% 10,0 mL/KgBB/hari)

K2 (Kelompok FHEERL 1,29 mg/KgBB/hari)

K3 (Kelompok FHEERL 2,58 mg/KgBB/hari)

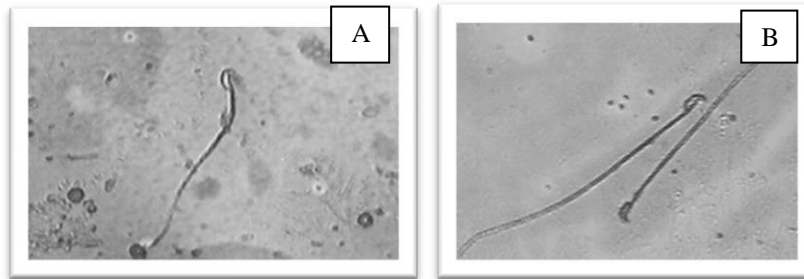
K4 (Kelompok FHEERL 5,16 mg/KgBB/hari)

* Hasil uji Mann-Whitney menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna dengan rata-rata morfologi spermatozoa normal kelompok perlakuan kontrol negatif ($p < 0,05$).

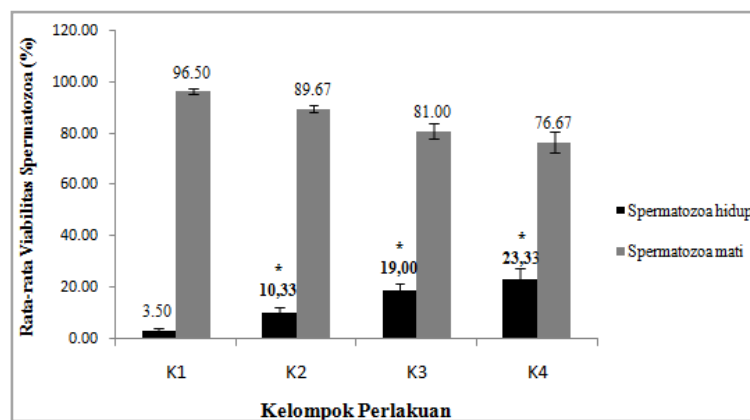
Gambar 4. Perbandingan persentase morfologi spermatozoa normal dan abnormal mencit jantan galur Swiss setelah mendapatkan perlakuan dengan CMC 1% 10,0 mL/KgBB/hari, FHEERL (1,29; 2,58; dan 5,16) mg/KgBB/hari selama 30 hari. Data disajikan dalam bentuk (rata-rata \pm SE) melalui 6 percobaan independen.

Efek Fraksi n-Heksan Ekstrak Etanol Rimpang Lengkuas Terhadap Viabilitas Sperma Mencit Jantan Galur Swiss

Viabilitas yang tinggi menunjukkan kualitas spermatozoa yang baik. Viabilitas spermatozoa dapat diklasifikasikan menjadi spermatozoa hidup dan spermatozoa mati. Spermatozoa hidup memiliki kepala yang tidak terwarnai oleh pewarna eosin. Sebaliknya, spermatozoa mati memiliki kepala berwarna merah karena terwarnai oleh pewarna eosin (WHO, 2010). Perbedaan warna kepala spermatozoa hidup dan spermatozoa mati dapat dilihat pada Gambar 5. Hasil persentase rata-rata viabilitas spermatozoa hidup dan mati mencit jantan galur Swiss akibat perlakuan CMC 1% 10,0 mL/KgBB/hari FHEERL (1,29; 2,58; dan 5,16) mg/KgBB/hari selama 30 hari dapat dilihat pada gambar 6.



Gambar 5. Perbedaan spermatozoa mencit jantan galur Swiss yang hidup dan mati dengan perbesaran 200x. A (Spermatozoa hidup memiliki kepala berwarna transparan). B (Spermatozoa mati memiliki kepala berwarna merah).



Keterangan : K1 (kelompok kontrol negatif, perlakuan CMC 1% 10,0 mL/KgBB/hari)

K2 (Kelompok FHERL 1,29 mg/KgBB/hari)

K3 (Kelompok FHERL 2,58 mg/KgBB/hari)

K4 (Kelompok FHERL 5,16 mg/KgBB/hari)

* Hasil uji Mann-Whitney menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna dengan rata-rata viabilitas spermatozoa hidup kelompok perlakuan kontrol negatif ($p < 0,05$)

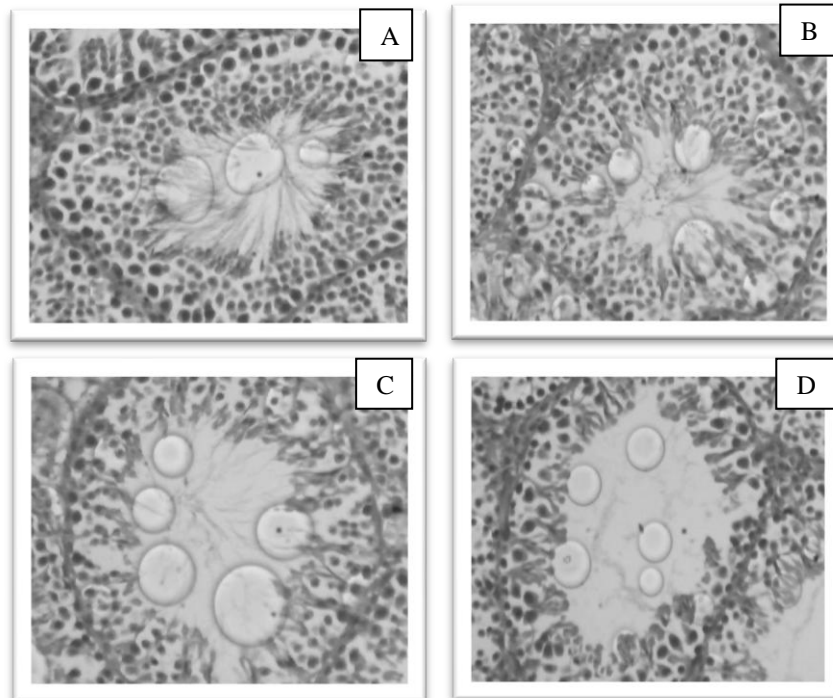
Gambar 6. Perbandingan persentase viabilitas spermatozoa hidup dan mati mencit jantan galur Swiss setelah mendapatkan perlakuan dengan CMC 1% 10,0 mL/KgBB/hari, FHERL (1,29; 2,58; dan 5,16) mg/KgBB/hari selama 30 hari. Data disajikan dalam bentuk (rata-rata \pm SE) dari 6 percobaan independen.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa mencit yang mendapat perlakuan dengan FHERL (1,29; 2,58 dan 5,16) mg/KgBB/hari memiliki persentase spermatozoa hidup yang lebih tinggi dari pada kelompok kontrol negatif ($p < 0,05$). Selain itu, terdapat pula perbedaan yang bermakna persentase spermatozoa hidup pada antar kelompok perlakuan fraksi uji ($p < 0,05$), sehingga pengaruh perlakuan fraksi FHERL terhadap persentase spermatozoa hidup mengikuti pola tergantung dosis. Kesimpulan ini juga diperkuat oleh hasil uji korelasi Spearman yang menunjukkan adanya korelasi positif antara dosis fraksi uji dengan spermatozoa hidup ($p < 0,05$) dengan nilai koefisien korelasi sebesar 0,835.

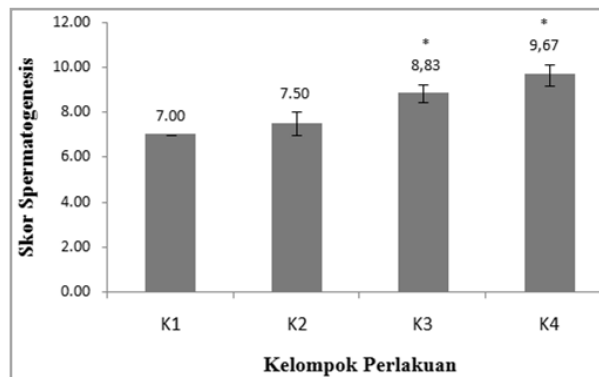
Hasil pengamatan viabilitas spermatozoa menunjukkan banyaknya jumlah spermatozoa yang mati pada tiap kelompok perlakuan. Hasil ini menunjukkan pola yang sama dengan jumlah spermatozoa imotil pada pengamatan motilitas spermatozoa. Spermatozoa yang mati tersebut diduga bukan diakibatkan karena pengaruh senyawa uji, baik CMC 1% maupun fraksi n-heksan ekstrak etanol rimpang lengkuas, akan tetapi disebabkan karena kelemahan metode penilaian spermatozoa secara in vitro. Spermatozoa yang diamati dan diukur tidak berasal dari air mani, akan tetapi berasal dari epididimis yang disuspensikan dengan larutan NaCl 0,9%. Media tersebut tidak terdapat nutrisi yang berasal dari cairan semen yang dibutuhkan oleh spermatozoa untuk bertahan hidup di luar tubuh sehingga spermatozoa cepat mati dan memiliki pergerakan imotil.

Efek Fraksi n-Heksan Ekstrak Etanol Rimpang Lengkuas Terhadap Spermatogenesis Mencit Jantan Galur Swiss

Pengamatan spermatogenesis dilakukan terhadap preparat jaringan testis mencit jantan galur Swiss. Spermatogenesis mencit dinilai berdasarkan skor spermatogenesis yang mengacu pada Skor Johnsen (skala 1-10) terhadap jumlah spermatogonium, spermatosit, spermatid, serta spermatozoa matang pada tubulus semiferus preparat testis mencit jantan galur Swiss. Skor 1 menggambarkan tidak adanya sel-sel yang divisualisasikan di dalam tubulus semiferus yang berarti terjadi kerusakan yang sangat parah. Sebaliknya, skor 10 menggambarkan spermatogenesis berjalan secara lengkap dengan dipenuhi sel-sel spermatogonia, spermatosit, spermatid dan spermatozoa matang di dalam tubulus semiferus (Filho, dkk., 2010). Gambaran mikroskopik tubulus semiferus preparat jaringan testis yang dinilai dengan skor spermatogenesis dapat dilihat pada Gambar 7. Perbandingan skor spermatogenesis preparat jaringan testis mencit jantan galur Swiss (berdasarkan Skor Johnsen) kelompok CMC 1% 10,0 mL/KgBB/hari, kelompok fraksi n-heksan (1,29; 2,58; dan 5,16) mg/KgBB/hari selama 30 hari dapat dilihat pada Gambar 8.



Gambar 7. Gambaran mikroskopik tubulus semiferus preparat jaringan testis mencit jantan galur Swiss dengan perbesaran 200x menggunakan mikroskop trinokuler. A (skor spermatogenesis 10, pada testis mencit yang mendapat perlakuan FHEERL 5,16 mg/KgBB/hari), B (skor spermatogenesis 9, pada testis mencit yang mendapat perlakuan FHEERL 2,58 mg/KgBB/hari), C (skor spermatogenesis 8, pada testis mencit yang mendapat perlakuan FHEERL 1,29mg/KgBB/hari), dan D (skor spermatogenesis 7, pada testis mencit yang mendapat perlakuan CMC 1% 10,0 mL/KgBB/hari).



Keterangan : K1 (kelompok kontrol negatif, perlakuan CMC 1% 10,0 mL/KgBB/hari)

K2 (Kelompok FHEERL 1,29 mg/KgBB/hari)

K3 (Kelompok FHEERL 2,58 mg/KgBB/hari)

K4 (Kelompok FHEERL 5,16 mg/KgBB/hari)

* Hasil uji Mann-Whitney menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna dengan kelompok kontrol negatif ($p < 0,05$).

Gambar 8. Perbandingan skor spermatogenesis preparat jaringan testis mencit jantan galur Swiss setelah mendapatkan perlakuan dengan CMC 1% 10,0 mL/KgBB/hari, FHEERL (1,29; 2,58; dan 5,16) mg/KgBB/hari selama 30 hari. Data disajikan dalam bentuk (rata-rata \pm SE) melalui 6 percobaan independen.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa skor spermatogenesis mencit jantan yang diberi perlakuan dengan FHEERL lebih tinggi daripada kelompok kontrol. Hasil uji Mann-Whitney menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna antara nilai Skor Spermatogenesis preparat jaringan testis mencit kelompok FHEERL 2,58 dan 5,16 mg/KgBB/hari dengan kelompok kontrol negatif ($p < 0,05$). Selain itu, juga terdapat perbedaan yang bermakna skor spermatogenesis antar kelompok perlakuan fraksi uji ($p < 0,05$). Uji korelasi Spearman juga memperlihatkan adanya korelasi positif antar kelompok fraksi uji dengan skor spermatogenesis ($p < 0,05$), dengan nilai koefisien korelasi sebesar 0,897. Oleh karena itu, penelitian ini menyimpulkan bahwa peningkatan Skor Spermatogenesis akibat perlakuan FHEERL mengikuti pola tergantung dosis. Rata-rata nilai Skor Spermatogenesis preparat jaringan testis paling tinggi diperlihatkan oleh kelompok mencit yang mendapatkan perlakuan dengan FHEERL 5,16 mg/KgBB/hari (skor sebesar $9,67 \pm 0,47$).

Hasil penelitian ini secara nyata menunjukkan adanya hubungan antara penilaian spermatogenesis dengan kualitas spermatozoa. Spermatozoa yang memenuhi tubulus semiferus pada gambaran preparat jaringan testis akan berdampak langsung terhadap penilaian jumlah spermatozoa di dalam epididimis. Semakin tinggi nilai skor spermatogenesis, maka semakin tinggi pula jumlah spermatozoa. Hal tersebut dikarenakan spermatozoa yang telah matang di dalam tubulus semiferus akan segera dikeluarkan melalui saluran epididimis sehingga spermatogenesis yang berlangsung dengan baik akan menghasilkan banyak spermatozoa. Tiga parameter kualitas spermatozoa yang lain juga berhubungan erat dengan jumlah spermatozoa. Jumlah spermatozoa, motilitas progresif, morfologi normal dan viabilitas spermatozoa hidup memiliki peranan masing-masing yang sangat berpengaruh terhadap kemampuannya dalam membuahi sel telur wanita.

Hasil penelitian ini secara keseluruhan menyimpulkan bahwa pemberian FHEERL (1,29; 2,58 dan 5,16) mg/KgBB/hari selama 30 hari mampu meningkatkan spermatogenesis dan kualitas spermatozoa mencit jantan galur Swiss. Pengaruh perlakuan FHEERL terhadap spermatogenesis dan kualitas spermatozoa memiliki pola tergantung dosis, dimana semakin tinggi dosis FHEERL yang diberikan, maka semakin tinggi pula pengaruhnya terhadap spermatogenesis dan kualitas spermatozoa. Pengaruh tersebut diduga karena terdapat berbagai senyawa aktif di dalam FHEERL.

Senyawa aktif yang diduga bertanggung jawab dalam FHEERL terhadap peningkatan spermatogenesis dan kualitas spermatozoa mencit jantan galur Swiss adalah 1'-asetoksiklavikol (ACA) dan senyawa golongan flavonoid. Hasil penelitian Hernani, dkk. (2007) menunjukkan bahwa FHEERL mengandung senyawa ACA. Senyawa ACA dan senyawa golongan flavonoid mampu mempengaruhi spermatogenesis dan kualitas spermatozoa karena aktivitasnya sebagai

antioksidan. Secara umum, antioksidan mampu mencegah aktivitas berlebih dari *reactive oxygen species* (ROS) yang dihasilkan melalui stres oksidasi. Aktivitas oksidasi ROS yang dihambat oleh antioksidan memberikan kesempatan sel-sel germinal utuh dapat berkembang menjadi sel-sel spermatosit, spermatid dan pada akhirnya menjadi spermatozoa matang yang memenuhi tubulus semiferus (Maneesh dan Jayalekshmi, 2006). Tubulus semiferus yang dipenuhi spermatozoa mencerminkan pengaruh yang sangat baik terhadap spermatogenesis (Filho, dkk., 2010). Selain itu, jika membran spermatozoa dan DNA mitokondria terhindar dari oksidasi ROS, maka dampaknya akan mengakibatkan peningkatan motilitas progresif, viabilitas spermatozoa hidup, dan morfologi spermatozoa normal (Maneesh dan Jayalekshmi, 2006). Dampak tersebut dikarenakan mitokondria merupakan tempat pembentukan *Adeno Tri Phosphat* (ATP) sebagai sumber energi penggerak ekor spermatozoa, baik secara anaerob maupun melalui Siklus Krebs. Jika radikal bebas yang terbentuk karena stres oksidasi dapat mengoksidasi membran sel dan DNA mitokondria, maka hal ini akan mengakibatkan kerusakan spermatozoa (mati dan abnormal) (Gagnon, dkk., 2006).

Selain memiliki aktivitas antioksidan, senyawa aktif golongan flavonoid juga memiliki aktivitas hormonal terhadap sistem reproduksi mamalia jantan. Flavonoid merupakan salah satu fitokimia penghambat aktivitas enzim aromatase yang berperan merubah androgen (testosteron) menjadi estrogen sehingga terjadi peningkatan hormon testosteron. Aktivitas senyawa golongan flavonoid yang mampu menghambat aktivitas enzim aromatase dinilai berdasarkan IC_{50} , yaitu konsentrasi senyawa flavonoid yang mampu menghambat 50% aktivitas enzim aromatase. Contoh senyawa golongan flavonoid yang telah diketahui mampu menghambat aktivitas enzim aromatase diantaranya, seperti: rotenone memiliki nilai IC_{50} sebesar 0,3 mM, naringenin (IC_{50} sebesar 85mM), quercetin (IC_{50} sebesar 10 mM) dan isoflavon genistein (IC_{50} sebesar 10 mM) (Sanderson, dkk., 2004).

Peningkatan hormon testosteron akan berdampak terhadap peningkatan produksi spermatozoa atau yang disebut dengan spermatogenesis (Hong dan Chen, 2006). Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang pengaruh pemberian FHEERL terhadap peningkatan kadar testosteron mencit jantan galur Swiss. Selain itu, perlu juga dilakukan penelusuran lebih jauh terhadap kandungan senyawa aktif di dalam FHEERL.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

FHEERL [*Alpinia galanga* (L.) Swartz.] dosis 2,58 dan 5,16 mg/KgBB/hari selama 30 hari mampu meningkatkan spermatogenesis mencit jantan galur Swiss ($p<0,05$). Selain itu, FHEERL (1,29; 2,58; dan 5,16) mg/KgBB/hari selama 30 hari juga memiliki kemampuan meningkatkan kualitas spermatozoa. Nilai dari jumlah spermatozoa, motilitas spermatozoa progresif, morfologi tersebut lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol negatif ($p<0,05$).

Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai pengaruh pemberian FHEERL [*Alpinia galanga* (L.) Swartz.] terhadap kadar testosteron darah mencit jantan galur Swiss. Penelitian selanjutnya juga dapat diarahkan pada penelusuran kandungan senyawa aktif dalam FHEERL yang diduga berperan dalam peningkatan spermatogenesis dan kualitas spermatozoa mencit jantan galur Swiss.

DAFTAR PUSTAKA

- Chandur U., Shashidhar S., Chandrasekar S.B. and Rao, M.N., 2010, Phytochemical Evaluation and Screening of Anti-arthritis Activity of *Alpinia galanga* (Linn.), *INT. J. PH. SCI.*, 2(2), 593-597
- Darminto, 2012, Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Rimpang Lengkuas [*Alpinia galanga* (L.) Swartz.] terhadap Spermatogenesis dan Kualitas Spermatozoa Mencit Jantan Galur Swiss, *Skripsi*, Universitas Wahid Hasyim Semarang
-

-
- Dohle G.R., Weidner W., Jungwirth A., Colpi G., Papp G., Pomerol J. and Hargreave T.B., 2004, Guidelines on Male Infertility, *European Association of Urology*, 7
- Filho A.B.O, Souza R.S., Oliveira M.T.V.A., Peruquetti R.L., and Cedenho A.P., 2010, Microdissection Testicular Sperm Extraction Causes Spermatogenic Alterations in the Contralateral Testis, *Journal Genetics and Molecular Research*, **9**(3), 1405-1413
- Firman S., 2012, Infertilitas Pria Akibat Kerja, *C.D.K-195*, **39**(7), 508-511
- Gholib D. dan Darmono, 2008, Pengaruh Ekstrak Lengkuas Putih (*Alpinia galanga* (L.) Willd) terhadap Infeksi *Trychophyton mentagrophytes* pada Kelinci, *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, **6**(2), 57-62
- Gagnon C. and de Lamirande E., 2006, *Controls of Sperm Motility*, Cambridge University Press, New York, 109-110
- Hernani, Marwati T. dan Winarti C., 2007, Pemilihan Pelarut pada Pemurnian Ekstrak Lengkuas (*Alpinia galanga*) secara Ekstraksi, *J.Pascapane*, **4**(1), 1-8
- Hong Y. and Chen S. 2006, Aromatase Inhibitors Structural Features and Biochemical Characterization, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1089, 237-251
- Khaki A., Fathiazad F., Nouri M., Khaki A.A., Ghanbari Z., Ghanbari M., Ouladsahebmadarek E., Javadi L., and Farzadi L., 2011, Anti-oxidative Effects of Citrus Flavonoids on Spermatogenesis in Rat, *Afr. J. Pharm. Pharmacol.*, **5**(6), 721-725
- Kobayashi H., Koichi Nagao K. and Nakajima K., 2012, Focus Issue on Male Infertility, *Adv. Urol*, **01**, 2012
- Maneesh M., and Jayalekshmi H., 2006, Role of Reactive Oxygen Species and Antioxidants on Pathophysiology of Male Reproduction, *Indian. J. Clin. Biochem.*, **21**(2), 80-89
- Miyamoto T., Tsujimura A., Miyagawa Y., Koh E., Namiki M. and Senoku K., 2012, Male Infertility and Its Causes in Human, *Adv. Urol*, **2012**, 2012
- Sanderson J.T., Hordijk J., Denison M.S., Mark F. Springsteel M.F., Nantz M.H. and van den Berg M., 2004, Induction and Inhibition of Aromatase (CYP19) Activity by Natural and Synthetic Flavonoid Compounds in H295R Human Adrenocortical Carcinoma Cells, *Toxi. Sci.*, **82**(1), 70-79
- Singh B., Gupta V., Bansal P., Singh R. and Kumar D., 2010, Pharmacological Potential of Plant Used as Aphrodisiacs, *Int. J. Pharm. Sci.Rev.Res.*, **5**(1), 104-113
- Stuart S. and Howard, M.D., 1995, Treatment of Male Infertility, *N. Eng. J.Med.* **332**, 312-317
- Sudarsono, Pudjoarnto A., Gunawan D., Wahyuono S., Donatus I.A., Drajad M., Wibowo S. dan Ngatidjan, 2006, *Tumbuhan Obat I*, Edisi I Cetakan II, Pusat Penelitian Obat Tradisional (PPOT) Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, 19-23
- Suparni, 2009, Pengaruh Pemberian Vitamin C terhadap Jumlah Sperma dan Morfologi Sperma Mencit Jantan Dewasa (*Mus musculus* L.) yang Dipaparkan Monosodium Glutamat (MSG), *Tesis*, Sekolah Pascasarjana Universitas Sumatera Utara.
- Verma R.K., Mishra G., Singh P., Jha K.K. and Khosa R.L., 2011, *Alpinia galanga*, An Important Medicinal Plant: A review, *Der Pharmacia Sinica*, **2**(1), 142-154
-

Warit, S., 2009, A Wish List of New Anti-Tuberculous Candidate Agents, *Siriraj. Med. J.*, 61: 34-36

WHO, 2010, *Laboratory Manual For The Examination And Processing of Human Semen*, World Health Organization, 5th Edition, 21-22, 26-27, 56-57, 69-70

Zulham, 2009, *Penuntun Praktikum Histoteknik*, Departemen Histologi FKUSU, Medan, 5