

ISBN : 978-623-7911-63-0

# **MONOGRAF ISOFLAVON KEDELAI TERHADAP SPERMATOZOA**

**Penulis**

**Elvina Sari Sinaga, SST., M.Biomed**



# **ISOFLAVON KEDELAI TERHADAP SPERMAOZOA**

**DISUSUN OLEH :**

Penyusun : Elvina Sari Sinaga,SST.,M.Biomed  
Penyunting : Aminah,SST.,.M.Kes  
Desainisi : Elvina Sari Sinaga.SST.,M.Biomed  
Desain Sampul : Elvina Sari Sinaga,SST.,M.Biomed

ISBN : 978-623-7911-63-0

Diterbitkan oleh:

**UNPRI PRESS  
(ANGGOTA IKAPI)**

Alamat:  
Surel: [unpripress@unprimdn.ac.id](mailto:unpripress@unprimdn.ac.id)

Cetakan Pertama, Januari 2022

Hak Cipta dilindungi undang-undang  
Dilarang memperbanyak sebagian atau seluruh isi buku ini dalam  
bentuk dan cara apapun tanpa izin tertulis dari penerbit.



**UNPRI PRESS**

## KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis ucapkan kehadiran Allah SWT atas rahmat dan karuniaNya, sehingga penulis dapat menyelesaikan buku Monograf dengan judul **“Isoflavon Kedelai Terhadap Spermatozoa”** berisi tentang pengaruh Isoflavon terhadap jumlah kecepatan dan morfologi spermatozoa.

Penulis menyadari manusia tidak ada yang sempurna,sehingga masih banyak kekurangan dalam penulisan monograf ini,oleh karena nya kirtikan dan saran yang sifat nya membangun untuk kesempurnaan buku ini

Penulis mengucapkan terima kasih yang setinggi-tinggi nya kepada semua yang memberi dukungan,motivasi,dorongan dan semangat untuk dapat terbitnya monograf ini .

Medan, Januari 2022

Penulis

Elvina Sari Sinaga

## DAFTAR ISI

	Halaman
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	i
<b>DAFTAR ISI</b> .....	ii
<b>BAB I Isoflavon Kedelai</b> .....	1
1.1. Kedelai .....	1
1.2. Sumber Isoflavon .....	2
1.3. Struktur Kimia Isoflavon.....	3
1.4. Metabolisme Isoflavon.....	5
<b>BAB II Pengaruh Isoflavon Terhadap Reproduksi</b> .....	7
2.1. Isoflavon sebagai <i>Estrogen Like</i> .....	7
2.2. Isoflavon sebagai Antioksidan .....	8
<b>BAB III Reproduksi Tikus Jantan</b> .....	10
3.1. Anatomi Reproduksi .....	15
3.2. Spermatogenesis .....	17
3.3. Poros Hipotalamus-Hipofisis-Testis .....	
3.4. Jumlah, Morfologi dan Kecepatan Spermatozoa .....	19
<b>BAB IV Pengamatan Jumlah, Morfologi dan Kecepatan Spermatozoa</b> .....	25
4.1. Pengambilan sekresi Vas deferens .....	25
4.2. Menghitung Jumlah Spermatozoa .....	25
4.3. Pemeriksaan Kecepatan Spermatozoa.....	26
4.4. Pemeriksaan Morfologi Spermatozoa .....	26
<b>BAB V Analisa Isoflavon Kedelai Terhadap Spermatozoa</b> .....	28
5.1. Pendahuluan.....	28
5.1.1. Perumusan Masalah .....	31
5.2.2. Tujuan Penelitian .....	31
5.3.3. Manfaat Penelitian .....	32
5.2. Metode Penelitian .....	32
5.2.1. Lokasi dan Waktu Penelitian .....	32
5.2.2. Jenis dan Desain Penelitian .....	32
5.2.3. Alat dan Bahan .....	32
5.2.4. Tahapan Penelitian.....	33
5.3. Hasil dan Pembahasan .....	35
5.3.1. Jumlah Spermatozoa.....	35
5.3.2. Kecepatan Spermatozoa .....	37
5.3.3. Morfologi Spermatozoa.....	40
5.4. Kesimpulan .....	42
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	44

# BAB I

## ISOFLAVON KEDELAI

### 1.1. Kedelai

Kedelai atau *Glycine max (L) Merr* termasuk familia *Leguminoceae*, sub famili *Papilionaceae*, genus *Glycine max*, berasal dari jenis kedelai liar yang disebut *Glycine unriensis* (Samsudin, 1985). Menurut Ketaren (1986), secara fisik setiap kedelai berbeda dalam hal warna, ukuran dan komposisi kimianya. Perbedaan secara fisik dan kimia tersebut dipengaruhi oleh varietas dan kondisi dimana kedelai tersebut dibudidayakan. Biji kedelai tersusun atas tiga komponen utama, yaitu kulit biji, daging (kotiledon), dan hipokotil dengan perbandingan 8:90:2. Sedangkan komposisi kimia kedelai adalah 40,5% protein, 20,5% lemak, 22,2% karbohidrat, 4,3% serat kasar, 4,5% abu, dan 6,6% air (Snyder and Kwon, 1987).



**Gambar 1.1. Tanaman dan Biji Kedelai**

Menurut Budisantoso (1994), terdapat empat jenis kedelai, yaitu sebagai berikut :

- a. Kedelai kuning: kedelai yang kulit bijinya berwarna kuning, putih atau hijau, yang bila dipotong melintang memperlihatkan warna kuning pada irisan keping bijinya, yang biasanya dijadikansusu.
- b. Kedelai hitam: kedelai yang kulit bijinya berwarna hitam.
- c. Kedelai hijau: kedelai yang kulit bijinya berwarna hijau, yang bila dipotong melintang memperlihatkan warna hijau pada irisan keping bijinya.
- d. Kedelai coklat: : kedelai yang kulit bijinya berwarna coklat.

Bentuk biji kedelai bergantung kultivarnya, dapat berbentuk bulat, agak gepeng dan sebagian besar bulat telur. Sedangkan besar dan bobotnya dibagi menjadi tiga, yaitu:

- a. Kedelai berbiji kecil : bobot 100 biji 7-11gr.
- b. Kedelai berbiji sedang : bobot 100 biji 11-13gr.
- c. Kedelai berbiji besar : bobot 100 biji lebih dari 13gr.

## **1.2. Sumber Isoflavon**

Isoflavon adalah : senyawa flavonoid yang merupakan salah satu anggota senyawa fitoestrogen. Senyawa isoflavon terdistribusi secara luas pada berbagai bagian tanaman, baik pada bagian akar, batang, daun maupun buah. Sebagai metabolit sekunder, isoflavon banyak terdapat pada tanam-tanaman, khususnya dari golongan *Leguminosae*. Isoflavon juga ditemukan pada berbagai tanaman yang banyak dikonsumsi manusia, termasuk biji-bijian dan padi-padian. Dari berbagai tanaman tersebut, isoflavon paling banyak terdapat dalam kedelai dan produk olahannya. Isoflavon kedelai merupakan komponen yang diketahui sebagai flavonoid, yang tersusun atas daidzein, genestein dan sejumlah kecil glisitein.

King (2002) melaporkan bahwa dalam kedelai terdapat 12 macam isoflavon yaitu : daidzein dengan tiga glukosida konjugasinya yaitu : daidzin, asetildaidzin dan malonildaidzin; genestein dengan tiga glukosida konjugasinya yaitu : genistin, asetilglisitin dan malonilglisitin. Dalam kedelai, glisitein dan glukosidanya terdapat dalam jumlah yang sangat kecil dibandingkan dengan daidzein dan genestein sertaglukosidanya.

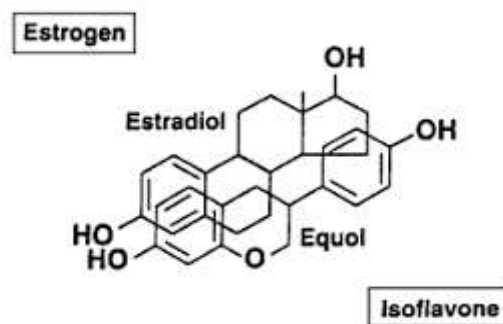
**Tabel 1.1**  
**Kandungan Isoflavon pada beberapa produk kedelai setiap 100 gram**

Kandungan Isoflavon Beberapa Produk Kedelai Setiap 100 gr Produk Kedelai	Kandungan Isoflavon ( <i>genistein dan daidzein</i> ) mg
Kedelai hijau,tak dimasak	54,8
Kedelai matur,tak dimasak	188,8
Kedelai panggang	194,2
Susu kedelai	8,8
Tahu, takdimasak	33,6
Tempe, tak dimasak	53,1
Tepung kedelai	208.6

### 1.3. Struktur Kimia Isoflavon

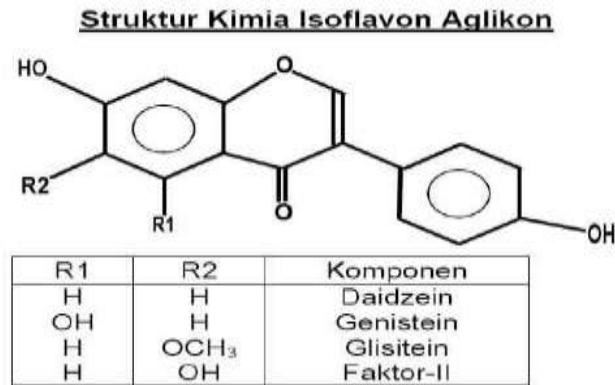
Isoflavon memiliki kemiripan struktur kimia dengan estrogen pada mamalia (Setchell & Adlercreutz, 1988). Cincin fenolat pada isoflavon merupakan struktur penting pada kebanyakan komponen isoflavon yang berfungsi untuk berikatan dengan reseptor estrogen (Leclercq & Heuson, 1979). Struktur kimia isoflavon sangat menentukan aktivitas biologis, bioavailabilitas dan efek fisiologis. Schmidl dan Labuza (2000) dalam Winarsi menyatakan bahwa setelah dikonsumsi, isoflavon kedelai dihidrolisis oleh glukosidase intestinal, sehingga terbentuk aglikon daidzein, genestein, dan glisitein. Perubahan isoflavon glukosida menjadi aglikon dikatalisis oleh enzim glukosidase. Isoflavon sebagai senyawa *estrogen*

like, mengawali kerjanya dengan cara meniru kerja estrogen. Implikasi klinis isoflavon, tergantung pada beberapa faktor termasuk reseptor yang dapat *binding* dengan isoflavon, letak reseptor dan konsentrasi estrogen yang bersaing dengan isoflavon (Kim *et al*, 1998). Tidak adanya gugus yang bersifat lipolitik dalam komponen fitoestrogen tersebut, juga memudahkan terjadinya pengikatan isoflavon dengan reseptor estrogen (Cunningham *et al*, 1997). Manifestasi ikatan isoflavon dengan reseptor estrogen, akan menunjukkan aktivitasnya yang agonis atau antagonis tergantung pada kadar estrogen (Brzozowski *et al*, 1997). Aktifitas estrogenik isoflavon terkait dengan struktur kimianya yang mirip dengan stilbestrol, yang biasanya digunakan sebagai obat estrogenik. Bahkan isoflavon mempunyai aktivitas yang lebih tinggi dari stilbestrol. Daidzein merupakan senyawa isoflavon yang aktivitas estrogeniknya lebih tinggi dibandingkan dengan senyawa isoflavon lainnya. Aktivitas estrogenik tersebut terkait dengan struktur isoflavon yang dapat ditransformasikan menjadi *equol*, dimana *equol* mempunyai struktur fenolik yang mirip dengan hormon estrogen. Apabila struktur *equol* sebagai metabolit isoflavon ditumpangkan pada struktur estradiol maka jarak antara gugus hidroksil keduanya sangat identik, oleh sebab itu tidak mengherankan jika isoflavon mampu berikatan dengan reseptor estrogen (RE), dengan sifatnya yang agonis ataupun antagonis (Winarsi 2005).





Gambar 2.2. Struktur molekul isoflavon dan estradiol (Setchell & Cassidy)



Gambar 2.8. Struktur kimia isoflavon aglikon

#### 1.4. Metabolisme Isoflavon

Isoflavon glikosida pertama-tama akan mengalami deglukosilasi menjadi aglikon oleh hidrolisa bakteri (Hawkesworth et al,1971) atau glukosidase seluler dan kemudian sebagian besar akan mengalami glukoronidasi dan sulfatasi oleh enzim-enzim intraseluler. Demikian pula aglikon setelah masuk ke dalam sel akan mengalami konjugasi secara ekstensif. Konjugat tersebut akan keluar dari permukaan basolateral enterosit dengan mekanisme transport fasilitas dan masuk kedalam sirkulasi darah. Glukoronidasi dan sulfatasi fraksi isoflavon yang lolos dari proses konjugasi dalam dinding usus dapat terjadi didalam hati, ginjal dan organ lain. Konjugasi merupakan jalur utama metabolisme isoflavon pada mamalia, meskipun ditemukan juga terjadinya hidroksilasi dan metilisasi didalam hati. Kemungkinan lain aglikon tersebut akan difermentasi terlebih dahulu oleh mikroflora usus menjadi metabolit spesifik yaitu *equol* dan p-etilfenol (Axelson et al,1984; Joannou et al,1995), baru kemudian diserap oleh usus. Metabolisme dalam usus tersebut sangat bervariasi diantara individu dan dipengaruhi oleh

komponen lain yang terkandung didalam makanan yang dikonsumsi. Bila diet mengandung karbohidrat dalam jumlah banyak, maka akan meningkatkan fermentasi intestinal, sehingga menghasilkan biotransformasi isoflavon lebih banyak dan meningkatkan pembentukan *equol* sebagai hasil metabolisme daidzein mamalia.

Xu et al (1995) menyimpulkan bahwa penyerapan, ekskresi dan konsentrasi isoflavon dalam plasma darah dipengaruhi oleh dosis yang dikonsumsi. Selain itu dinyatakan bahwa mikroflora usus mempunyai peranan dalam meningkatkan ketersediaan isoflavon. Ketersediaan isoflavon kedelai bervariasi antara 13 sampai 35% tergantung dari jumlah dan kondisi mikroflora individu. Secara klinis fermentasi isoflavon oleh mikroflora usus sangat penting, karena potensi estrogenik *equol* lebih tinggi dibandingkan dengan prekursornya yaitu : daidzein. Waktu paruh (*half-life*) daidzein dan genestein dalam plasma sebesar 7,9 jam pada orang dewasa dan konsentrasi tertinggi terdapat 6-8 jam setelah dikonsumsi. Xu et al (1998) dalam Winarsi melaporkan bahwa konsumsi protein kedelai yang mengandung isoflavon 65-129 mg/hari, meningkatkan rasio 2-(OH) E<sub>1</sub>, terhadap 16 $\alpha$  (OH) E<sub>1</sub> sebesar 67% dan rasio 2-(OH) E<sub>1</sub>, terhadap 4-(OH) E<sub>1</sub> sebesar 33% lebih tinggi bila dibandingkan dengan konsumsi protein kedelai yang mengandung isoflavon 10 mg/hari. Bila kedelai di konsumsi secara reguler, maka kadar isoflavon plasma dapat melebihi kadar estradiol normal.

Terdapat 2 macam reseptor estrogen yaitu : reseptor estrogen beta dan reseptor estrogen alfa. Dua reseptor tersebut memainkan peran yang berbeda, demikian pula terdistribusinya ke dalam jaringan dan afinitas binding dengan ligand juga berbeda. Reseptor estrogen beta terdistribusi dalam jaringan

otak,tulang,kandung kemih dan epitel pembuluh darah. Reseptor estrogen alfa terdistribusi dalam jaringan payudara liver dan ginjal.

## BAB II

### PENGARUH ISOFLAVON TERHADAP REPRODUKSI

#### 2.1. Isoflavon sebagai *Estrogen Like*

Struktur molekul isoflavon memiliki kemiripan dengan struktur estrogen, oleh sebab itu isoflavon disebut sebagai *estrogen like*. Adanya kemiripan struktur antara dua senyawa tersebut maka, isoflavon mampu berikatan dengan reseptor estrogen yang terdapat dalam sel berbagai jaringan tubuh. Isoflavon, diketahui berpotensi lebih rendah yaitu :  $10^{-3}$ -  $10^{-5}$  kali dibanding estrogen endogen, namun mampu berikatan kuat dengan reseptor estrogen beta. Penelitian berkaitan dengan terpaparnya isoflavon dalam tubuh hewan dan dampaknya terhadap reproduksi sudah banyak diteliti, baik pada hewan jantan maupun hewan betina. Hasil penelitian menunjukkan pengaruh isoflavon terhadap fertilitas dan perkembangan hewan bervariasi, ada yang berdampak positif dan ada juga yang negatif. Hal tersebut disebabkan respon biologis isoflavon pada hewan bergantung pada faktor-faktor seperti spesies, umur, jenis kelamin, dosis, cara pemberian dan metabolisme (Winarsi2005).

Hasil penelitian Kang, *et al* (2002) menunjukkan bahwa ketika genestein diberikan dengan dosis tinggi selama kebuntingan dan laktasi dengan dosis 0,04 dan 4 mg/kg bb/hari, tidak ada perbedaan yang signifikan pada berat anak, jenis kelamin, jumlah anak, dan tidak berpengaruh pada jumlah dan motilitas spermatozoa pada tikus jantan. Selanjutnya hasil penelitian Controneo, *et al* (2001), pemberian genestein 250 mg/kg pakan tidak berpengaruh pada konsentrasi plasma hormon seks dan reseptor hormon seks uterus pada anak tikus betina.

Fritz et al (2002) melihat pengaruh genestein pada androgen dan ekspresi *Estrogen Reseptor* (ER) pada prostat tikus jantan yang diberikan pada induk bunting dengan dosis 0,25 dan 250 mg/kg makanan. Hasil penelitiannya menunjukkan bahwa kelompok perlakuan genestein reseptor androgen, ekspresi ER $\alpha$  dan ER $\beta$  prostat tikus menurun. Tetapi tidak ada perbedaan terhadap histopatologi dan berat organ reproduksi diantara kelompok perlakuan. Selanjutnya hasil penelitian Glover dan Assinder (2006) menunjukkan bahwa tikus jantan yang diberikan pakan dengan fitoestrogen tinggi selama 3 hari fekunditasnya menurun, tetapi sifatnya sementara dimana pada hari ke 12 kembali normal. Selanjutnya ekspresi RE $\alpha$  dan reseptor androgen mRNA meningkat pada segmen epididimis, tetapi menurun pada cauda epididimis pada tikus yang diberi fitoestrogen tinggi.

Pemberian isoflavon dapat mengganggu jalannya spermatogenesis, karena fitoestrogen menghambat kerja enzim 17- $\beta$ -hidroksisteroidoksidoreduktase, enzim yang dibutuhkan untuk sintesis testosteron, hambatan kerja tersebut menyebabkan penurunan kadar testosteron serta hambatan pada perkembangan sistem syaraf pusat dan gonadal (Atanasova *et al*, 2000). Efek antiandrogenik juga dapat menghambat sekresi LH pada hipofisis, yang berakibat penurunan kadar sekresi testosteron pada sel Leydig (Gultekin, 2006).

## **2.2. Isoflavon sebagai Antioksidan**

Suatu senyawa dikatakan memiliki sifat antioksidatif bila senyawa tersebut mampu mendonasikan satu atau lebih elektron kepada senyawa prooksidan, kemudian mengubah senyawa oksidan menjadi senyawa yang lebih stabil. Sifat

seperti ini dimiliki oleh senyawa isoflavon kedelai. Sebagai antioksidan, isoflavon dalam kedelai mampu meredam aktivitas radikal bebas dengan cara mengikat dan mencegah reaksi berantainya. Radikal bebas dibentuk oleh metabolisme xenobiotik atau metabolisme sel aerob secara normal. Senyawa species oksigen reaktif (*Reactive Oxygen Species/ROS*) adalah radikal bebas yang punya peran penting pada beberapa proses fisiologis spermatozoa seperti kapasitas, hiperaktivasi, reaksi akrosom dan fusi dengan oosit. Spermatozoa membutuhkan ROS pada level rendah untuk menginduksi proses kapasitas dan pada reaksi akrosom, serta berikatan dengan zona pelusida sehingga dapat berlangsung proses fertilisasi (Sanocha dan Kurpisz 2004).

Pembentukan ROS menginduksi peroksidasi lipid yang bersifat sitotoksik akibat inisiasi suatu reaksi rantai ke dalam membran, diikuti dengan reaksi propagasi sehingga secara keseluruhan akan mengakibatkan kerusakan sel. Pembentukan ROS yang berlebihan maka akan memicu stres oksidatif, berpotensi mengakibatkan pengaruh toksik, dan merupakan mediator penting terhadap berkurangnya fungsi dan kualitas spermatozoa. Berlebihnya pembentukan ROS dihubungkan dengan penurunan motilitas, morfologi abnormal dan penurunan kapasitas penetrasi spermatozoa dengan oosit, serta penurunan fertilitas (Saleh dan Agarwal 2002).

Spermatozoa memiliki sistem pertahanan enzimatik atau non enzimatik untuk menetralkan pengaruh toksik senyawa ROS pada spermatozoa, sehingga ROS hanya terdapat dalam jumlah kecil yang diperlukan untuk menjaga fungsi spermatozoa tetap normal. Sistem pertahanan radikal bebas, baik enzimatik maupun non enzimatik, meliputi proteksi terhadap berbagai kompartemen sel

antara lain mitokondria, retikulum endoplasma, peroksisom, sitoplasma dan membran sel. Pemeliharaan integritas sel tergantung pada keseimbangan antara pembentukan radikal bebas dengan sistem pertahanan radikal bebas. Terjadinya kerusakan sel dihasilkan oleh ketidakseimbangan antara pembentukan ROS dan aktivitas pertahanan enzim antioksidan (Winarsi 2005).

## **BAB III**

### **REPRODUKSI TIKUS JANTAN**

#### **3.1. Anatomi Reproduksi**

##### **3.1.1. Testis**

Testis adalah organ lunak yang berbentuk oval. Merupakan sepasang kelenjer kelamin yang bersifat endokrin dan eksokrin. Sebagai kelenjer endokrin, testis menghasilkan hormon steroid yang kemudian disekresikan ke dalam pembuluh darah, dan sebagai kelenjer eksokrin, testis menghasilkan spermatozoa yang kemudian dikeluarkan ke dalam saluran ekskretori. Setiap testis dikelilingi oleh suatu jaringan yang disebut dengan tunika albuginea. Jaringan ikat fibrosa ini membentuk septum ke dalam testis, sehingga membagi testis menjadi lobulus-lobulus yang tidak beraturan. Di dalam lobulus terdapat tubulus seminiferus yang merupakan jaringan yang dapat menghasilkan sel-sel germinal dari hewan jantan (Hafez, 1996).

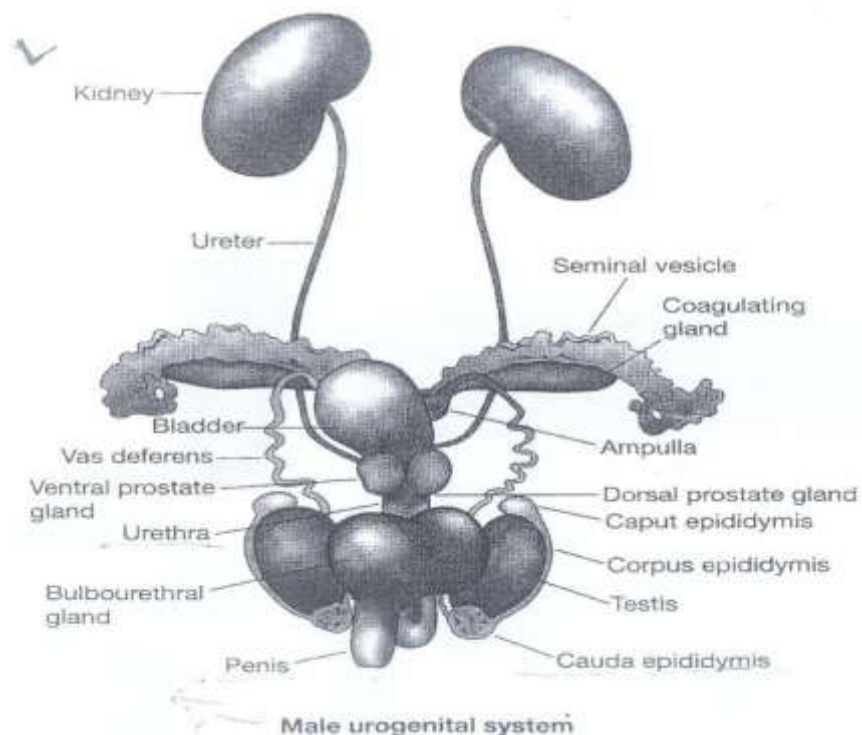
Diantara tubulus tubulus tersebut selain terdapat stroma interstitial yang terdiri dari sel-sel interstitial atau sel Leydig, juga terdapat pembuluh darah limfe. Tubulus seminiferus yang disusun oleh epitel seminiferus yang terletak di atas jaringan ikat yang disebut dengan membran basalis. Epitel seminiferus terdiri dari 2 jenis sel yaitu sel-sel kelamin jantan yang akan mengalami spermatogenesis dan sel sertoli.

Sel sertoli berada dekat membran basalis dan fungsinya selain memberi nutrisi kepada sel spermatogenik juga menghasilkan ABP (Androgen Binding Protein). ABP berfungsi mengikat testosteron yang dihasilkan oleh sel Leydig dan membawanya dari tubulus ke reseptor yang terdapat dalam sel-sel germinal, untuk



selanjutnya diperlukan dalam spermatogenesis (Hafez, 1996).

Testis selain merupakan kelenjar endokrin yang menghasilkan hormon steroid, juga bersifat sebagai kelenjar eksokrin karena menghasilkan spermatozoa. Dalam testis terdapat lebih kurang 250 kompartemen piramidal yang disebut lobulus testis. Setiap lobulus terdiri dari 1-4 tubulus seminiferus (Carneiro., Kelly, 1998). Diameter tubulus seminiferus 250  $\mu$ m, serta panjang rata-rata 32 cm. Epitel tubulus seminiferus terdiri atas dua jenis sel yaitu sel sertoli sebagai penyokong dan sel-sel yang merupakan garis turunan spermatogenik. Sel-sel turunan spermatogenik tersebar dalam 4 sampai 8 lapisan yang menempati ruangan antara lamina basalis dan lumen tubulus. Sel-sel ini membelah beberapa kali dan akhirnya berdeferensiasi, menghasilkan spermatozoa (Rudolf, Stromberg, 1986, Nasution, 1993 : Carneiro, Kelley, 1998).



**Gambar 3.1 : Organ genital tikus dewasa (Howard, 2002 )**

### 3.1.2. Saluran Ekskretori

Saluran ekskretori terdiri dari rete testis, saluran eferens, epididimis dan duktus (vas) deferens. Rete testis merupakan suatu sistem anastomosis dari tubulus seminiferus yang lurus dan berkumpul. Rete testis selanjutnya membuka ke dalam tiga sampai tujuh saluran eferens. Saluran-saluran tersebut kemudian akan bergabung menjadi satu yaitu epididimis.

Epididimis merupakan saluran yang memanjang dari bagian atas sampai bawah testis dan terbagi atas tiga bagian yaitu kaput, korpus dan kauda epididimis. Epididimis berfungsi sebagai tempat pematangan spermatozoa, penyimpanan spermatozoa dan sebagai saluran yang menyalurkan spermatozoa dari testis menuju saluran ejakulasi. Selain itu epididimis juga mempunyai fungsi absorbsi bagi spermatozoa yang mati dan sekresi berbagai macam zat seperti glikoprotein, karnitin dan lainnya. Fungsi absorbsi dan sekresi ini diperlukan untuk memelihara lingkungan intraminal epididimis (Hafez, 1996).

Lingkungan intraminal yang sesuai akan mendukung perubahan-perubahan yang terjadi selama proses pematangan spermatozoa. Pematangan spermatozoa merupakan proses yang kompleks, menyangkut beberapa perubahan morfologi, fisiologis dan biokimia dari spermatozoa. Hasil dari rangkaian proses tersebut adalah kemampuan spermatozoa melakukan fertilisasi ovum. Kemampuan tersebut diperoleh secara bertahap selama spermatozoa melewati saluran epididimis. Saluran setelah kauda epididimis adalah vas deferens yang akan menuju uretra. Pada bagian ujung vas deferens terdapat ampulla, yaitu tempat penyimpanan spermatozoa sebelum keluar atau diejakulasikan.

### 3.1.3. Tubulus Seminiferus

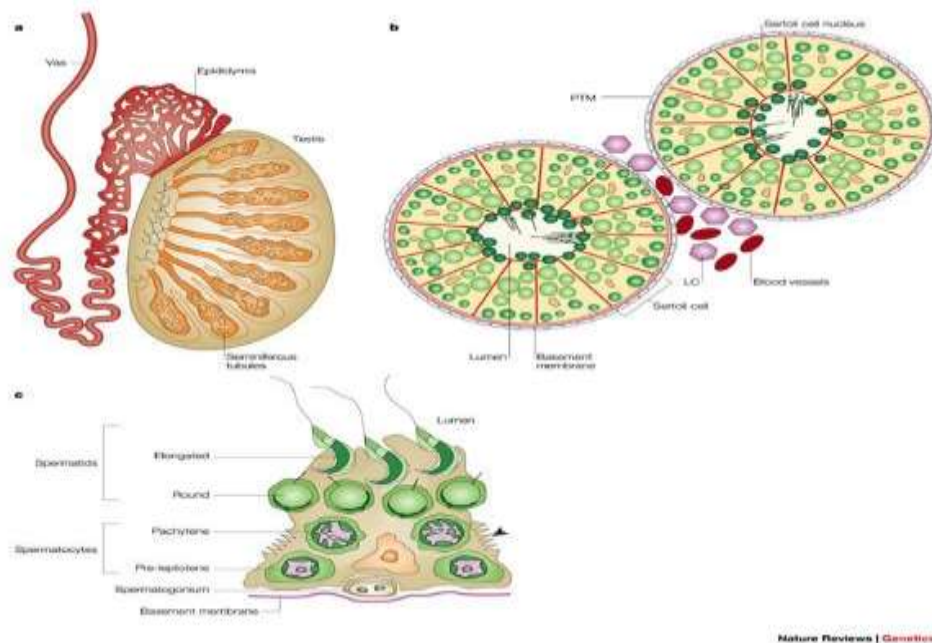
Tubulus seminiferous merupakan suatu saluran yang berjalan berlekuk lekuk yang bisa berakhir buntu atau bisa beranastomosis dengan tubulus-tubulus didekatnya baik dari satu lobulus testis maupun dari lobulus testis sebelahnya. Saluran ini mempunyai ukuran panjang 30-70 cm dengan diameter bervariasi antara 150-300µm (Compenhaver et al,1988).

Tubulus seminiferous dilapisi oleh epitel germinativum / epitel seminiferus, merupakan jaringan epitel berlapis kubis yang duduk pada membrana basalis. Diluar tubulus terdapat jaringan peritubuler yang terdiri atas jaringan ikat fibrous yang disebut tunica propia, mengandung serat-serat jaringan ikat, sel-sel fibroblast dan sel otot polos yang disebut myoidperitubuler. Kontraksi sel myoid peritubuler diduga akan merubah diameter tubulus seminiferus dan akan membantu pergerakan spermatozoa sepanjang tubulus (Junqueira 1997).

Epitelium tubulus seminiferus terdiri atas dua jenis sel yaitu :Sel penyokong atau sel sustentakular atau sel sertoli. Pada tikus jumlahnya kira kira 17-19% dari epitel tubulus seminiferus yang terdapat diantara sel-sel spermatogenik. Sel ini membentuk tidak teratur, selindris tinggi dan duduk pada lamina basalis tubulus seminiferus. Intinya berada agak jauh dari dasar sel, berwarna pucat, berbentuk lonjong atau segitiga dengan sumbu panjang mengarah ke lumen. Sitoplasma tampak fibriler dan kadang terlihat badan. Kristaloid yang terdiri atas protein disekitar inti, dua sel sertoli yang berdekatan mempunyai hubungan occludent/tigh junction yang bersama sama dengan jaringan peritubuler membentuk sawar darah testis (*blood testis barrier*). Sel sertoli mempunyai beberapa fungsi yaitu:

1. Menyokong dan mengatur nutrisi spermatozoa yang berkembang
2. Fagositosis
3. Salah satu komponen sawar darah testis
4. Sekresi cairan ke lumen tubulus seminiferus untuk transport spermatozoa

Sel spermatogenik membentuk lapisan epitel berlapis yang terdiri dari 4-8 lapis sel. Sel-sel ini berkembang secara progresif dari basal ke arah lumen tubulus seminiferus. Terjadinya proliferasi mendorong sel-sel ke arah lumen dan sel-sel yang sudah dekat dengan lumen akan mengalami transformasi menjadi spermatozoa. Pada masa pubertas sel ini mulai berproliferasi secara mitosis.



**Gambar 3.2 : Tubulus seminiferus Testis ( Howard, 2002 )**

#### **3.1.4. Duktus Deferens**

Panjang 5 – 6 cm dengan diameter 2,5 mm dan dilapisi oleh epitel kolumnar bertingkat. Sebelum memasuki prostat duktus deferens membentuk bagian yang disebut ampula. Bagian akhir ampula dan vesikula seminalis kemudian memasuki prostat dan bermuara ke uretra prostaticum. Ampula dilapisi oleh sel epitel kolumnar yang pendek (Hafez, 1996).

#### **3.1.5. Kelenjar Tambahan ( Accessorius)**

Kelenjar asesoris mempunyai peranan penting sebagai media hidup bagi sperma. Kelenjar ini terdiri dari vesikula seminalis, kelenjar prostat, kelenjar Cowper, kelenjar ampula, kelenjar bulbouretra dan kelenjar preputial (Rugh, 1997).

#### **3.1.6. Uretra**

Merupakan saluran keluarnya sperma, adapun saluran ini terdapat pada rongga dalam penis. Dimana pada bagian ventralnya dilapisi epitel berlapis gepeng dan disebelah dorsalnya terdapat epitel kuboid (Rugh, 1997)

#### **3.1.7. Penis**

Terdiri dari tiga lapisan, antara lain satu lapisan tipis corpus cavernosa uretra (corpus spongia) yang dikelilingi oleh tunika albuginea dan dua lapisan tebal corpus cavernosa penis. Glans penis dilapisi oleh epitel berlapis gepeng yang terdiri atas folikel - folikular rambut. Akar penis melekat pada tulang pubis yang berhubungan dengan *musculus ischiocavernosa* (Rugh, 1997).

### 3.2. Spermatogenesis

Proses spermatogenesis terjadi di dalam lumen tubuli seminiferus testis dan proses ini dalam keadaan normal terjadi setiap saat. Spermatogenesis adalah segala proses yang terjadi dari spermatogonium menjadi spermatozoa. Rangkaian perkembangan ini dapat dibagi menjadi 4 fase yaitu:

1. Fase Proliferasi ( perbanyakan)

Pada fase proliferasi sel-sel spermatogonium mengalami mitosis sampai beberapa kali, dimana sel-sel turunannya disebut spermatosit primer dengan mengandung 46 kromosom.

2. Fase growing(pertumbuhan)

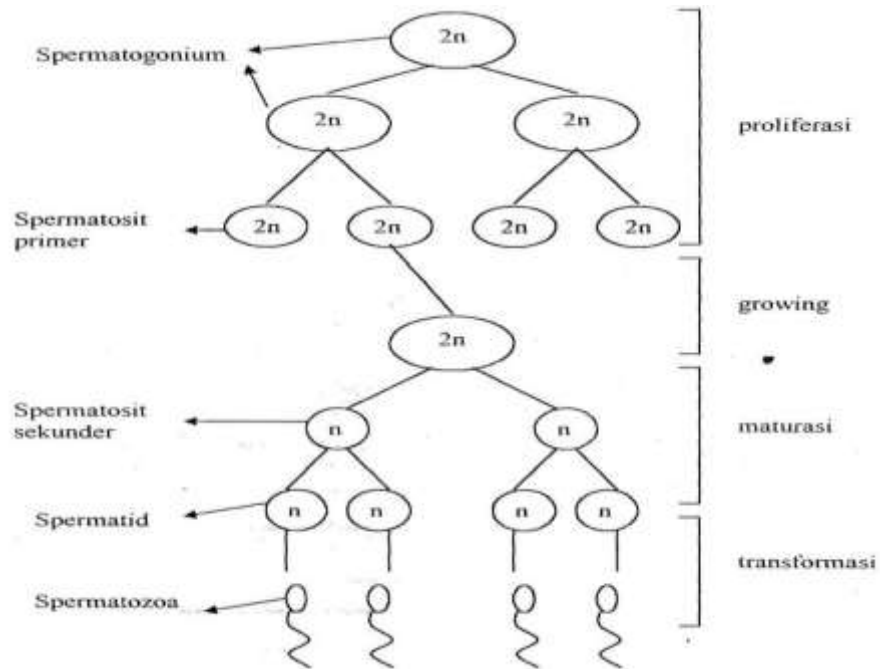
Pada fase ini satu spermatosit primer membelah secara meiosis menjadi dua spermatosit sekunder yang mengandung 23 kromosom.

3. Fase maturasi ( pematangan )

Fase ini merupakan fase pembagian pematangan yang akan menghasilkan dua sel spermatid

4. Fase transformasi ( perubahan bentuk)

Spermatid berubah bentuk dengan lambat menjadi spermatozoa (Nasution, 1993: Tjitrosomo, Sugiri, 1996)



**Gambar 3.3 : Proses Spermatogenesis ( Nasution, 1993)**

Faktor hormonal banyak berperan dalam proses spermatogenesis, beberapa diantaranya adalah ( Guyton& Hall, 1997: Jungueira,Carnerro,Kelly, 1998 ):

1. Testosteron

Disekresikan oleh sel-sel leydig yang terletak di intestinum testis.Hormon ini penting dalam pembelahan meiosis untuk pembentukan spermatosit sekunder

2. LH (Luteinizing Hormon) dan FSH (Folikel StimulatingHormon)

Kedua hormon ini disekresikan oleh kelenjer hipofise anterior melalui umpan balik antara hipotalamus-hipofise-testis

Dalam proses spermatogenesis terdapat siklus epitelium spermatogonium yang terjadi dalam tubulus seminiferus testis, yaitu perubahan lengkap sel spermatogenik dalam komposisi sel tertentu sampai menampilkan komposisi sel yang sama berikutnya, siklus ini dimulai dari mitosis spermatogonium A sampai keluarnya spermatozoa dari tubulus seminiferus yang berulang sesuai dengan

waktu siklus bervariasi, pada manusia terjadi 64 hari sedangkan pada tikus waktu siklus spermatogenesis adalah selama 48 hari (Hess, 1999)

### **3.3. Poros Hipotalamus-Hipofisis-Testis**

Kelangsungan dari proses spermatogenesis sangat tergantung pada faktor hormon. Hormon yang diketahui berpengaruh terhadap proses spermatogenesis adalah GnRH, FSH, LH, Testosteron dan inhibin. Mekanisme pengendalian proses spermatogenesis tersebut diatur oleh kerja poros hipotalamus- hipofisis - testis. Dari hipotalamus disekresi hormon pelepas yaitu GnRH. Hormon pelepas ini akan dikeluarkan ke hipofisis melalui pembuluh darah sistem porta hipofisis. GnRH akan mempengaruhi hipofisis untuk mensekresi FSH dan LH. Hormon FSH merangsang perkembangan sel spermatogenik tahap proliferasi, spermatogenesis dan spermiogenesis. FSH juga merangsang sel sertoli membentuk *Androgen Binding Protein* (ABP) dan inhibin. ABP yang dihasilkan oleh sel sertoli berperan mengikat testosteron yang berada diluar tubulus seminiferus kedalam tubulus untuk membentuk proses spermatogenesis. Inhibin merupakan senyawa nonsteroid yang dihasilkan oleh sel sertoli. Inhibin dapat memberikan umpan balik negatif bagi hipofisis dalam mensekresi FSH. Sedangkan LH berfungsi merangsang sel Leydig membentuk testosteron (Nasution, 1999).

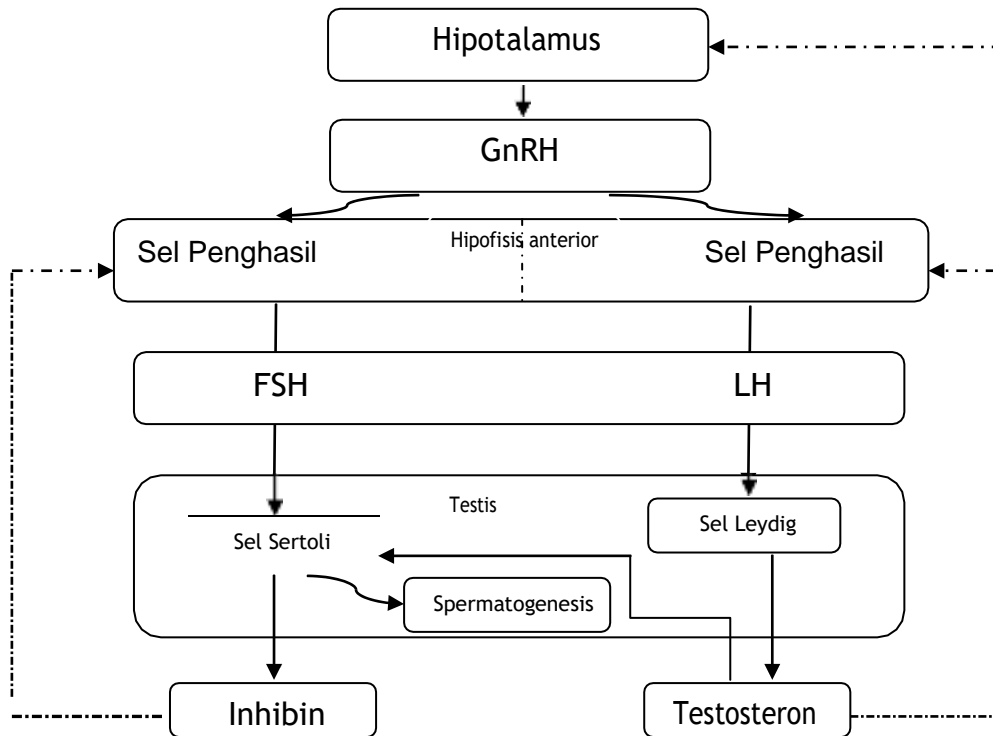
Mekanisme kerja poros hipotalamus - hipofisis - testis terjadi melalui umpan balik antara sel penghasil hormon dengan sel sasaran. Sebagai contoh adalah pengaturan sekresi LH pada hipofisis oleh testosteron. Jika kadar hormon testosteron dalam sirkulasi darah meningkat maka hormon tersebut akan menghambat sekresi LH yang dihasilkan oleh hipofisis. Umpan balik dapat pula terjadi terhadap hipotalamus, sehingga sekresi GnRH dihambat. Menurunnya



sekresi LH maka aktivitas sel leydig serta produksi testosteron akan menurun pula. Penurunan ini akan merangsang hipotalamus dan hipofisis untuk memproduksi LH (Nasution,1999).

Selain FSH dan LH, Hipofisis juga memproduksi hormon prolaktin dibawah pengaruh hipotalamus. Sekresi prolaktin ini diatur oleh *Prolaktin Releasing Faktor* (PRF) dan prolaktin inhibiting faktor (PIF). PRF berfungsi untuk merangsang pembentukan prolaktin sedang PIF berperan menghambat pembentukannya. Peranan hormon prolaktin dalam reproduksi ialah meningkatkan aktivitas reseptor LH pada sel leydig, sehingga sekresi testosteron meningkat (Nasution,1999).

Ketergantungan spermatogenesis terhadap hormon telah banyak dibuktikan melalui penelitian - penelitian. Rojks dan Scili ( 1989 ) menyatakan bahwa kadar FSH dan LH dalam serum pria fertil berbeda makna dengan serum oligospermia dan azospermia. Bartke menyimpulkan pemberian prolaktin dengan LH terhadap proses spermatogenesis berbeda makna dengan perlakuan hanya berupa pemberian LH saja.



**Gambar 3.4 : Kontrol fungsi testis (Sherwood 2001)**

### 3.4. Jumlah, Morfologi dan Kecepatan Spermatozoa

#### 3.4.1. Jumlah Spermatozoa

Jumlah spermatozoa adalah salah satu faktor penentu dalam menentukan kualitas sperma. Jumlah sperma yang berkualitas adalah spermatozoa yang memiliki jumlah sekitar lebih dari 20 juta / ml ejakulat. Apabila jumlahnya kurang maka bisa dikatakan spermatozoanya tidak berkualitas. Jumlah spermatozoa dihitung menurut beberapa cara yaitu jumlah spermatozoa per ml ejakulat dan jumlah spermatozoa per volume ejakulat. Namun yang umum dipakai adalah jumlah spermatozoa per ml ejakulat (Yatim, 1994).

Menghitung jumlah spermatozoa per ml ejakulat dapat dilakukan dalam dua tahap yaitu menghitung jumlah spermatozoa per lapangan pandang dan menghitung jumlah spermatozoa per ml dengan menggunakan kamar hitung

*Hemacytometer Neubauer*. Spermatozoa yang memiliki morfologi yang matang yang dihitung, spermatozoa yang tidak ada kepala dan ekor tidak dihitung. (WHO, 1994).

Jumlah spermatozoa yang dihasilkan oleh testis sangat tergantung pada proses spermatogenesis yang terjadi di tubulus seminiferus. Spermatogenesis adalah suatu rangkaian perkembangan sel spermatogonia dari epitel tubulus seminiferus yang mengadakan proliferasi dan selanjutnya berubah menjadi spermatozoa yang terdiri dari kepala, leher dan ekor (Moeloek, 1994).

Spermatogonia pada tikus terdiri atas 3 macam yaitu spermatogonia tipe A, intermediet, dan spermatogonia tipe B. Spermatogonia tipe A merupakan yang terbesar dan terdiri atas partikel-partikel inti kromatin. Tahap metafasenya lebih panjang dan lebih ramping. Spermatogonia A berlanjut menjadi tipe intermediet yang lebih kecil, banyak dan terdiri atas inti kromatin di dalam jonjot-jonjot yang kasar atau berupa gumpalan yang terletak diatas atau didekat permukaan sebelah dalam dari membran nukleus. Tahap metafasenya pendek, berkelompok dan berbentuk seperti kepala, dari spermatogonia tipe B akan membelah lagi menjadi spermatosit primer. Diperkirakan waktu dari tahap metafase spermatogonia menjadi profase sekitar 3-9 hari, dan dari tahap diakinesis ke spermatozoa yang belum matang lebih kurang 10 hari. Spermatogonia tipe A pertama kali muncul 3 hari setelah lahir, lalu jumlahnya meningkat menjadi sel primordial dan diletakkan pada membran basal berikutnya, setelah itu jumlahnya akan menurun. Tahap meiosis di dalam testis di mulai 8 hari setelah lahir. Petunjuk pertama bahwa spermatogonia tipe B membelah menjadi spermatosit primer adalah tampaknya pembesaran secara nyata dan berpindah dari membran basal. Spermatosit primer

membelah menjadi 2 spermatosit sekunder yang lebih kecil, lalu menjadi 4 spermatid (Rugh, 1997).

Ada 16 tingkatan perkembangan perubahan spermatid menjadi spermatozoa yang terbagi atas 4 fase yaitu :

1. Tahap Golgi mencakup tahap 1 – 3 dari spermiogenesis, ditandai dengan terlihatnya idiosom yang mendekat ke inti dan berakhir dengan menyatunya proakrosom granul menjadi granul tunggal yang besar.
2. Tahap pembentukan tudung yaitu tahap ke 4 - 7 dari spermiogenesis, diawali dengan pembesaran penipisan granul yang terbentuk pada tahap ke 3 dan terjadinya perpanjangan ke lateral dari inti yang merupakan tanda dimulainya pembentukan tudung dari tahap spermiogenesis. Terbentuknya kepala yang melapisi sepertiga sampai setengah dari inti merupakan tahap terakhir dari tahap ini.
3. Tahap akrosom yaitu tahap 8 – 12 dari tahap spermiogenesis. Pada tahap ini sperma mencapai bentuk terpanjang.
4. Tahap pematangan yaitu tahap 13 - 16 dari tahap spermiogenesis, pada tahap ini akrosom, tudung dan inti menjadi lebih pendek dan lebih lengkung dan pada akhirnya spermatozoa ini dilepaskan ke dalam tubuli seminiferi.

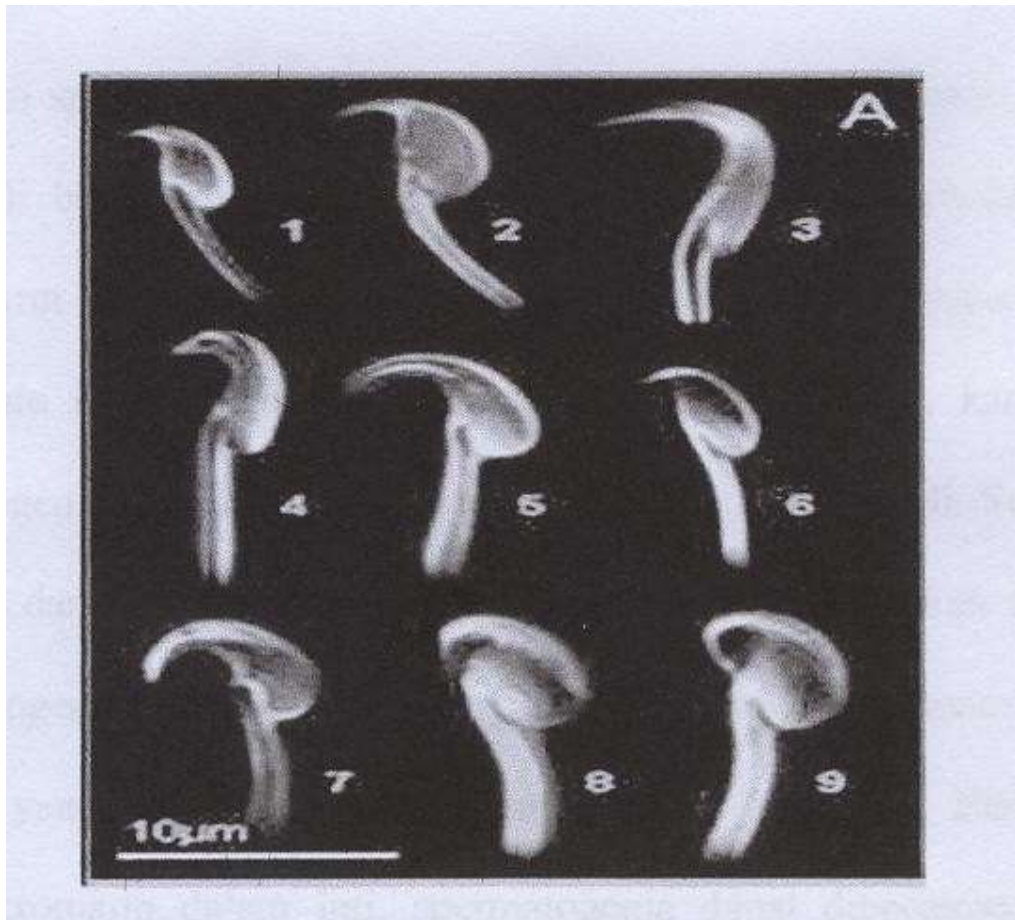
### **3.4.2. Morfologi Spermatozoa**

Spermatozoa yang diproduksi testis tikus mempunyai variasi panjang lebar dan bentuk. Pada umumnya kepala spermatozoa tikus berbentuk sabit atau kait. (Yatim W, 1996 : Rugh, 1997), bagian tengah (*miedle piece*) pendek dan bagian ekor yang sangat panjang.

Akrosom mengandung enzim hialuronidase yang berguna untuk menembus kumulus ooforus pada saat fertilisasi, dan bagian yang sudah tembus membawa lisin untuk mengubah substansi kimia pada zona tersebut sehingga kepala sperma dapat menembusnya. Pada akrosom terdapat plasma membran yang meluas mengelilingi seluruh spermatozoa. Hampir setengah bagian distal dari plasma membran dari kepala sperma membawa sekumpulan partikel yang halus (Rugh, 1997).

Bagian middlepiece terdiri dari mitokondria, badan golgi, dan 2 sentriol. Bagian ekor terdiri atas flagela – flagela yang membentuk seperti helaian – helaian. Kepala dari spermatozoa dalam jumlah banyak melekat pada sel sertoli untuk nutrisi sampai mereka dibebaskan selama koitus (Rugh, 1997).

Dalam keadaan patologi, ada sel spermatozoa yang berbentuk abnormal terdapat pada orang fertil maupun infertil. Hanya saja pada orang fertil kadarnya sedikit. Ada batas minimum % abnormal terhadap normal. Kalau % abnormal kebanyakan, mengakibatkan orangnya infertil. Normalnya morfologi yang baik itu lebih dari 50% dari abnormal. Bentuk abnormal spermatozoa pada orang terjadi karena berbagai macam gangguan dalam spermatogenesis, terutama waktu spermiogenesis. Gangguan itu mungkin karena faktor hormonal, nutrisi, obat, akibat radiasi, radikal bebas, bahan kimia, atau oleh penyakit tertentu (Yatim, 1994)



**Gambar 3.5 :Spermatozoa tikus ( Howard, 2002 )**

Kelainan atau abnormal sperma dapat terjadi pada :

1. Bagian kepala / kelainan ukuran, meliputi kepala besar, kecil, bentuk tidak normal, kepala kembar, atau kombinasi dari yanglainnya.
2. Kelainan leher dan bagian tengah, termasuk sperma tidak berekor ( tampak sebagai kepala bebas atau kepala lepas ), ekor yang tidak tersisip atau ekor yang bengkok, atau bagian tengah yang bengkok, bagian tengah terlihat tipis.
3. Kelainan ekor, meliputi ekor pendek, ganda, berbentuk seperti tusuk rambut, patah ( sudut  $> 90^\circ$  ), ekorbergulung.

4. Sisa sitoplasma lebih besar dari  $\frac{1}{3}$  daerah kepala sperma normal. Sisa sperma biasanya terletak dibagian leher / bagian tengah sel, walaupun sperma muda dapat mempunyai sisa sitoplasma pada lokasi lain sepanjang ekor (WHO,1994)

Bahkan antara satu spermatozoa dengan spermatozoa sering juga mengalami penggumpalan atau perlengketan yang disebut dengan aglutinasi. Aglutinasi dapat terjadi antara ekor dengan kepala atau spermatozoa bergerombol. Bisa juga terjadi perlengketan spermatozoa dengan benda asing (Nasution, 1999)

Untuk dapat melihat normal atau abnormalnya spermatozoa dapat dilakukan dengan pewarnaan Giemsa. Semua diwarnai dengan Giemsa, dilihat dengan mikroskop. Amati di bawah mikroskop cahaya dalam beberapa lapangan pandang terhadap sperma yang abnormal, dengan pembesaran 400 kali, kemudian dilakukan penghitungan jumlah morfologi spermatozoa normal dan abnormal. Ciri spermatozoa normal mempunyai bentuk kepala seperti kait pancing dan ekor panjang lurus, sedangkan spermatozoa yang abnormal mempunyai bentuk kepala tidak beraturan, dapat berbentuk pisang atau tidak beraturan (amorphous), atau terlalu bengkok, atau ekornya tidak lurus bahkan tidak berekor atau hanya terdapat ekornya saja tanpa kepala (Yatim, 1994).

### **3.4.3. Kecepatan Spermatozoa**

Kecepatan spermatozoa adalah : waktu yang dibutuhkan untuk menempuh jarak tertentu oleh seekor spermatozoa yang mempunyai gerak aktif dan progresif dan lurus maju kedepan. Kecepatan spermatozoa merupakan komponen penting

yang akan menentukan kualitas spermatozoa untuk menembus cairan serviks dan mencapai ovum. Kecepatan spermatozoa ditentukan oleh berbagai faktor diantaranya bentuk anatomi spermatozoa, metabolisme dan cairan semen. Faktor inilah yang nantinya akan mempengaruhi gerakan spermatozoa sehingga dihasilkan suatu gerak yang aktif, progresif dan lurus kedepan.

Gerakan spermatozoa normal berasal dari gerak kepala, leher dan ekor yang berirama teratur. Gerakan ini membutuhkan energi yang disuplai dari bagian tengah spermatozoa dan dialirkan ke ekor. Cara mengukurnya adalah dengan menggunakan stopwatch dan menghitung waktu yang diperlukan oleh seekor spermatozoa yang motil dalam jarak 0,05 mm (satu kotak kecil kamar hitung improved Neubauer). Kecepatan gerak spermatozoa yang dianggap normal adalah  $\leq 1,3$  detik dalam menempuh jarak 0,025 mm. Kecepatan rata-rata diambil dari 25 ekor spermatozoa motil (Soehadi, 1992).



## **BAB IV**

### **PENGAMATAN JUMLAH, MORFOLOGI DAN KECEPATAN SPERMATOZOA**

Setelah diberi perlakuan suplemen isoflavon kedelai selama 48 hari, masing-masing hewan coba dikorbankan dengan cara dislokasi leher dan selanjutnya dibedah. Kemudian dilakukan pengamatan sebagai berikut:

#### **4.1. Pengambilan sekresi Vas deferens**

Untuk mendapatkan sperma di dalam sekresi Vas deferens dilakukan menurut Suhadi dan Arsyad (1983) sebagai berikut : setelah 48 hari perlakuan masing-masing hewan coba dikorbankan dengan cara dislokasi leher dan selanjutnya dibedah.

Kemudian organ testis dikeluarkan beserta vas deferens . Vas deferens diambil dan diletakkan ke dalam cawan petri yang berisi NaCl 0,9%. Membuat larutan stok dengan jalan meletakkan vas deferens dalam cawan petri yang berisi NaCl fisiologis 0,9% tersebut, disebut sebagai larutan stok yang digunakan untuk mengetahui kualitas dan kuantitas spermatozoa seperti dibawah ini (Soehadi dan Arsyad, 1983). Suspensi sperma dari Vas deferens yang telah diperoleh dapat digunakan untuk pengamatan yang meliputi: jumlah, kecepatan dan morfologi spermatozoa.

#### **4.2. Menghitung Jumlah Spermatozoa**

Sperma yang telah diaduk homogen dihisap dengan pipet eritrosit sebanyak 0,5 ml, selanjutnya ditambahkan larutan *George* 0,5 ml, setelah diaduk rata diteteskan diatas kotak kamar hitung *improved newbauer*, kemudian dilihat

dibawah mikroskop dan dihitung menggunakan *stopwatch* jumlah spermatozoa pada 32 kotak besar pada *improved neubauer*. Selanjutnya teteskan sperma yang dicampur larutan fisiologis ( NaCl 0,9 % ), kemudian dihitung jumlah spermatozoayangmati, setelah kedua hasil di dapat maka dihitung jumlah spermatozoa yang mati oleh larutan *George* dikurang jumlah spermatozoa yang mati oleh larutan NaCl, setelah didapatkan hasil maka didapat jumlah motil spermatozoa, setelah itu dikalikan dengan 1 juta. Adapun yang biasa digunakan untuk satuan jumlah total spermatozoa adalah juta/ml.

#### **4.3. Pemeriksaan Kecepatan Spermatozoa**

Pemeriksaan dapat dilakukan sejalan dengan pemeriksaan jumlah total spermatozoa. Sperma ditetaskan sebanyak 1 tetes diatas kamar hitung Improved Neubauer, kemudian lihat dibawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 10x. Hitung sebanyak 25 ekor. Hitung kecepatan pada bilik kecil dari garis ke garis (atas ke bawah atau kiri ke kanan) dengan gerakan lurus kedepan secara aktif dan lincah disertai gerak ekor yang teratur. Hitung dalam detik. Untuk mencari rata-rata kecepatan, hasil yang didapat dijumlahkan kemudian dibagi 25.

#### **4.4. Pemeriksaan Morfologi Spermatozoa**

Dilakukan dengan cara ambil larutan stok sebanyak  $\pm 5$  mikro liter (ul) larutan stok. Kemudian teteskan pada kaca objek. Buat hapusan dengan cara mendorong larutan tersebut dengan kaca objek lain ke depan. Biarkan mengering, fiksasi dengan alkohol 70 %, biarkan mengering selama 15 menit. Beri pewarnaan giemsa 5 mikro liter (ul) (merck chemical Co, Jerman) dan dibiarkan mengering selama 15 menit. Bilas dengan air mengalir dan dibiarkan kering.

Amati dibawah mikroskop cahaya dalam beberapa lapangan pandang terhadap sperma yang abnormal, dengan pembesaran 400 kali, kemudian dilakukan penghitungan jumlah morfologi spermatozoa normal dan abnormal. Ciri sperma normal mempunyai bentuk kepala seperti kait pancing dan ekor panjang lurus, sedangkan sperma yang abnormal mempunyai bentuk kepala tidak beraturan, dapat berbentuk seperti pisang atau tidak beraturan (amorphous), atau terlalu bengkok, dan ekornya tidak lurus bahkan tidak berekor, atau hanya terdapat ekornya saja tanpakepala.

Hitung jumlah sperma terhadap keseluruhan total sperma yang terhitung dengan beberapa kali lapangan pandang (kriteria WHO minimal 5 x lapangan pandang) ( Tadjudin, 1998 )

$$\text{Morfologi} = \frac{\text{Jumlah sperma ( dalam beberapa lapangan pandang )}}{\text{Jumlah total ( normal + abnormal dalam seluruh )}} \times 100\%$$

## BAB V

### ANALISA ISOFLAVON KEDELAI TERHADAP SPERMATOZOA

#### 5.1. Pendahuluan

Kasus infertilitas sejak beberapa tahun terakhir meningkat. Dahulu perhatian terfokus hanya pada pihak wanita saja sebagai penyebab ketidaksuburan pasangan. Saat ini diketahui kelainan pada pria memberikan kontribusi 30% dan 20% disebabkan kelainan kedua belah pihak pasangan. Oleh karena itu, faktor pria atau suami memegang kontribusi 50% pada pasangan infertil atau dengan kata lain baik suami ataupun istri mempunyai kontribusi yang sama (Trilsky, 2008).

Siswono 2003 dalam Afriani 2009 menyebutkan bahwa: kasus infertil di negara maju seperti Amerika, Jepang, baik dari laki maupun perempuan ditemukan sekitar 80 persen jumlah pasangan infertil, yang diperoleh dari 400 juta pasangan. Berdasar Survei Kesehatan Rumah Tangga tahun 1996, diperkirakan ada 3,5 juta pasangan (7 juta orang) yang infertil. Mereka disebut infertil karena belum hamil setelah setahun menikah. Kini, para ahli memastikan angka infertilitas telah meningkat mencapai 15-20 persen dari sekitar 50 juta pasangan di Indonesia.

WHO dalam Adiyono (2005) melaporkan bahwa kasus infertilitas terjadi 1/10 pasangan suami istri yang tersebar di seluruh negara di dunia. Penelitian yang dilakukan di Inggris menyebutkan bahwa penyebab infertilitas adalah : multifaktorial dengan penyebab kombinasi. Faktor tersebut diantaranya *unexplain infertility* 28%, problematik faktor sperma 21%, kegagalan ovulasi sel telur 18%, kerusakan faktor saluran tuba falopi 14%, penyakit endometriosis 6%,

problematis faktor hubungan seksual 5% , pengaruh cairan mukus di serviks 3% dan 2% karena problematis dari pihak suami.

Banyak penelitian telah dilakukan untuk mengungkapkan penyebab masalah infertilitas. Hasil penelitian terkini bahwa adanya kemungkinan efek yang merugikan dari toksin lingkungan, seperti dari tumbuhan terhadap fungsi reproduksi. Tumbuhan menghasilkan berbagai bahan untuk manusia, baik yang menguntungkan maupun yang merugikan. Salah satu bahan yang dapat merugikan adalah fitoestrogen. Fitoestrogen suatu senyawa yang banyak ditemukan di lingkungan sekitar dan diketahui dapat mengacaukan keseimbangan sistem hormon binatang maupun manusia (Gultekin dan Yildiz 2006, Atanassova dan Mc.Kinnel 2000). Pada tahun 1940, pertama kali disadari bahwa komponen yang berasal dari beberapa tanaman mempunyai efek estrogenik (Karahalil 2006). Domba-domba yang mengonsumsi semanggi merah setiap harinya, mengalami sindrom infertilitas atau yang lebih dikenal dengan *clover disease*. Dalam daun semanggi ini terkandung banyak isoflavon formononetin dan biochanin A (Gultekin dan Yildiz 2006).

Isoflavon merupakan salah satu kelompok fitoestrogen. Senyawa isoflavon terdistribusi secara luas pada berbagai bagian tanaman , baik pada bagian akar, batang daun, maupun buah. Tanaman golongan Leguminosae, khususnya pada tanaman kedelai mengandung senyawa isoflavon yang cukup tinggi. Bagian tanaman kedelai yang mengandung senyawa isoflavon lebih tinggi terdapat pada biji kedelai, khususnya pada bagian hipokotil (*germ*) yang akan tumbuh menjadi tanaman. Sebagian lagi terdapat pada kotiledon yang akan menjadi daun pertama dari tanaman (Hernawati, 2009).

Kandungan isoflavon pada kedelai berkisar 2-4 mg/g kedelai. Senyawa isoflavon tersebut pada umumnya berupa senyawa kompleks atau konjugasi dengan senyawa ikatan glukosida (Synder dan Kwon,1987). Kedelai mengandung 12 macam isoflavon, yang terdapat dalam bentuk glukosida dan bentuk aglikon. Proses pencernaan atau fermentasi kedelai atau hidrolisis enzimatis akan melepaskan molekul gula dari isoflavon glikosida sehingga menghasilkan isoflavon aglikon (Muchtadi 2010).

Kacang kedelai dikenal sebagai fitoestrogen karena struktur molekul isoflavon kedelai mirip dengan struktur molekul estrogen. Hal ini menyebabkan isoflavon kedelai dapat berikatan dengan *Receptor Estrogen* (RE), namun afinitas RE ligan tersebut lebih rendah dibanding estrogen endogen sel epitel dari jaringan reproduksi seperti kelenjar susu, ovarium dan testis. Mekanisme aksi biologis estrogen adalah kemampuannya untuk bertindak sebagai estrogen agonis yang dapat berikatan dengan RE dan menstimulasi respon estrogen, atau bertindak sebagai estrogen antagonis yang dapat berikatan dengan RE namun menghambat respon estrogen. Isoflavon bersifat antagonis ketika kadar estrogen tinggi, sebaliknya isoflavon bersifat agonis ketika kadar estrogen rendah (Robertson2000).

Puspasari (2007) dalam penelitiannya menemukan rerata morfologi spermatozoa abnormal paling rendah pada kelompok mencit yang tidak diberi ekstrak kedelai dan paling tinggi pada kelompok ekstrak kedelai 780mg/hari, Peningkatan abnormalitas ini disebabkan karena adanya fitoestrogen, terutama isoflavon yang terkandung didalam kedelai. Pemberian fitoestrogen dapat mengganggu jalannya spermatogenesis, karena fitoestrogen dapat menghambat

kerja enzim 17- $\beta$ - hidroksisteroidoksidoreduktase, enzim yang dibutuhkan untuk sintesis testosteron. Hambatan kerja dari enzim menyebabkan penurunan kadar testosteron serta hambatan pada perkembangan sistem saraf pusat dan gonadal. Efek antiandrogenik fitoestrogen juga dapat menghambat sekresi LH pada hipofisis, yang berakibat penurunan kadar sekresi testosteron pada sel Leydig.

Penelitian yang dilakukan oleh Astuti (2009) pemberian tepung kedelai kaya isoflavon dengan dosis 3 mg/ekor/hari tidak memberikan pengaruh yang berarti terhadap konsentrasi spermatozoa dan perkembangan berat testis akan tetapi pada dosis 6mg/kg/hari akan menghambat perkembangan testis dan menyebabkan atrofi testis. Hal ini diduga adanya reaksi estrogen agonis pada dosis isoflavon tertinggi (6mg/ekor/hari); menyebabkan rusaknya struktur membran plasma mitokondria spermatozoa akibat proses oksidasi oleh radikal bebas sehingga menurunkan fungsi dan kualitas spermatozoa.

Pernyataan yang berbeda dinyatakan oleh *Committee on Toxicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment*. Komite ini telah menyelidiki efek pemberian isoflavon, suatu fitoestrogen yang terdapat pada kedelai, terhadap kadar hormon seksual dan kualitas semen pria. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian suplemen isoflavon (40 mg/hari) selama 2 bulan terhadap pria *non-vegetarian* berusia 18-35 tahun tidak mempengaruhi kadar estradiol, testosteron, LH, FSH, volume semen, jumlah, motilitas, dan morfologi sperma, ataupun pada besar testis. (Hughes 2003). Pernyataan serupa juga dituliskan dalam sebuah kepustakaan, bahwa tidak ada pengaruh pemberian isoflavon pada hormon reproduksi pria, besar testis, maupun kualitas semen (Watanabe 2006).

### **5.1.1. Perumusan Masalah**

Melalui penelitian ini akan dianalisis “ apakah ada pengaruh pemberian isoflavon kedelai terhadap jumlah, morfologi dan kecepatan spermatozoa tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*)”

### **5.1.2. Tujuan Penelitian**

Mengetahui pengaruh pemberian isoflavon kedelai terhadap jumlah, kecepatan dan morfologi spermatozoa tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*)

### **5.1.3. Manfaat Penelitian**

Bagi perkembangan ilmupengetahuan, isoflavon kedelai dapat dipertimbangkan sebagai salah satu metode kontrasepsi bagi pria yang tingkat fertilitasnya tinggi serta dalam kepentingan masyarakat merupakan salah satu upaya pencegahan kasus infertil pada pria mengingat bangsa Indonesia merupakan salah satu pengonsumsi kedelai terbesar di Asia selain Jepang.

## **5.2. Metode Penelitian**

### **5.2.1. Lokasi dan Waktu Penelitian**

Penelitian dilaksanakan pada bulan Maret -Desember 2011 di  
Laboratorium Farmasi Universitas Andalas Padang.

### **5.2.2. Jenis dan Desain Penelitian**



Penelitian ini merupakan penelitian experimental, dengan desain penelitian *posttest only control group design* yaitu untuk mengukur pengaruh perlakuan pada kelompok eksperimen dengan cara membandingkan kelompok tersebut dengan kelompok kontrol (Zainudin, 2000).

### **5.2.3. Alat dan Bahan**

#### **a. Alat Penelitian**

1. Tempat makan dan minum tikus beserta pakan biasa
2. Obyek glass & coverglass
3. Mikroskop cahaya yang dilengkapi dengan optik lab
4. Seperangkat alat bedah minor untuk pengambilan saluran vas deferens
5. Gelas ukur
6. Pulpen, Jarum, sarung tangan dan masker
7. Pipet eritrosit, batang pengaduk
8. Kamar hitung *Hemocytometer Improved Neubauer*
9. *Stopwatch*, tissue
10. Gelas arloji
11. Alkohol 96%

#### **b. Bahan Penelitian**

1. Isoflavon yang terdapat dalam suplemen isoflavon soybean Woo Tech yang diberikan secara peroral
2. Aquadest Steril

3. Tempat makan dan minum tikus beserta pakan biasa
4. Kandang tikus sebanyak lima buah
5. Tikus putih dewasa sebanyak 25 ekor
6. Larutan *Giemsa*
7. Larutan *George*
8. NaCl 0,9%

#### **5.2.4. Tahapan Penelitian**

##### **a. Tahap persiapan meliputi:**

1. Tikus putih jantan dewasa yang memenuhi kriteria ( baik umur maupun berat badan ) disiapkan sebanyak 25 ekor.
2. Melakukan adaptasi lingkungan selama 1 minggu untuk penyesuaian terhadap lingkungan dengan diberi makan yaitu pakan dan minum tikus biasa.
3. Pengelompokkan tikus ( 4 kelompok perlakuan dan 1 kontrol dimana masing-masing terdiri dari 5 ekor tikus).
4. Melarutkan isoflavon kedelai dengan menggunakan aquadest, dimana dosis yang digunakan dalam penelitian ini adalah 1,26 mg, 2,52 mg, 3,78 mg dan 5,04 mg berdasarkan penelitian sebelumnya.

##### **b. Tahap Pelaksanaan**

1. Tikus ditempatkan didalam kandang yang terbuat dari bahan plastik ( ukuran 30 x 20 x 10 cm) yang ditutup dengan kawat kasa. Dasar kandang dilapisi dengan sekam padi setebal 0,5-1 cm dan diganti setiap 3 hari. Cahaya ruangan dikontrol persis jam 12 terang

(pukul 06.00 sampai dengan pukul 18.00) dan 12 jam gelap (pukul 18.00 sampai pukul 06.00), sedangkan suhu kelembaban ruangan dibiarkan berada pada kisaran alamiah. Pakan (pelet) dan minum (air PAM) disuplai setiap hari. Persetujuan Ethical clearance dari Komisi Etika Penelitian Fakultas Kedokteran Universitas Andalas

2. Larutan isoflavon kedelai diberikan secara oral dengan menggunakan semprit yang ujung jarumnya dibuat tumpul berbentuk sonde. Perlakuan diberikan pada masing-masing kelompok secara berulang dengan dosis 1,26 mg, 2,52 mg, 3,78 mg dan 5,04 mg selama 48 hari (selama satu tahap spermatogenesis tikus)
3. Setelah hari ke-48 disiapkan untuk dilakukan pematangan batang otak, kemudian dilaparotomi dan selanjutnya dilakukan pemotongan terhadap vasdeferens masing-masing 2cm
4. Selanjutnya dilakukan pengambilan spermatozoa vas deferens dengan cara memijat vas deferens yang telah dipotong dan kemudian ditampung dengan menggunakan gelas arloji yang berisi larutan NaCl 0,9 %.

### 5.3. Hasil dan Pembahasan

#### 5.3.1. Jumlah Spermatozoa

**Tabel 1. Hasil Uji Normalitas Kolmogorov-Smirnov Jumlah Spermatozoa (juta/ml) Tikus Putih Jantan Dewasa (*Rattus Norvegicus*) setelah Pemberian Isoflavon Kedelai**

Jumlah spermatozoa (juta/ml)	
Mean	97,64
SD	39,90
<i>p</i>	0,059

Berdasarkan Tabel 1. didapatkan hasil uji normalitas dengan nilai *p* value sebesar 0,059 yang berarti data tersebut terdistribusi normal, kemudian dilanjutkan dengan uji ANOVA untuk melihat adakah pengaruh pemberian isoflavon kedelai terhadap jumlah spermatozoa tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*)

**Tabel 2. Hasil Uji ANOVA terhadap Jumlah Spermatozoa (juta/ml) Tikus Putih Jantan Dewasa (*Rattus norvegicus*) setelah Pemberian Isoflavon Kedelai**

Kelompok	Mean (juta/ml)	SD	<i>p</i>
Kontrol	164,80	40,40	0,001
P1	96,20	10,99	
P2	82,20	5,63	
P3	81,20	6,72	
P4	63,80	3,70	

Hasil penelitian menunjukkan pemberian isoflavon kedelai memperlihatkan respon terhadap penurunan rata-rata jumlah spermatozoa tikus mulai dari kelompok P1 sampai dengan P4. Penurunan rata-rata jumlah spermatozoa tertinggi terdapat pada kelompok P4 dengan dosis tertinggi (5,04 mg). Pada

kelompok kontrol rata-rata jumlah spermatozoa adalah : 164,80 juta/ml, kemudian terjadi penurunan pada kelompok P1 : 96,20 juta/ml, P2 : 82,20 juta/ml, P3 : 81,20 juta/ml dan P4 : 63,80 juta/ml. Secara statistik dengan menggunakan uji ANOVA diperoleh  $p$  value sebesar 0,001 ( $p < 0,05$ ) yang berarti ada pengaruh pemberian isoflavon kedelai terhadap jumlah spermatozoa. Untuk mengetahui perbedaan yang signifikan antara kelompok kontrol dengan masing-masing kelompok perlakuan, dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Bonferroni* dengan hasil antara kelompok kontrol dengan kelompok P1, kelompok kontrol dengan kelompok P2, kelompok kontrol dengan kelompok P3, kelompok kontrol dengan P4 menunjukkan perbedaan yang signifikan ( $p < 0,05$ ). Untuk antar kelompok perlakuan, kelompok P1 dengan kelompok P2, kelompok P1 dengan kelompok P3, kelompok P1 dengan kelompok P4, kelompok P2 dengan kelompok P3, kelompok P2 dengan kelompok P4, kelompok P3 dengan kelompok P4 tidak terdapat perbedaan yang signifikan ( $p > 0,05$ ).

Jumlah spermatozoa yang dihasilkan sangat tergantung pada proses langsung yang terjadi selama proses spermatogenesis dalam tubulus seminiferus. Bila spermatogenesis berlangsung normal maka akan di hasilkan jumlah spermatozoa yang normal juga. Sebaliknya jika selama proses spermatogenesis terjadi gangguan, maka perkembangan sel spermatogonium akan mempengaruhi jumlah spermatozoa yang terbentuk. Hal ini sangat tergantung pada besarnya gangguan yang terjadi selama proses spermatogenesis.

Penurunan jumlah spermatozoa setelah pemberian isoflavon kedelai diduga isoflavon bersifat estrogen agonis yang dapat berikatan dengan Receptor Estrogen (RE) dan menstimulasi respon estrogen sehingga dapat mengganggu

jalannya spermatogenesis. Fitoestrogen dapat menghambat kerja enzim  $17\text{-}\beta$ -hidroksisteroidoksidoreduktase, enzim yang dibutuhkan untuk sintesis testosteron. Hambatan kerja dari enzim menyebabkan penurunan kadar testosteron serta hambatan pada perkembangan sistem saraf pusat dan gonadal. Efek antiandrogenik fitoestrogen juga dapat menghambat sekresi LH pada hipofisis, yang berakibat penurunan kadar sekresi testosteron pada sel Leydig (Gultekin 2006)

Hormon testosteron sangat diperlukan untuk mengawali, mempertahankan proses spermatogenesis, serta mempertahankan kualitas spermatozoa hingga keluar dari tubuh. Penurunan kadar testosteron ini dapat menyebabkan proses spermatogenesis tidak berjalan optimal, yang pada akhirnya menurunkan kualitas spermatozoa, termasuk jumlah spermatozoa (Matsumoto 2001). Jumlah spermatozoa yang dihasilkan testis tidak cukup untuk mendiagnosa fertil atau infertilitas seseorang. Karena adakalanya jumlah spermatozoa yang normal tetapi bila memiliki morfologi dan kecepatan yang kurang baik akan bisa menyebabkan infertil. Sebaliknya dengan jumlah spermatozoa yang sedikit tapi memiliki morfologi dan kecepatan normal maka masih bisa fertil (Guyton, 1997).

### 5.3.2. Kecepatan Spermatozoa

**Tabel 3. Hasil Uji Normalitas Kolmogorov-Smirnov Kecepatan Spermatozoa (detik) Tikus Putih Jantan Dewasa (*Rattus norvegicus*) setelah Pemberian Isoflavon Kedelai**

Kecepatan spermatozoa (detik)	
Mean	1,64
SD	0,47
<i>p</i>	0,43

Berdasarkan Tabel 3. didapatkan hasil uji normalitas dengan nilai  $p$  value sebesar 0,43 yang berarti data tersebut terdistribusi normal, kemudian dilanjutkan dengan uji ANOVA untuk melihat adakah pengaruh pemberian isoflavon kedelai terhadap kecepatan spermatozoa tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*)

**Tabel 4. Hasil Uji ANOVA terhadap Kecepatan Spermatozoa (detik) Tikus Putih Jantan Dewasa (*Rattus norvegicus*) setelah Pemberian Isoflavon Kedelai**

Kelompok	Mean (detik)	SD	$p$
Kontrol	1,14	0,22	0,001
P1	1,26	0,15	
P2	1,52	0,24	
P3	2,11	0,10	
P4	2,18	0,17	

Kecepatan spermatozoa adalah waktu yang dibutuhkan untuk menempuh jarak tertentu oleh seekor spermatozoa yang mempunyai gerak aktif, progresif, dan lurus maju kedepan. Hasil penelitian dengan menggunakan uji statistik ANOVA diperoleh nilai  $p$  value sebesar 0,001 ( $p < 0,05$ ) yang berarti ada pengaruh pemberian isoflavon kedelai terhadap kecepatan spermatozoa. Rata-rata kecepatan spermatozoa kelompok perlakuan lebih lambat bila dibandingkan dengan kontrol (1,14/detik). Lebih lambatnya kecepatan spermatozoa sebanding dengan dosis isoflavon kedelai yang diberikan selama 48 hari. Semakin tinggi dosis isoflavon kedelai yang diberikan, semakin berkurang kecepatan spermatozoa. Penurunan kecepatan yang paling tinggi adalah pada kelompok P4 dengan pemberian isoflavon kedelai (5,04mg).

Kecepatan spermatozoa ditentukan oleh berbagai faktor diantaranya

bentuk anatomi spermatozoa, metabolisme dan cairan semen. Faktor inilah yang nantinya akan mempengaruhi gerakan spermatozoa sehingga dihasilkan suatu gerak yang aktif, progresif dan lurus kedepan. Gerakan spermatozoa normal berasal dari gerak kepala, leher dan ekor yang berirama teratur. Gerakan ini membutuhkan energy yang disuplai dari bagian tengah spermatozoa dan dialirkan ke ekor. Pada bagian itu terdapat mitokondria yang memecah bahan-bahan tertentu untuk mengeluarkan energi. Energi dibagian tengah disalurkan ke distal atau ekor, dan ekor kemudian bergerak. Energi yang keluar menyebabkan dua macam gerakan. Pertama gerakan bergelombang keujung ekor, kedua bersifat sirkular. Energi yang keujung ekor itu tidak lurus kebelakang, tetapi arahnya melingkari batang tubuh bagian tengah, terus keujung ekor ( Hafes dkk, 2000).

Adenosin Tri Phospat (ATP) didapatkan dari enzymatic hidrolisis ATP dan menyebarkan gelombang ke flagella spermatozoa. Fosfatagen lainnya (fosfat berenergi tinggi) dalam sel sperma dapat bertindak sebagai cadangan pendukung. Sel-sel sperma mengandung sekitar 150 moles ATP dan 85 mole ADP ditambah sekitar 20 moles fruktosa 1,6 – diphosphate dan triose phosphate yang digabungkan. Fruktosa dihasilkan oleh kelenjer vesikula seminalis dan disekresikan pada plasma semen. Banyak asam dikarboxyli, tricarboxylic dan asam lemak yang masuk ke dalam metabolisme sperma melalui siklus krebs (Hafes dkk, 2000).

Spermatozoa memiliki sistem pertahanan enzimatik atau non enzimatik untuk menetralkan pengaruh toksik senyawa ROS pada spermatozoa, sehingga ROS hanya terdapat dalam jumlah kecil yang diperlukan untuk menjaga fungsi spermatozoa tetap normal. Sistem pertahanan radikal bebas, baik enzimatik maupun non enzimatik, meliputi proteksi terhadap berbagai kompartemen sel



antara lain mitokondria, retikulum endoplasma, peroksisom, sitoplasma dan membran sel. Pemeliharaan integritas sel tergantung pada keseimbangan antara pembentukan radikal bebas dengan sistem pertahanan radikal bebas. Terjadinya kerusakan sel dihasilkan oleh ketidakseimbangan antara pembentukan ROS dan aktivitas pertahanan enzim antioksidan.(Astuti 2009).

Penurunan kecepatan spermatozoa karena isoflavon bersifat sebagai estrogen agonis dengan menstimulasi respon estrogen sehingga berpotensi menimbulkan gangguan, mengakibatkan rusaknya struktur membran plasma mitokondria spermatozoa akibat proses oksidasi radikal bebas dan menyebabkan peningkatan peroksidasi lipid. Struktur internal mitokondria yang tidak sempurna sehingga mengakibatkan terganggunya proses metabolisme spermatozoa.

Terbentuknya perosidasi lipid berhubungan dengan peningkatan pembentukan radikal bebas dan berkorelasi dengan penurunan kecepatan spermatozoa, penurunan fosforilasi protein pada aksonem dan berkurangnya ATP intrasel. Ketidakseimbangan antara pembentukan ROS dan aktivitas pertahanan enzim antioksidan (*scavenger*) dari isoflavon kedelai dapat mengakibatkan kerusakan sel spermatozoa terutama membran plasma mitokondria yang berperan dalam memproduksi energi dalam bentuk ATP, dimana ATP dibutuhkan untuk kontraksi/pergerakanspermatozoa.

### 5.3.3. Morfologi Spermatozoa

**Tabel 5. Hasil Uji Normalitas Kolmogorov-Smirnov Morfologi Abnormal Spermatozoa (%) Tikus Putih Jantan Dewasa (*Rattus norvegicus*) setelah Pemberian Isoflavon Kedelai**

Morfologi abnormal spermatozoa (%)	
Mean	23,96
SD	9,78
<i>p</i>	0,97

Berdasarkan Tabel 5. didapatkan hasil uji normalitas nilai *p* value sebesar 0,97 yang berarti data tersebut terdistribusi normal, kemudian dilanjutkan dengan uji ANOVA untuk melihat adakah pengaruh pemberian isoflavon kedelai terhadap morfologi abnormal spermatozoa tikus putih jantan.

**Tabel 6. Hasil Uji ANOVA terhadap Morfologi Abnormal Spermatozoa (%) Tikus Putih Jantan Dewasa (*Rattus norvegicus*) setelah pemberian Isoflavon Kedelai**

Kelompok	Mean (%)	SD	<i>p</i>
Kontrol	9,60	2,30	0,001
P1	22,20	4,21	
P2	26,00	2,65	
P3	29,20	9,78	
P4	31,40	9,02	

Hasil penelitian pemberian isoflavon kedelai dengan beberapa dosis yang berbeda memperlihatkan respon terhadap peningkatan rata-rata morfologi abnormal spermatozoa tikus putih jantan, dimana mulai dosis terendah perlakuan (P1) telah menunjukkan peningkatan rata-rata morfologi abnormal spermatozoa tikus. Peningkatan morfologi abnormal spermatozoa sebanding dengan tingkat dosis yang diberikan setiap hari selama 48 hari. Terlihat bahwa semakin tinggi

dosis isoflavon kedelai yang diberikan maka semakin tinggi peningkatan morfologi abnormal spermatozoa yang terjadi. Pada kelompok kontrol rata-rata morfologi abnormal spermatozoa adalah 9,60%, kelompok P1 terjadi peningkatan menjadi 22,20%. Peningkatan terus terjadi pada kelompok P2 : 26,00% , kelompok P3 : 29,20% dan pada kelompok P4 menjadi 31,40%.

Secara statistik dengan menggunakan uji ANOVA diperoleh  $p$  value sebesar 0,001 ( $p < 0,05$ ) yang berarti ada pengaruh pemberian isoflavon kedelai terhadap morfologi abnormal spermatozoa. Untuk mengetahui perbedaan yang signifikan antara kelompok kontrol dengan masing-masing kelompok perlakuan, dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Bonferroni* dengan hasil antara kelompok kontrol dengan kelompok P1, kelompok kontrol dengan kelompok P2, kelompok kontrol dengan kelompok P3, kelompok kontrol dengan P4 menunjukkan perbedaan yang signifikan ( $p < 0,05$ ). Untuk antar kelompok perlakuan, kelompok P1 dengan kelompok P2, kelompok P1 dengan kelompok P3, kelompok P1 dengan kelompok P4, kelompok P2 dengan kelompok P3, kelompok P2 dengan kelompok P4, kelompok P3 dengan kelompok P4 tidak terdapat perbedaan yang signifikan ( $p > 0,05$ ).

Meningkatnya bentuk spermatozoa yang abnormal dapat terjadi karena berbagai macam gangguan dalam proses spermatogenesis terutama pada tahap spermiogenesis. Gangguan ini bisa disebabkan oleh akibat hormonal, radikal bebas dan bahan kimia (Yatim, 1994). Spermatogenesis dapat terjadi melalui beberapa tahap pembelahan. Tahap awalnya spermatogonia akan mengalami perubahan menjadi spermatosit primer, kemudian menjadi spermatosit sekunder dan menjadi spermatid. Sebelum spermatid menjadi spermatozoa ada fase yang

dilewati spermatid yang disebut fase spermiogenesis. Fase ini terdiri dari fase golgi, tutup, akrosom dan pematangan bertujuan untuk membentuk morfologi normal spermatozoa yang terdiri dari kepala, leher dan ekor yang normal (Rugh,1997).

Peningkatan abnormalitas morfologi ini dapat disebabkan karena adanya fitoestrogen, terutama isoflavon yang banyak terkandung dalam kedelai. Pemberian fitoestrogen dapat mengganggu jalannya spermatogenesis, karena fitoestrogen menghambat kerja enzim 17- $\beta$ -hidroksisteroidoksidoreduktase, enzim yang dibutuhkan untuk sintesis testosteron. Hambatan kerja enzim tersebut menyebabkan penurunan kadar testosteron serta hambatan pada perkembangan sistem saraf pusat dan gonadal (Karahalil 2006 dan Attanassova et.al 2000). Efek antiandrogenik fitoestrogen juga dapat menghambat sekresi LH pada hipofisis, yang berakibat penurunan kadar sekresi testosteron pada sel leydig (Gultekin 2006). Hormon testosteron sangat diperlukan untuk mengawali, mempertahankan proses spermatogenesis, serta mempertahankan kualitas spermatozoa hingga dikeluarkan dari tubuh. Penurunan kadar testosteron inilah yang menyebabkan proses spermatogenesis tidak berjalan optimal, yang pada akhirnya menurunkan kualitas spermatozoa, termasuk morfologi spermatozoa (Glenn 1995 dan Matsumoto 2001).

#### **5.4. Kesimpulan**

Hasil penelitian pengaruh isoflavon kedelai terhadap jumlah, kecepatan dan morfologi spermatozoa tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) dapat disimpulkan bahwa :

1. Terdapat pengaruh yang signifikan pemberian isoflavon kedelai terhadap

penurunan jumlah spermatozoa tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*)

2. Terdapat pengaruh yang signifikan pemberian isoflavon kedelai terhadap penurunan kecepatan spermatozoa tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*)
3. Terdapat pengaruh yang signifikan pemberian isoflavon kedelai terhadap peningkatan morfologi abnormal spermatozoa tikus putih jantan (*Rattusnorvegicus*)

## DAFTAR PUSTAKA

- Astuti S,2009. Kualitas Spermatozoa Tikus Jantan yang Diberi Tepung Kedelai Kaya Isoflavon, Fakultas Pertanian Universitas Lampung
- Adiyono W, 2005. <http://w.w.w.suaramerdeka.com/harian/0503.28/ragam01htm>, dikutip tanggal 10 Maret 2011.
- Attanassova N, Mckinnel , 2000. Comparative Effects of Neonatal Exposure of Male Rats to Potent and Weak (environmental) Estrogens on Spermatogenesis at Puberty and The Relationship to adult testis size and Fertility : Evidence for Stimulatory Effects of Low Estrogen levels.
- Axelson M,KDR Setchell,1981. The excretion of lignans in rats-Evidence for an intestinal bacterial source for this new group of compounds.FEBS Lett,123:337-342.
- Budisantoso, Hieronymus. 1994. Susu Dan Yogurt Kedelai. Yogyakarta: Penerbit Kanisius.
- Brzozowski AM et al, 2002.Molecular basis of agonism and antagonism in the estrogen receptor.Nature (Lond).389:753-758.
- Cotroneo , 2001. Sex Steroid Receptor Regulation by Genestein in The Pubertal rat Uterus, Moll Cell Endocrinol
- Carnerro and Kelly,1998. Sistem Reproduksi Pria, Dalam ( Tambayong J, Alih Bahasa).Histology Dasar, Edisi ke-8, Jakarta : Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Cunningham AR,Klopman G,Rosenkranz HS,1997.A dichotomy in the lipophilicity of natural estrogens, xenoestrogens,and phytoestrogens. Environ Health Perspect.105:665-668.
- Fritz WA ,2002. Dietary Genistein Down-Regulates Androogen and Estrogen Receptor Expression in The Rat Prostate, Moll Cell Endocrinol
- Greenspan, Baxter, 1998. Endokrinologi Dasar dan Klinik,Ed IV, alih bahasa : Caroline Wujaya, maulany, Sonny Samsudin. EGC.Jakarta
- Gultekin E, Yildiz F, 2006. Introduction to Phytoestrogen, In : Yildiz F, Editor, Phytoestrogen in Functional food, Boca Raton, Florida, CRC Press Taylor & Francis GroupLLC

- Guyton AC, Hall JE. 1997. Buku Ajar Fisiologi Kedokteran Edisi 9, EGC. Jakarta
- Compenhaver, 1988. The Male Reproductive Toxicity Immune Cell Sing A Protein From Bitter Melon (*Momordica Charantia*) Cell Immunol.
- Glover A and Assinder S.J, 2006. Acute exposure of Adult Male Rats to Dietary Phytoestrogen Reduces Fecundity and Alters Epididymal Steroid Hormon Receptor Expression. *Jour. Endoc.* 189 : 565-573
- Cotroneo MS, Wang J, Eltoum IEA, Lamartiniere CA. Sex Steroid Receptor Regulation by Genestein in the Pubertal Rat Uterus. *Mol Cell Endocrinol* 2001, 173 : 135-145
- Hugges I, Woods HF, 2003. Phytoestrogen and Health. London : Committe on Toxicity of Chemicals in Food, Consumer Product and The Environment.
- Hafez, E.S.E 1996. Human Semen and Fertility Regulation in Men. The CV. Mosbyuni)
- Hess, R.A. 1999. Spermatogenesis, Overview in Encyclopedia of Reproduction 4 : 539-545
- Hernawati, 2009. Perbaikan Kinerja Reproduksi Akibat Pemberian Isoflavon dari Tanaman Kedelai, Jurusan Pendidikan Biologi FMIPA Universitas Pendidikan Indonesia Bandung
- Hawkesworth G, BS Drasar dan MJ Hill, 1971. Intestinal bacteria and the hidrolisis of glisidic bonds. *J Med Microbiol*, 4:451-459.
- Junqueira LC, Carneiro J, Kelly RO, 1997. Judul Asli Textbook of Basic Hystology. 8<sup>th</sup> ed. Diterjemahkan oleh dr. Jan Tambajong. Histologi dasar Edisi 8. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta
- Joannou GE et.al, 1995. A urinary profil study of dietary phytoestrogens. The indentification and mode of metabolism of new isoflavonoids. *J steroid Biochem Molec Biol*, 54:167-184
- Kang KS, Che JH, and Lee YS, 2002, Lack of Adverse Effects in the F1 Offspring maternally Exposed to Genistein at human Intake Dose Level, *Food Chem Toxicol*
- Karahalil B, 2006. Benefits and risk of Phytoestrogens, in : Yildiz F, Editor, Phytoestrogen in functional foods, Boca Raton, Florida, CRC Press Taylor & Francis Group LLC

- Kim H, Peterson TG, Barnes S, 1998. Mechanism of action of the soy isoflavone genistein : emerging role of its effects through transforming growth factor beta signaling. *Am J Clin Nutr.* 68: 1418S-1425S.
- Kusumawati D, 2004. Bersahabat dengan Hewan Coba. Gajah Mada *University Press*
- Khaidir M ,2006. Studi Literatur Penilaian Tingkat Fertilitas dan Penatalaksanaannya pada Pria, *Jurnal Kesehatan Masyarakat*
- King RA, 2002. Soy Isoflavones in Foods: Processing Effects and Metabolism. *ASA Tech Bull*, 87 (10) : 1-10.
- Leclercq G , Heuson JC, 1979. Physiological and pharmacological effect of estrogen in breast cancer. *Biochem Biophys Acta.* 560:427-455
- Llewellyn D, 2001. Dasar-dasar Obstetri dan Ginekologi Ed VI, Jakarta, Hipokrates
- Matsumoto AM. The testis. In: Felig P, Frohman LA, editors. *Endocrinology and metabolism*, 4th ed. USA: The McGraw-Hill Companies Inc., 2001:635-58.
- Moeloe N, 1994. *Reproduksi dan Embriologi: Dari Satu Sel menjadi Organisme*. Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia Jakarta.
- Muchtadi D, 2010. *Kedelai Komponen Bioktif untuk Kesehatan*. Penerbit Alfabeta Bandung
- Nasution, A.W, 1993. *Biologi Kedokteran ( Reproduksi )* Fakultas Kedokteran Universitas Andalas Padang
- Nasution, A.W, 1999. *Andrologi*, Fakultas Kedokteran Universitas Andalas Padang.
- Puspasari D, 2007. Pengaruh Pemberian Ekstrak Kedelai Dosis Bertingkat Terhadap Morfologi Spermatozoa Mencit Jantan Strain Balb/C, Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang.
- Robertson KM, O'Donnell L, Simpson ER, Jones MEE, 2002. The phenotype of aromatase knockout mouse reveals dietary phytoestrogens impact significantly on testis function. *Endocrinology*.
- Rugh. 1997. *The Mouse is Reproduction and Development* Mineopolis : Burgess.
- Rudolf Stromberg, 1986. *The Anatomy Of Laboratory Rat*. Baltimore: The Williams and Wilking Company.



- Samsudin, U. S. dan D. S. Djakamihardja. 1985. *Budidaya Kedelai*. C.V. Pustaka Buana. Bandung. Hal 13-15.
- Saleh RA dan Agarwal A, 2002. Oxidative stress and male infertility : from research bench to clinical practice. *J Androl*.23(6) : 737-52
- Sanocka D dan Kurpisz M, 2004. Reactive OxygenSpecies and Sperm Cells. *Reprod Biol Endocrinol* 2:12
- Santoso.S, 2001. *Buku Latihan SPSS Statistik Non Parametrik*. PT Elek Media Komputindo. Jakarta
- Soehadi Koentjoro, 1992. *Analisis Sperma*, Airlangga University Press, Surabaya.
- Snyder, H.E. and W. Kwon, T. 1987. *Soyhean Utiluzatin*. an AVI Book. Published by van Nostrad Rein hold company, New york.
- Setchell KDR, Aldercreutz H, 1998. Mammalian Lignans and Phytoestrogen Recent Studies on Their Formation, Metabolism and Biological Role in Health and Disease. In: *Role of The Gut Flora in Toxicity and Cancer* (Rowland IR.ed). Pp 315-345. AcPress. London. UK.
- Schmidl MK, Labuza TP, 2000. *Essentials of Fungctional Foods*. Aspen Publisher, Inc. Gaithersburg. Maryland.
- Siswono, 2003. *Infertilitas pada Pria*. Dalam Afriani, 2010. *Gambaran Kecemasan Pasangan Infertil yang berkunjung ke Rs Adenan Adenin, Fk Keperawatan USU*
- Trilsky, 2008. *Infertilitas Pria*, <http://trilsky.wordpress.com/2008/01/09/infertilitas-pria-2/> dikutip tanggal 09.05.2011
- Tjitrosomo and Sugiri, 1996. *Biologi*. Jakarta Erlangga
- Winarsi, 2005. *Isoflavon, Berbagai Sumber, Sifat dan Manfaatnya pada Penyakit Degeneratif*, Yogyakarta, UGM University Press
- Watanabe S, Gang Zhoo V, Melby MK, Ishiwata N, Kimira M, 2006. Systematic review of intervention using isoflavon supplement and proposal for further studies. In : Sugono M, editor. *Soy in health and disease prevention* Boca Raton, Florida : CRC Press Taylor & Francis Group LLC.
- WHO, 1994. *Penuntun Laboratorium WHO untuk Pemeriksaan Semen Manusia dan interaksi Sperma-Getah serviks*, Jakarta : Balai penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.

Xu et.al.1995 Bioavaibility of soybean isoflavones depens upon gut microflora in women. J Nutr,130:798-801

Yatim.Wildan .1994.*Reproduksi dan Embriologi*.Bandung , Tarsito.

LAMPIRAN





Mengeluarkan Organ Testis beserta Vas Deferens Tikus Putih Jantan (*Rattus Novergicus*). Vas Deferens diletakkan ke dalam cawan petri yang berisi NaCl 0,9%

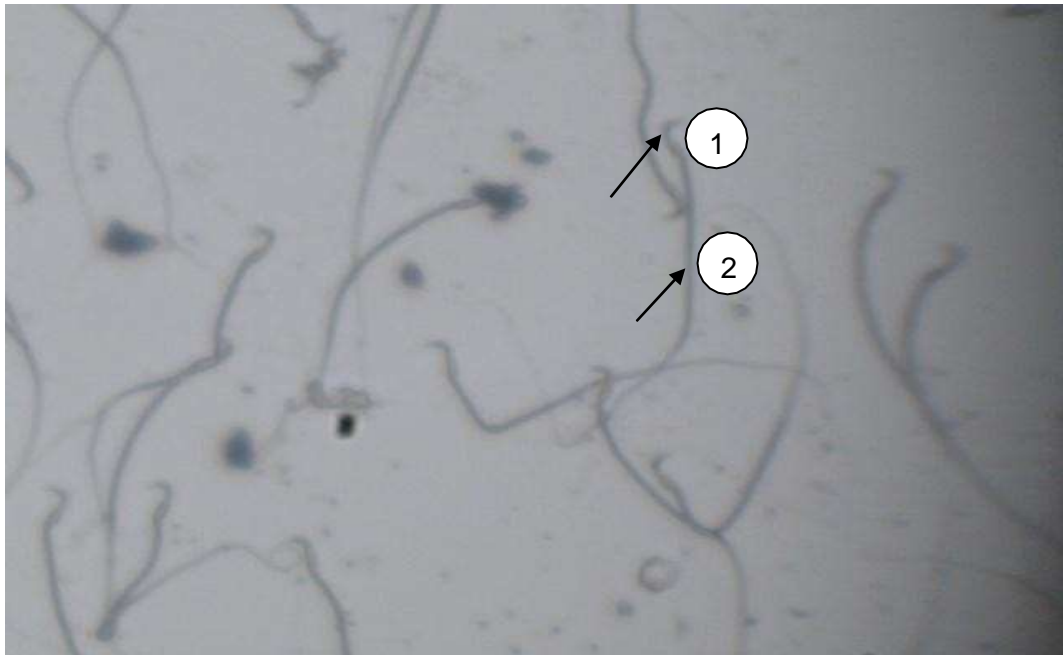




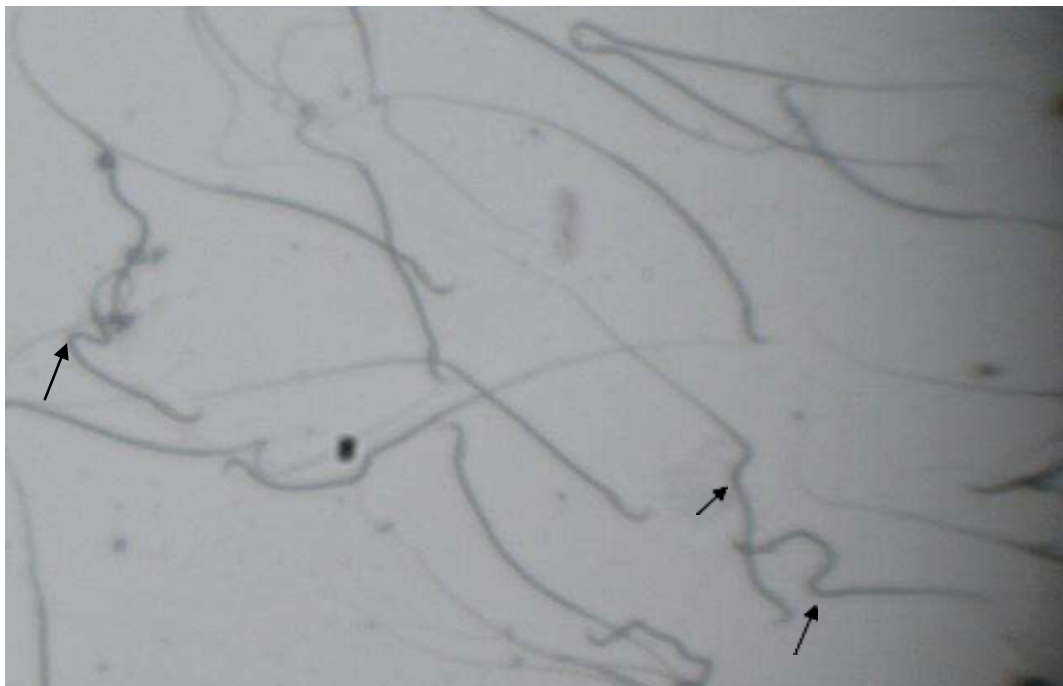
Spermatozoa yang telah diaduk homogen di hisap dengan pipet eritrosit sebanyak 0,5 ml,selanjutnya di tambahkan larutan George 0,5 ml,setelah diaduk rata di teteskan diatas kotak kamar hitung Improve Neubauer,kemudian dilihat dibawah mikroskop dan hitung menggunakan stopwatch jumlah spermatozoa pada 32 kotak besar di Improve Neubauer. Untuk kecepatan dilakukan sejalan dengan pemeriksaan jumlah total spermatozoa lihat dibawah mikroskop dengan pembesaran 10 kali.



Membuat apusan untuk pemeriksaan Morfologi Spermatozoa, dengan cara mengambil larutan stok sebanyak  $\pm 5$  mikro liter (ul),kemudian teteskan dalam kaca objek kemudian dorong larutan tersebut dengan kaca objek lain ke depan. Biarkan mongering selama 15 menit,beri pewarnaan giemsa 5 mikro liter (ul) dan dibiarkan mongering selam 15 menit,bilas dengan air mengalir dan biarkan kering



Morfologi spermatozoa tikus putih jantan ( kelompok kontrol) bentuk morfologi normal dengan kepala seperti kait pancing (1) dan ekor lurus (2) (pembesaran 400 x)



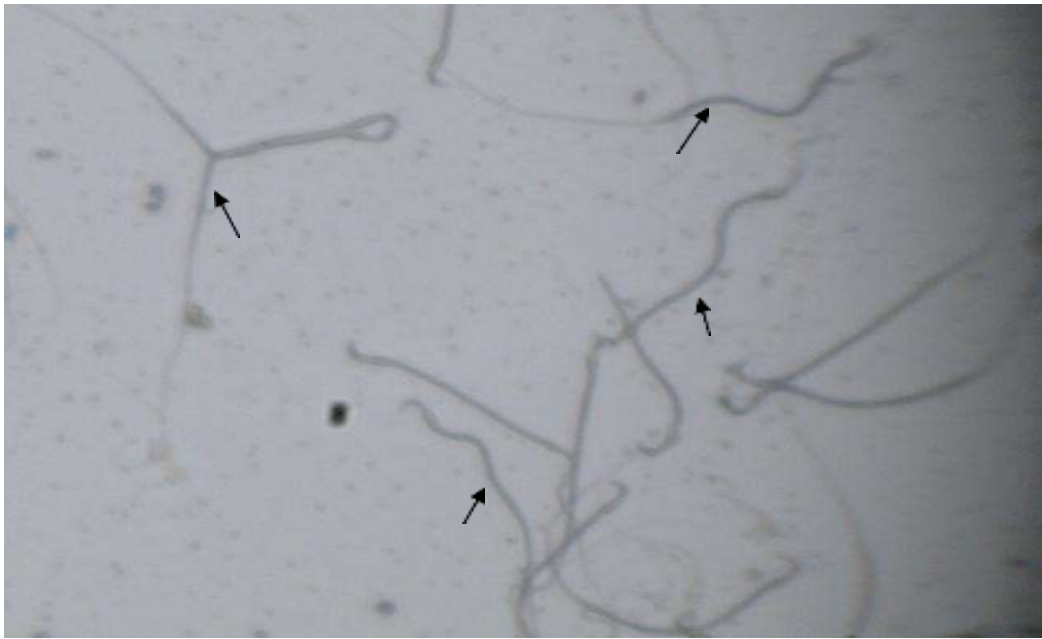
Morfologi spermatozoa tikus putih jantan kelompok (P1) bentuk morfologi abnormal dengan ekor yang membengkok (pewarnaan giemsa pembesaran 400 x)



Morfologi spermatozoa tikus putih jantan kelompok ( P2 ) bentuk morfologi abnormal dengan ekor yang membengkok (pewarnaan giemsa, pembesaran 400x)



Morfologi spermatozoa tikus putih jantan kelompok (P3) bentuk morfologi abnormal dengan ekor yang membengkok (pewarnaan giemsa, pembesaran 400x)



Morfologi spermatozoa tikus putih jantan kelompok (P4) bentuk morfologi abnormal dengan ekor yang membengkok (pewarnaan giemsa,pembesaran 400 x)



## Biografi Penulis



Elvina Sari Sinaga, SST., M. Biomed lahir di Tanjungbalai, 27 Maret 1975, lulus Sarjana Terapan Tahun 2006 di Program Studi Bidan Pendidik Universitas Sumatera Utara dan mendapatkan gelar Magister Biomedik di Universitas Andalas pada tahun 2012. Aktif sebagai dosen mulai tahun 2006 -2019 di STIKes Widya Husada, Tahun 2019 sampai sekarang di Fakultas Keperawatan dan Kebidanan Universitas Prima Indonesia Prodi Pendidikan Profesi Bidan. Penulis mengajar mata kuliah Fisiologi Kehamilan Persalinan Nifas dan BBL, Asuhan Kehamilan dan Bayi Baru Lahir dan aktif melakukan penelitian dan pengabdian masyarakat. Penulis mengucapkan rasa syukur kepada Tuhan yang Maha Esa dan Tim Penyusun atas diterbitkannya monograf dengan judul “Isoflavon Kedelai Terhadap spermatozoa” semoga dengan diterbitkannya monograf ini dapat memberikan kontribusi positif khususnya dalam bidang reproduksi

ISBN 978-623-7911-63-0

