

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Spermatogenesis dan Spermatozoa

Testis terdiri atas sekitar 250 m (800 kaki) tubulus seminiferus penghasil sperma. Di tubulus seminiferus terdapat dua jenis sel, yaitu sel germinativum dan sel sertoli. Sel germinativum sebagian besar berada dalam berbagai tahap pembentukan sperma. Sel sertoli berperan penting dalam proses spermatogenesis. Spermatogenesis adalah suatu proses kompleks dimana sel germinativum primordial yang relatif belum berdiferensiasi, spermatogonia (masing-masing mengandung komplemen diploid 46 kromosom), berproliferasi dan diubah menjadi spermatozoa yang sangat khusus dan mudah bergerak, masing-masing mengandung sel haploid 23 kromosom yang terdistribusi secara acak.

Spermatogenesis pada manusia membutuhkan waktu 64 hari untuk pembentukan dari spermatogonium menjadi sperma matang. Spermatogenesis mencakup tiga tahapan utama:

a. Proliferasi mitotik

Spermatogonia yang berada di lapisan terluar tubulus terus menerus bermitosis, dengan semua sel anak mengandung komplemen lengkap 46 kromosom identik dengan sel induk. Proliferasi ini menghasilkan pasokan sel germinativum baru yang terus-menerus. Setelah pembelahan mitotik sebuah spermatogonium, salah satu sel anak tetap di

tepi luar tubulus sebagai spermatogonium tak berdiferensiasi sehingga turunan sel germinativum tetap terpelihara. Sel anak yang lain mulai bergerak ke arah lumen sembari menjalani berbagai tahap yang dibutuhkan untuk membentuk sperma, yang kemudian akan dibebaskan ke dalam lumen. Pada manusia, sel anak penghasil sperma membelah secara mitosis dua kali lagi untuk menghasilkan empat spermatosit primer identik. Setelah pembelahan mitotik terakhir, spermatosit primer masuk ke fase istirahat saat kromosom-kromosom terduplikasi dan untaian-untaian rangkap tersebut tetap menyatu sebagai persiapan untuk pembelahan meiotik pertama.

b. Meiosis

Selama meiosis, setiap spermatosit primer (dengan jumlah diploid 46 kromosom rangkap) membentuk dua spermatosit sekunder (masing-masing dengan jumlah haploid 23 kromosom rangkap) selama pembelahan meiosis pertama, akhirnya menghasilkan empat spermatid (masing-masing dengan 23 kromosom tunggal) akibat pembelahan meiotik.

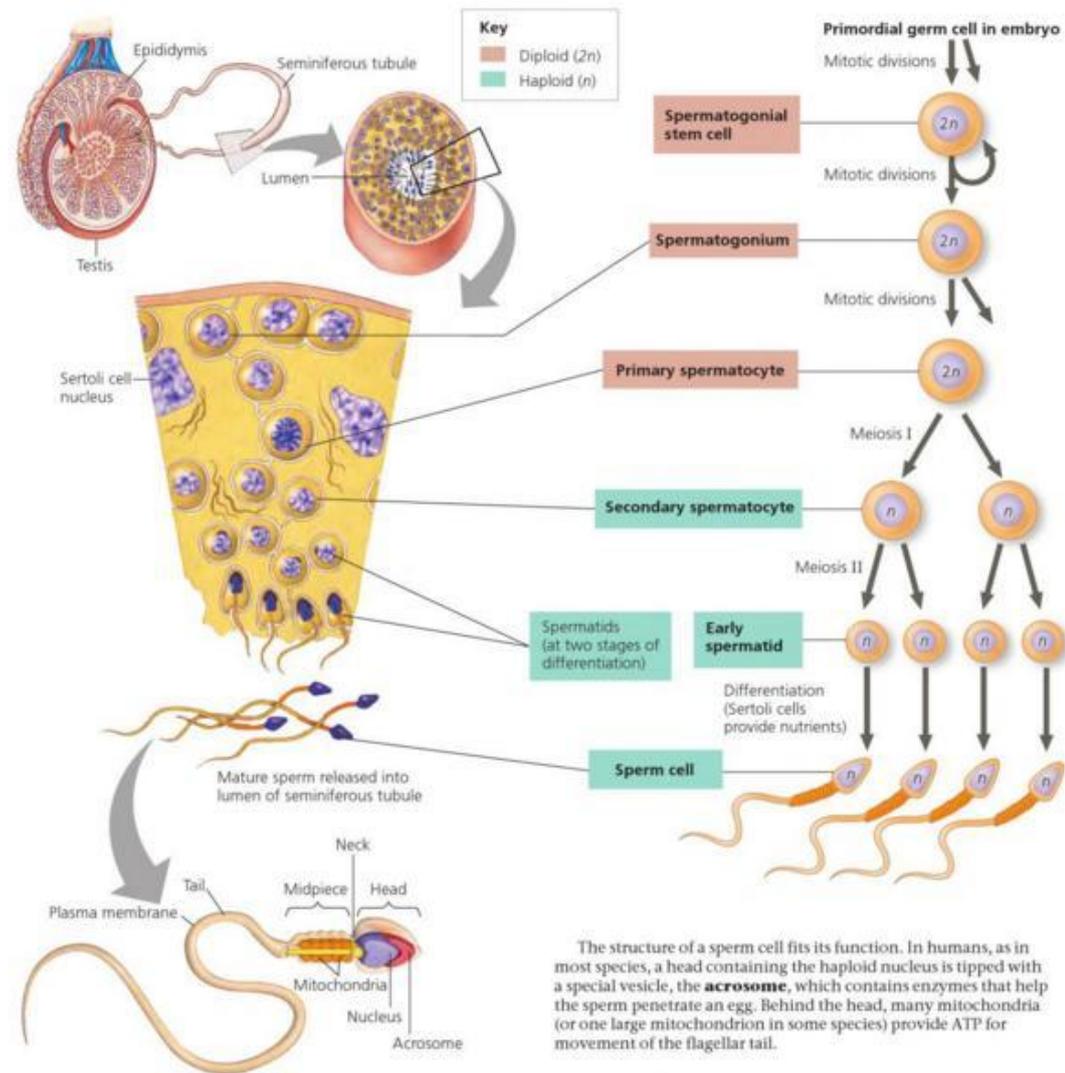
Setelah tahap spermatogenesis ini tidak terjadi lagi pembelahan lebih lanjut. Setiap spermatid mengalami *remodelling* menjadi spermatozoa. Karena setiap spermatogonium secara mitosis menghasilkan empat spermatosit primer dan setiap spermatosit primer menghasilkan empat spermatid, maka rangkaian spermatogenesis pada manusia menghasilkan 16 spermatozoa setiap kali spermatogonium memulai proses

ini. Namun, biasanya sebagian sel lenyap di berbagai tahap sehingga defisiensi produksi jarang setinggi ini.

c. Pengemasan

Spermatid setelah meiosis masih memiliki struktur mirip spermatogonia yang belum berdiferensiasi, kecuali bahwa komplemen kromosomnya kini hanya separuh. Pembentukan spermatozoa yang sangat khusus dan bergerak dari spermatid memerlukan proses *remodelling*, atau pengemasan ekstensif elemen-elemen sel, suatu proses yang dikenal sebagai spermiogenesis.

Spermatozoa memiliki empat bagian: kepala, akrosom, bagian tengah, dan ekor. Kepala terdiri atas nukleus, yang mengandung informasi genetik sperma. Akrosom, vesikel berisi enzim yang menutupi ujung kepala, digunakan sebagai “bor enzim” untuk menembus ovum. Akrosom dibentuk oleh agregasi vesikel-vesikel yang diproduksi oleh kompleks retikulum endoplasma/Golgi sebelum organel ini disingkirkan. Mobilitas spermatozoa dihasilkan oleh suatu ekor panjang mirip cambuk yang digerakkan oleh energi yang dihasilkan oleh mitokondria yang terkonsentrasi di bagian tengah sperma.^{11,12}



Gambar 1. Proses Spermatogenesis¹³ (Reece, 2014)

2.2 Jumlah Spermatozoa

Terminologi "jumlah spermatozoa" dan "konsentrasi spermatozoa" tidaklah sama. Konsentrasi sperma mengacu pada jumlah spermatozoa per unit volume air mani dan merupakan fungsi dari jumlah spermatozoa yang dipancarkan dan volume dilusi cairan mereka. Total jumlah spermatozoa mengacu pada jumlah total spermatozoa di seluruh ejakulasi dan diperoleh dengan

mengalikan konsentrasi sperma oleh volume air mani. Jumlah spermatozoa per ejakulat dihitung dari konsentrasi spermatozoa, yang diukur selama evaluasi semen. Untuk ejakulasi yang normal dan tanpa adanya obstruksi pada saluran reproduksi laki-laki, jumlah total spermatozoa perejakulat berkorelasi dengan volume testis¹⁴

Beberapa istilah yang sering digunakan dalam interpretasi jumlah spermatozoa, yaitu:

- Azoospermia: keadaan dimana tidak terdapat sel-sel spermatozoa dalam semen
- Necrospermia: tidak dijumpai adanya spermatozoa yang hidup dan bergerak aktif dalam semen
- Oligozoospermia: jumlah spermatozoa dalam semen kurang dari normal
- Normozoospermia: jumlah spermatozoa yang hidup dan bergerak aktif normal (nilai rujukan terendah dari WHO adalah 39×10^6 spermatozoa per ejakulat)¹⁴
- Asthenozoospermia: jumlah spermatozoa yang hidup dan bergerak aktif kurang dari normal (<32% spermatozoa motil progresif)³
- Teratozoospermia: jumlah spermatozoa yang bentuknya abnormal lebih tinggi dari nilai normal (<4% spermatozoa bentuk normal)³

2.3. Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Jumlah Spermatozoa

Beberapa faktor yang mempengaruhi jumlah spermatozoa antara lain:

1. Suhu

Peningkatan suhu dalam testis akibat demam berkepanjangan atau akibat panas yang berlebihan dapat menyebabkan berkurangnya jumlah sperma dan meningkatkan jumlah sperma yang abnormal dalam semen. Pembentukan sperma paling optimal adalah pada suhu 35,5°C (lebih rendah dari suhu tubuh). Testis dapat tetap berada pada suhu tersebut karena terlatak didalam skrotum yang berada diluar rongga tubuh.¹⁵

2. Varicocele

Varicocele adalah suatu kondisi dimana terjadi dilatasi pada pleksus pampiniformis sedangkan klep vena tetap sehingga aliran darah menjadi tidak lancar dan dapat terjadi refluks. Kondisi tersebut mengakibatkan darah tidak dapat kembali ke jantung dan terperangkap di sekitar testis sehingga suhu testis dapat lebih tinggi dari suhu ideal testis.¹

3. Penyakit serius dan infeksi

Penyakit serius pada testis atau penyumbatan atau tidak adanya vas deferens (pada kelainan kongenital) dapat menyebabkan kondisi azospermia atau tidak terbentuknya testis sama sekali.³

4. Zat/obat gonadotoksik

Beberapa penelitian menunjukkan adanya sejumlah zat pestisida yang toksin terhadap gonad, antara lain imidakloprid, organofosfat, organoklorin,

karbamat, fumigan, dan beberapa herbisida serta fungisida. Obat-obatan tertentu seperti marijuana, heroin, kokain juga dapat menekan fungsi reproduksi pria.^{16,17}

5. Pemaparan terhadap radiasi dan polutan

Paparan radiasi dan polutan, misalnya asap rokok dan polusi udara, dapat memberikan pengaruh buruk terhadap fungsi reproduksi pria dan wanita karena dapat menimbulkan zat radikal bebas yang dapat merusak sel. Radikal bebas merupakan suatu molekul yang tidak stabil akibat kehilangan electron, dan dapat mengakibatkan kerusakan pada DNA dan berbagai sel dalam tubuh. Kondisi tersebut dapat terjadi bila tidak diimbangi dengan asupan antioksidan yang cukup.^{18,19}

6. Bahan makanan

Jenis bahan makanan yang mengandung antioksidan, misalnya makanan dengan kandungan vitamin C, vitamin E, polifenol, flavonoid, dan jenis-jenis antioksidan lain dapat memperbaiki kualitas sperma dengan mencegah terjadinya kerusakan sel akibat radikal bebas.¹⁰

7. Minuman beralkohol

Alkohol telah dikaitkan dengan fungsi hati yang abnormal dan peningkatan kadar estrogen pada pria, yang dapat berpotensi mengganggu perkembangan sperma yang normal dan kadar hormon. Zat toksin yang ditemukan dalam alkohol dapat merusak sel-sel yang berperan dalam spermatogenesis, mempengaruhi ukuran testis, dan meningkatkan sperma bentuk abnormal, yang pada akhirnya dapat menurunkan fertilitas. Alkohol juga dikaitkan dengan kerusakan sperma sehingga dapat menurunkan jumlah spermatozoa.

8. Stress psikologik

Penelitian pada Universitas Copenhagen menunjukkan bahwa kualitas semen yang lebih buruk didapatkan pria dengan nilai stres yang dilaporkan sendiri atas tingkat stres menengah, dengan cara dosis-respons. Pria dengan tingkat stres tertinggi memiliki konsentrasi sperma lebih rendah 38% dari normal, dengan jumlah sperma total yang lebih rendah 34% dari normal²⁰

9. Hormon

Pada pria dengan defisiensi testikuler, hipogonadisme hipogonadotropik biasanya hadir, dengan kadar hormon FSH dan LH yang tinggi, serta kadang dijumpai kadar testosteron yang rendah. Umumnya, kadar FSH berkorelasi dengan jumlah spermatogonium: ketika spermatogonium absen atau nyata berkurang, nilai FSH biasanya meningkat; ketika jumlah spermatogonium adalah normal, tetapi penangkapan pematangan ada pada spermatosit atau spermatid tingkat, nilai FSH berada dalam kisaran normal. Namun, pada beberapa individu, tingkat FSH tidak akurat memprediksi status spermatogenesis karena pria dengan histologi penangkapan pematangan dapat memiliki FSH yang normal dan volume testis normal namun terdapat azoospermia.¹

2.4 Asap Rokok sebagai Radikal Bebas dan Antioksidan

2.4.1 Asap Rokok sebagai Radikal Bebas

Radikal bebas, dalam pengertian kimia, adalah atom atau molekul yang memiliki elektron tidak berpasangan. Elektron tersebut cenderung untuk membentuk pasangan dengan menarik elektron lain sehingga terbentuk radikal baru. Hal ini berakibat radikal bebas memiliki dua sifat yaitu reaktifitas tinggi dan dapat mengubah suatu molekul menjadi elektron. Dengan demikian secara teoritis radikal bebas dapat terbentuk bila terjadi pemisahan ikatan kovalen. Radikal bebas dianggap berbahaya karena menjadi sangat reaktif dalam upaya mendapatkan pasangan elektronnya, dapat pula terbentuk radikal bebas baru dari atom atau molekul yang elektronnya terambil untuk berpasangan dengan radikal bebas sebelumnya.²¹

Radikal bebas yang menimbulkan berbagai proses patologis melibatkan apa yang disebut sebagai senyawa oksigen reaktif (*Reactive Oxygen Compound*). Senyawa oksigen reaktif berasal dari oksigen yang mengalami peralihan elektron kurang sempurna pada saat proses pembentukan ATP. Dalam gerakannya yang tidak beraturan, karena sangat reaktif, radikal bebas dapat menimbulkan kerusakan di berbagai bagian sel. Awal terjadinya radikal bebas antara lain proses reduksi molekul oksigen dalam rangkaian elektron transpor dalam mitokondria atau dalam proses-proses lain yang terjadi secara acak dari berbagai proses kimiawi dalam tubuh yang melibatkan senyawa organik maupun anorganik. Radikal hidroksil merupakan senyawa yang sangat berbahaya karena

reaktifitasnya sangat tinggi dan dapat merusak tiga jenis senyawa yang penting untuk mempertahankan integritas sel antara lain: asam lemak tak jenuh yang merupakan komponen penyusun membran sel, DNA yang merupakan perangkat genetik sel, dan protein yang memegang berbagai peran penting seperti enzim, reseptor, antibodi, dan proses pertahanan tubuh.²²

Asap rokok mengandung berbagai zat toksik yang kompleks, beberapa dari zat tersebut adalah radikal bebas. Asap rokok dapat diuraikan menjadi gas dan partikulat. Beberapa unsur pokok pada asap rokok dalam bentuk gas adalah CO, CO₂, NO, NO₂, dan HCN. Beberapa unsur asap rokok dalam bentuk partikulat adalah tar, nikotin, metal, fenol/semikuinon/kuinon.

Diperkirakan terdapat lebih dari 1 miliar perokok tersebar di seluruh dunia yang lebih dari 80% dari jumlah tersebut diketahui berasal dari negara berkembang. Penelitian yang dilakukan oleh Kadiri Pullana menunjukkan bahwa 54 dari 72 orang perokok didapatkan penurunan jumlah spermatozoa dari nilai normal. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa terdapat peningkatan antibodi antisperma pada perokok, yang dapat menyebabkan penurunan jumlah hitung spermatozoa. Pada perokok juga diketahui terdapat konsentrasi non metiltetrahidrofolat yang lebih rendah yang juga dapat mengakibatkan berkurangnya jumlah hitung spermatozoa.⁴

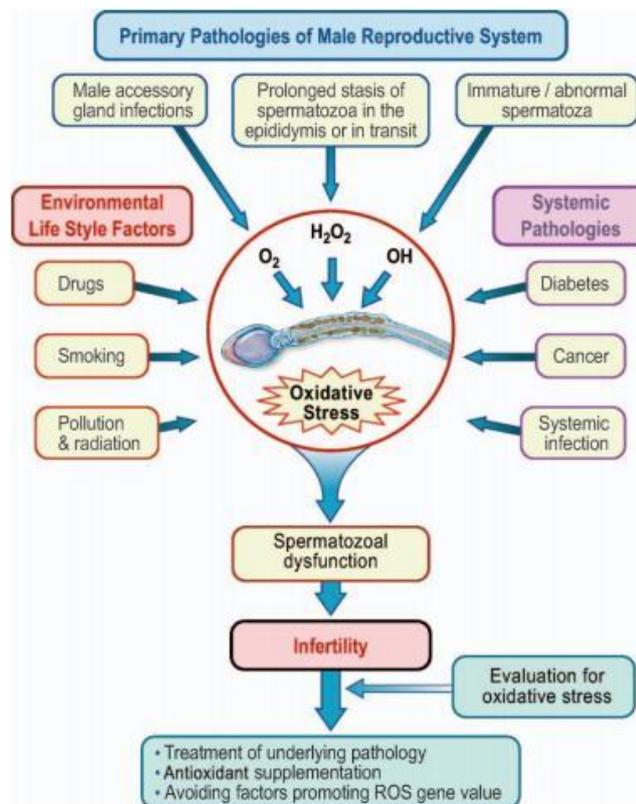
2.4.2 Antioksidan

Antioksidan sesuai mekanisme kerjanya memiliki dua fungsi, yaitu fungsi primer dan sekunder. Fungsi primer bekerja dengan memberikan atom hidrogen secara cepat ke radikal lipida, atau mengubahnya ke bentuk lebih stabil, sementara turunan antioksidan tersebut memiliki keadaan lebih stabil dibanding radikal lipida. Fungsi sekunder antioksidan bekerja dengan memperlambat laju autooksidasi dengan perubahan radikal lipida ke bentuk lebih stabil.²³

Salah satu mekanisme pertahanan antioksidan adalah dengan penambahan antioksidan primer. Jika antioksidan primer ditambahkan dengan konsentrasi rendah pada lipida maka akan menghambat atau mencegah reaksi autooksidasi lemak tak jenuh. Hal ini dapat memutuskan rantai reaksi oksidasi pada tahap inisiasi maupun propagasi. Penambahan ini akan menghasilkan radikal antioksidan. Radikal-radikal antioksidan yang terbentuk pada reaksi tersebut relatif stabil dan tidak mempunyai cukup energi untuk dapat bereaksi dengan molekul lipida lain membentuk radikal lipida baru.²⁴

Radikal bebas berkontribusi pada patogenesis infertilitas pria. Radikal bebas adalah kelompok molekul kimia yang sangat reaktif dengan satu atau lebih elektron tak berpasangan yang dapat mengoksidasi biomolekul yang mereka hadapi. Bereaksi sesegera mungkin dengan zat di sekitar mereka, radikal bebas memulai reaksi berantai yang mengarah ke kerusakan seluler. Anion superoksida, radikal hidroksil dan hidrogen peroksida merupakan spesies reaktif oksigen (*Reactive Oxygen Species/ROS*) utama yang terdapat pada plasma seminal. Sel

germinal pria di berbagai tahap diferensiasi memiliki potensi untuk menghasilkan ROS yang pada ambang rendah yang diperlukan untuk mengatur kapasitas sperma, reaksi akrosom dan fusi sperma-oosit. Untuk menjaga fungsi sel yang normal, kelebihan ROS harus selalu mengalami inaktivasi oleh antioksidan plasma seminal. Hal ini dapat menghalangi pembentukan ROS baru atau bertindak sebagai perombak dan menghilangkan ROS yang sudah dihasilkan. Sistem enzim dengan antioksidan alami termasuk katalase, glutathion peroksidase, dan superoksida dismutase. Pada pria sehat, terdapat keseimbangan fisiologis antara ROS dan antioksidan dalam saluran reproduksi.⁶



Gambar 2. Pengaruh Antioksidan dan Stress Oksidatif Terhadap Infertilitas²⁵ (Esteves, 2011)

2.5 Jumlah Spermatozoa dan Kaitannya dengan Asap Rokok

Asap rokok mengandung komponen-komponen yang beraneka ragam dan kebanyakan bersifat toksik bagi tubuh. Komponen yang dihisap dari asap rokok dapat berupa radikal bebas, nikotin, mutagen, atau karsinogen dan konstituen lainnya. Radikal bebas yang terdapat dalam asap rokok jumlahnya sangat banyak, dalam satu kali hisap diperkirakan terdapat 1014 molekul radikal bebas.⁴

Riset yang dipublikasikan dalam *Cleveland's Clinical Urology News*, menunjukkan bahwa jumlah radikal bebas abnormal yang terkadang merusak sel, mungkin menjadi penyebab infertilitas pada beberapa pria. Radikal bebas mengakibatkan terbentuknya senyawa oksigen reaktif.⁴

Dalam kondisi fisiologis, sebenarnya spermatozoa memproduksi sejumlah kecil *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang dibutuhkan untuk kapasitasi, reaksi akrosom, dan fertilisasi. Akan tetapi, normalnya terdapat keseimbangan antara aktivitas produksi ROS dan perombakan oleh antioksidan dalam traktus reproduksi pria. Jumlah ROS yang berlebih dapat melebihi mekanisme pertahanan antioksidan dalam spermatozoa dan plasma semen, sehingga menimbulkan stress oksidatif. Jumlah ROS berlebih yang diproduksi oleh leukosit dan spermatozoa imatur dapat menyebabkan kerusakan pada spermatozoa normal dengan menginduksi lipid peroksidase dan kerusakan DNA spermatozoa, sehingga mengganggu proses pembelahan dan reproduksi sel. Senyawa ini juga dapat merusak asam lemak tak jenuh yang terdapat dalam fosfolipid dan glikolipid

penyusun membran sel. Hal ini mengakibatkan peningkatan apoptosis sel, sehingga jumlah sel menurun.^{5,6}

Asap rokok mengandung berbagai zat toksik yang kompleks, beberapa dari zat tersebut adalah radikal bebas. Asap rokok dapat diuraikan menjadi gas dan partikulat. Beberapa unsur pokok pada asap rokok dalam bentuk gas adalah karbon monoksida, CO₂, NO, NO₂, dan hidrogen sianida. Beberapa unsur asap rokok dalam bentuk partikulat adalah tar, nikotin, metal, fenol/semikuinon/kuinon. Kandungan karbon monoksida dalam asap rokok dapat menyebabkan berkurangnya kemampuan darah dalam membawa oksigen yang dapat mengakibatkan kematian sel karena minimnya suplai oksigen. Nikotin adalah agen oksida yang potensial dan dapat mempengaruhi integritas plasma membrane dan DNA sperma. Nikotin dalam asap rokok dapat menstimulasi medulla adrenal untuk melepaskan katekolamin yang dapat mempengaruhi system saraf pusat, sehingga mekanisme umpan balik antara hipotalamus, hipofisis anterior, dan testis terganggu. Akibatnya, proses sintesis hormone testosterone dan spermatogenesis akan terganggu. Penelitian sebelumnya juga menunjukkan bahwa paparan asap rokok selama 45 hari dapat menyebabkan berkurangnya diameter tubulus seminiferus sehingga jumlah spermatozoa yang diproduksi berkurang.

2.6. Manfaat dan Dosis *Dark chocolate*

2.6.1 *Dark chocolate*

Theobroma cacao L. dan produk-produknya seperti *dark chocolate*, bubuk cokelat, dan *baking chocolate* dikonsumsi di seluruh dunia dan dipelajari terutama karena kandungan antioksidan dan antiradikal sifat *in vitro* dari beberapa konstituen polifenol mereka, khususnya *procyanidins* dan flavanol. Kandungan antioksidan dalam cokelat meliputi senyawa larut fenolik (asam fenolik, *catechin*, *epicatechin*, dan *proanthocyanidins*), fenolik polimer yang tidak *soluble*, dan *methylxanthines*. Dalam beberapa tahun terakhir beberapa penelitian besar fokus dalam kandungan polifenol kakao, terutama flavonoid, dan fungsinya sebagai antioksidan poten dalam kesehatan manusia. Kelas utama senyawa polifenol yang diidentifikasi adalah seperti fenol sederhana, benzokuinon, asam fenolik, *acetophenone*, asam *phenylacetic*, asam *hydroxycinnamic*, *phenylpropenes*, *coumarin*, *chromones*, naftokinon, *xanthones*, *stilbenes*, antrakuinon, flavonoid, lignan dan lignin. Beberapa efek menguntungkan dari polifenol adalah seperti anti-karsinogenik, anti-aterogenik, anti-ulkus, anti-trombotik, anti-inflamasi, modulasi kekebalan tubuh, anti-mikroba, vasodilatasi dan efek analgesik.²⁶

Di *United States*, standard untuk produk-produk berbau cokelat dan kakao telah ditetapkan oleh *Food and Drug Administration* (FDA). Pada umumnya, dikenal 3 jenis cokelat: Cokelat susu (*milk chocolate*), cokelat putih (*white chocolate*), dan *dark chocolate*. Dari ketiga jenis cokelat tersebut, *dark chocolate* memiliki kandungan cokelat yang tertinggi sehingga terasa lebih pahit

dibandingkan jenis cokelat yang lain. Kandungan bermanfaat dalam *dark chocolate* disebut flavonoid, yang juga berkontribusi memberikan pigmen gelap pada cokelat. *Dark chocolate* mengandung kakao dengan presentasi tinggi ($\pm 70\%$), dengan sedikit atau tanpa tambahan gula. Hal inilah yang menyebabkan kandungan manfaat pada *dark chocolate* lebih tinggi dari jenis cokelat lainnya.²⁷

Flavanol dan *procyanidins* pada kakao, ekstrak kakao, dan coklat yang dimurnikan memberikan efek antioksidan in vitro. Sifat antioksidan flavanol didasarkan pada struktur dan karakteristik mereka, termasuk hidroksilasi dari cincin flavan, terutama 3',4'-cincin B yang terhidroksilasi (struktur katekolik), panjang rantai oligomer, dan fitur stereo kimia molekul.²⁸

Menariknya, kakao bubuk dan ekstrak kakao telah terbukti menunjukkan kapasitas antioksidan lebih besar daripada makanan-makanan dan ekstrak makanan kaya flavanol lainnya, seperti teh hijau dan hitam, anggur merah, *blueberry*, bawang putih, dan *strawberry*.²⁶

Karakteristik struktural flavanol mewakili dasar molekuler untuk sifat pendonor hidrogen dan sifat antioksidan mereka yang mampu mengkelasi besi. Misalnya, flavanol dan *procyanidins* pada kakao dan kakao yang dimurnikan telah dilaporkan untuk melemahkan oksidasi sel endotel yang dimediasi LDL, untuk mengurangi produksi spesies oksigen reaktif yang diaktifkan oleh leukosit, untuk melindungi hemolisis eritrosit, dan untuk menghambat oksidasi DNA C yang diinduksi ultraviolet. Dalam kasus terakhir, flavonoid kakao yang teruji efektif (secara molar) sebagai antioksidan adalah askorbat, tokoferol, dan glutathione.²⁸

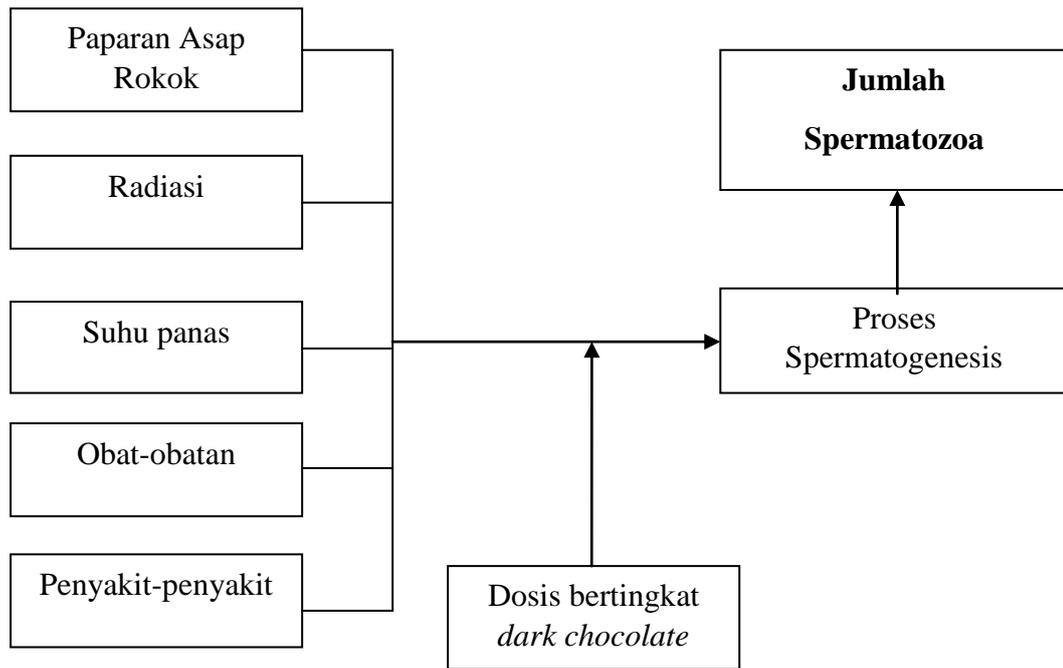
2.6.2 Dosis *Dark chocolate*

Dosis *dark chocolate* yang diberikan pada mencit *Balb/c* jantan dihitung berdasarkan penelitian terdahulu yang menjelaskan bahwa kadar asupan polifenol dalam *dark chocolate* yang dapat memberikan pengaruh pada manusia adalah 860 mg per 45 gram *dark chocolate*.²⁹

Dosis ini dikonversikan kepada jumlah yang dibutuhkan pada tiap mencit *Balb/c* jantan dengan cara mengalikan 45 gram dengan 0,0026 sehingga didapatkan dosis *dark chocolate* untuk tiap mencit adalah 0,1 gram.

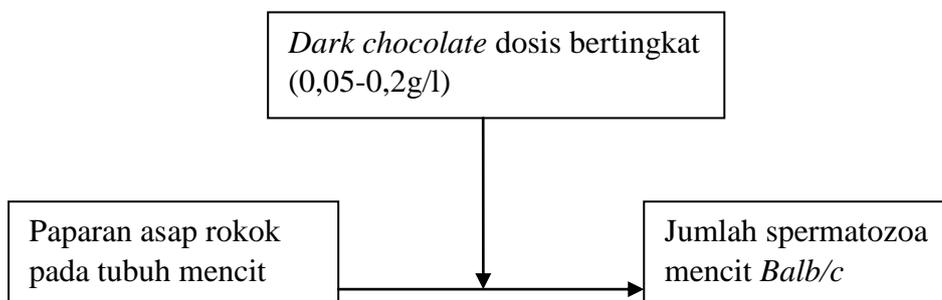
2.7 Kerangka Teori

Kerangka teoritis pada penelitian dapat digambarkan secara skematis sebagai berikut:



Gambar 3. KerangkaTeori

2.8. Kerangka Konsep



Gambar 4.Kerangka konsep

2.9 Hipotesis

Terdapat perbedaan bermakna antara jumlah spermatozoa mencit *Balb/c* yang diberi *dark chocolate* dengan dosis bertingkat dan dipapar asap rokok, dibandingkan dengan jumlah spermatozoa mencit *Balb/c* yang tidak diberi *dark chocolate*.