

DISERTASI

**PENGARUH PEMBERIAN MINUMAN SOPI MAYANG
TERHADAP JUMLAH SPERMATOZOID, EKSPRESI mRNA
ENZIM CYTOCHROME P450 CYP2E1 DAN KADAR PROTEIN
CYTOCHROME CYP2E1 PADA TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*)
JANTAN
THE EFFECT OF ALCOHOLIC BEVERAGE "SOPI MAYANG" ON
SPERMATOZOID COUNT, EXPRESSION OF CYTOCHROME P450
mRNA, AND CYTOCHROME CYP2E1 PROTEIN LEVELS IN MALE
WHITE RATS (*Rattus norvegicus*)**



**Marliyati Sanaky
C013181034**

**PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KEDOKTERAN
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2023**

DISERTASI

**PENGARUH PEMBERIAN MINUMAN SOPI MAYANG BERALKOHOL
TERHADAP JUMLAH SPERMATOZOID, EKSPRESI MRNA ENZIM
CYTOCHROME P450 CYP2E1 DAN KADAR PROTEIN CYTOCHROME
CYP2E1 PADA TIKUS PUTIH (*RATTUS NORVEGICUS*) JANTAN**

***THE EFFECT OF ALCOHOLIC BEVERAGE "SOPI MAYANG" ON
SPERMATOZOID COUNT, EXPRESSION OF CYTOCHROME P450
mRNA, AND CYTOCHROME CYP2E1 PROTEIN LEVELS
IN MALE WHITE RATS (*Rattus norvegicus*)***

Disusun dan diajukan
Oleh

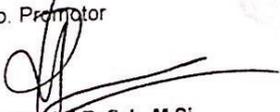
Marliyati Sanaky
C013181034

*Telah dipertahankan di hadapan Penilai Ujian yang dibentuk dalam rangka
Penyelesaian Studi Program Studi Doktor Ilmu Kedokteran
Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin
pada tanggal, 25 Agustus 2023
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan*

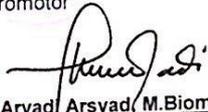
Menyetujui
Promotor,


Dr. dr. Irfan Idris, M.Kes
Nip.19671103 199802 1 001

Co. Promotor


Dr. dr. Siti Rafiah, M.Si
Nip.19680530 199703 2 001

Co. Promotor


dr. M. Aryad Arsyad, M.Biomed.Sc, Ph.D
Nip.197608 200212 1 003

Ketua Program Studi S3
Ilmu Kedokteran,


Dr. dr. Irfan Idris, M.Kes
Nip.19671103 199802 1 001

Dekan Fakultas Kedokteran
Universitas Hasanuddin,


Prof. Dr. dr. Haerani Rasyid, M.Kes, Sp.PD-KGH, FINASIM Sp.GK
Nip.19680530 199603 2 001



KEMENTERIAN PENDIDIKAN, KEBUDAYAAN, RISET, DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
UPT LAYANAN BAHASA
JL. PERINTIS KEMERDEKAAN KM. 10 KAMPUS TAMALANREA
MAKASSAR 90245 INDONESIA
Email : unhaspusatbahasa@gmail.com HP 081344431789

SURAT KETERANGAN ABSTRAK

Yang bertanda tangan di bawah ini menerangkan bahwa :

Nama : MARLIYATI SANAKY
No. Pokok : C013181034
Program Studi : S3 kedokteran
Judul Tesis/Disertasi : PENGARUH PEMBERIAN MNUMAN SOPI MAYANG BERALKOHIL TERHADAP JUMLAH SPERMATOZOID, EKSPRESI GEN ENZIM CYTOCHROME P450 CYP2E1 DAN KADAR PROTEIN CYTOCHROME CYP2E1 PADA TIKUS PUTIH(RATTUS NORVEGICUS) JANTAN

Menyatakan bahwa naskah abstrak yang disusun oleh mahasiswa tersebut di atas telah diedit dan diterjemahkan di UPT Layanan Bahasa Unhas.

Makassar, 8 Agustus 2023

Mengetahui,
Kepala Layanan Bahasa,




Dra. Herawaty, M.Hum., M.A., Ph.D. †
NIP. 19630103 198803 2 003



ABSTRAK

MARLIYATI SANAKY. *Pengaruh Pemberian Minuman Sopi Mayang Beralkohol terhadap Jumlah Spermatozoid, Ekspresi Gen Enzim Cytochrome P450 CYP2E1, dan Kadar Protein Cytochrome CYP2E1 pada Tikus Putih Jantan (Rattus norvegicus)* (dibimbing oleh Irfan Idris, Sitti Rafiah, dan M. Aryadi Arsyad).

Penelitian ini bertujuan menganalisis perbedaan pemberian *Sopi Mayang* beralkohol dengan dosis per oral 2,7 ml/ 200g BB/ hari, 4,05 ml/ 200g BB/ hari, 5,4 ml/ 200g BB/ hari, dan kontrol dengan *aquadest* per oral 2 ml/ 200g BB/ hari terhadap jumlah sperma, jumlah perubahan kadar protein CYP2E1, jumlah perubahan ekspresi gen sitokrom P450-CYP2E1 selama 60 hari pada tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*). Salah satu budaya yang melekat dalam kehidupan sehari-hari masyarakat Provinsi Maluku adalah mengonsumsi minuman beralkohol yang disebut dengan *Sopi*. Minuman *Sopi* yang paling banyak dikonsumsi oleh masyarakat adalah *Sopi Mayang* dengan kadar alkohol 2-5%. Minuman beralkohol dapat memberikan gangguan motilitas sperma, kematangan inti sel, dan integritas DNA spermatozoa tikus, hingga infertilitas. Pemberian alkohol dalam waktu yang lama pada tikus jantan menyebabkan kegagalan testicular disertai overekspresi mRNA CYP2E1 dan protein pada testis. Penelitian ini merupakan penelitian *eksperimental laboratoris* dengan menggunakan rancangan *The Randomized Post-test Only Control Group Design*. Jumlah sampel yang digunakan pada penelitian ini sebanyak 40 ekor tikus putih jantan *Strain Wistar (Rattus norvegicus)* dengan teknik pengambilan sampel menggunakan rumus *Steel* dan *Torrie*. Pemeriksaan kadar protein dengan metode *Real Time PCR*. Analisis data menggunakan uji normalitas dengan *Shapiro Wilk* ($\alpha = 0,05$) dan homogenitas dengan *Levene test*. Uji beda antar kelompok dengan *Kruskal Wallis* ($\alpha = 0,05$) dilanjutkan dengan uji *One Way Anova* ($\alpha = 0,05$). Hasil analisis data penelitian menemukan bahwa terdapat penurunan jumlah sperma pada pemberian *Sopi Mayang* beralkohol dengan dosis per oral 2,7 ml/ 200g BB/ hr, 4,05 ml/ 200g/ hr, 5,4 ml/ 200g BB/ hr selama 60 hari dan terdapat peningkatan jumlah ekspresi gen sitokrom P450 CYP2E1 pada pemberian *Sopi Mayang* dengan dosis *Sopi* per oral 2,7 ml/ 200g BB/ hr, 4,05 ml/ 200g BB/ hr, 5,4 ml/ 200g BB/ hr selama 60 hari serta terdapat peningkatan jumlah kasar protein CYP2E1 pada pemberian *Sopi Mayang* dengan dosis *Sopi Mayang* per oral 2,7 ml/ 200g BB/ hr, 4,05 ml/ 200g BB/ hr, 5,4 ml/ 200g BB/ hr selama 60 hari.

Kata kunci: gen enzim sitokrom P450-CYP2E1, *sopi mayang*, spermatozoid



ABSTRACT

MARLIYATI SANAKY. *The Effect of Alcoholic Beverage "Sopi Mayang" on Spermatozoid Count, Expression of Cytochrome P450 CYP2E1 Gene, and Cytochrome CYP2E1 Protein Level in White Male Rats (Rattus norvegicus)* (supervised by Irfan Idris, Sitti Rafiah and M. Aryadi Arsyad).

The research aims to disclose the differences in the administration of alcoholic beverage "Sopi Mayang" in oral doses of 2.7 ml/200g body weight/day, 4.05 ml/200g body weight/day, 5.4 ml/200g body weight/day, and control with oral aquadest in 2 ml/200g body weight/day, on sperm count, change in CYP2E1 protein levels, and change in the expression of cytochrome P450-CYP2E1 gene over a period of 60 days in the white male rats (*Rattus norvegicus*). One of the inherent cultural practices in the daily life of Maluku Province community is the consumption of an alcoholic beverage called "Sopi." The most commonly consumed Sopi beverage among the people is "Sopi Mayang" with the alcohol content of 2-5%. The alcoholic beverage can disrupt sperm motility, nuclear maturation of cells, and spermatozoa DNA integrity in the rats, leading to infertility. The long-term alcohol administration in the male rats result in the testicular failure accompanied by an overexpression of CYP2E1 mRNA and protein in the testes. This study was the experimental laboratory research using the randomized post-test only control group design. The samples used in the research were as many as 40 white male Wistar rats (*Rattus norvegicus*) with the large sampling technique using the Steel and Torrie formula. The protein levels were examined using the Real-Time PCR method. The data analysis used normality test with Shapiro-Wilk ($\alpha = 0.05$) and homogeneity test with Levene's test. The difference between groups was tested using Kruskal-Wallis ($\alpha = 0.05$) and followed by One-Way ANOVA ($\alpha = 0.05$). The results of the data analysis indicate the decrease in the sperm count in the administration of the alcoholic beverage "Sopi Mayang" in the oral doses of 2.7 ml/200g body weight/hr, 4.05 ml/200g/hr, 5.4 ml/200g body weight/hr for 60 days. There is the increase in the expression of cytochrome P450 CYP2E1 gene in the administration of "Sopi Mayang" in the oral doses of 2.7 ml/200g body weight/hr, 4.05 ml/200g body weight/hr, 5.4 ml/200g body weight/hr for 60 days. There is also the increase in the gross amount of CYP2E1 protein in the administration of "Sopi Mayang" in oral doses of 2.7 ml/200g body weight/hr, 4.05 ml/200g body weight/hr, 5.4 ml/200g body weight/hr for 60 days.

Key words: Cytochrome P450-CYP2E1 enzyme gene, "Sopi Mayang", spermatozoid.





KEMENTERIAN PENDIDIKAN, KEBUDAYAAN, RISET DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
FAKULTAS KEDOKTERAN
PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KEDOKTERAN

Jl. Perintis Kemerdekaan Km. 10 Makassar 90245 Telp. (0411) 580010 (0411) 586297
EMAIL: info@fd.kedokteranhasanudin.com

SURAT PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama	MARLIYATI SANAKY
NIM	C013181034
Program Studi	Doktor Ilmu Kedokteran
Jenjang	S3

Menyatakan dengan ini bahwa karya tulisan saya berjudul

Pengaruh Pemberian Sopi Mayang terhadap jumlah spermatozoid, ekspresi mRNA enzim cytochrome P450 CYP2E1 dan Kadar Protein Cytochrome CYP2E1 pada tikus putih (*Rattus Norvegicus*) Jantan

Adalah karya tulisan saya sendiri dan bukan merupakan pengambilan alihan tulisan orang lain, bahwa Disertasi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri.

Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan Disertasi ini hasil karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, 25 Agustus 2023

Yang menyatakan,



MARLIYATI SANAKY

PRAKATA

Bismilahirrahmanirrahim

Assalamualiakum Warahmatullahi Wabarakatuh

Alhamdulillahirobbil'alamin segala puji bagi Allah Subhanahu Wa Ta'ala Tuhan semesta alam yang senantiasa melimpahkan keberkahan, hidayah, nikmat dan rahmat-Nya, serta salam dan sholawat kepada junjungan kita nabiullah Muhammad Shallahu 'Alaihi Wa Sallam, keluarga beserta para sahabatnya sehingga penulis dapat menyelesaikan disertasi ini dengan baik sebagai salah satu persyaratan untuk mencapai gelar Pendidikan Doktor di Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin.

Pertama-tama penulis ucapkan terima kasih yang tulus dari lubuk hati yang paling dalam kepada orang tua saya, Ibunda Fatma Picalouhatta dan Alm. Ayahanda Ahyat Sanaky yang telah membesarkan dan mendidik saya dengan penuh rasa kasih sayang, serta mensupport dengan semaksimal mungkin untuk pendidikan saya di tengah keterbatasan yang dimiliki sehingga membentuk pribadi seperti saat ini. Kepada mertua yang menjadi orang tua saya di Kota Ambon Ibunda Siti Mauseya, yang selalu memberikan dukungan secara moril, memotivasi, menyemangati dalam menjalani kehidupan ini dan menyelesaikan studi ini. Studi ini bisa terselesaikan berkat dukungan Suami Zainal Riyadi Mauseya tercinta dan anak-anak tersayang Zhafira Anindya Mauseya, Falatehan Mauseya, yang sangat mendukung semua proses studi hingga selesai.

Penulis sadar, dalam penyusunan dan penyelesaian disertasi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu penulis ingin menyampaikan terima kasih

dan penghargaan setinggi tingginya kepada : Dr. dr. Irfan Idris, M.Kes selaku Promotor yang senantiasa meluangkan waktunya untuk memberikan bimbingan serta ilmunya dengan ikhlas sehingga disertasi ini dapat terselesaikan dengan baik, dan tak lupa membacakan suroh Al-Fatiha buat Alm.Prof.dr.Andi Wardihan Sindrang, Sp.And (K) selaku Promotor terdahulu, beliau sangat memberikan perhatiannya untuk diskusi dan sangat memberikan dukungan serta motivasi untuk segera menyelesaikan studi. Dr. dr. Sitti Rafiah, S.Ked, M.Si, selaku Co-Promotor yang senantiasa meluangkan waktunya untuk mengarahkan penelitian ini sehingga dapat terselesaikan. Dr.dr.Aryadi Arsyad, M.Biomed.Sc,Ph.D selaku Co-Promotor yang tentunya senantiasa banyak memberikan arahan dan masukan dalam penyelesaian disertasi ini.

Dr. dr. Maftuchah Rochmanti, M.Kes (penguji eksternal FK UNAIR), Prof. Dr. dr. Nusratuddin Abdullah, Sp.OG(K), MARS, Prof. dr. Muh. Nasrum Massi, Ph.D, Sp.MK, dr. Agussalim Bukhari, M.Med, Ph.D, Sp.GK(K), penulis mengucapkan terima kasih atas kesediaan waktu untuk menjadi tim penguji dan memberikan ide saran sehingga disertasi ini dapat rampung dengan baik.

Terkahir kepada Ibu Dekan Dr.dr.Bertha Jean Que, Sp.S., M.Kes serta teman teman sejawat di Fakultas Kedokteran Universitas Pattimura yang telah memberikan dukungan dan motivasi dalam menyelesaikan pendidikan doktor. Semoga Allah Subhanahu Watala melimpahkan rahmat dan karunia-Nya.

Makassar, Agustus 2023

Marliyati Sanaky

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	
LEMBAR PENGESAHAN	i
KATA PENGANTAR	ii
DAFTAR ISI	iii
DAFTAR TABEL	iv
DAFTAR GAMBAR	v
DAFTAR LAMPIRAN	vi
DAFTAR SINGKATAN	vii
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang Masalah.....	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	5
1.3.1 Tujuan Umum Penelitian	5
1.3.2 Tujuan Khusus Penelitian	5
1.4 Manfaat Penelitian	6
1.4.1 Manfaat Subyek Penelitian	6
1.4.2 Manfaat Untuk Masyarakat	6
1.4.3 Manfaat Pengembangan Ilmu	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Minuman Sopi Mayang.....	7
2.2 Alkohol.....	9
2.2.1 Komposisi dan Konsentrasi Minuman Sopi	9
2.2.2 Metabolisme Alkohol	15
2.2.3 Hubungan Alkohol dengan radikal bebas	18
2.3 Sitokrom P450-CYP2E1.....	20
2.4 Hubungan Alkohol dengan Spermatogenesis	23
2.5 Spermatogenesis.....	28
2.5.1 Proses Spermatogenesis	28
2.5.2 Tubulus Seminiferus	34

2.6 Hubungan Alkohol dengan DNA dan Protein	36
---	----

BAB III KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS

PENELITIAN DAN DEFINISI OPERASIONAL

3.1 Kerangka Teori.....	48
3.2 Kerang Konsep.....	49
3.3 Hipotesis Penelitian.....	50
3.4 Definisi Operasional.....	50
3.4.1 Definisi Operasional Variabel Penelitian.....	50

BAB IV METODE PENELITIAN

4.1 Jenis Penelitian Rancangan Penelitian	52
4.2 Populasi, Sampel, Besar Sampel.....	53
4.2.1 Populasi	53
4.2.2 Sampel	53
4.2.3 Besar Sampel	53
4.3 Variabel	54
4.3.1 Variabel penelitian	54
4.4 Bahan Penelitian.....	54
4.4.1 Bahan Perlakuan	54
4.4.2 Bahan Pemeriksaan Kadar Protein CYP2E1	55
4.4.3 Bahan Pemeriksaan Ekspresi mRNA CYP2E1	55
4.4.4 Bahan Pemeriksaan	56
4.5 Instrumen Penelitian.....	56
4.5.1 Alat Untuk Pemeliharaan Tikus Putih Jantan	56
4.5.2 Alat Untuk Pembiusan dan Pengambilan Jaringan Testis	56
4.5.3 Alat Pembuatan dan Pengamatan Sediaan Sperma	56
4.6 Lokasi dan Waktu Penelitian	57
4.6.1 Lokasi Penelitian	57
4.6.2 Waktu Penelitian	57
4.7 Prosedur Pengumpulan Data	58
4.7.1 Dosis pemberian Sopi Mayang	58

4.7.2 Persiapan Hewan Coba	59
4.7.3 Perlakuan Hewan Coba	59
4.7.4 Pembiusan	60
4.7.5 Pengambilan Jaringan Testis	61
4.7.6 Pembuatan Sperma	61
4.8 Pemeriksaan Kadar Protein CYP2E1 dan Ekspresi mRNA CYP2E1 Dengan Metode Real Time PCR	62
4.9 Pengolahan dan Analisis Data	67
4.10 Etik Penelitian	68
4.11 Alur Penelitian	69

BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Hasil Penelitian	70
5.1.1 Pengaruh Minuman Sopi Mayang Pada Jumlah Spermatozoa.....	71
5.1.2 Pengaruh Minuman Sopi Mayang Terhadap Ekspresi mRNA CYP2E1.....	72
5.1.3 Pengaruh Minuman Sopi Mayang Terhadap Jumlah Kadar Protein CYP2E1.....	73
5.2. Pembahasan.....	74
5.2.1 Pengaruh Minuman Sopi Mayang Terhadap Jumlah Spermatozoa	74
5.2.2 Pengaruh Minuman Sopi Mayang Terhadap Ekspresi mRNA CYP2E1	77
5.2.3 Pengaruh Minuman Sopi Mayang Terhadap Kadar Protein CYP2E1	79
5.3 Keterbatasan Penelitian	84

BAB VI PENUTUP

6.1 Kesimpulan	85
6.2 Saran.....	85

DAFTAR PUSTAKA	86
-----------------------------	-----------

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	Komposisi Kandungan Nira	9
Tabel 2.2	Konsentrasi Alkohol Pada Minuman Sopi	11
Tabel 2.3	Standar Mutu Minuman Beralkohol.....	12
Tabel 2.4	Siklus Epithel Seminiferous dan Spermatogenesis Pada Beberapa Mamalia	34
Tabel 2.5	Judul Penelitian Menggunakan Alkohol dan Spermatozoid	45
Tabel 3.1	Definisi Oprasional	50
Tabel 4.1	Waktu Penelitian	57
Tabel 5.1.	Karakteristik Hewan Coba.....	70

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Pohon Enau	7
Gambar 2.2	Mekanisme Alkohol di Hepar	17
Gambar 2.3	Sumber Spesies Oksigen Reaktif	19
Gambar 2.4	Mekanisme Sitokrom P450 CYP2E1 Sampai ke Sistem Reproduksi Pria	22
Gambar 2.5	Kontrol Hormonal Spermatogenesis	25
Gambar 2.6	Tahapan Pembelahan Spermatogenesis	31
Gambar 2.7	Tubulus Seminiferus	35
Gambar 2.8	Spermatogenesis Pada Tubulus Seminiferus	36
Gambar 2.9	Skema Diagram Perubahan Seluler, Genetik, dan Kromatin	37
Gambar 2.10	Pengaruh <i>Oxidative Stress</i> Terhadap Alkohol	38
Gambar 2.11	<i>Oxidate Stress</i> Pada Reproduksi Pria	39
Gambar 2.12	Mekanisme Alkohol dan Mitokondria	42
Gambar 2.13	Peran Genetik DNA mitokondria Pada Motilitas Spermatozoid	43
Gambar 2.14	Peran Alkohol Pada Kalinan Ekpresi Protein Terhadap Infertilitas Pria	44
Gambar 3.1	Kerangka Teori	48
Gambar 3.2	Kerangka Konsep	49
Gambar 4.1	Rancangan Penelitian	52
Gambar 5.1	Pengaruh minuman Sopi Mayang terhadap jumlah Spermatozoid...	71
Gambar 5.2	Pengaruh minuman Sopi Mayang terhadap ekspresi mRNA CYP2E1	71
Gambar 5.3	Pengaruh minuman Sopi Mayang terhadap Kadar Protein CYP2E....	72

DAFTAR LAMPIRAN

Dokumentasi Penelitian.....	91
Perbandingan Luas Permukaan Tubuh Hewan Percobaan Untuk Konversi Dosis	102
Deskripsi Spermatozoid	103

DAFTAR SINGKATAN

ADH	= Alkohol <i>dehydrogenase</i>
ALDH	= Aldehida <i>dehydrogenase</i>
BAL	= <i>Blood alcohol level</i>
BNT	= Beda Nilai Terkecil
CO ₂	= Karbondioksida
CH ₃ CH ₂	= Etanol
DNA	= <i>Dexoyribonucleic acid</i>
FSH	= <i>Follicel stimulating hormone</i>
GI	= <i>Gastrointestinal</i>
GnRH	= <i>Gonadotropin realizing</i>
HPG	= Hipotalamus Hipofisis Gonad
H ₂ O ₂	= <i>Hidrogen peroksida</i>
LH	= <i>Lutening hormone</i>
LHRH	= <i>LH-releasing hormone</i>
LSD	= <i>Least Significant Difference</i>
mGSH	= Glutation mitokondria
NAD	= <i>Nikotinamid adenine dinokletida</i>
ROS	= <i>Reaktive oxigen species</i>
SD	= <i>Standard of Deviation</i>
SSP	= Sistem saraf pusat
SNI	= Standar National Indonesia
SOME	= Sistem oksidase etanol mikrosom
TNF	= <i>Tumor necrosis factor</i>

TBARS	= <i>Thiobarbituric acid- reactive substances</i>
KEPK.	= Etik Penelitian Kesehatan
PCR	= Polimerase Chain Reaction
ABI PRISM	= Applied Biosystem, Fosfor City, California.
RFPL	= Restriction Fragment Length Polymorphirms
EDTA	= Etylen Diamine Tetra Acetat
GuSCN	= Guanidium thyocianate
PIP	= Protein Induksi Prolaktin Protein antimikroba kationik manusia
SP	= Spinal Plasma
RNA	= <i>Ribonuclead acid</i>
ABP	= Androgen Binding Protein Testosteron
OS	= Oksidatif Stress
HPT	= Hipotalamus Hipofisisi Tiroid
LH	= <i>Luteining Hormone</i>
HPA	= <i>Hypothalamic Pituitary Adrenocortical</i>
HPG	= Hipotalamus Hipofisisigonad
NAD	= Nicotinamide adenine Dinucleitide
Ro/Rs	= Resistor Resistansi
BAC	= Blood Alcohol Consetration
CYP2E1	= CYTOCHOROME Subfamili E Polipeptida 1
mDNA	= Mitokondria DNA
MI	= Mili
ETC	= Electron Transport Chain
ATP	= Adenosin Triposfat

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia adalah salah satu negara dengan sangat banyak suku dan budaya yang tersebar luas. Dari setiap suku dan budaya tersebut terdapat adat istiadat yang berbeda-beda baik dari segi tradisi berpakaian, tempat tinggal, hingga makanan dan minuman sehari yang masih terus dilestarikan hingga saat ini. Salah satu budaya yang masih dipertahankan adalah tradisi mengonsumsi minuman beralkohol di provinsi Maluku (Viona Milana & Deasy Lourens, 2016).

Mengonsumsi minuman beralkohol di provinsi Maluku sudah melekat dalam kehidupan sehari masyarakat. Salah satu minuman beralkohol di provinsi Maluku yaitu Sopi. Kata 'Sopi' berasal dari bahasa Belanda *zoopje*, yang berarti alkohol cair. (Glantinodkk,2020). Minuman Sopi sendiri berasal dari hasil olahan pohon enau atau aren yang dibuat secara tradisional dan dikemas secara sederhana, dan sering dipakai untuk kebutuhan upacara keagamaan dan adat-istiadat masyarakat (Dewi,2019).

Provinsi Maluku termasuk dalam salah satu dari delapan provinsi dengan prevalensi peminum alkohol tertinggi di Indonesia (Viona Milana & Deasy Lourens, 2016). Namun belum ada data gangguan infertilitas pada laki laki meminum alkohol di Maluku yang menunjukkan bahwa laki laki yang meminum alkohol secara kronis menimbulkan infertilitas seperti penurunan jumlah spermatozoa, menurunnya testosteron dan kerusakan sel Leidig.

Hampir 15% pasangan Infertil di seluruh dunia disebabkan oleh laki laki. Beberapa faktor berkontribusi terhadap infertilitas pria, seperti infeksi saluran reproduksi, kelainan genetik dan anatomi, serta kelainan imunologi dan endokrin.

Gaya hidup dan faktor lingkungan seperti pola makan, olah raga dan konsumsi alkohol sama pentingnya dengan keadaan kesehatan seseorang (Houda Amor dkk, 2023).

Minuman Sopi Mayang di daerah Maluku masih dipertimbangkan dalam pelegalan untuk diperjualbelikan secara bebas sebagai minuman tradisional, (Kompas.com., 2020), seperti dikutip dari Gubernur dan Wakil Gubernur Maluku yang menyebutkan bahwa Sopi Mayang sampai saat ini belum menjadi minuman legal di Maluku (Gatra Media Group., 2020). Walaupun demikian, masyarakat Maluku sering mengonsumsi Sopi Mayang pada saat acara kumpul-kumpul seperti kumpul keluarga, kumpul dengan teman teman maupun pada acara pesta seperti pernikahan, pesta ulang tahun, acara pergantian tahun, dan lain sebagainya, ini dilakukan oleh sebagian masyarakat untuk menambah semangat dan kegembiraan (Suhardi, 2011; Viona Milana & Deasy Lourens, 2016).

Salah satu jenis olahan Sopi yang banyak dikonsumsi masyarakat adalah Sopi Mayang dengan kadar alkohol 4-5% (Mirtha dkk., 2017). Minuman Sopi dibuat dengan cara fermentasi sukrosa yang terdapat pada pohon enau (Kristina dkk., 2019). Fermentasi menjadi Sopi dibutuhkan waktu selama sehari yang dibantu oleh ragi *Saccharomyces* dan bakteri *Lactobacillus*. *Saccharomyces* dapat menghasilkan etanol dan *Lactobacillus* menghasilkan asam selama fermentasi berlangsung (Rika Musa., 2014).

Sopi Mayang diduga mengandung alkohol yang dapat menghasilkan efek samping negatif, mulai dari masalah mental, sosial, kriminalitas, dan kesehatan masyarakat. Alkohol mempengaruhi beberapa sistem organ, seperti sistem hepatobilier, sistem saraf pusat, sistem kardiovaskular, sistem imun, sistem

hematologi, sistem endokrin, sistem gastrointestinal, sistem urinaria, sistem keseimbangan elektrolit, dan sistem reproduksi (Adyana Putra, 2012).

Komposisi minuman Sopi Mayang yaitu sukrosa, mineral, protein dan vitamin C. Salah satu komposisi Sopi Mayang yaitu sukrosa yang diduga di fermentasikan menjadi alkohol pada jalur metabolisme sitosol melalui proses oksidasi dengan ADH (*alcohol dehydrogenase*) dihepar. Metabolisme alkohol oleh ADH menghasilkan senyawa asetaldehida. Senyawa ini merupakan produk yang sangat reaktif dan sangat toksik terhadap tubuh sehingga menyebabkan kerusakan beberapa jaringan atau sel yang dapat menurunkan hormon testosteron dan meningkatkan stress oksidatif akibat adanya peningkatan R.O.S (*Spesies Oksigen Reaktif*) (Bertram G & Katzung., 2010).

Hasil penelitian terhadap hewan coba terkait penggunaan alkohol dan efeknya terhadap sistem reproduksi, didapatkan bahwa minuman beralkohol dapat memberikan gangguan motilitas spermatozoid, kematangan inti sel, dan integritas DNA spermatozoid pada tikus. Penyalahgunaan alkohol juga dapat menyebabkan terjadinya infertilitas (Marzieh Rahimpour dkk., 2013), serta meningkatkan kromatin spermatozoid dan kerusakan DNA pada hewan percobaan. Dalam penelitian Ganna M. Shayakmetova dkk (2013), pemberian alkohol dalam waktu lama pada tikus jantan menyebabkan kegagalan testikular disertai over ekspresi mRNA CYP2E1 (Cytochrome Subfamili E Polipeptida 1) dan protein pada testis.

Pengaruh alkohol pada sistem reproduksi pria menurut penelitian Gomathi dkk bahwa mengkonsumsi alkohol secara kronis dapat menyebabkan penurunan jumlah spermatozoid, motilitas dan morfologi spermatozoid. Infertilitas pada pria dapat disebabkan oleh rendahnya motilitas spermatozoid, jumlah spermatozoid,

kelainan morfologi spermatozoid. Produksi radikal bebas terjadi secara terus menerus pada semua sel sebagai bagian dari fungsi sel yang normal. Jika terjadi radikal bebas yang berlebihan akan menyebabkan terjadinya stress oksidatif, stress oksidatif berperan penting dalam patologi berbagai penyakit (Wael, 2013).

Peran CYP2E1 pada sistem reproduksi pria yang dihubungkan dengan ekspresi mRNA CYP2E1 dapat menyebabkan terjadinya peningkatan oksidasi, serta pembentukan stress oksidatif (Shayakmetova dkk., 2014).

Peningkatan protein CYP2E1 diakibatkan oleh adanya etanol. Protein CYP2E1 terdeteksi pada spermatozoid di dalam testis, namun tidak terdeteksi pada spermatid. CYP2E1 di dalam spermatozoid yang diisolasi dari testis dan epididimis (Katen dkk, 2017).

Berdasarkan latar belakang, dimana minuman Sopi Mayang yang sering di gunakan rakyat Maluku berpotensi menyebabkan terjadinya gangguan reproduksi pria, maka peneliti tertarik untuk melakukan penelitian dengan judul pengaruh pemberian minuman Sopi Mayang terhadap jumlah spermatozoid, ekspresi mRNA enzim cytochrome P450 CYP2E1 dan kadar protein cytomhrome pada tikus putih jantan.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah penelitian ini adalah

1. Bagaimana efek Sopi Mayang yang diberikan selama 60 hari dengan dosis per oral 2,7 ml/200gBB/hari; 4,05 ml/200gBB/hari; 5,4ml/200gBB/hari, terhadap jumlah perubahan ekspresi mRNA enzim sitokrom P450 CYP2E1 pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan

2. Bagaimana efek Sopi Mayang yang diberikan selama 60 hari dengan dosis per oral 2,7 ml/200gBB/hari; 4,05 ml/200gBB/hari; 5,4 ml/200gBB/hari, terhadap jumlah kadar protein CYP2E1, pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan?
3. Bagaimana efek Sopi Mayang yang diberikan selama 60 hari dengan dosis yang berbeda per oral 2,7 ml/200g BB/hari; 4,05 ml/200g BB/hari; 5,4 ml/200gBB/hari, terhadap jumlah spermatozoid pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum Penelitian

Mengetahui pengaruh pemberian Sopi Mayang terhadap jumlah ekspresi mRNA sitokrom P450 CYP2E1, jumlah perubahan kadar protein CYP2E1, dan jumlah spermatozoid selama 60 hari pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan.

1.3.2 Tujuan Khusus Penelitian

- 1) Mengetahui perbandingan jumlah perubahan ekspresi mRNA sitokrom P450 CYP2E1 antara tikus kontrol dengan tikus yang diberikan Sopi Mayang beralkohol per oral dengan dosis 2,7 ml/200gBB/hari; 4,05 ml/200gBB/hari; 5,4 ml/200gBB/hari, selama 60 hari.
- 2) Mengetahui perbandingan jumlah kadar protein sitokrom P450 CYP2E1 antara tikus kontrol dengan tikus yang diberikan Sopi Mayang beralkohol per oral dengan dosis 2,7 ml/200gBB/hari; 4,05 ml/200gBB/hari; 5,4 ml/200gBB/hari, selama 60 hari.

- 3) Mengetahui perbandingan jumlah spermatozoid antara tikus kontrol dengan tikus yang diberikan Sopi Mayang per oral dengan dosis 2,7 ml/200gBB/hari; 4,05 ml/200gBB/hari; 5,4 ml/200gBB/hari, selama 60 hari.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Subyek Penelitian

Untuk mengetahui pengaruh Sopi Mayang terhadap, perubahan jumlah ekspresi mRNA enzim sitokrom P450 CYP2E1, perubahan jumlah kadar protein sitokrom P450 CYP2E1, dan perubahan jumlah spermatozoid.

1.4.2 Manfaat Untuk Masyarakat

Memberikan sumbangan informasi ilmiah tentang pengaruh pemberian minuman Sopi Mayang terhadap sumlah perubahan ekspresi sitokrom P450 CYP2E1, perubahan jumlah kadar protein CYP2E1 dan perubahan jumlah spermatozoid.

1.4.3 Manfaat Pengembangan Ilmu

1. Sebagai dasar pengembangan kebijakan terhadap konsumsi minuman Sopi Mayang.
2. Menjelaskan peran minuman Sopi Mayang terhadap pengaruh perubahan jumlah ekspresi mRNA enzim sitokrom P450 CYP2E1, perubahan jumlah kadar protein CYP2E1 dan perubahan jumlah spermatozoid.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Minuman Sopi Mayang

Minuman Sopi Mayang berasal dari pohon enau (*Arenga pinnata MERR*) termasuk salah satu jenis tanaman palma, yang tersebar hampir di seluruh wilayah Indonesia, terutama di 14 provinsi, yaitu Papua, Maluku, Maluku Utara, Sumatera Utara, Sumatera Barat, Jawa Barat, Jawa Tengah, Banten, Sulawesi Utara, Sulawesi Selatan, Sulawesi Tenggara, Bengkulu. (Mentri Pertanian, 2014).



Gambar 2.1 Pohon Enau
Jurnal Asia, 2015

Hasil olahan dari pohon enau berupa nira yang dihasilkan melalui proses fermentasi antara lain nata *pinnata*, cuka, dan alkohol. Pada pengolahan nira aren jika dilihat dengan kasat mata, secara fisik nata pinnata adalah produk berbentuk padat, bertekstur lembut, kenyal dan berwarna putih. Produk ini mengandung kadar

air yang sangat tinggi yaitu rata-rata 97,4%, yang mengandung air yang tinggi, nata pinnata juga mengandung serat 0,82%; protein 0,15%; sementara kandungan vitamin C ; lemak ; kalsium dan posfor sangat rendah. Selain gula aren dan nata pinnata, nira aren dapat juga digunakan untuk menghasilkan minuman beralkohol melalui proses fermentasi. Proses fermentasi yang terjadi dalam pembuatan minuman beralkohol berlangsung secara spontan oleh adanya aktifitas organisme yang ada dalam nira itu sendiri (Mody Lempang, 2012).

Fermentasi nira menjadi tuak umumnya dilakukan selama sehari, dibantu ragi/khamir (*Saccharomyces*) dan bakteri *Lactobacillus*. *Saccharomyces* dapat menghasilkan etanol dan *Lactobacillus* menghasilkan asam selama fermentasi berlangsung. Jumlah sel ragi pada tuak adalah 10^7 - 10^8 sel/mL, sedangkan bakteri akan mengalami sukseksi karena konsentrasi etanol meningkat. Menurut kebiasaan masyarakat, penggunaan nira yang baik yaitu beberapa saat setelah disadap dan tidak boleh dibiarkan bermalam, karena akan mengubah cita rasa. Berubahnya cita rasa ini disebabkan keberadaan bakteri yang mengubah gula menjadi asam. Perubahan ini juga diikuti dengan jumlah banyaknya ragi pada nira yang digunakan, karena ragi akan mengalami sukseksi jika substratnya mengandung asam. Sukseksi adalah pergantian jenis mikroba sejalan dengan bertambahnya waktu fermentasi. Proses fermentasi pada nira dapat berlangsung dalam hitungan jam. Mikroba yang berkembang selanjutnya adalah mikroba yang membentuk asam asetat. Peristiwa perubahan cita rasa nira karena kehadiran bakteri, ragi dan asam laktat ini disebut fermentasi (Rika Musa., 2014).

Nira merupakan cairan manis yang mengucur dari tandan kelapa atau pun aren, komposisi kandungan nira segar tiap 100 ml dengan berat jenis 1,058–1,077 gram pada 29°C, pada tabel berikut:

Tabel 2.1 Komposisi Kandungan Nira (Rika Musa., 2014)

No	Senyawa	Persentase (gr)
1	Sukrosa	12,330-17.40
2	Mineral	0,11-0,42
3	Protein	0,23-0,32
4	Vitamin C	16,0-30

Nira yang belum difermentasi menjadi tuak pada dasarnya mengandung sejumlah mikroba baik berupa ragi maupun bakteri. Mikroba dalam nira ini berasal dari tandan maupun udara bebas ketika proses penyadapan berlangsung. Untuk kualitas organoleptik tuak sendiri bergantung pada ramuan yang ditambahkan, tuak yang dihasilkan dapat berasa sedikit manis, agak masam atau pahit, dengan bau yang tajam dan warna yang sangat keruh (Rika Musa,2014).

2.2 Alkohol

2.2.1 Kosentrasi Minuman Sopi Mayang

Minuman ini merupakan salah satu jenis zat adiktif yang penyalahgunaannya menimbulkan dampak yang serius pada kesehatan masyarakat dan masalah sosial. Menurut peraturan menteri perdagangan No. 20 Tahun 2014 tentang pengendalian dan pengawasan terhadap pengadaan, peredaran, dan penjualan minuman beralkohol, pengertian minuman beralkohol adalah minuman yang mengandung etanol atau etil alkohol (C_2H_5OH) yang diproses dari bahan hasil

pertanian yang mengandung karbohidrat dengan cara fermentasi dan destilasi atau fermentasi tanpa destilasi.

Berdasarkan ketentuan Standar Industri Indonesia (SII) dari Kementerian Perindustrian RI, minuman berkadar alkohol di bawah 20% tidak tergolong minuman keras tetapi juga bukan minuman ringan, sedangkan dalam peraturan Kementerian Kesehatan No. 86/MenKes/Per/IV/1977 tanggal 29 April 1977 yang mengatur produksi dan peredaran minuman keras, yang dimaksud dengan minuman keras adalah semua jenis minuman beralkohol meliputi tiga golongan, yaitu (Tri Rini., 2016):

- a) Golongan A, dengan kadar etanol 1 sampai dengan 5%.
- b) Golongan B, dengan kadar etanol dari 5 sampai dengan 20%.
- c) Golongan C, dengan kadar etanol lebih dari 20 sampai dengan 55%.

Menyadari konsekuensi dari konsumsi alkohol yang berlebihan pada kesehatan manusia, pemerintah Indonesia mengeluarkan Keputusan Presiden No. 3 tahun 1997 yang memuat peraturan, pengawasan, dan pengendalian minuman beralkohol legal; namun, itu dibatalkan oleh kebijakan Mahkamah Agung tentang peraturan dan pengawasan minuman beralkohol di Indonesia. Di era reformasi, peraturan Presiden No. 74 tahun 2013 dikeluarkan, yang mengatur tentang konsumsi alkohol sebagai pengganti pengawasan otoritas (Frans Salesman., 2018).

Alkohol yang terkandung dalam minuman tradisional Sopi adalah etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) dari fermentasi nira. Secara umum peminum minuman alkohol dapat digolongkan ke dalam tiga kelompok. Kelompok pertama adalah peminum ringan yaitu mereka yang mengkonsumsi antara 0,28 gram sampai dengan 5,9 gram atau setara dengan minum satu botol bir perhari atau kurang. Kelompok kedua adalah

peminum menengah yaitu mereka yang mengkonsumsi antara 6,2 sampai 27,7 gram alkohol atau setara dengan satu sampai dengan empat botol bir sehari. Kelompok ketiga adalah peminum berat yaitu mereka yang mengkonsumsi lebih dari 28 gram alkohol atau lebih dari empat botol bir sehari (Syahrani Wael dkk., 2014).

Pengaruh konsumsi alkohol terhadap individu berbeda-beda. Akan tetapi terdapat hubungan antara konsentrasi alkohol di dalam darah (*Blood Alcohol Concentration-BAC*) dan tingkatan efek yang ditimbulkannya. Euforia ringan dan stimulasi terhadap perilaku lebih aktif seiring dengan meningkatnya konsentrasi alkohol di dalam darah (Topaz., 2015). Untuk mengukur konsentrasi Alkohol pada Sopi dari cairan, dapat membandingkan resistor resistansi (R_s / R_0) setiap sampel dengan resistor resistansi (R_s / R_0) yang sudah diketahui dari pengenceran alkohol (lihat Tabel 2.2). Berdasarkan Tabel 2.2, minuman Sopi (kualitas premium) memiliki konsentrasi alkohol berkisar antara 4-5% per mL, dari hasil pengukuran konsentrasi minuman Sopi menunjukkan bahwa alat detektor konsentrasi alkohol berfungsi dengan baik, sehingga ketika konsumsi alkohol berlebihan akan berdampak negatif bagi kesehatan manusia (Mirtha Y dkk., 2017)

Tabel 2.2 Konsentrasi Alkohol pada minuman Sopi (Mirtha Y dkk., 2017)

Sampel	Alkohol Konsentrasi
Sopi mayang	4,52 %

Tabel 2.3 Berbagai jenis minuman beralkohol serta kandungannya

Kategori	Definisi	Standar Mutu
Bir	Minuman mengandung etanol sebagai hasil proses fermentasi khamir (<i>yeast</i>) terhadap bahan baku utama malt, hops (<i>humulus lupulus</i>) dan air yang memberikan aroma, rasa, dan sifat khas bir dapat ditambahkan bahan pangan lain seperti: beras, jagung, gula, tapioka, barley, barley yang disangrai.	a. Kadar etanol 0,5% hingga 8%; b. Kadar metanol tidak lebih dari 0,01% v/v (dihitung terhadap volume produk).
Anggur (Grape Wine)	Anggur (<i>Grape wine</i>) adalah minuman beralkohol hasil peragian sari buah anggur <i>Vitis</i> sp.	a. Kadar etanol 7%- 24% v/v; b. Kadar metanol tidak lebih dari 0,01% v/v (dihitung terhadap volume produk);
Anggur brem Bali	Minuman hasil fermentasi beras ketan. Merupakan produk khas daerah Bali.	a. Kadar etanol tidak kurang dari 7% dan tidak lebih dari 24% v/v; b. Kadar metanol tidak lebih dari 0,01% v/v (dihitung terhadap volume produk)

Tuak	Minuman beralkohol yang diperoleh dari hasil fermentasi nira kelapa atau aren.	Kadar etanol tidak kurang dari 7% dan tidak lebih dari 24% v/v; Kadar metanol tidak lebih dari 0,01% v/v
Brandy	Hasil penyulingan dari fermentasi buah anggur yang dimatangkan dalam tong kayu selama tidak kurang dari 1 tahun dengan ukuran tong kayu tidak lebih dari 1000 L	a. Kadar etanol tidak kurang dari 36% v/v; b. Kadar metanol tidak lebih dari 0,01% v/v (dihitung terhadap volume produk) c. Dapat mengandung gula, glukosa, fruktosa, jus anggur maupun anggur.
Whisky	Minuman beralkohol dari spirit hasil peragian lumatan sereal atau biji-bijian atau hasil olahannya, dan di matangkan dalam tong kayu selama tidak kurang dari 2 tahun	a. Kadar etanol tidak kurang dari 40% v/v b. Kadar methanol tidak lebih dari 0,01% v/v (dihitung terhadap volume produk)
Gin	Hasil penyulingan fermentasi dari biji- bijian, kentang, molases, atau bahan pertanian lainnya, penyulingan ulang dari spirit hasil penyulingan atau pencampuran beberapa spirit asli dan penambahan aroma <i>Juniper berries</i>	a. Kadar etanol tidak kurang dari 37,5%. b. Kadar metanol tidak lebih dari 0,01% v/v (dihitung terhadap volume produk)

Vodka	Hasil penyulingan produk fermentasi biji- bijian, kentang, molases, atau bahan pertanian lainnya dan setelah penyulingan ditambahkan arang atau karbon aktif atau absorben lainnya.	<ul style="list-style-type: none"> a. Kadar etanol tidak kurang dari 37,5% b. Kadar metanol tidak lebih dari 0,01% v/v (dihitung terhadap volume produk)
Arak	Minuman beralkohol yang diperoleh dari penyulingan cairan beralkohol hasil fermentasi bahan pangan misalnya beras, shorgum, molases, nira, dan atau buah- buahan.	<ul style="list-style-type: none"> a. Bau dan rasa normal dan khas. b. Kadar etanol tidak kurang dari 30% v/v; c. Kadar metanol tidak lebih dari 0,01% v/v (dihitung terhadap volume produk)

BPOM RI Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia
 Nomor 14 Tahun 2016 Tentang Standar Keamanan dan Mutu Minuman Beralkohol,
 2016.

2.2.2 Metabolisme Alkohol

Alkohol yang masuk kedalam tubuh akan mengalami beberapa proses biokimia, dalam hal ini proses metabolisme antara lain :

a. Jalur sitosol/ Lintasan alkohol dehydrogenase

Jalur utama metabolisme alkohol melibatkan alkohol dengan dehydrogenase (*alcohol dehydrogenase*), suatu enzim sitosolik yang mengkatalisis perubahan alkohol menjadi asetaldehid. Enzim ini terutama terdapat di hepar, tetapi juga dapat ditemukan di organ lain, seperti cerebellum dan gaster. Pada sebagian populasi Asia yang mengidap polimorfisme ADH yang mempengaruhi aktivitas enzim, suatu bentuk ADH yang aktivitasnya berkurang akan disertai peningkatan risiko alkoholisme.

Proses ini melibatkan enzim alkohol dehydrogenase. Pada proses ini alkohol dehydrogenase terjadi didalam hepar, kemudian alkohol dehydrogenase akan menghasilkan asetaldehid yang sangat beracun sehingga dapat merusak jaringan atau sel (Bertram G & Katzung., 2010)

b. Jalur peroksisom / sistem katalase

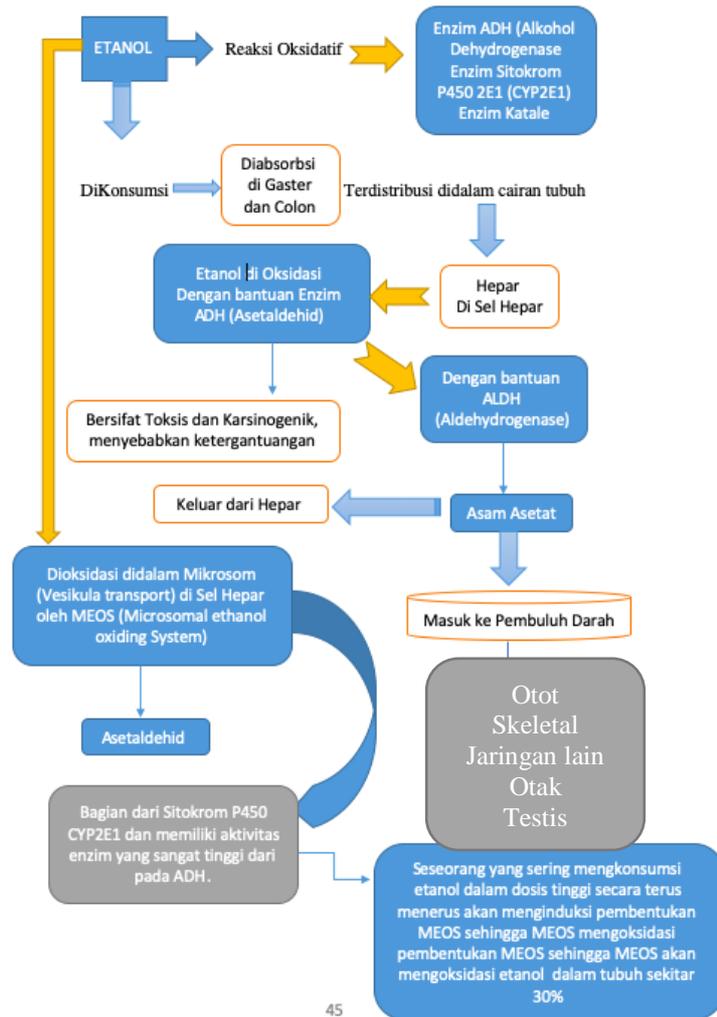
Pada sistem ini berlangsung dengan menggunakan katalase. Pada sistem diperlukan H_2O_2 . dan sistem akan berfungsi ketika kadar alkohol didalam tubuh meningkat (Marliyati., 2016).

c. Jalur Sistem Osidasi Etanol Mikrosom (SOEM)

Sistem oksidasi etanol mikrosom (SOEM) dikenal sebagai sistem oksidasi dengan fungsi campuran, menggunakan NADPH pengganti NAD sebagai kofaktor dalam metabolisme etanol dan terutama terdiri dari sitokrom P450 2E1, 1A2, dan 3A4. Aktivitas SOEM akan meningkat dalam konsumsi alkohol kronik. Akibatnya konsumsi alkohol kronik akan

menyebabkan peningkatan signifikan tidak hanya pada metabolisme etanol tetapi juga pada klirens obat-obat lain yang dieliminasi oleh sitokrom P450 yang berperan dalam system SOEM dan pembentukan produk toksin dari reaksi sitokrom P450 (toksin, radikal bebas, H₂O₂) (Betram G & Katzung, 2010).

Pada sistem ini disebut dengan sistem SOEM. Sistem ini melibatkan sitokrom P 450 yang berada dalam mikrosom, sehingga sistem ini diubah menjadi asetaldehid, yang kemudian diubah aldehidogenase didalam mitokondria. Alkohol yang telah masuk ke dalam saluran pencernaan akan diabsorpsi melalui dinding gastrointestinal, tepat di usus kecil, kemudian alkohol didistribusikan ke semua jaringan dan cairan tubuh serta cairan jaringan. Alkohol yang diabsorpsi ke dalam tubuh sekitar 30% yang akan mengalami oksidasi dengan enzim, sedangkan 2-10% diekskresikan tanpa mengalami perubahan, baik melalui paru-paru, cairan gaster, air ludah dan ginjal (Christianto, 2013).



45

Gambar 2.2

Mekanisme Alkohol di dalam Hepar

Proses reaksi oksidatif menggunakan bantuan enzim ADH (*alcohol dehydrogenase*), sitokrom P450 2E1 (CYP2E1) dan katalase (Brent, 2009). Etanol yang dikonsumsi akan diabsorpsi oleh gaster dan colon lalu terdistribusi dalam cairan tubuh. Etanol yang telah dikonsumsi akan masuk ke dalam hepar. Tepat di bagian sitosol (komponen sel di dalam sitoplasma berupa cairan) dari sel hepar, etanol akan mengalami oksidasi oleh bantuan enzim ADH menjadi asetaldehid. Asetaldehid yang dihasilkan bersifat toksik, karsinogenik, sangat reaktif dan menyebabkan ketergantungan. Asetaldehid yang dihasilkan akan mengalami

oksidasi dengan bantuan ALDH (*aldehyde dehydrogenase*) menjadi asam asetat seperti pada Gambar 2.2. Asam asetat yang dihasilkan akan masuk ke dalam siklus Krebs dan diubah menjadi CO₂ (karbon dioksida) dan air (Sinta, 2018).

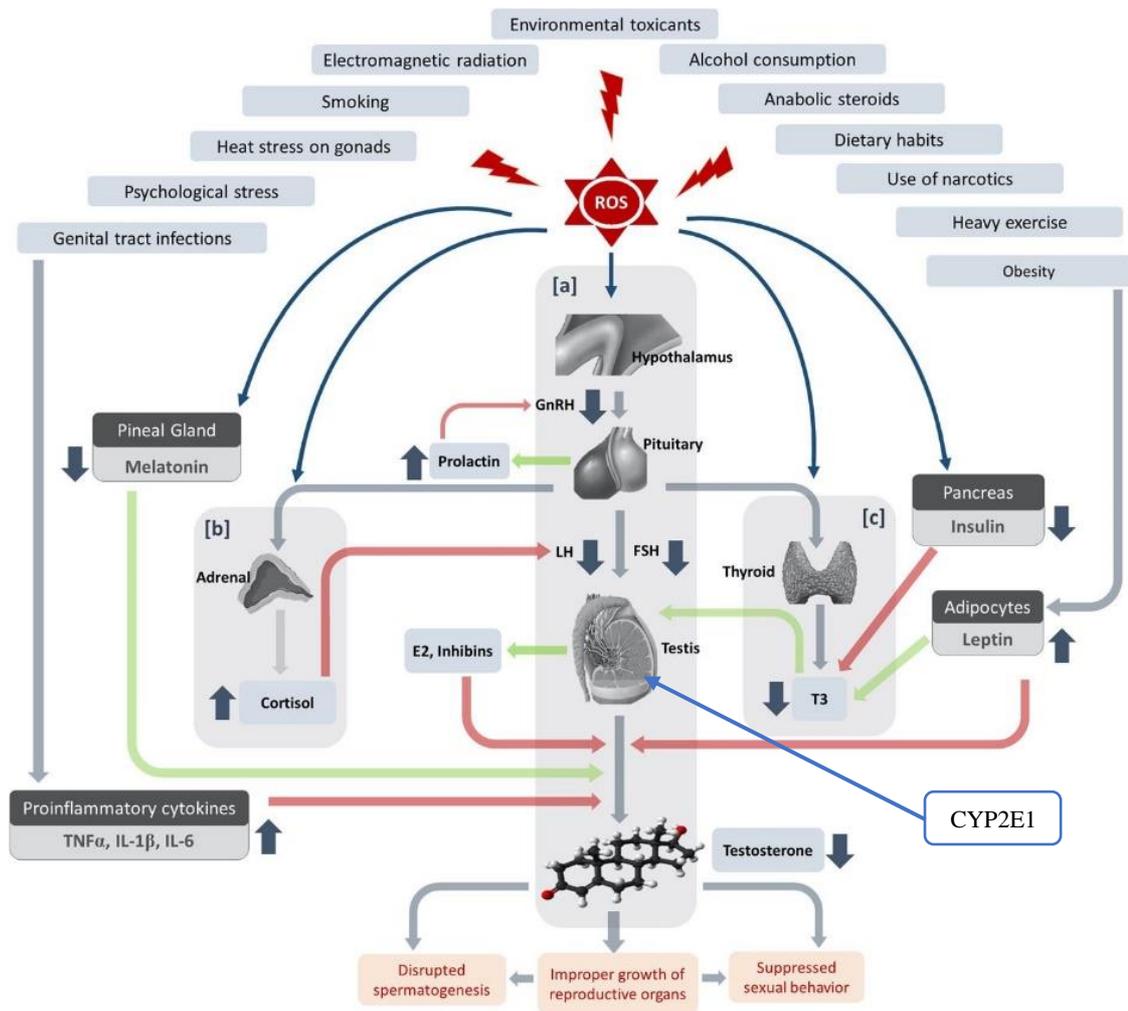
2.2.3. Hubungan Alkohol dengan Radikal Bebas

ROS (*Reactive Oxygen Species*) merupakan sumber utama timbulnya radikal bebas sehingga terjadi reaksi enzimatis sistem pernafasan, fagositosis, sintesis prostaglandin dan reaksi sitokrom P450 (Harasym,J., 2014).

Sumber radikal bebas termasuk peroksisom dan enzim detoksikasi dari P450, *nicotinamide adenine dinucleotide* (NAD) oksidasi. Sebagian dari enzim P450 bekerja di mitokondria sebagai sumber utama radikal bebas. Sumber eksternal radikal bebas adalah radiasi sinar matahari, komponen kimia lain, yaitu alkohol, rokok, dan polusi lingkungan. Kerusakan yang diakibatkan *reactive oxygen species* pada sel karena adanya konsentrasi *reactive oxygen species* intraseluler tinggi, dan adanya gangguan keseimbangan antara *reactive oxygen species* dan antioksidan endogen (Sosa V dkk., 2013).

Etanol juga dapat menurunkan testosteron dan meningkatkan stress oksidatif akibat adanya peningkatan ROS. Pada keadaan konsentrasi tinggi, ROS menjadi sangat toksik terhadap sel, dan dapat menyebabkan kerusakan DNA, lipid peroksidase dan protein. Selain itu, juga berpengaruh pada biologi mekul yang lainnya. Namun, pada kondisi fisiologi, oksidasi etanol terjadi sebagai suatu bagian dari metabolisme alkohol. ROS terbentuk dan berperan dalam kerusakan sel, kerusakan sistem reproduksi yang disebabkan oleh konsumsi alkohol. Mengonsumsi alkohol dapat meningkatkan stress oksidatif, akibat megonsumsi alkohol dapat mengganggu sintesis testosteron pada hewan coba, selanjutnya juga

terdapat laporan peningkatan konsumsi alkohol menyebabkan penurunan aktifitas enzim steroidogenik yang ada di testis sehingga menyebabkan penurunan testosteron (Glaucia, 2015).



Gambar 2.3 Sumber spesies oksigen reaktif (ROS) dan dampaknya terhadap jaringan endokrin yang kompleks yang mengatur reproduksi pria. Tingginya kadar ROS berdampak pada HPG (*hipotalamus hipofisisgonad*) yang menghasilkan sekresi penurunan hormon reproduksi pria. Melalui jalur HPA (*hypothalamic pituitary adrenocortical*), ROS meningkatkan pelepasan hormon stres kortisol, yang melalui HPA-HPG, selanjutnya dapat menurunkan sekresi hormon

LH(*luteinizing hormon*). Peningkatan ROS juga mempengaruhi HPT(*hipotalamus hipofisis tiroid*) yang mengakibatkan penurunan produksi T3 dari kelenjar tiroid, yang melalui jalur HPT dan HPG, dapat menurunkan sintesis testosteron. ROS juga mempengaruhi kelenjar endokrin lain yang mengganggu sumbu endokrin ini untuk menghasilkan produksi testosteron menurun. Peningkatan stres oksidatif (OS), dalam kondisi yang berbeda, menurunkan produksi insulin dari pankreas yang lagi mengurangi produksi T3 dari tiroid kelenjar dan melalui HPT-HPG berkurang biosintesis testosteroe (Mahsa Darbandi,dkk.,2018).

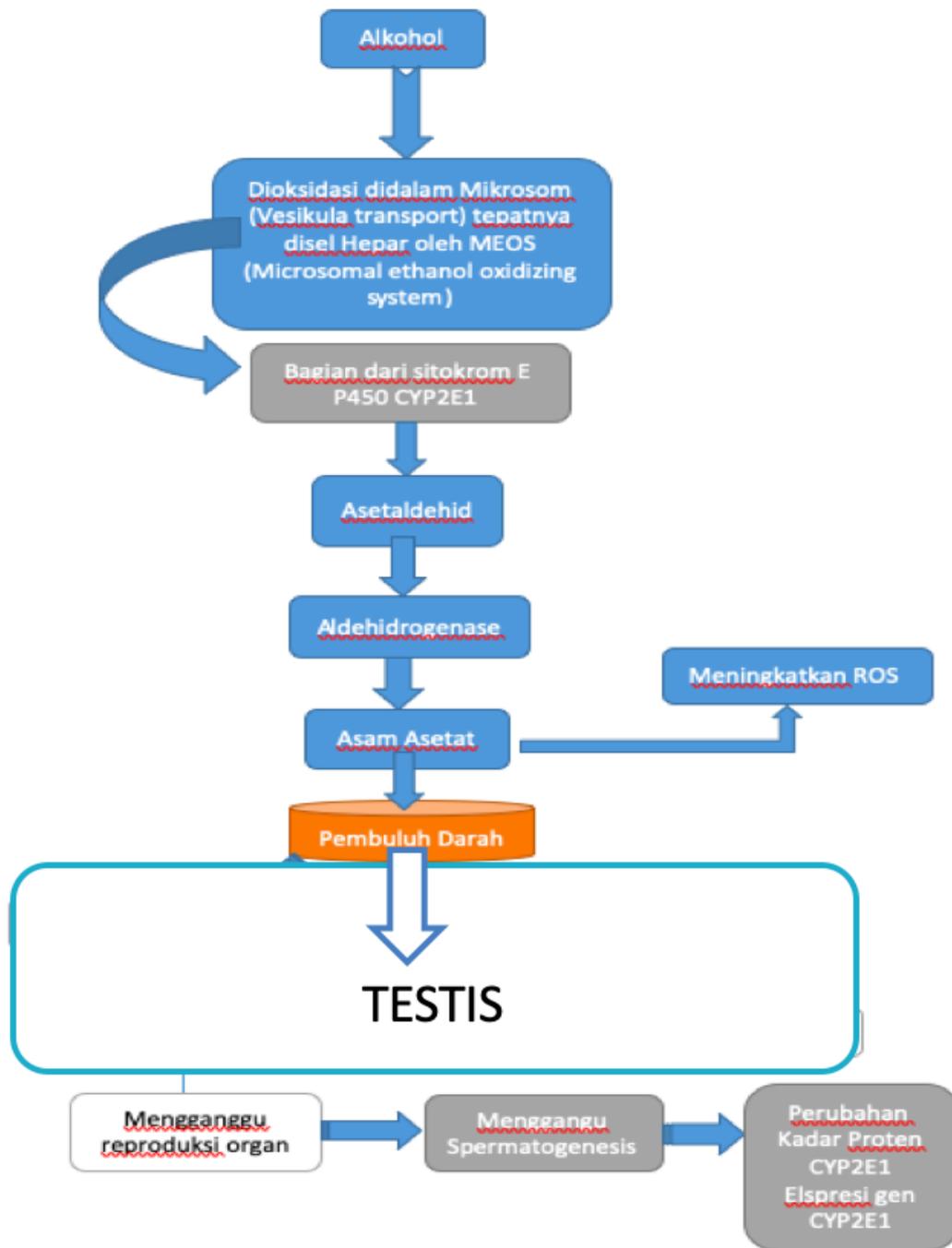
2.3 Sitokrom P450 (CYP) CYP2E1

Cytochrome P4502E1 (CYP2E1) mempunyai peran penting dalam generasi ROS dan CYP2E1 juga berada didalam alkohol itu sendiri. Alkohol (ALD) hasil dari peningkatan steatosis, peradangan, oksidan, dan nitrosatif stres dan disfungsi mitokondria. Alkohol dehydrogenase (ADH) adalah alkohol pengoksidasi enzim utama. Keterlibatan sitokrom P450 dalam metabolisme alkohol pertama kali diidentifikasi oleh Charles S. Lieber dalam studinya pada sistem pengoksidasi mikrosomaletanol (MEOS). MEOS memiliki alkohol yang lebih tinggi dari pada pengoksidasi alkohol dan pengoksidasi alkohol untuk menghasilkan asetaldehid. Aktivitas MEOS meningkat dengan mengkonsumsi alkohol dalam waktu yang lama sebagian karena enzim sitokrom P450. Di antara *famili* sitokrom P450, CYP2E1 telah diidentifikasi sebagai yang paling berperan di alkohol karena sangat dapat diinduksi dan memiliki aktivitas katalitik yang tinggi untuk alkohol. CYP2E1 berada di hepar, tetapi juga terletak di organ lain seperti cerebrum dan colon. CYP2E1 terutama terletak di dalam endoplasmicreticulum (ER) meskipun juga juga berada didalam mitokondria. CYP2E1 memetabolisme berbagai zat termasuk

obat multiple, asam lemak tak jenuh ganda, etanol, asetaminofen dan sebagian besar pelarut organik. Berbagai faktor seperti insulin, *aceone*, leptin, adiponektin dan sitokin mengatur ekspresi protein mRNA dan CYP2E1 (Tung-Ming Leung, Natalia, 2013).

Peningkatan aktivitas CYP2E1 menyebabkan produksi ROS yang berlebihan. ROS yang dihasilkan CYP2E1 secara sekunder dapat merusak oksidatif komponen sel termasuk lipid, protein, dan asam nukleat (J. Aubert, K. Begriche, 2011).

Pada rodents (hewan pengerat) mice (tikus) yang defisiensi ALDH2 menjadi resisten terhadap steatosis yang dipicu alkohol, namun cenderung untuk mengalami infalmasidan fibrosis hepar aktivasi parakrin IL-6 pada sel kupper yang dimediasi oleh hasil produk reaksi antara malondialdehid dan asetaldehid. Kerentanan terhadap ALD yang berhubungan dengan ALHD tidak dapat dikonfirmasi pada alkoholik. Selain ADH, alkohol dapat di metabolisme oleh CYP2E1. Terdapat beberapa lokus polimorfik pada gen CYP2E1 pada manusia, dengan dua mutasi dalam bentuk linkage disequilibrium (LD) yang terjadi pada alel c1 dan c2. Alel CYP2E1 (c2) berhubungan dengan messenger RNA, protein dan aktivitas enzim sebanyak 10 kali lipat disbanding alel c1, serta dapat menyebabkan paparan tinggi asetaldehid dan ROS pada hepar (Liang Punsakul, David W. Crabb, 2020).



Gambar 2.4

Mekanisme Sitokrom P450 CYP2E1 sampai ke sistem reproduksi pria (Sinta., 2018).

Alkohol juga akan dioksidasi di dalam mikrosom (vesikula transpor) sel hepar oleh MEOS (*microsomal ethanol oxidizing system*) menghasilkan asetaldehid. MEOS adalah bagian dari P450 dan memiliki aktivitas enzim yang sangat tinggi

daripada ADH. Seseorang yang sering mengonsumsi alkohol dalam tubuh 30%. Disamping itu, katalase yang terdapat pada peroksisom juga merupakan enzim yang berperan dalam proses reaksi metabolisme etanol menjadi asetaldehid di dalam hepar (Sinta, 2018).

Sistem enzim CYP terdiri dari superfamili hemoprotein yang menjalankan rangkaian proses oksidasi, peroksidasi, dan transformasi metabolik dari berbagai komponen eksogen dan endogen serta zat-zat terapeutik. Sistem enzim CYP dapat ditemukan pada hampir semua organisme hidup, seperti pada bakteri, jamur, tumbuhan, dan binatang. Ekspresi CYP tersebar secara merata pada berbagai jaringan, namun terutama di temukan di hepar (Leise dkk., 2014).

2.4. Hubungan Alkohol dengan Spermatogenesis

Proses pembentukan spermatozoa dikenal dengan istilah dikenal dengan istilah spermatogenesis. Menurut Clearmont, proses ini pada manusia berlangsung dalam waktu 64 hari di dalam testis dengan tambahan waktu 10-14 hari di dalam epididymis untuk maturase spermatozoa, dengan demikian, keseluruhan proses membutuhkan waktu 70+4 hari. Namun studi yang lebih baru menunjukkan bahwa keseluruhan proses dari produksi hingga siap ejakulasi spermatozoa selesai dalam waktu yang lebih singkat, rata-rata 64 hari dan retang 42-76 hari. Spermatogenesis terjadi di dalam testis, tepatnya di dalam tubulus seminiferous. Proses ini merupakan proses kompleks yang melibatkan berbagai sel dan hormon. Spermatogenesis dimulai saat pubertas dan bersinambung sepanjang kehidupan pria dewasa (Agustinus dkk., 2018).

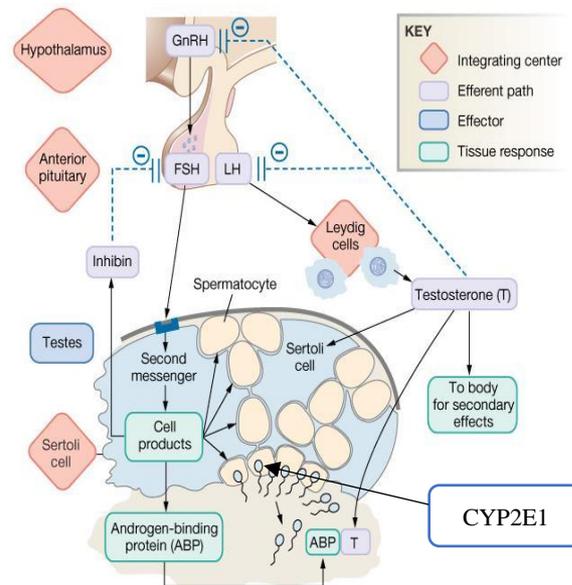
Produksi testosteron didahului beberapa tahap yang melibatkan beberapa hormon dan tahap-tahap ini bertanggung jawab atas perubahan tingkah laku. Otak

mengatur LHRH (*LH-releasing hormone*) yang memerintahkan hipofisis memproduksi LH yang beredar dalam darah dan kemudian menstimulasi produksi testosteron. Testosteron mengirimkan signal ke otak dan hipofisis mengenai kadarnya. Jika kadar testosteron rendah, maka otak dan hipofisis disignal untuk menghasilkan hormon-hormon yang dibutuhkan untuk produksi testosteron. Setelah mengkonsumsi alkohol kadar testosteron rendah, maka otak dan hipofisis diperintah oleh testis untuk memproduksi LH. (ST.Aisyah,dkk., 2017).

Menjaga level hormon (testosteron, LH, FSH) dapat berkaitan dengan desain eksperimental yang telah dipaparkan oleh Hong-geun. Para peneliti ini tidak fokus pada level testosteron pada tikus yang diberi etanol 20% selama 8 minggu. Namun berdasarkan hasil penelitian dari menemukan bukti penurunan hormon-hormon ini pada tikus yang diberikan paparan etanol (1ml/80gr, 30% v/v, dosis tunggal. Eksperimen ini seperti menunjukkan kehidupan seorang pria yang terus menerus mengkonsumsi etanol yang ia bahkan tidak tahu akibatnya (Glaucia.,2015).

Alkohol diketahui mengganggu mekanisme umpan balik dari aksis hipotalamus-hipofisis-gonad (HPG) yang mengakibatkan gangguan produksi dan sekresi kuantitas atau potensi hormon luteinizing (LH) yang memadai dan hormon perangsang folikel (FSH), yang menyebabkan kerusakan sel Sertoli. Protein yang dibutuhkan untuk spermatogenesis rusak lebih lanjut yang mengakibatkan disfungsi sel Sertoli. Sel-sel Leydig juga terpengaruh dan kadar testosteron dalam darah juga berkurang (karena penurunan produksi dan peningkatan pembersihan metabolik). Konsekuensi dari berkurangnya testosteron, LH, dan FSH diterjemahkan menjadi perkembangan morfologis abnormal dan pematangan

spermatozoa, penurunan tingkat produksi sperma, atrofi gonad, impotensi, infertilitas, dan berkurangnya karakteristik seksual sekunder pria (Dilip Gude., 2012).



Gambar 2.5

Kontrol hormonal spermatogenesis (Landung, 2010)

Proses spermatogenesis dipengaruhi oleh hormon-hormon yang dihasilkan oleh organ hipotalamus, hipofisis dan testis sendiri. Pengaturan pembentukan spermatogenesis dimulai dengan sekresi gonadotropin releasing hormon (GnRH) oleh hipotalamus. Hormon ini selanjutnya merangsang kelenjar hipofisis anterior untuk menyekresikan dua hormon lain yang disebut hormon-hormon gonadotropin, yaitu Follicle Stimulating Hormone (FSH), Luteinizing Hormone (LH). Selanjutnya, Luteinizing Hormone (LH) merupakan rangsangan utama untuk sekresi testosteron pada sel Leydig yang diperlukan untuk perkembangan normal sel spermatogenik, sedangkan *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) untuk merangsang pertumbuhan testis dan meningkatkan produksi protein pengikat androgen oleh sel Sertoli, yang merupakan komponen tubulus testis yang berguna

menyokong pematangan sel spermatozoa dalam proses spermatogenesis (Landung., 2010).

Proses pembentukan spermatozoa dipengaruhi oleh kerja beberapa hormon sebagai berikut (A. Robicahyadi, 2018):

a. Testosteron

Hormon Testosteron bertanggung jawab terhadap pertumbuhan seks sekunder pria seperti pertumbuhan kumis dan jenggot, penambahan masa otot dan perubahan suara. Hormon testosteron di produksi di testis, yaitu sel Leydig yang berperan penting bagi tahap pembelahan sel – sel germinal untuk membentuk sperma dan berfungsi merangsang perkembangan organ seks primer serta mendorong spermatogenesis.

b. Luteinizing Hormon/ LH

Luteinizing Hormon dihasilkan oleh kelenjar hipofisis anterior. Fungsi LH adalah merangsang sel Leydig untuk menghasilkan hormon testosteron pada masa pubertas antara usia 13 sampai 15 tahun, yang berdampak pada peningkatan tinggi dan berat badan serta penambahan panjang penis dan testis.

c. *Follicle Stimulating Hormone*/ FSH

Follicle Stimulating Hormone dihasilkan oleh kelenjar hipofisis anterior. FSH berfungsi merangsang sel sertoli menghasilkan ABP (*Androgen Binding Protein*) yang akan memacu spermatogonium untuk memulai proses spermatogenesis. Proses pematangan spermatosit menjadi spermatozoa disebut *spermiogenesis*. Spermiogenesis terjadi di dalam epididimis dan membutuhkan waktu selama 2 hari.

d. Estrogen

Estrogen *dibentuk* oleh sel – sel sertoli ketika distimulasi oleh FSH. Sel-sel sertoli juga mensekresi suatu protein pengikat androgen yang mengikat testosteron dan estrogen serta membawa keduanya ke dalam cairan pada tubulus seminiferus.

e. Hormon Pertumbuhan

Hormon pertumbuhan diperlukan untuk mengatur metabolisme testis. Hormon pertumbuhan secara khusus meningkatkan pembelahan awal pada spermatogenesis.

f. Hormon Gonadotropin

Hormon gonadotropin dihasilkan oleh hipotalamus. Hormon gonadotropin berfungsi untuk merangsang kelenjar hipofisa bagian depan (anterior) agar dapat mengeluarkan hormon FSH dan LH.

Alkohol dapat menyebabkan penurunan viabilitas spermatozoa yang mana dapat dilihat dari banyaknya jumlah sperma yang abnormal pada kelompok yang diberi intervensi. Hal ini bahwa mengkonsumsi alkohol dalam waktu lama dapat mempengaruhi perubahan integritas struktur spermatozoa melalui jalur mitokondria. Etanol juga dilaporkan dapat menyebabkan penurunan kapasitas mitokondria dalam menghasilkan protein, dimana protein dihasilkan melalui jalur sintesis protein yang terjadi di ribosom dan membuat mereka kehilangan fungsinya. Terjadi penekanan pada proses translasi polipeptida yang berkaitan dengan fosforilasi oksidatif yang menyebabkan inaktivasi enzim, akhirnya, proses tersebut merupakan suatu proses panjang yang terjadi dalam mitokondria sehingga dapat

memicu suatu apoptosis dan nekrosis kematian sel, yang berperan dalam progres kerusakan testikular akibat alkohol (Dosumu, 2014).

2.5 Spermatogenesis

2.5.1 Proses Spermatogenesis

Testis terdiri atas sekitar 250m 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 (Retno Anggi, 2012).

Spermatogenesis adalah proses pembentukan sperma menjadi sperma dewasa dari germinal sel atau yang sering disebut sel induk. Spermatogenesis dimulai dari proses poliferasi dan diferensiasi germinal sel dan diakhiri dengan terbentuknya formasi sperma dewasa. Spermatogonia berkembang menjadi spermatozot primer, kemudian perkembangan berlanjut menjadi spermatozot sekunder. Pematangan spermatozot sekunder terbentuklah spermatid, tahap akhir spermatogenesis adalah pematangan spermatid menjadi sel sperma, keseluruhan proses ini membutuhkan waktu sekitar 64 hari (Krisna, 2018).

Spermatozoa pada mamalia akan mengalami diferensiasi dan ke testis, terdapat beberapa protein atau molekul dan fungsinya untuk epididimis. Epididimis merupakan bagian struktur reproduksi pria dengan tingkat spesialisasi yang tinggi

dan berfungsi sebagai tempat transportasi, pematangan, dan penyimpanan spermatozoa. Dalam fungsinya sebagai tempat sekresi dan absorpsi, epitel epididymis untuk pematangan spermatozoa. Epididimis mamalia mempunyai 2 fungsi utama, yaitu, 1) mikro yang unik di *hearts* lumen duktus yang berfungsi membantu spermatozoa dari testikular yang masih belum matang menjadi sel-sel yang sepenuhnya fertil; 2) menyimpan spermatozoa yang sudah fertil dan poten di cauda epididimis/vas deferens hingga spermatozoa keluar dan selanjutnya memasuki epididimis sebagai gamet yang belum matang. Ketika spermatozoa berada disepanjang epididimis, maka spermatozoa akan mengalami pematangan yang sangat dibutuhkan untuk menginduksi motilitas progresif dan kemampuan membuahi sel telur (ovum). Pematangan spermatozoa di epididimis melibatkan adanya Interaksi antara spermatozoa dengan protein-protein yang disintesis dan disekresikan Oleh epitel epididimis.(Muslim Akmal dkk.,2015).

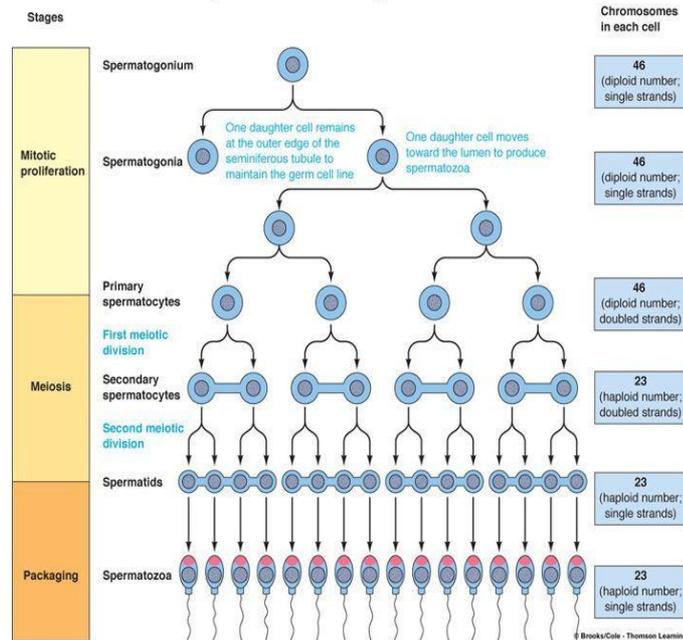
Selain tentang spermatogonia menjadi sel sperma, spermatogenesis juga mencakup pematangan sel epitel germinal dengan melalui proses pembelahan dan diferensiasi sel, untuk membentuk sperma fungsional. Didalam testis terdapat ruang-ruang testis atau yang lebih sering disebut dengan lobulus testis. Terdapat 250 lobulus testis pada satu buah testis. Pada lobulus testis terdapat pintalan-pintalan tubulus seminiferus tempat spermatogenesis terjadi. Sebagian besar penyusun tubulus seminiferus adalah berupa sel epitel germinal (sel benih) atau yang lebih sering disebut spermatogonia. Spermatogonia terletak di dua sampai tiga lapisan luar sel-sel epitel tubulus seminiferus. Spermatogonia terus-menerus membelah untuk memperbanyak diri, sebagian dari spermatogonia berdiferensiasi

melalui tahap-tahap perkembangan tertentu untuk membentuk sperma (Jungwirth, 2015).

Proses spermatogenesis ini terjadi didalam tubulus seminiferus, adapun tahapan maturasi sperma dibagi kedalam empat fase, yaitu :

1. Mitotik mengalami proses poliferasi dan diferensiasi duplo dari germinal sel, tahapan ini juga disebut spermatogoniogenesis, masing-masing memiliki 46 kromosom lengkap.
2. Kedua sel tersebut terus aktif membelah, spermatosit sekunder adalah sel yang nantinya menghasilkan sel anak dan spermatosit primer yang berukuran lebih besar dan bergerak menuju tubulus seminiferus. *Spermatocytes* merupakan germinal sel yang sudah mengalami pembelahan menjadi tetraploid dan dilanjutkan menjadi haploid germinalinal sel (spermatidis).
3. Transformasi spermatidis menjadi sperma testikular, tahapan ini disebut juga spermiogenesis, dimana pada tahap ini juga spermatosit primer aktif membelah bersamaan dengan spermatosit sekunder yang memiliki 23 kromosom masing-masing 22 kromosom tubuh dan 1 kromosom kelamin.
4. Spermitasi, merupakan tahapan pelepasan sel sperma dari epitel germinalinal menuju ke lumen tubular (Krisna., 2018).

Spermatogenesis



Gambar 2.6

Tahapan pembelahan spermatogenesis
(Ketut Sukada, 2016)

Tahap pembentukan spermatozoa dibagi atas tiga tahap yaitu: (Ketut Sukada, 2016).

1. Spermatogenesis

Merupakan spermatogonia yang mengalami mitosis berkali-kali yang akan menjadi spermatosit primer. Spermatogonia merupakan struktur primitif dan dapat melakukan reproduksi (membelah) dengan cara mitosis. Spermatogonia ini mendapatkan nutrisi dari sel-sel Sertoli dan berkembang menjadi spermatosit primer. Spermatogonia yang bersifat diploid ($2n$ atau mengandung 23 kromosom berpasangan), berkumpul di tepi membran epitel germinal yang disebut spermatogonia tipe A. Spermatogonia tipe A membelah secara mitosis

menjadi spermatogonia tipe B, kemudian, setelah beberapa kali membelah, sel ini akhirnya menjadi spermatosit primer yang masih bersifat diploid.

Spermatogonia tipe A adalah spermatogonia awal yang dibentuk. Seiring perkembangan ilmu pengetahuan, saat ini diketahui bahwa spermatogonia tipe A ini akan mengalami serangkaian fase pembelahan secara mitosis, dan akhirnya membentuk spermatogonia tipe B. Spermatogonia tipe B ini kemudian yang akan bergerak ke lumen, termodifikasi dan membesar membentuk spermatosit primer. Spermatosit primer nantinya akan semakin ke arah lumen sambil membelah secara mitosis menjadi spermatosit sekunder. Pada fase mitosis pertama, proses yang berlangsung cukup lama adalah pada tahap profase I, yakni sekitar 22 hari, sedangkan proses selanjutnya yakni metafase, anafase dan telofase berlangsung dengan cepat. Setelah terbentuk spermatosit sekunder, alamiahnya ia akan langsung membelah kembali secara mitosis (mitosis II) menjadi spermatid. Spermatid yang dihasilkan sekarang telah haploid, atau memiliki setengah dari kromosom induknya (spermatosit primer). Langkah selanjutnya adalah tahap dimana spermatid berdiferensiasi menjadi spermatozoa (Ahmad Syauqy., 2014).

2. Tahapan Meiosis

Spermatosit primer menjauh dari lamina basalis, sitoplasma makin banyak dan segera mengalami meiosis I menghasilkan spermatosit sekunder yang n kromosom (haploid). Spermatosit sekunder kemudian membelah lagi secara meiosis II membentuk empat buah spermatid yang haploid juga. Sitokenesis pada meiosis I dan II ternyata tidak membagi sel benih yang lengkap terpisah, tapi masih berhubungan lewat suatu jembatan (*Intercellular bridge*).

Dibandingkan dengan spermatosit I, spermatosit II memiliki inti yang gelap (Ketut Sukada., 2016).

3. Tahapan Spermiogenesis

Merupakan transformasi spermatid menjadi spermatozoa yang meliputi 4 fase yaitu fase golgi, fase tutup, fase akrosom dan fase pematangan. Hasil akhir berupa empat spermatozoa (sperma) masak. Ketika spermatid dibentuk pertama kali, spermatid memiliki bentuk seperti sel-sel epitel. Namun, setelah spermatid mulai memanjang menjadi sperma, akan terlihat bentuk yang terdiri dari kepala dan ekor. Bila spermatogenesis sudah selesai, maka ABP testosteron (Androgen Binding Protein Testosteron) tidak diperlukan lagi, sel Sertoli akan menghasilkan hormon inhibin untuk memberi umpan balik kepada hipofisis agar menghentikan sekresi FSH dan LH. Spermatozoa akan keluar melalui uretra bersama-sama dengan cairan yang dihasilkan oleh kelenjar vesikula seminalis, kelenjar prostat dan kelenjar *cowper*. Spermatozoa bersama cairan dari kelenjar-kelenjar tersebut dikenal sebagai semen atau air mani. Pada waktu ejakulasi, seorang laki-laki dapat mengeluarkan 300 – 400 juta sel spermatozoa (Ketut Sukada., 2016).

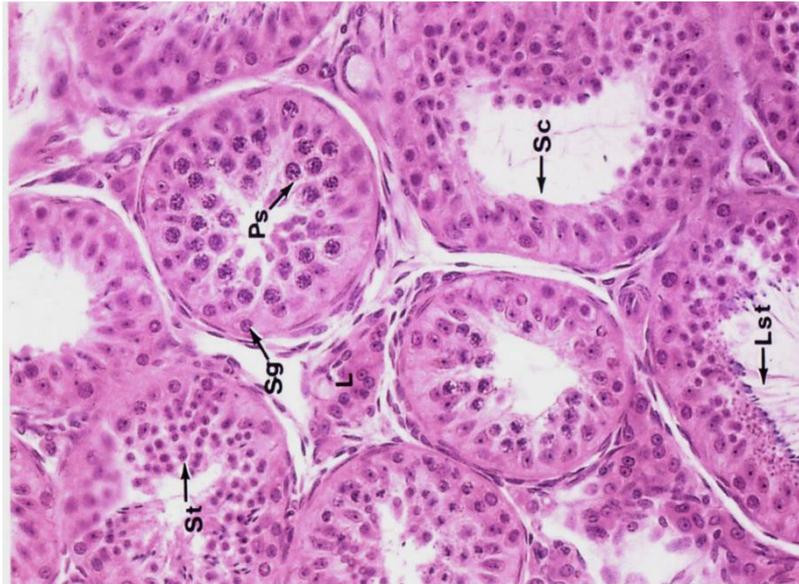
Tabel 2.4

Siklus Epithel Seminiferous dan Spermatogenesis Pada Beberapa Mamalia (Susilawati., 2011).

Spesies	Lamanya Hari Siklus	Spermatogenesis
Manusia	813,6	54,4
Tikus (Wistar)/Rattus norvegicus	13	52

2.5.2 Tubulus Seminiferus

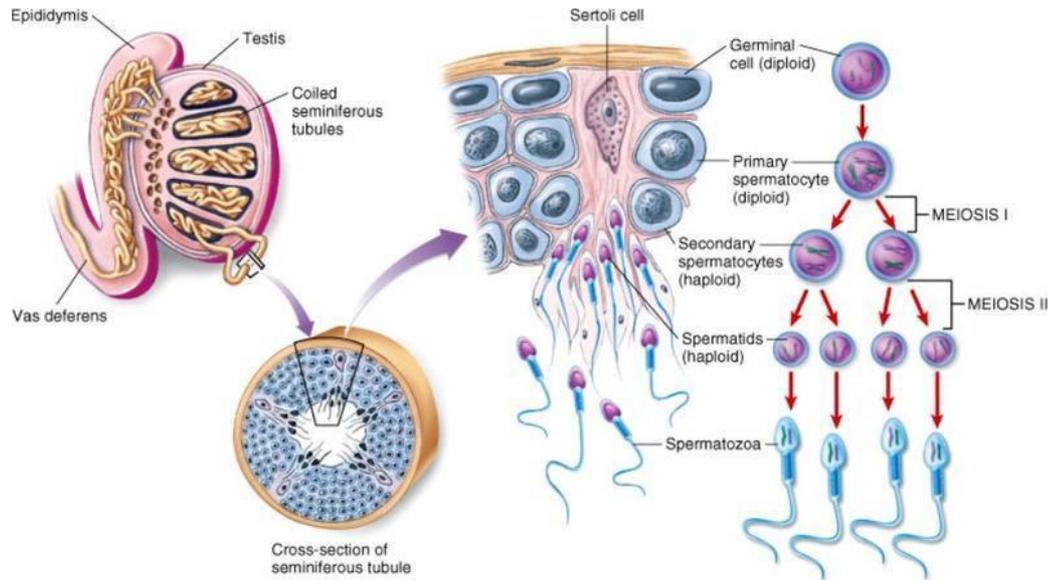
Setiap tubulus seminiferus dilapisi oleh epitel berlapis kubis dan panjangnya 30-70 cm. Panjang seluruh tubulus satu testis mencapai 250 m. Tubulus kontortus ini membentuk jalinan, tempat masing-masing tubulus berakhir buntu atau dapat bercabang. Pada ujung setiap lobulus, lumennya menyempit dan berlanjut ke dalam ruas pendek yang dikenal sebagai tubulus rektus, yang menghubungkan tubulus seminiferus dengan labirin saluran-saluran berlapis epitel yang berkelanjutan, yaitu rete testis. Rete ini, terdapat dalam jaringan ikat mediastinum, dihubungkan dengan kaput epididimis oleh 10-20 duktulus deferentes (Marliyati., 2016).



Gambar 2.7.

Tubulus Semineferus (Atlas Histologi).

Tubulus seminiferus dibatasi oleh suatu epitel germinal kompleks atau epitel seminiferus, yang merupakan modifikasi epitel berlapis kuboid. Epitel tersebut terletak di atas lamina basal yang tipis dan diluarnya diliputi oleh daerah khusus terdiri atas jaringan ikat fibrosa yang disebut jaringan *peritubular* atau pembatas terdiri dari banyak serat jaringan ikat, fibroblas yang pipih dan beberapa sel bersifat sebagai sel otot polos. Unsur-unsur mioid ini mempunyai "*junctional complex*" pada bagian sisi sel-sel di sampingnya yang menghambat, namun tidak seluruhnya, penyebaran makro molekul dari ruang intestinal ke epitel seminiferus. Diduga kontraksi sel-sel mioid ini dapat mengubah diameter tubulus seminiferus dan membantu gerakan spermatozoa sepanjang tubulus. (Leeson Roland, 1996). Tubulus seminiferus terdiri atas suatu lapisan jaringan ikat fibrosa, lamina basalis yang berkembang baik dan suatu epitel germinal kompleks, atau seminiferus (Marliyati., 2016).



Gambar 2.8

Spermtogenesis pada Tubulus Seminiferus

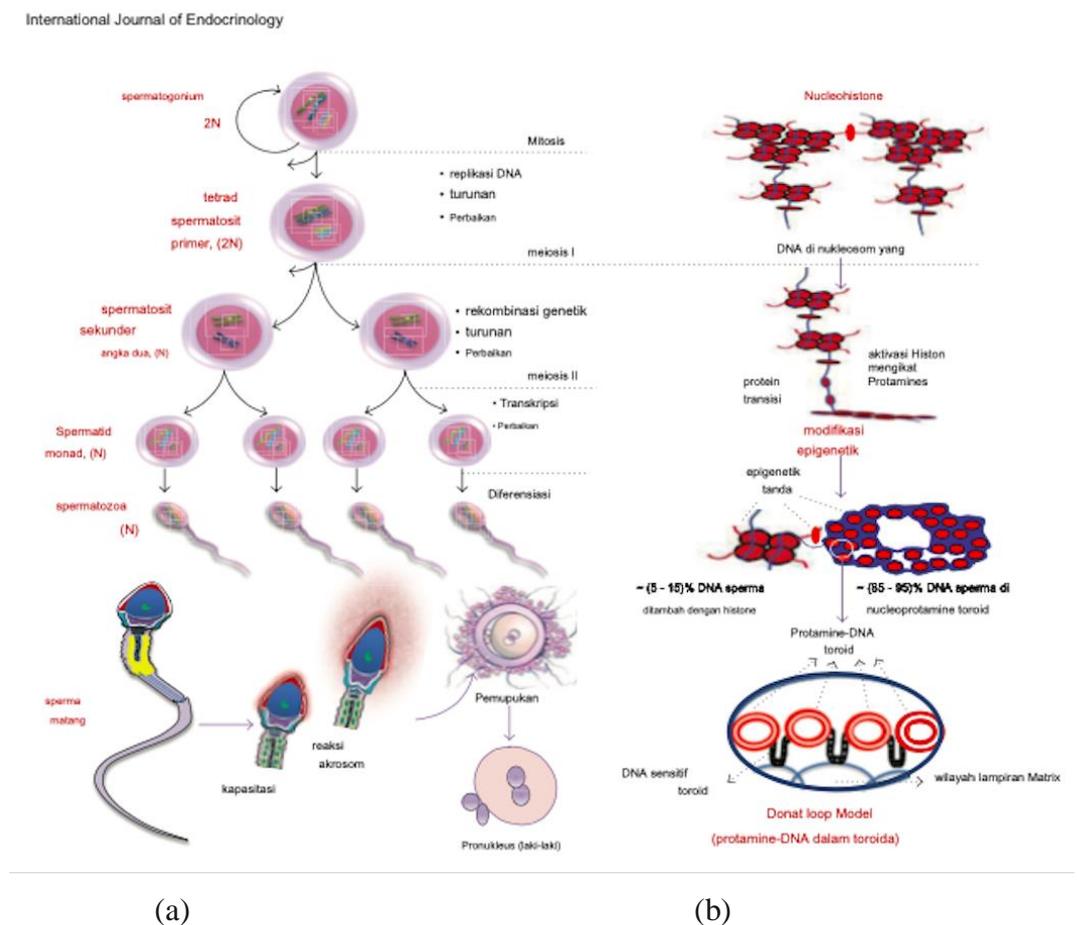
(Marliyati, 2016)

2.6 Hubungan Alkohol dengan DNA dan Protein

Identifikasi komprehensif dan kuantifikasi berbagai protein diekspresikan dalam sel dan jaringan menginformasikan informasi penting dan menarik ke dalam dinamika fungsi sel dan diferensiasi. Mencirikan protein dengan cara kedua analisis kualitatif dan kuantitatif dikenal sebagai proteomic. Proteome adalah spermatozoa berisi semua spermatozoa untuk bertahan hidup dan berfungsi dengan benar. Studi tentang protein spermatozoa sebenarnya diawali dengan penemuan luar biasa oleh Friedrich Miescher pada tahun 1874 Miescher mampu mengidentifikasi komponen dasar salmon spermatozoa disebut “protamine” yang ditambah dengan nuklein, yang dikenal sebagai DNA sesudahnya (MD Saidur Rahman dkk., 2013).

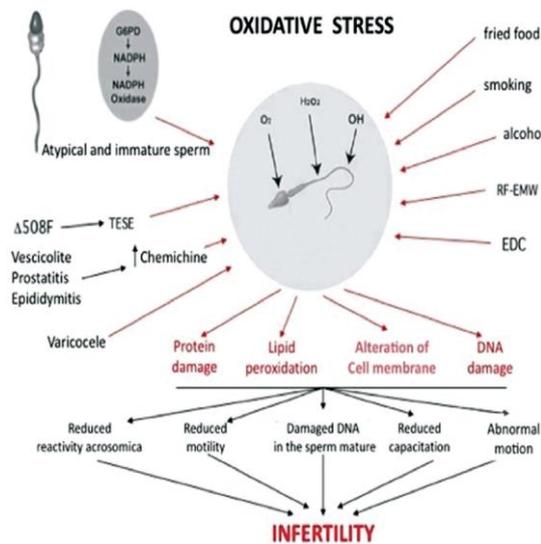
Berbagai jenis molekul, seperti gen, messenger RNA, microRNA, protein, metabolit atau kombinasi keduanya, dapat berfungsi sebagai biomarker. Meskipun pendekatan untuk penemuan dan pengembangan biomarker semakin cepat matang dan jumlah penemuan biomarker semakin meningkat, dalam ulasan oleh Kovac *et*

al, merangkum pendekatan genomik, proteomik, dan metabolomik yang paling signifikan untuk mengidentifikasi biomarker infertilitas pria. Protein adalah molekul yang paling menjanjikan untuk mengembangkan biomarker penyakit. Analisis protein seminal plasma (SP) atau spermatozoa dapat memberikan informasi mengenai keberadaan protein dan modifikasi pascatranslasi. Beberapa penelitian yang dilakukan pada 1980-an menghasilkan penemuan peran transferin, protein pengikat heparin (HBPs), protein diinduksi prolaktin (PIP), dan protein antimikroba kationik manusia (hCAP18) dalam spermatogenesis (Christina G,dkk., 2014).



Gambar 2.9: Skema diagram yang menunjukkan perubahan seluler, genetik, dan kromatin selama spermatogenesis. (a) gambar tersebut merupakan perubahan

seluler selama spermatogenesis ditambah dengan modifikasi genetik. Spermatid berpartisipasi dalam proses diferensiasi lain untuk menghasilkan spermatozoa matang. Spermatozoa mamalia menjalani kapasitasi pertama dan kemudian akrosom reaksi, yang secara kolektif memungkinkan spermatozoa menembus zona pelusida dan membran oosit plasma baik in vivo dan in vitro. (b) gambar menunjukkan kromatin perubahan yang menyebabkan transisi dari nukleohistone mamalia untuk nucleoprotamine. Selain itu, model *Donut Loop* telah dimasukkan pada akhir untuk mewakili struktur internal dari serat protamine-DNA di dalam toroida. Warna merah menunjukkan histon dan warna biru menunjukkan DNA (MD Saidur Rahman dkk., 2013).

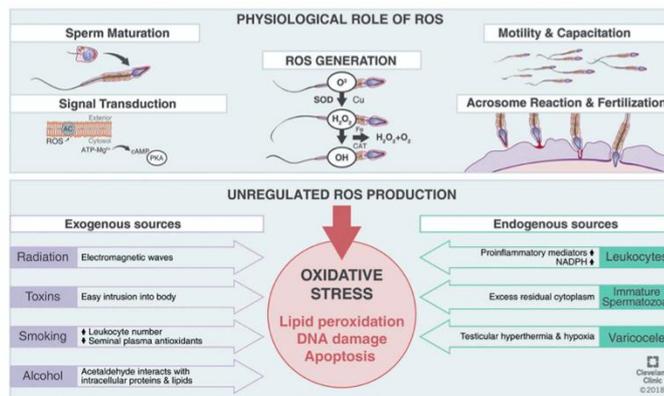


Gambar 2.10

Pengaruh oxidative stress terhadap alkohol.

Stres oksidatif mengakibatkan kerusakan endotel pembuluh darah dan menyebabkan mikroangiopati yang dapat mengganggu pemberian nutrisi melalui pembuluh darah ke jaringan - jaringan pembentuk spermatozoa sehingga tahapan spermatogenesis pada organ testis tidak sempurna. Testis dalam proses reproduksi

mempunyai dua fungsi utama yaitu memproduksi hormon dan spermatozoa kedua fungsi tersebut secara anatomi berlangsung terpisah yaitu hormon testosteron dihasilkan oleh sel Leydig, sedangkan sel spermatozoa dihasilkan oleh sel epitel tubulus seminiferus. Stres oksidatif juga dapat mengganggu jalur hypothalamus pituitary gonad axis sehingga mengalami gangguan maka tahapan spermatogenesis akan terganggu, menyebabkan produksi pengeluaran hormon menjadi tidak normal. Apabila sel-sel dan hormon pada testis spermatozoa berkurang, dan pada akhirnya berujung pada masalah infertilitas (Siera Adelati., 2016).



Gambar 2.11

Oxidative stress pada reproduksi pria (Sulagna dkk., 2019)

Stres oksidatif terjadi ketika produksi ROS berlebih melampaui kemampuan alami antioksidan untuk menetralkannya. Sebanyak 25-40% laki - laki infertil memiliki semen dengan jumlah ROS meningkat akibat proses kaskade peroksidasi lipid dan degenerasi makromolekul. Komposisi umum membrane sel spermatozoa dengan kemampuan antioksidan terbatas membuat sel sangat rentan terhadap stress oksidatif (Silvia, Triyana., 2015). Alkohol adalah pendukung generasi ROS dan juga mempengaruhi mekanisme pertahanan antioksidan. Asetaldehida, produk sampingan dari metabolisme etanol, dapat menghasilkan ROS dengan berinteraksi

dengan protein dan lipid, dengan demikian, merusak komponen seluler dan menurunkan persentase spermatozoa normal (Sulagna dkk., 2019).

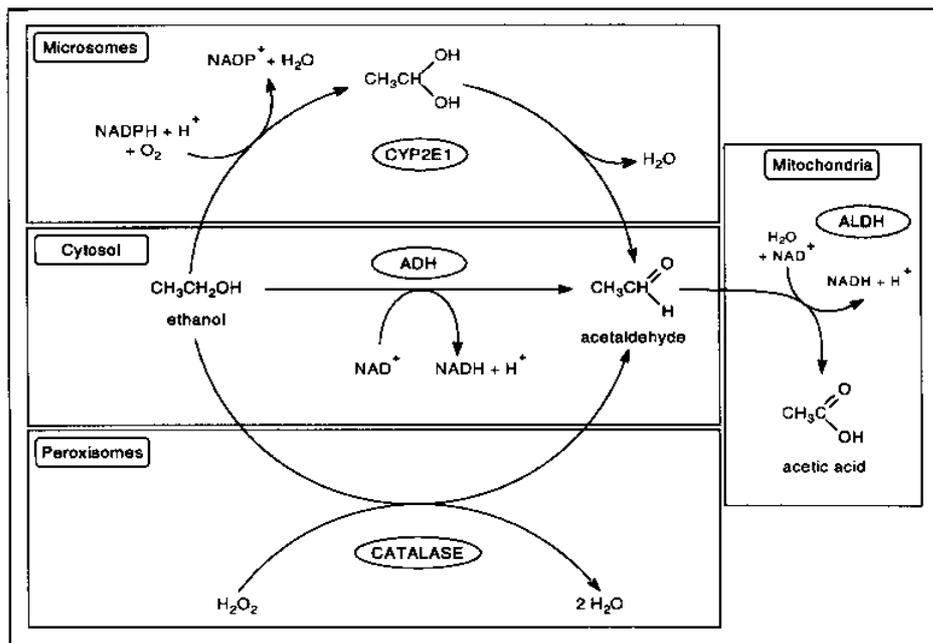
Hasil dari banyak penelitian menunjukkan bahwa toksisitas alkohol dipengaruhi oleh oksigen reaktif spesies (ROS), yang mengarah ke stres oksidatif. ROS sangat reaktif dan tidak memiliki target spesifik, hal ini dapat menyebabkan banyak lesi saat bereaksi dengan komponen seluler seperti asam nukleat, protein dan lipid peran penting dalam pengurangan potensi pembuahan sperma, karena spermatozoa memiliki kapasitas terbatas untuk memperbaiki kerusakan DNA. Lesi kromatin melalui oksidasi, nitrasi, halogenasi dan alkilasi basa, *interstrand* DNA spermatozoa yang cacat secara morfologis tidak memiliki bukti langsung, kami berhipotesis bahwa hubungan antara persentase sperma makrosefal dan konsumsi alkohol yang diamati dalam penelitian ini mencerminkan fragmentasi DNA yang disebabkan oleh ROS. ROS dapat menyebabkan spektrum yang luas ikatan silang dan ikatan silang DNA-protein. Untuk reaksi spontan atau proses perbaikan, lesi ini dapat dikonversi menjadi pemutusan DNA (fragmentasi DNA), menghasilkan dekondensasi kromatin. Studi sebelumnya telah melaporkan kromatin yang serupa kerusakan pada spermatozoa di tikus yang mengkonsumsi alkohol. Dekondensasi kromatin dan fragmentasi DNA dilaporkan berkorelasi positif dengan persentase sperma makrosefal dan tipe lainnya (Felicja Lwow., 2017).

Alkohol bersifat toksik untuk testis dan menyebabkan berbagai macam gangguan seperti menurunnya jumlah sperma dan motilitas pada sperma. Selain itu, penelitian Van Thiel dkk tahun 1975 dan 1980 menunjukkan bahwa paparan etanol dalam waktu lama dapat menurunkan kadar testosteron plasma dan menyebabkan

atrofi testikular. Inti DNA sperma pada mamalia mengelilingi molekul protamin selama spermiogenesis di testicular (Ali Reza Talebi., 2010).

ROS dapat menyerang asam nukleat dan protein serta menyebabkan permeabilisasi membrane mitokondria, sehingga menyebabkan kematian sel. Oleh karena itu, produksi ROS yang dimediasi oleh CYP2E1 dapat secara langsung merusak banyak komponen seluler dan mitokondria termasuk DNA mitokondria dan sitokrom (J.Aubert, K.Begrache, 2011).

Pada spermatozoa, mitokondria terletak pada daerah *midpiece*, terdiri atas 11-13 gila (masing- masing girus ada 2 mitokondria) yang tersusun secara heliks, melingkari bagian pusat *midpiece* ekor (Gambar 2.12). Mitokondria yang tersusun heliks ini bertanggung jawab menyediakan energi bagi motilitas spermatozoa. Gangguan pada mitokondria, baik struktur maupun genomnya dapat mengganggu motilitas sperma. Mundy *et al.* (1995) membuktikan bahwa pada subjek astenozoospermia, daerah *midpiece* yang berisi mitokondria secara bermakna lebih pendek dibanding subjek normal, sedangkan menurut Cardullo dan Baltz (1991) ada korelasi antara volume mitokondria, panjang sperma dan frekuensi gerak flagela. Menurunnya motilitas dapat disebabkan oleh gangguan gen-gen yang terlibat dalam pembentukan ekor dan fungsi axonema ekor spermatozoa (Tri Panjiasih 2010).

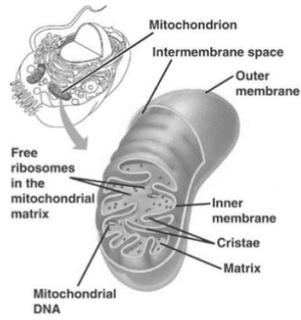


Gambar 2.12

Mekanisme Alkohol dan Mitokondria

(Sri Utamai, 2010)

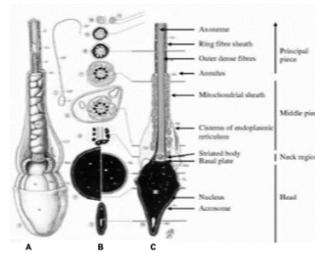
Molekul histon yang tidak terdapat pada mtDNA menyebabkan kurangnya sistem repair. mtDNA secara fisik berhubungan dengan membran dalam, memungkinkan radikal oksigen mutagenik (ROS) yang dibebaskan dari produk OXPHOS lebih meningkatkan mutasi mtDNA. Berbagai tipe mutasi gen termasuk delesi, mutasi titik, polimorfisme, baik pada mtDNA maupun nDNA sperma, disebabkan oleh ROS. Stres oksidatif (OS) merupakan suatu keadaan yang mana produksi ROS lebih tinggi dari tingkat antioksidan. Faktor-faktor fisik, kimiawi, dan biologis yang merusak mitokondria, akan meningkatkan produksi ROS di atas tingkat antioksidan dan ROS juga akan merusak enzim-enzim antioksidan. Letak mtDNA pada matriks yang berdekatan dengan rantai elektron transpor (ETC) (Sri Utami., 2010).



Gambar 1. Struktur Mitokondria.

Keterangan : Mitokondria diselaputi oleh dua membran yaitu membran luar dan membran dalam. Membran dalam membentuk struktur yang melipat ke dalam disebut krista. Mitokondria memiliki dua kompartemen yaitu matriks dan ruang antar membran. Membran luar dapat dilalui ion atau molekul kecil, sedangkan membran dalam bersifat impermeabel. Pada membran dalam terdapat kompleks protein rantai respirasi, ATP sintase dan transporter

(Zamboni, 1991; Holstein *et al.*, 2003) (Gambar 2).

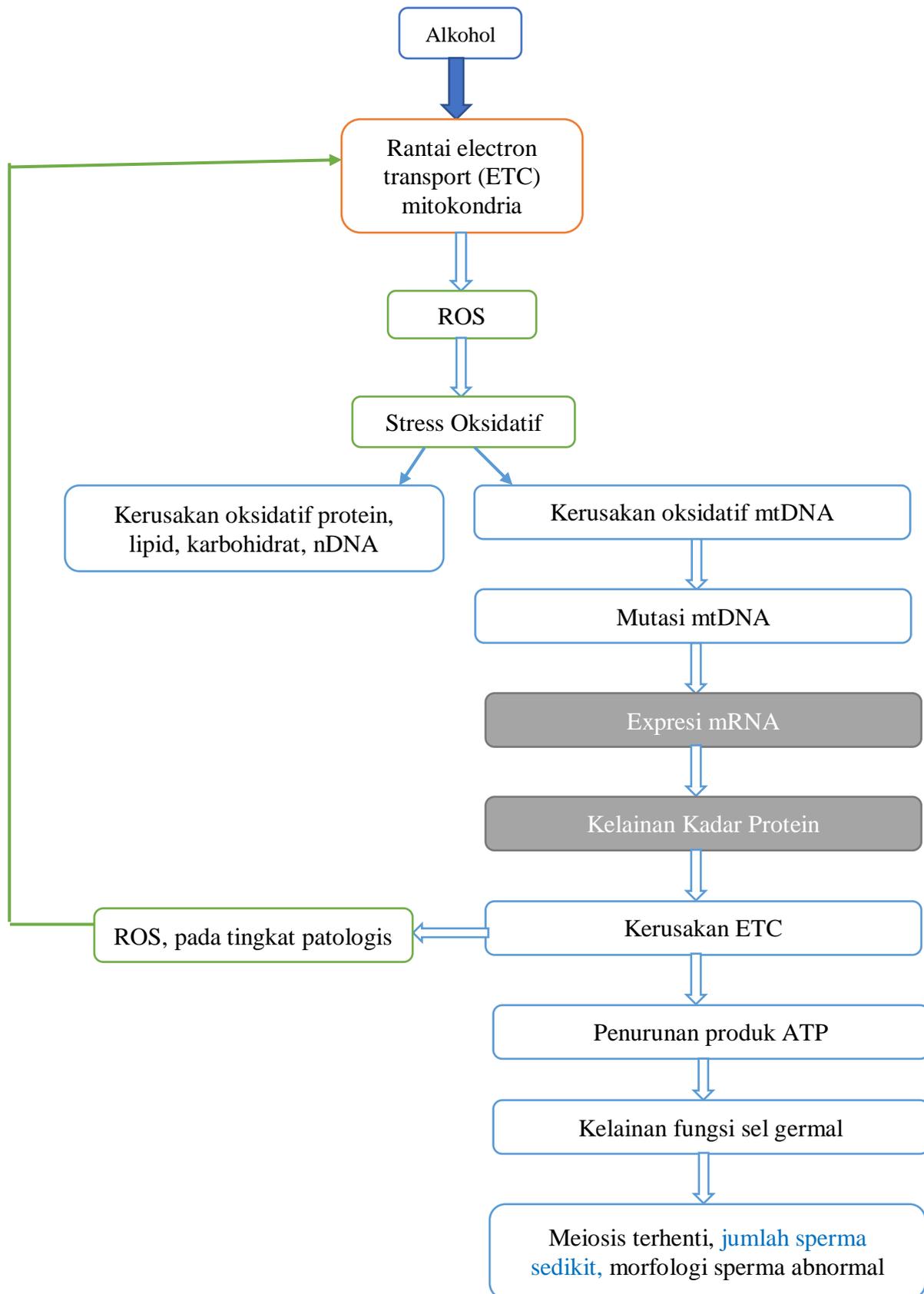


Gambar 2. Spermatozoa manusia.

Keterangan : Spermatozoa dengan tudung akrosom, nukleus, selubung mitokondria dan mitokondria yang tersusun heliks di daerah midpiece (A). Penampang melintang bagian spermatozoa, mulai bagian kepala, leher dan ekor (B). Gambar skematik penampang longitudinal spermatozoa yang didasari mikrografi elektron (C)(Holstein *et al.*, 2003).

Gambar 2.13

Peran Genetik DNA mitokondria (mtDNA) Pada Motilitas Spermatozoa (Tri Panjiasih, 2010)



Gambar 2.14.

Peran Alkohol pada Kelainan ekspresi Protein terhadap Infertilitas Pria (Sri Utami.,2010).

Beberapa penelitian yang menggunakan minuman beralkohol seperti pada judul penelitian berikut penurunan jumlah sel spermatogenik setelah pemberian alkohol peroral secara kronis pada tikus putih (*Rattus.sp*) dengan tujuan menghitung berat testis dan menghitung jumlah sel-sel spermatogenik. Penelitian tersebut sama dengan penelitian kami dengan menggunakan alkohol bedanya pada penelitian kami menghitung jumlah spermatozoid, ekspresi mRNA dan kadar protein CYP2E1.

Berikut penelitian yang menggunakan alkohol seperti judul berikut pengaruh minuman beralkohol terhadap jumlah lapisan sel spermatogenik dan berat vesikul seminalis mencit dengan tujuan menentukan berat kelenjar vesikula menentukan jumlah lapisan sel spermatogenik, berbeda dengan penelitian kami menghitung jumlah spermatozoa. Penelitian ini juga menggunakan alkohol dengan judul Pengaruh pemberian cap tikus terhadap kualitas spermatozoid Wistar jantan dengan tujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian cap tikus terhadap kualitas sperma Wistar jantan, berbeda dengan penelitian kami menghitung jumlah spermatozoa. Efek pemberian alkohol 40% Peroral terhadap ketebalan lapisan sel spermatogenik tubulus seminiferus tikus Wistar jantan dengan tujuan untuk mengukur ketebalan lapisan sel spermatogenik menggunakan mikroskop.

Pemberian minyak jintan hitam terhadap motilitas dan jumlah spermatozoa terhadap tikus Sprague dauley jantan setelah paparan minuman Sopi, judul penelitian ini berbeda dengan penelitian kami, kami menggunakan tikus Wistar dan menghitung jumlah

Berikut beberapa penelitian menggunakan alkohol dengan tujuannya masing-masing untuk melihat perbedaan tujuan dengan penelitian Sopi Mayang yang kami meneliti tentang jumlah Sperma, ekspresi CYP2E1 dan kadar protein CYP2E1

CYP2E1 Tesis Expression and Alcohol Mediated Changes Of Rat Spermatogenesis Indicators and Type I Collagen dengan tujuan untuk menyelidiki korelasi antara gangguan spermatogenesis dan kandungan mRNA CYP2E1 pada testis tikus dengan alkoholisme eksperimental atau diabetes tipe 1.

Cytochrome P450 enzymes in the brain: emerging evidence of biological significance dengan tujuan untuk memahami signifikansi fungsional dari CYP2E1 di Otak.

Regulasi sitokrom ekspresi P450 2E1 oleh Etanol : Peran Stress Oksidatif yang dimediasi jalur PCK/JNK/SPI untuk menguji peran CYP2E1 dalam implikasi klinis sehubungan dengan toksisitas *neuroinflammatory* akibat mengkonsumsi alkohol.

CYP2E1 in alcoholic and Non-Alcoholic Liver Injury. Role of ROS, reactive intermediates and Lipid Overload, dengan tujuan untuk mereduksi dioksidasi secara efektif menjadi spesies radikal yang menyebabkan cedera pada hati., kemampuannya dan untuk mengaktifkan prokarsinogen dan mengubah obat-obat tertentu.

Regulation of cytochrome P450 2e1 expression by ethanol: role of oxidative stress-mediated pck/jnk/sp1 pathway, dengan tujuan peningkatan aktivitas CYP2E1 pada penyakit hati berlemak nonalkohol (NAFLD) dianggap menyebabkan kelebihan produksi spesies oksigen reaktif, yang pada gilirannya memicu stres oksidatif, peradangan nekrotik, dan fibrosis. Pada tahun 1997, kelompok Avadhani melaporkan untuk pertama kalinya keberadaan CYP2E1 di mitokondria hati tikus,

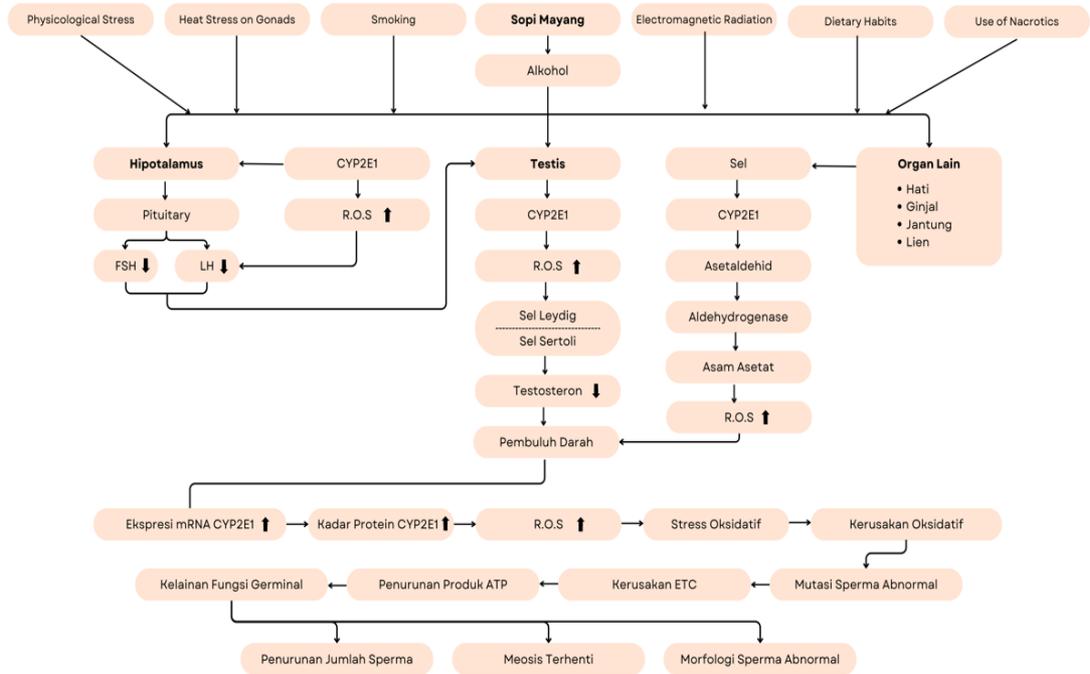
dan penyelidikan selanjutnya oleh kelompok lain menegaskan bahwa CYP2E1 mitokondria (mtCYP2E1) dapat ditemukan dalam model percobaan yang berbeda.

Pengaruh etanol pada kondensasi kromatin dan integritas DNA spermatozoa epididymis pada tikus dengan tujuan untuk mengevaluasi pengaruh konsumsi etanol terhadap parameter sperma dan integritas kromatin spermatozoa yang di ambil dari kauda epididymis tikus.

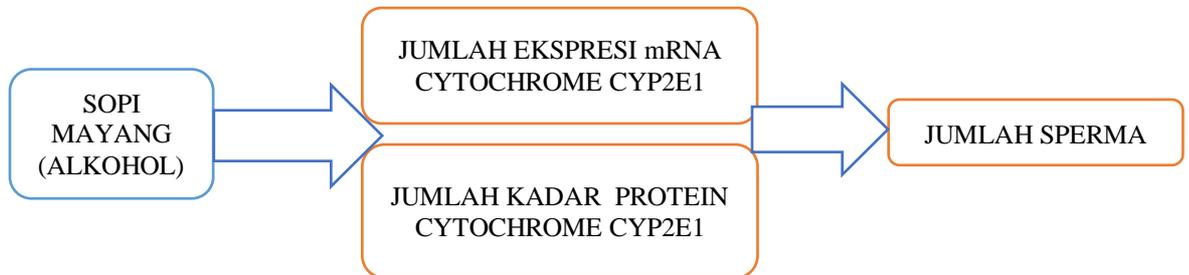
Efek penggunaan etanol dalam dosis berbeda pada parameter sperma, struktur kromatin dan apoptosis pada tikus dewasa dengan tujuan untuk mengevaluasi efek dari berbagai dosis etanol pada parameter sperma, struktur kromatin dan apoptosis pada tikus dewasa.

BAB III
KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS
PENELITIAN DAN DEFINISI OPERASIONAL

3.1 Kerangka Teori



3.2 Kerangka Konsep



Keterangan :

Variabel Bebas. : Sopi Mayang

Variabel Tergantung : Jumlah Sperma

Variabel Antara : Jumlah Ekspresi mRNA CYTOCROME P450 CYP2E

Jumlah Kadar Protein CYTOCROME P450 CYP2E1

3.3 Hipotesis Penelitian

- 1) Terdapat peningkatan jumlah ekspresi mRNA sitokrom P450 CYP2E1 pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan dengan dosis pemberian Sopi per oral 2,7ml/200g BB/hr, 4,05 ml/200g BB/hr, 5,4 ml/200g BB/hr selama 60 hari.
- 2) Terdapat peningkatan jumlah kadar protein CYP2E1 pada pemberian Sopi dengan dosis Sopi per oral 2,7ml/200g BB/hr, 4,05 ml/200g BB/hr, 5,4 ml/200g BB/hr selama 60 hari.
- 3) Terdapat penurunan jumlah spermatozoid pada pemberian Sopi dengan dosis Sopi per oral 2,7.ml/200g BB/hr, 4,05 ml/200g BB/hr, 5,4 ml/200g BB/hr selama 60 hari.

3.4 Definisi Operasional

3.4.1 Definisi Operasional Variabel Penelitian

Tabel 3.1 Definisi Operasional

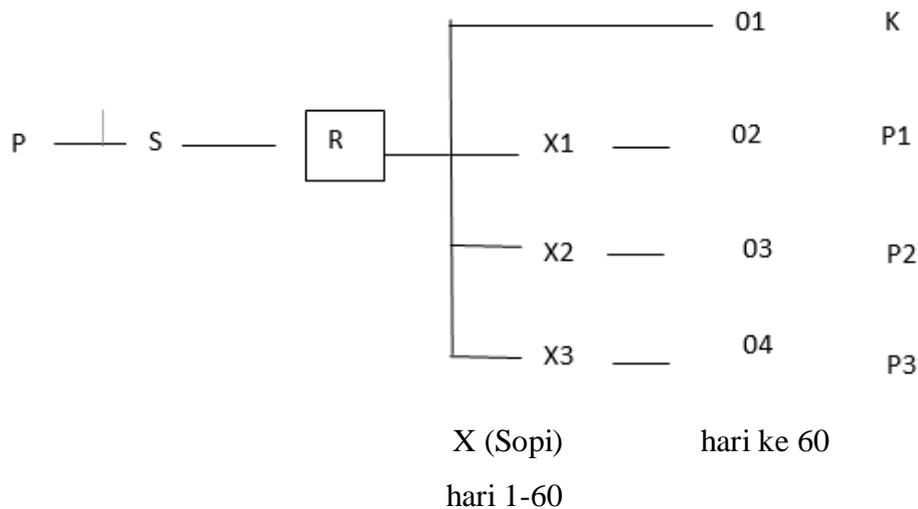
No	Jenis Variabel	Definisi	Alat Ukur	Cara pengukuran	Hasil Ukur	Jenis Data
1	Variabel bebas : Dosis sopi mayang	Dosis yang diberikan ke hewan coba dibagi 4 kelompok Kelompok kontrol 2ml Aquadest, Perlakuan 1 Sopi 2,7, Perlakuan 2 4,05, Perlakuan 3 5,4 ml/200g BB/hr dalam bentuk cairan selama 60 hari secara sonde		Larutan diambil dengan spuit untuk P1 2,7 ml/200g BB/hr, P2 untuk 4,05 ml/200g BB/hr, dan P3 untuk 5,4 ml./200g BB/hr.	MI	Rasio

2	Variabel tergantung : Jumlah Sperma	Jumlah Sperma yang diambil dari sedian epididimis hewan coba	Improved Neubauer	Jumlah sperma di hitung dalam kotak hitung dibawah mikroskop dengan pembesaran 400x rumus $C = (n \times 5) \times 10^4$	Jumlah Sperma/ Mm^3 Interprestasi kadar protein dalam kosentrasi Mg/ml	Rasio
3	Variabel antara Ekspresi mRNA sitokrom P450 CYP2E1	Perubahan ekspresi mRNA meningkat pada sitokrom P450 CYP2E1	PCR	Pengambilan darah tikus putih jantan, di pembuluh darah Vena pada ujung ekor tikus dengan menggunakan metode real time PCR		Rasio
4	Variabel antara Kadar Protein CYP2E1	Perubahan kadar protein CYP2E1	Elisa	Pengambilan darah tikus putih jantan di pembuluh darah Vena pada ujung ekor tikus dengan menggunakan metode Elisa	Terjadi peningkatan ataupun penurunan ekspresigen berdasarkan nilai $2^{-\Delta\Delta Ct}$	Rasio

BAB IV METODE PENELITIAN

4.1 Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini adalah *eksperimental laboratoris*, dengan menggunakan rancangan *The Randomized Post-test Only Control Group Design* (Zainuddin, 2011). Rancangan penelitian ini disusun sebagai langkah untuk melihat gambaran histologi sperma, perubahan ekspresi mRNA *Cytochrome* CYP2E1 dan kadar protein *Cytochrome* P450 CYP2E1, setelah pemberian minuman beralkohol Sopi jenis etanol dan dosis yang berbeda-beda, yang diberikan pada kelompok perlakuan dan dibandingkan dengan kelompok kontrol. Secara skematik rancangan penelitian tersebut dapat digambarkan sebagai berikut (Zainuddin, 2011).



Gambar 4.1 Rancangan penelitian

Keterangan :

- P : Populasi
- S : Sampel
- R : Randomisasi
- X1 : Pemberian Sopi 2,7 ml/200gram BB/hr per oral
- X2 : Pemberian Sopi 4,05 ml/200gram BB/hr per oral
- X3 : Pemberian Sopi 5,4 ml/200gram BB/hr per oral
- O1 : Pengamatan hasil pada kelompok K

- O2. : Pengamatan hasil pada kelompok P1
 O3 : Pengamatan hasil pada kelompok P2
 O4. : Pengamatan hasil pada kelompok P3
 K : Kelompok kontrol pemberian
 P1 : Kelompok perlakuan 1 pemberian dosis 2,7 ml/200gram BB/hr per oral
 P2 : Kelompok perlakuan 2 pemberian dosis 4,05 ml/200gram BB/hr per oral
 P3 : Kelompok perlakuan 3 pemberian dosis 5,4 ml/200gram BB/hr per oral

4.2 Populasi, Sampel, Besar Sampel

4.2.1 Populasi

Populasi pada penelitian ini adalah tikus putih *Rattus norvegicus* galur wistar jantan, umur 16 -18 minggu (Tikus dewasa), berat badan 180 - 200 gram dan sehat yang diperoleh dari unit hewan coba Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Makassar.

4.2.2 Sampel

Sampel pada penelitian ini adalah tikus putih jantan *Strain Wistar (Rattus Norvegicus)* umur 16-18 minggu, berat badan 180-200 gram.

4.2.3 Besar sampel

Penentuan besar sampel berdasarkan rumus dari Steel and Torrie $(K-1)(r-1) \geq 20$, dimana K = Banyaknya kelompok dan r = jumlah replikasi ,(Steel and Torrie 1991).

$$K = 4 \rightarrow (4-1)(r-1) \geq 20$$

$$3(r-1) \geq 20$$

$$3r - 3 \geq 20$$

$$3r \geq 17$$

$$r \geq 17 / 3$$

$$= 7 \text{ ekor}$$

Jadi, besar sampel minimal pada penelitian ini adalah 7 ekor tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) *Strain Wistar* pada setiap kelompok. Pada penelitian ini besar sampel per kelompok adalah 10 ekor tikus putih jantan, total sampel 40 ekor tikus putih.

a. Kriteria sampel

- 1) Kriteria inklusi :
 - a) Tikus wistar (*rattus novergicus*) jantan jenis albino
 - b) Umur 16-18 minggu
 - c) Berat 180-200 gram
 - d) Selama adaptasi 1 minggu tidak sakit, aktivitas dan tingkah laku normal
- 2) Kriteria eksklusi :
 - a) Selama adaptasi 1 minggu tikus tampak sakit (gerakan tidak aktif)
 - b) Tikus mati selama eksperimen berlangsung (drop out)

4.3 Variabel

4.3.1 Variabel penelitian

- 1) Variabel independet : Sopi Mayang dengan variasi dosis 2,7 ml/200gram BB/hr, 4,05 ml/200gram BB/hr, 5,4 ml/200gram BB/ hr, dengan dosis pemberian 2 kali dalam sehari.
- 2) Variabel dependent : Jumlah Sperma
- 3) Variabel Antara : Jumlah ekspresi mRNA CYP2E1, jumlah Kadar Protein Sitoktom P450 CYP2E1.

4.4 Bahan Penelitian

4.4.1 Bahan perlakuan

Bahan-bahan yang akan digunakan pada penelitian ini yaitu:

- a. Sopi dengan variasi dosis 2,7 ml/200gram BB/hr, 4,05 ml/200gram BB/hr, dan 5,4 ml/200gram BB/hr.
- b. air kemasan
- c. aquadest

d. pellet : Makanan yang diberikan pada hewan coba yang sesuai dengan standar pakan Indonesia (Standar Nasional Indonesia / SNI) oleh PT.Charon Pokphand, Sidoarjo, Indonesia (Hidayaturrahmi, 2014). Komposisi pellet sebagai berikut :

- 1). Kadar air : 13% (maksimal)
- 2). Protein : 13-15%
- 3). Lemak : 3%
- 4). Serat : 8% (maksimal)
- 5). Abu : 6% (maksimal)
- 6). Kalsium : 0,8% (minimal)
- 7). Fosfor : 0,6% (minimal)

4.4.2 Bahan Pemeriksaan Kadar Protein CYP2E1 :

1. Elisa kit CYP2E1
2. Tip 20-200 ul
3. Reservoir
4. Aquadest
5. Tisu

4.4.3 Bahan Pemerikssan Ekspresi mRNA CYP2E1 :

1. Sampel darah hewan coba
2. L2 dan L6
3. Guanidium
4. Diatom
5. Triton
6. Mikrosentrifuge 1,5ml
7. Tip 0,1-10ml
8. Tabung untuk menampung darah Vena dari ekor tikus
9. Spoit 1 cc

10. Handskun

4.4.4 Bahan pemeriksaan

- a. eter untuk pembiusan
- b. NaCl fisiologis untuk mencuci testis
- c. testis tikus putih jantan (*Rattus norvegicus strain wistar*)

4.5 Instrument Penelitian

4.5.1 Alat untuk pemeliharaan tikus putih jantan

- a. kandang tempat pemeliharaan
- b. botol untuk tempat minum
- c. tempat makan
- d. sonde (feeding tube) no.8
- e. spuit 10 cc untuk memasukkan bahan coba dalam sonde

4.5.2 Alat untuk pembiusan dan pengambilan jaringan testis

- a. toples dengan tutup untuk pembiusan
- b. botol kecil dengan tutup untuk fiksasi jaringan
- c. alat bedah minor

4.5.3 Alat pembuatan dan pengamatan Sperma

- a. gunting kecil
- b. *object glass dan deck glass*
- c. gelas pengaduk
- d. pipet lekosit
- e. Natrium klorida (NaCl) fisiologis 0,9%
- f. *water bath*
- g. alat penghitung kotak-kotak kamar hitung Neubauer
- h. mikroskop

4.6 Lokasi dan Waktu Penelitian

4.6.1 Lokasi Penelitian

Penelitian ini telah dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Makassar.

4.6.2 Waktu penelitian

Penelitian ini akan dilakukan pada bulan November 2021-2022

Tabel 4.1 Waktu penelitian

Bulan	November	Desember	Januari	Februari	Maret
Minggu	I II III IV	V VI VII	VIII IX X	XI XII XIII	XIV
URAIN					
Persentasi proposal	x				
Persiapan penelitian		x			
Perlakuan hewan coba			x		
Pengambilan Sperma					x
Pembuatan ekspresi gen CYP2E1real time PCR					x
Pembuatan kadar protein Enzim sitokrom P450					
Pengambilan data					x
Pengolahan dan analisis data					x

Penyusunan					×
Disertasi					
Disertasi					×

4.7 Prosedur Pengumpulan Data

4.7.1 Dosis pemberian Sopi Mayang

Minuman Sopi Mayang mempunyai konsentrasi alkohol berkisar antara 4-5% per ml (Mirtha.,dkk., 2017). Sesuai dengan wawancara dengan masyarakat yang mengkonsumsi Sopi, didapati bahwa dosis yang digunakan 150 ml dengan berat badan 70 kg. Dosis yang digunakan jika dikonversi ke tikus putih jantan dengan : (Laurence dan Bacharah, 1964).

Berat badan tikus putih jantan : 200 gram, Nilai konversi : 0, 018, Dosis yang dikonsumsi manusia : 150 ml, Pemberian dosis kelompok P1 yaitu : $200g = 0,018 \times 150 \text{ ml} = 2,7 \text{ ml}$, Jadi pemberian dosis untuk kelompok perlakuan ke 1 yaitu 2,7 ml/200g BB/hr. Kadar alkohol dari $2,7\text{ml} \times 5\% = 13,5\%$, Pemberian Dosis 2 kali sehari, Pemberian dosis kelompok P2 yaitu : dosis kelompok perlakuan ke 1 yaitu 2,7 ml dibagi dua menjadi 1,35, sehingga $2,7 \text{ ml} + 1,35 = 4,05 \text{ ml}$, jadi pemberian dosis untuk kelompok perlakuan ke 2 yaitu 4,05 ml/200gram BB/hr. Kadar alkohol dari $4,05 \text{ ml} \times 5\% = 20,25\%$,Pemberian Dosis 2 kali sehari, Pemberian dosis kelompok P3 yaitu :dosis kelompok perlakuan ke 1 yaitu $2,7 \text{ ml} \times 2 = 5,4 \text{ ml}$, jadi pemberian dosis untuk kelompok perlakuan ke 3 yaitu 5,4 ml/200gram BB/hr. Kadar alkohol dari $5,4 \text{ ml} \times 5\% = 27\%$, Pemberian Dosis 2 kali sehari. Dosis semua kelompok perlakuan adalah sebagai berikut :

- 1) Tikus putih jantan dengan pemberian aquadest 2 ml/200gram BB/hr per oral selama 60 hari.
- 2) Tikus putih jantan dengan pemberian Sopi 2,7 ml/200gram BB/hr per oral selama 60 hari.
- 3) Tikus putih jantan dengan pemberian Sopi 4,05 ml/200 gram BB/hr per oral selama 60 hari
- 4) Tikus putih jantan dengan pemberian Sopi 5,4 ml/200gram BB/hr per oral selama 60 hari

(Laurence dan Bacharah, 1964).

4.7.2 Persiapan hewan coba

Sebelum diberikan perlakuan, hewan coba diaklimatisasi selama 1 minggu dalam kondisi laboratorium, di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Makassar. Hewan coba dipelihara dalam kandang, dilengkapi dengan tempat minum dan makan. Ukuran kandang diperhitungkan karena mengingat kebebasan bergerak bagi hewan coba. Untuk luas kandang mengikuti rumus :

$$A' = n (0,7 W' + 6 W')$$

Keterangan : A' = Luas kandang (cm^2)

W' = berat hewan (gram)

N = jumlah hewan

Makanan tikus putih menggunakan makan standar dan minum air kemasan.

4.7.3 Perlakuan hewan coba

Tikus putih dibagi secara acak menjadi 4 kelompok

- a. Kelompok K : Kelompok kontrol yang diberi aquadest 2 ml/200gram BB/hr per oral selama 60 hari.
- b. Kelompok P1 : Kelompok perlakuan yang diberi Sopi 2,7 ml /200gram BB/hr per oral selama 60 hari

- c. Kelompok P2 : Kelompok perlakuan yang diberi Sopi 4,05 ml /200gram BB/hr/ per oral selama 60 hari.
- d. Kelompok P3 : Kelompok perlakuan yang diberi Sopi 5,4 ml/200gram BB/ hr/ per oral selama 60 hari.

Masing-masing kelompok terdiri dari 10 ekor tikus putih jantan umur 18 minggu dengan berat badan 200 gram. Sopi diberikan 2 kali/ hari pada waktu yang sama. Cara pemberian per oral dengan menggunakan sonde. Perlakuan ini diberikan selama 60 hari, mengingat siklus tubulus seminiferus adalah 16 hari sehingga diharapkan dalam waktu 60 hari sudah terlihat hasil yang diinginkan.

Teknik penyondean.

Teknik penyondean yang dilakukan merupakan teknik pemberian suatu bahan secara oral. Teknik ini bahan dimasukkan ke dalam lambung dengan menggunakan sonde. Cara yang dilakukan untuk penyondean yaitu : tikus dipegang dengan menggunakan tangan kiri, kemudian posisinya ditelentangkan, tangan kanan memegang sonde yang berisi bahan cairan sopi sesuai dosis, selanjutnya selang sonde dimasukkan ke dalam lambung dan isinya dikeluarkan dengan menekan perlahan-lahan agar tidak ada bahan yang tumpah sehingga pemberian dosis sesuai dengan yang diharapkan. Setelah penyondean selesai tikus kemudian diletakkan kembali ke kandangnya masing-masing.

4.7.4 Pembiusan

Pembiusan dilakukan dengan menggunakan eter. Tikus putih jantan dimasukkan ke dalam toples kaca dan ditutup dengan kaca, kemudian larutan eter di teteskan kedalam botol tersebut. Tikus diangkat dari toples jika sudah tidak bergerak lagi 1 menit setelah eter di teteskan) kemudian diletakkan di papan bedah untuk pengambilan jaringan testis.

4.7.5 Pengambilan jaringan testis

Tikus putih diletakkan diatas meja bedah dalam posisi terlentang dengan keempat anggota gerak difiksasi. Testis diambil dengan cara membuka skrotum. Testis diikat dengan memotong duktus epididymis yang berbatasan dengan testis kemudian testis dibersihkan dari jaringan ikat dan lemak serta pembungkusnya, dan setelah itu seluruhnya segera dimasukkan ke dalam larutan fiksatif dan dilabelisasi.

4.7.6 Pengambilan Spermatozoid

Spermatoza diperoleh dengan cara pemotongan 0,5 cm cauda epididymis, dimasukkan ke dalam gelas arloji yang berisi 1 ml natrium klorida (NaCl) fisiologi dengan gunting kecil hingga halus dan diaduk dengan gelas pengaduk. Larutan ini disebut suspense spermatozoa (Modifikasi dari First, 1991). Suspensi sperma dihisap dengan pipet leukosit sampai tanda 1. Pipet yang telah berisi suspense spermatozoa kemudian diencerkan dengan larutan NaCl fisiologis 0,9% sampai tanda 11, kemudian pipet dikocok rata. Sebelum menghitung spermatozoa, terlebih dahulu beberapa tetes campuran spermatozoa dibuang agar yang terhitung nanti adalah bagian yang benar-benar mengandung spermatozoa homogeny. Campuran spermatozoa dimasukkan ke dalam kotak-kotak kamar hitung Neubauer. Jumlah spermatozoa kotak dihitung di bawah mikroskop dengan pembesaran 400x menggunakan rumus, $C=(n \times 5) \times 10^4 \times \text{pengenceran/ml}$. Hasil perhitungan merupakan jumlah spermatozoa dalam mm^3 suspensi. Viabilitas dan abnormalitas spermatozoa diperiksa dengan cara pewarnaan eosin 2%. Pada gelas objek, satu tetes suspensi sperma ditambah satu tetes eosin, kemudian dibuat sediaan hapus. Pengamatan sediaan dilakukan di bawah mikroskop dengan pembesaran 400x dan dihitung dengan menggunakan cunter. Penghitungan dilakukan pada 200 spermatozoa, spermatozoa hidup tidak berwarna, sedang spermatozoa yang mati kepalanya berwarna merah oleh eosin. Hasil pengamatan spermatozoa hidup dan abnormal dinyatakan dalam persen (%) (Adrien Jems dkk., 2014).

4.8 Pemeriksaan Kadar Protein CYP2E1 dan ekspresi mRNA CYP2E1 dengan metode Real Time PCR.

a. Persiapan Sampel Kadar Protein CYP2E1

1. Persiapan sampel:

- Tabung: jika serum gunakan vacutainer tutup merah, untuk plasma gunakan vacutainer tutup ungu. Sentrifus pada kecepatan 1.000 xg selama 15 menit. Pindahkan supernatan (cairan bagian atas) ke dalam tabung 1,5 mL.
- Hindari beku-cair dengan cara *aliquot* menjadi beberapa tabung.
- Penyimpanan: suhu 2-8°C maksimum 7 hari, suhu -20 °C maksimum 1 bulan, dan suhu -80 °C maksimum 6 bulan.

2. Persiapan reagen:

- Larutan standar
Biarkan botol standar pada suhu ruang selama 15 menit. Sentrifus selama 10.000 xg selama 1 menit. Tambahkan 1 mL *reference standard and sampel diluent* (250 ng/mL) ke dalam botol standar, biarkan selama 10 menit. Buat dilusi berseri hingga diperoleh konsentrasi standar 250 ng/mL, 125ng/mL, 62,5ng/mL, 31,25ng/mL, 15,625 ng/mL, 7,8125 ng/mL, 3,906ng/mL dan 0 ng/mL; volume akhir 500 µL.
- Larutan *biotinylated detection antibody*
Dilusi sebanyak 100X dengan cara memipet 100 µL *biotinylated detection antibody concentrated* ke dalam tabung 15 mL, kemudian tambahkan pelarutnya sebanyak 9.900 µL. Homogenkan menggunakan maxi mix II.

- Larutan *HRP conjugate*
Dilusi sebanyak 100X dengan cara memipet 100 μL *HRP conjugated concentrated* ke dalam tabung 15 mL, kemudian tambahkan pelarutnya sebanyak 9.900 μL . Homogenkan menggunakan maxi mix II.
- Larutan *wash buffer IX*
Dilusi sebanyak 25X dengan cara memipet 2 mL *wash buffer concentrated 25X* ke dalam tabung 50 mL kemudian tambahkan 48 mL air destilasi (ddH₂O). Bolak balik, jangan divortex.

3. Prosedur Kerja

- a) Masukkan 100 μL standar/sampel secara duplikat ke dalam *well*.
- b) Tutup dan inkubasi pada suhu 37 °C selama 90 menit.
- c) Tambahkan 100 μL *biotinylated detection antibody* ke seluruh *well*.
- d) Tutup dan inkubasi pada suhu 37 °C selama 1 jam.
- e) Aspirasi dan cuci menggunakan *wash buffer IX* sebanyak 3 kali.
- f) Tambahkan 100 μL *HRP conjugate* ke seluruh *well*.
- g) Tutup dan inkubasi pada suhu 37 °C selama 30 menit.
- h) Aspirasi dan cuci menggunakan *wash buffer IX* sebanyak 5 kali.
- i) Tambahkan 90 μL *substrate solution* ke seluruh *well*.
- j) Tutup dan inkubasi pada suhu 37 °C selama 15 menit, hindarkan cahaya.
- k) Tambahkan 50 μL *stop solution* ke seluruh *well*.
- l) Baca dan ukur menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 450 nm.

Amplifikasi *complementary DNA* (cDNA) dengan *Reverse Transcriptase-PCR*

Amplifikasi cDNA dari hasil ekstraksi RNA dengan RT PCR dilakukan berdasarkan metode dari Invitrogen. Metode dilakukan dengan menggunakan *SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen).

b. Ekstraksi DNA

Larutan buffer L6, larutan buffer L2 dan aseton diambil secukupnya, hanya untuk keperluan pada hari yang sama lalu pipet dengan tip yang mempunyai lapisan *cotton* sebagai filter dan hindari kontak antar tip dengan vial dimana tip digunakan untuk setiap larutan yang diambil. 100 µl *whole blood* hewan coba, dicampurkan dengan 900 µl larutan buffer lisis L6 kemudian campuran ini disentrifus pada 12.000 rpm selama 10 menit. Sedimen sampel yang telah dipekatkan ini dihomogenkan selama 30 menit. Sebelum ditambahkan suspensi diatom, campuran *buffer* L6 yang telah mengandung RNA hasil ekstraksi disentrifus selama 2-3 menit pada kecepatan 12.000 rpm agar RNA hasil ekstraksi mengendap di bagian dasar tabung. Suspensi diatom 20 µl ditambahkan ke dalam tabung, suspensi diatom harus selalu *divortex* dan diaduk dengan menggunakan *gyratory shaker* dengan kecepatan 100 rpm selama 10 menit. Campuran diatom dan buffer L6 *divortex* kembali dengan mikrosentrifus *epENDORF* pada kecepatan 12.000 rpm selama 15 detik sehingga terbentuk Supernatan.

Supernatan dicuci sebanyak 2 (dua) kali dengan menggunakan 1 ml buffer pencuci L2. Buffer pencuci L2 ditambahkan sebanyak 1 ml, *divortex* dan disentrifus pada 12.000 rpm selama 15 detik, kemudian supernatan dibuang. Endapan dicuci kembali dengan 1 ml etanol 70% sebanyak 2 (dua) kali, lalu *divortex* dan disentrifus pada 12.000 rpm selama 15 detik, supernatannya dibuang dan endapannya dicuci lagi dengan 1 ml aseton. Aseton yang tersisa dalam endapan (sedimen) diuapkan dengan membuka penutup vial dan dipanaskan dengan oven pada suhu 50-55°C selama kurang lebih 10 menit.

Setelah sedimen mengering, tambahkan 60 ml TE buffer kemudian *divortex* secara merata sehingga sedimen dan suspensi tersebut larut lalu diinkubasi dalam oven pada suhu 56°C selama 10 menit. Larutan tersebut kemudian disentrifus dengan kecepatan 12.000 rpm selama 30 detik. Supernatan diambil secara hati-hati sebanyak 40-50 µl dari supernatant dan dimasukkan ke dalam tabung vial baru. Pada akhir dari prosedur teknik Boom akan didapatkan sejumlah kecil diatom (sekitar 1 µl suspense diatom dalam 100 ml TE buffer elusi). Hasil ekstraksi dapat disimpan pada suhu -20°C atau suhu -80°C.

c. Amplifikasi *complementary DNA* (cDNA) dengan *Reverse Transcriptase-PCR*

Amplifikasi cDNA dari hasil ekstraksi RNA dengan RT PCR dilakukan berdasarkan metode dari Invitrogen. Metode dilakukan dengan menggunakan *SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen)*. Master mix I dibuat dengan menambahkan RNA sebanyak 5 µg total RNA, 3 µl *random hexamers* (50 ng/µl), 1 µl 10mM dNTP mix dan *nuclease free water* (H₂O) sehingga total volume PCR 50 µl. Kemudian diinkubasi sampel pada 65°C selama 5 menit dan kemudian di atas es selama minimal 1 menit.

Selanjutnya disiapkan campuran reaksi master mix II dengan menambahkan 2 µl 10x RT buffer, 4 µl 25 mM MgCl₂, 2 µl 0,1 M DTT dan 1 µl *RNAase out*. Tambahkan campuran reaksi ke campuran RNA / primer, campurkan sebentar, lalu tempatkan pada suhu kamar selama 2 menit. Tambahkan 1 µl (50 unit) SuperScript II RT ke setiap tabung, campurkan dan inkubasi pada 25°C selama 10 menit, lalu diinkubasi pada 42°C selama 50 menit, untuk inaktivasi dipanaskan pada 70°C selama 15 menit, dan kemudian didinginkan di atas es. Selanjutnya ditambahkan 1 µl RNase H dan inkubasi pada suhu 37°C selama 20 menit. Strand cDNA dapat disimpan di -20°C hingga digunakan untuk *real time PCR*

d. Pemeriksaan ekspresi mRNA Sitokrom P450 CYP2E1 dengan *real time*PCR.

Pemeriksaan kekuatan ekspresi gen (*up regulation* atau *down regulation*) CYP2E1 menggunakan *SYBR green dye* dengan metode *real time* PCR (qPCR). Sebelum dilakukan amplifikasi dipersiapkan master mix dengan menambahkan 12.5 μ l SYBR green mix, 0,5 μ l cDNA, 0.5 μ l primer forward (5'-AGATCTCACCCAGATGACTTCAGAGTGGTC), 0.5 μ l primer reverse (5'-ACTAGTTATCTTGGAGTCTGAGAGAGG GAAAC-3) (masing-masing primer 5 pmol/ μ l) dan 11.3 μ l H₂O. Prosedur yang sama juga dilakukan untuk gen GAPDH sebagai kontrol namun menggunakan urutan primer yang berbeda. Primer GAPDH forward (5'-CCTGCACCACCAACTGCCTTA-3') dan primer GAPDH reverse (5'-GGCCATCCACAGTCTTCTGAG-3') Siklus qPCR dengan kondisi 50⁰C selama 2 menit, 95⁰C selama 1 menit masing-masing 1 siklus, denaturasi 95⁰C selama 15 detik kemudian dilanjutkan dengan *annealing* 60⁰C selama 30 detik dan ekstensi 72⁰C selama 30 detik diulang sebanyak 40 kali (siklus), Siklus terakhir yakni *final extension* pada 72⁰C selama 10 menit.

e. Analisa Data

Tingkat ekspresi gen diketahui melalui munculnya sinyal amplikon pada grafik. Sinyal yang terdeteksi pada jumlah siklus yang kecil menunjukkan tingkat ekspresi gen yang makin tinggi. Setelah proses amplifikasi diperoleh kurva disosiasi yang kemudian dianalisis ekspresi relatifnya dengan menggunakan metode yang membandingkan target Ct dengan nilai referensi yang dipilih, yaitu level ekspresi gen kontrol GAPDH (*housekeeping gene*), dengan perhitungan: $\Delta Ct = Ct_{\text{target gen}} - Ct_{\text{control}}$. Bila nilai ΔCt memiliki nilai positif maka nilai Ct gen target daripada nilai GAPDH ($+\Delta Ct$) dan sebaliknya nilai negatif bila Ct target lebih rendah daripada GAPDH ($-\Delta Ct$), kemudian perbandingan level ekspresi diperoleh dengan menggunakan rumus: $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

4.9 Pengolahan dan Analisis Data

Pengolahan dan analisis data menggunakan data berskala rasio, Variabel independent yaitu jumlah sperma, tingkat perubahan jumlah ekspresi mRNA sitokrom P450 CYP2E1 dan tingkat perubahan jumlah kadar protein CYP2E1 besar sampel dari keempat kelompok Tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan adalah 40 ekor. Variabel perlakuan pada penelitian ini adalah Sopi dosis 2,7, 4,05, dan 5,4 ml/200gram BB/hr. Variabel tergantung adalah jumlah sperma, jumlah kadar protein CYP2E1, dan perubahan jumlah ekspresi mRNA sitokrom P450 CYP2E1. Uji normalitas dengan *Shapiro Wilk* ($\alpha = 0,05$) dan homogenitas dengan *Levene test*. Uji beda antar kelompok dengan *Kruskal Wallis* ($\alpha = 0,05$), dan dilanjutkan dengan uji *One Way Anova* ($\alpha = 0,05$).

4.10 Etik Penelitian

Penelitian akan dilaksanakan setelah mendapatkan rekomendasi persetujuan dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin. Penelitian akan memperhatikan aspek-aspek yang berhubungan dengan prinsip etika penelitian pada hewan coba, antara lain :

1. *Replacement*

Adalah keperluan memanfaatkan hewan coba sudah diperhitungkan secara seksama baik dari pengalaman terdahulu maupun literatur untuk menjawab pertanyaan penelitian dan tidak dapat digantikan oleh makhluk hidup lain seperti sel atau biakan jaringan.

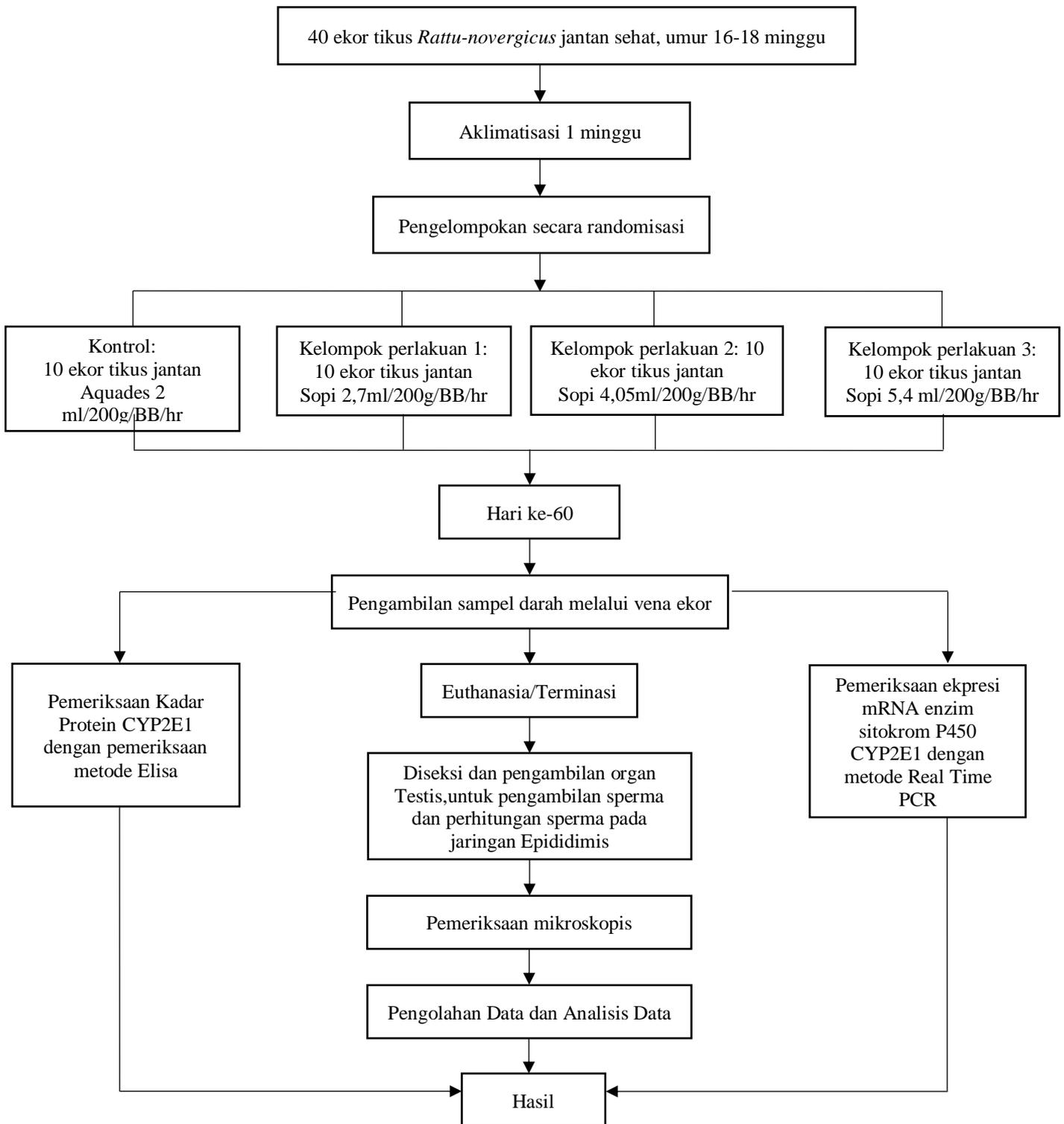
2. *Reduction*

Diartikan sebagai pemanfaatan hewan dalam penelitian sesedikit mungkin tetapi tetap mendapatkan hasil optimal.

3. *Refinement*

Adalah memelihara hewan dengan baik, tidak menyakiti hewan serta meminimalisasi perlakuan yang menyakitkan sehingga menjamin kesejahteraan hewan coba sampai akhir penelitian.

4.11 Alur Penelitian



BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 HASIL PENGAMATAN

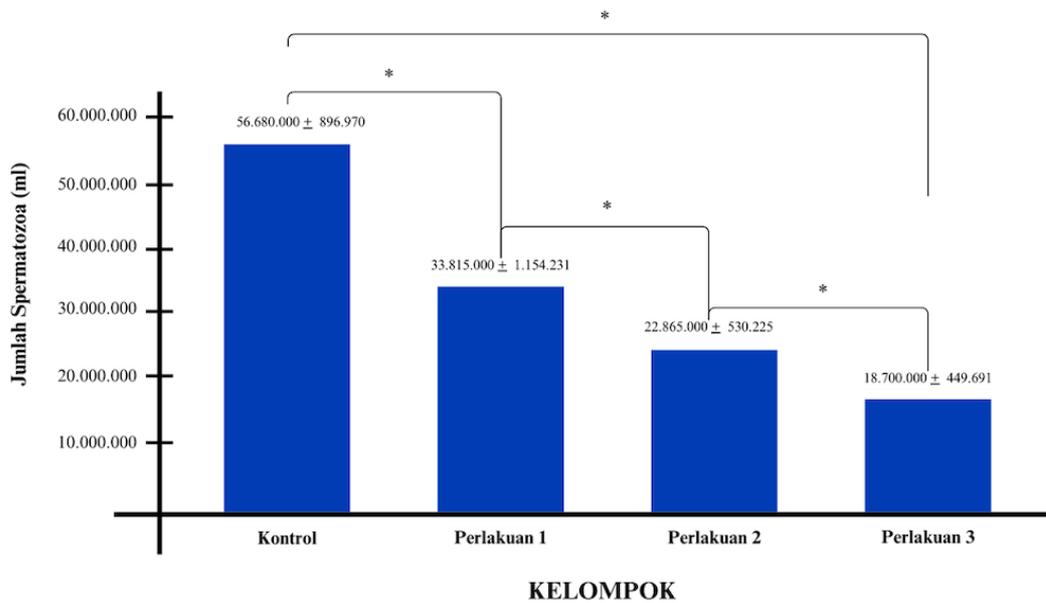
Penelitian ini ditujukan untuk melihat pengaruh minuman Sopi Mayang terhadap jumlah peningkatan ekspresi mRNA sitokrom P450, peningkatan kadar protein CYP2E1 dan penurunan jumlah spermatozoid dengan menggunakan tikus putih jantan sebanyak 40 ekor yang terbagi dalam 4 kelompok dimana masing masing kelompok terdiri dari 10 ekor yang diberikan minuman Sopi Mayang dengan pemberian 2 kali sehari. Pada kelompok kontrol diberikan 2 ml Aquadest dan pada 3 kelompok lainnya diberikan perlakuan yaitu Sopi Mayang dengan dosis 2,7 ml untuk kelompok perlakuan 2, dosis 4,5 ml kelompok perlakuan 3 dan dosis 5,4 ml kelompok perlakuan 4 yang dilakukan selama 60 hari.

Tabel 5.1.1. Karakteristik Hewan Coba

Variabel	Kontrol	Perlakuan 1	Perlakuan 2	Perlakuan 3
Jenis kelamin	Jantan	Jantan	Jantan	Jantan
Usia (minggu)	18.00 ± 0.00	18.00 ± 0.00	17.80 ± 0.63	18.00 ± 0.00
Berat badan (gram)	184.00 ± 0.00	182.80 ± 1.93	185.00 ± 6.05	184.20 ± 4.36

Pada tabel 5.1.1 menunjukkan hewan coba yang digunakan adalah hewan jantan dengan berat badan hampir sama.

5.1.1. Pengaruh minuman Sopi Mayang pada jumlah Spermatozoid

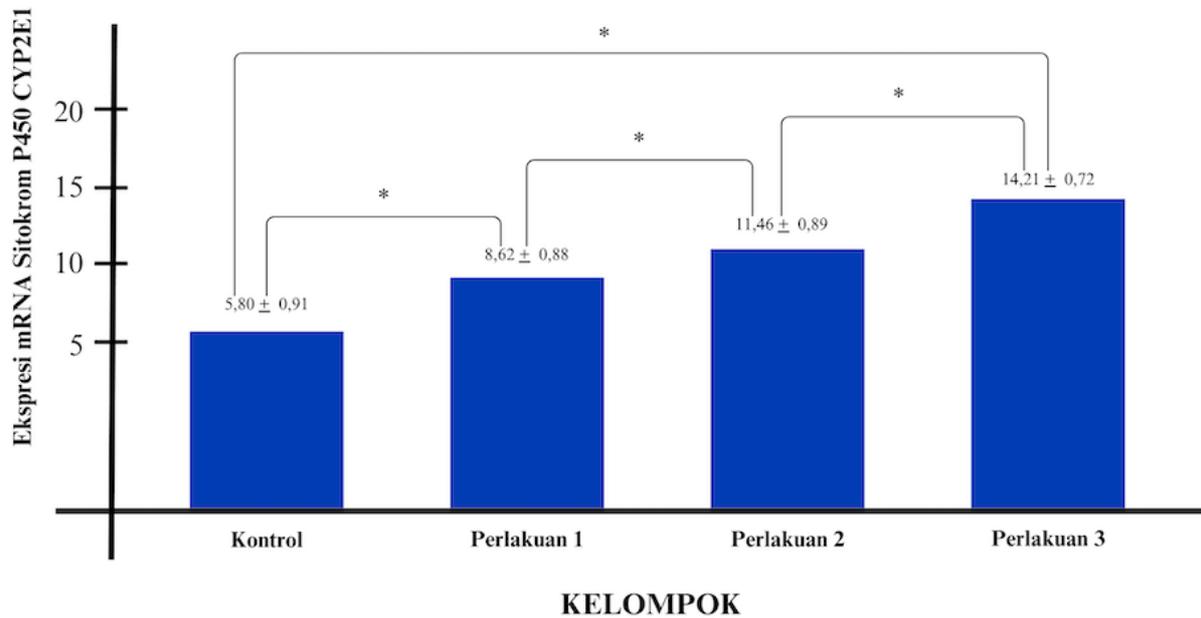


* $p < 0,001$ (Levene test)

Gambar 5.1.1 Pengaruh pemberian Sopi Mayang terhadap jumlah spermatozoid pada hewan coba setiap kelompok

Gambar 5.1.1 Hasil penelitian memperlihatkan bahwa jumlah spermatozoid pada beberapa kelompok dengan dosis yang berbeda menunjukkan semakin tinggi dosis Sopi Mayang yang diberikan nampak terjadi penurunan jumlah spermatozoid. Hal ini terlihat pada pemberian Sopi Mayang dengan dosis 2,7 ml terjadi penurunan jumlah spermatozoid yaitu 33.815.000 dibandingkan dengan kelompok kontrol tanpa pemberian Sopi Mayang yaitu 56.680.000 ($p = 0,0001$). Sopi Mayang dengan dosis 4,05 ml terjadi penurunan jumlah sperma dari 33.815.000 menjadi 22.334.775 ($p = 0,0001$). Sopi Mayang dengan dosis 5,4 ml terjadi penurunan jumlah sperma dari 22.865.000 menjadi 18.250.309 ($p = 0,0001$).

5.1.2. Pengaruh minuman Sopi Mayang terhadap Ekspresi mRNA CYP2E1

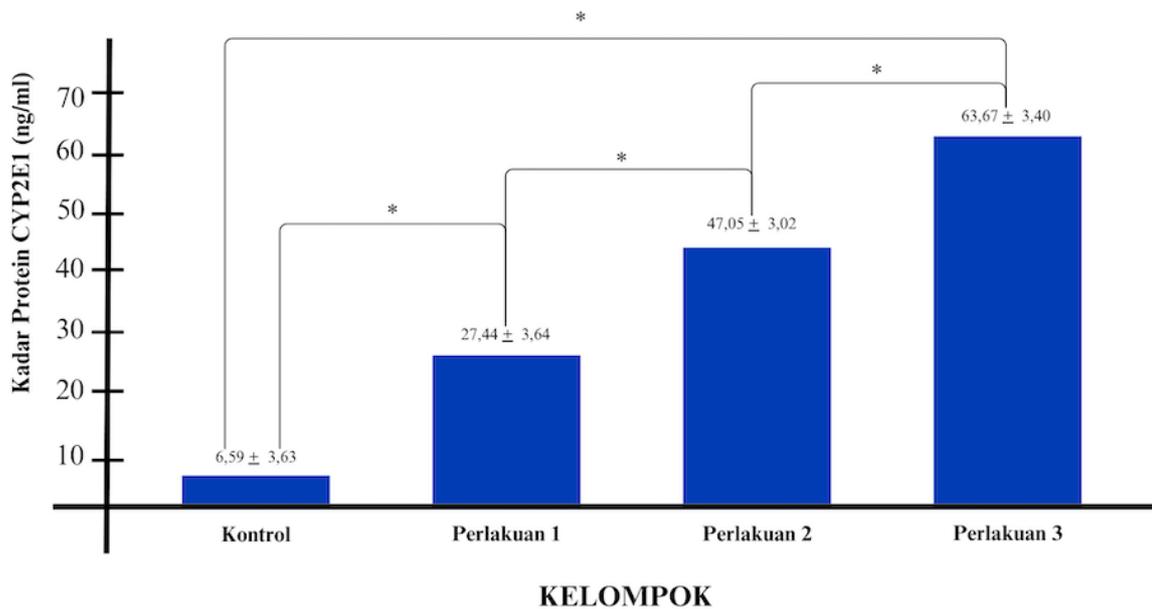


* p<0,001 (tes one way Anova)

Gambar 5.1.2 Pengaruh Sopi Mayang Terhadap Jumlah Ekspresi mRNA CYP2E1 pada plasma darah hewan coba setiap kelompok

Gambar 5.1.2 Menunjukkan hasil penelitian dari pengaruh pemberian Sopi Mayang pada jumlah ekspresi mRNA CYP2E1 pada tikus putih jantan, yang memperlihatkan bahwa Sopi Mayang dapat meningkatkan jumlah ekspresi mRNA CYP2E1 sitokrom P450. Hal ini terlihat pada pemberian Sopi Mayang dengan dosis 2,7ml terjadi peningkatan ekspresi mRNA CYP2E1 yaitu 8,62 dibandingkan dengan kelompok kontrol tanpa pemberian Sopi Mayang yaitu 5,80 ($p=0,0001$). Pada pemberian Sopi mayang 4,05 ml terjadi peningkatan ekspresi mRNA CYP2E1 dari 8,62 menjadi 11,46 ($p=0,0001$). Sopi Mayang 5,4 ml terjadi peningkatan kadar protein CYP2E1 dari 11,46 menjadi 14,21 ($p=0,0001$).

5.1.3. Pengaruh minuman Sopi Mayang terhadap Jumlah Kadar Protein CYP2E1



* $p < 0,001$ (tes one way Anova)

Gambar 5.3 Pengaruh Sopi Mayang Terhadap Kadar Protein CYP2E1 pada plasma darah hewan coba setiap kelompok

Gambar 5.3 Pemberian Sopi Mayang yang berpengaruh terhadap jumlah kadar protein CYP2E1 pada tikus putih jantan, memperlihatkan bahwa semakin tinggi dosis Sopi Mayang yang diberikan mempunyai pengaruh terhadap peningkatan jumlah kadar protein CYP2E1. Hal ini terlihat pada pemberian Sopi Mayang dengan dosis 2,7 ml terjadi peningkatan kadar protein CYP2E1 dari 6,59 tanpa pemberian Sopi Mayang menjadi 20,85 ($p=0,0001$). Sopi Mayang 4,05 ml terjadi peningkatan kadar protein CYP2E1 dari 27,44 menjadi 44,03 ($p=0,0001$). Sopi Mayang dosis 5,4 ml terjadi peningkatan CYP2E1 dari 47,05 menjadi 60,27 ($p=0,0001$).

5.2. PEMBAHASAN

Penelitian ini di tujukan untuk melihat pengaruh minuman Sopi Mayang terhadap jumlah peningkatan ekspresi mRNA CYP2E1, jumlah peningkatan kadar protein dan penurunan jumlah spermatozoid pada tikus putih jantan yang berumur 16-18 minggu dengan berat badan 180-200 kg. Peningkatan ekspresi mRNA CYP2E1, peningkatan kadar protein CYP2E1 dan penurunan jumlah spermatozoid dapat berdampak penurunan sekresi testosterone.

Alkohol termasuk senyawa organik dengan gugus hidroksil terikat karbon. Alkohol yang paling sering dikonsumsi adalah etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$), setelah dicerna, etanol dengan cepat diserap dari semua bagian sistem gastrointestinal sebagian besar masuk ke dalam darah kemudian di distribusikan ke seluruh tubuh dan sebagian besar metabolisme etanol terjadi di hepar. Alkohol dehydrogenase (ADH), katalase dan sitokrom P450 2E1 (CYP2E1) membantu dalam proses menjadi asetaldehida dan aldehida dehydrogenase (ALDH) mengubah asetaldehida menjadi asetat (Claire Heit dkk, 2013).

5.2.1. Pengaruh Minuman Sopi Mayang terhadap Ekspresi mRNA CYP2E1

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pada pemberian Sopi Mayang terjadi peningkatan jumlah ekspresi mRNA CYP2E1 (gambar 5.2) pada tikus putih jantan. Hasil ini membuktikan bahwa Sopi Mayang dapat meningkatkan jumlah ekspresi mRNA CYP2E1 Sitokrom P450 yang berada di mitokondria. Minuman Sopi Mayang yang diduga mengandung alkohol menjadi faktor pencetus keluarnya CYP2E1 dari mitokondria sperma. Hal ini terjadi karena pada saat mengkonsumsi Sopi Mayang, alkohol yang terkandung didalamnya akan di metabolisme di hepar melalui jalur peroksisom kemudian selanjutnya akan melalui mekanisme sistem oksidasi etanol mikrosom (MEOS/SOME). SOME dapat meningkat jika mengkonsumsi alkohol dalam kurun waktu yang lama, yang akan mengubah asetaldehid menjadi asam asetat

sehingga meningkatkan R.O.S yang masuk ke pembuluh darah kemudian diteruskan ke otak, usus kecil, ginjal dan testis serta epididimis. Otak yang sudah di pengaruhi Sopi Mayang, menyebabkan CYP2E1 terinduksi keluar sehingga R.O.S meningkat yang mengakibatkan meningkatnya sekresi stress oksidatif. Keadaan ini mempengaruhi hipotalamus yang akan menurunkan fungsi GNRH, dan kemudian mempengaruhi kelenjar pituitary dalam penurunan hormon FSH dan LH yang dihasilkan. Penurunan fungsi dari hormon FSH dan LH mengakibatkan gangguan pada spermatozoid dan mengakibatkan CYP2E1 terinduksi keluar di mitokondria sperma, hal tersebut memicu peningkatan R.O.S untuk meningkatkan sekresi stress oksidatif sehingga terjadi kerusakan oksidatif mtDNA yang diikuti dengan terjadinya mutasi mtDNA dalam meningkatkan ekspresi mRNA CYP2E1, yang selanjutnya akan mempengaruhi penurunan produksi ATP sehingga menyebabkan kelainan fungsi sel germinal.

Penelitian ini menunjukkan Sopi Mayang dapat menginduksi CYP2E1 dalam meningkatkan ROS yang merupakan faktor pencetus meningkatnya ekspresi mRNA CYP2E1 pada mitokondria sperma.

Penelitian ini sejalan dengan yang dilakukan oleh Shayakhmetova dkk bahwa pemberian etanol secara kronik menginduksi ekspresi CYP2E1 pada testis. Peningkatan CYP2E1 mRNA melibatkan regulasi transkripsional dari ekspresi mRNA. Perbedaannya pada penelitian ini menggunakan Sopi Mayang dalam melihat peningkatan jumlah ekspresi mRNA CYP2E1 pada testis tikus jantan yang dapat menjadi suatu mekanisme penting dalam berkontribusi terhadap perkembangan malfungsi testis terkait testosteron.

Pada tikus yang diberikan alkohol, ekspresi mRNA dari CYP2E1 meningkat sebanyak tiga kali lipat. Hubungan korelatif antara ekspresi mRNA testis CYP2E1 pada tikus yang diberikan alkohol mungkin dapat terjadi akibat keterlibatan isoenzim dalam perkembangan patologi testis. Sehubungan dengan pembentukan spesies oksigen reaktif, CYP2E1 tampaknya menonjol dibandingkan enzim CYP lainnya, karena memiliki aktivitas oksidase lebih tinggi

akibat ikatannya yang longgar dengan NADPH-sitokrom P450 reduktase, dan karena cepat berkurang bahkan tanpa adanya substrat. Peran khusus CYP2E1 dalam pembentukan stres oksidatif tercermin dari pengamatan peningkatan oksidasi lipid dalam sistem mikrosomal yang diperkaya dengan CYP2E1 dan berkontribusi tidak hanya pada kerusakan hati, tetapi juga untuk stres oksidatif di organ lain, yang telah dilaporkan mengekspresikan CYP2E1 (Shayakhmetova dkk., 2014).

Infertilitas pria yang terkait dengan konsumsi alkohol kronis mungkin juga disebabkan oleh regulasi ekspresi mRNA yang berbeda, diikuti oleh perubahan metabolisme protein spesifik yang terlibat dalam pematangan sperma, sehingga mempengaruhi ekspresi spesies RNA mitokondria, fungsi mitokondria spermatozoid, dan kemampuan reproduksi (Renata Finelli, 2022).

Mitokondria spermatozoid memegang peranan penting terhadap fungsi sperma, perubahan genetik pada DNA mitokondria (karena mutasi atau varian *haplogroup*) membawa konsekuensi tersendiri pada fertilisasi secara normal terutama kesuburan pria. Hal ini dapat dipahami karena selain genom inti, mtDNA ikut bertanggung jawab menjadi kompleks enzim respirasi dalam menghasilkan ATP yang digunakan untuk motilitas spermatozoid. ATP yang dihasilkan oleh mitokondria sebagian besar berasal dari rantai transfer elektron pada waktu fosforilasi oksidatif, dimana segala protein yang terlibat pada proses rantai respirasi ini ditandai oleh genom inti dan genom mitokondria. Hambatan fosforilasi oksidatif diyakini juga terkait dengan genom mitokondria karena secara genetik mtDNA ikut berperan dalam kompleks enzim respirasi. Mutasi titik atau delesi skala besar diyakini dapat menyebabkan disfungsi motilitas spermatozoid. Mutasi pada mtDNA dapat mengganggu ekspresi satu atau lebih protein enzimatik. Mutasi mtDNA dapat menurunkan motilitas spermatozoid dengan cara menurunkan produksi ATP (Tri Panjiasih, 2010).

5.2.2. Pengaruh minuman Sopi Mayang terhadap Kadar Protein CYP2E1

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian Sopi Mayang yang berpengaruh terhadap peningkatan jumlah kadar protein CYP2E1 pada tikus putih jantan. Hal ini disebabkan oleh meningkatnya mRNA CYP2E1, sehingga mRNA yang terbentuk akan di kirim ke retikulum endoplasma yang mengandung ribosom. Di ribosom terjadi proses translasi dimana mRNA CYP2E1 diubah menjadi protein CYP2E1. Kadar CYP2E1 meningkat akibat pemberian Sopi Mayang maka jumlah kadar protein CYP2E1 juga akan bertambah banyak. Protein CYP2E1 ini akan menyebabkan reaksi oksidasi melalui pembentukan ROS dan merusak sel Sertoli, sel Leydig dan spermatozoid sehingga jumlah spermatozoid menurun. Penelitian ini membuktikan bahwa semakin tinggi dosis Sopi Mayang yang diberikan berpengaruh terhadap peningkatan jumlah kadar protein CYP2E1. Sopi Mayang mengandung sukrosa yang difermentasikan diduga menjadi alkohol dapat meningkatkan R.O.S yang akan mengganggu jalur hipotalamus hipofisisgonad. Jalur ini akan menyebabkan penurunan sekresi hormon reproduksi pria yaitu FSH dan LH, dimana hormon FSH merangsang perkembangan testis dan meningkatkan produksi protein pengikat androgen oleh sel Sertoli, yang selanjutnya akan mempengaruhi testis, epididimis dan spermatozoid. Pada spermatozoid, Sopi Mayang akan menginduksi CYP2E1 keluar ke mitokondria badan spermatozoid, maka terjadilah peningkatan R.O.S yang menyebabkan stress oksidatif meningkat, selanjutnya terjadi kerusakan oksidatif mtDNA dan mutasi mtDNA yang dapat meningkatkan jumlah kadar protein CYP2E1 pada mitokodria spermatozoid.

Peningkatan stress oksidatif oleh CYP2E1 mRNA dapat menyebabkan kematian sel. Peran fisiologi CYP2E1 tersimpan dalam metabolisme dopamine dan faktor-2 terkait faktor 2-induksi nuklir dalam sel. Penelitian dari M.Jin, menjelaskan peran CYP2E1 dan R.O.S dalam apoptosis dan kematian sel (M.Jin, 2013), sedangkan pada hasil penelitian ini menggunakan Sopi Mayang yang menjelaskan tentang peningkatan kadar protein CYP2E1.

Menurut Shayakmetova dkk, menggunakan RT-PCR untuk mengevaluasi efek paparan etanol terhadap aktivasi transkripsional CYP2E1 pada testis menemukan bahwa jumlah protein CYP2E1 pada testis tikus yang diberikan alkohol meningkat 1,4 kali lipat. Peningkatan kandungan protein CYP2E1, disebabkan oleh stabilisasi oleh etanol dalam waktu paruh yang diperpanjang. Perbedaannya, pada hasil penelitian ini menggunakan Sopi Mayang yang melihat tentang peningkatan jumlah kadar Protein CYP2E1.

Protein CYP2E1 terdeteksi pada spermatosit di testis tikus, namun tidak terdeteksi pada spermatid. CYP2E1 terdapat di spermatozoid yang diisolasi dari testis serta spermatozoid dari semua bagian epididimis. Di sel-sel ini CYP2E1 secara eksklusif terlokalisasi di bagian tengah, menunjukkan terdapatnya hubungan dengan mitokondria. Ekspresi CYP2E1 juga terdeteksi kuat di dalam epididimis tikus. Dalam hal ini, protein CYP2E1 tampaknya diekspresikan pada kadar yang setara di semua segmen tubulus epididimis, dan ditemukan di seluruh sitosol serta menutupi nukleus. Imunofluoresen bagian testis manusia dan jaringan epididimis dengan antibodi anti-CYP2E1 mengkonfirmasi ekspresi enzim yang melimpah di seluruh saluran reproduksi pria. Terbukti bahwa protein terdapat di seluruh sitosol dan nukleus sel epitel yang melapisi saluran epididimis (Katen dkk., 2017).

Enzim sitokrom P450 CYP2E1 terbukti menghasilkan R.O.S dan menyebabkan perubahan peroksidatif yang menyebabkan peroksidasi lipid dimana produksi akhir dari degradasi oksidasi lipid mampu bereaksi dengan DNA dan menciptakan adisi DNA genetik (mutase) dan kasus kesalahan membaca dalam proses replikasi dan modifikasi protein terutama asam amino sistein, dapat secara berurutan merusak protein atau menghasilkan mekanisme yang salah. Stress oksidatif terjadi akibat elektron radikal bebas turunan oksigen yang menetralkan aktivitas antioksidan OS ini telah dipastikan menjadi salah satu mekanisme dasar yang menginduksi kerusakan pada sel Leydig melalui peroksidasi lipid, menginduksi apoptosis,

merusak aktivitas mitokondria dan mengurangi produksi testosteron (Elizabeth Monangeng, 2023).

Keberadaan protein histon pada genom dianggap sebagai dasar dari mekanisme pemulihan terhadap kerusakan gen. Namun pada DNA mitokondria hanya mengandung ekson tanpa intron dan histon hal ini menyebabkan genom mtDNA kurang terlindungi. Risiko mutasi pada mtDNA 10-100 kali lebih tinggi jika dibandingkan dengan mutasi pada nDNA. Mutan mtDNA dan wild type mtDNA dapat berada dalam jaringan yang sama pada tubuh sehingga mitokondria disebut bersifat heteroplasma (Sri Utami, 2009).

CYP2E1 dianggap sebagai CYP utama pada fase pertama metabolisme etanol. CYP2E1 mengubah etanol menjadi asetaldehida kemudian asetaldehida menjadi asetat. Konversi etanol menjadi asetaldehida menghasilkan spesies oksigen reaktif, yang terutama berkontribusi terhadap toksisitas alkohol, selanjutnya etanol meningkatkan metabolismenya sendiri dengan melindungi CYP2E1 dari ubiquitinasi dan degradasi oleh kompleks proteasome. Mekanisme ini menghasilkan peningkatan kadar CYP2E1 (Le Daré dkk., 2019). Pada penelitian Le Dare dkk berbeda dengan penelitian Sopi Mayang yang meneliti tentang peran CYP2E1 dalam meningkatkan kadar protein pada mitokondria spermatozoid tikus.

5.2.3 Pengaruh Sopi Mayang Terhadap Jumlah Spermatogenesis

Berdasarkan hasil penelitian ini pemberian Sopi Mayang pada tikus jantan menunjukkan bahwa semakin besar dosis Sopi Mayang yang diberikan maka semakin menurun jumlah spermatozoid yang didapatkan di epididimis. Sopi Mayang yang dikonsumsi akan menuju ke berbagai organ yaitu hepar, ren, jantung, lien, menyebabkan mitokondria pada sel tersebut akan terganggu sehingga dapat meningkatkan sitokrom P450 CYP2E1. CYP2E1 selanjutnya akan berubah menjadi asetaldehida, aldehydrogenase, asam asetat yang dapat

menyebabkan ROS meningkat dan masuk ke pembuluh darah mempengaruhi testis yang menyebabkan jumlah spermatozoid menurun (Sinta,2018).

Sopi mayang yang langsung menuju ke organ testis dapat meningkatkan CYP2E1 sehingga R.O.S meningkat dan mempengaruhi kerusakan pada sel Leydig, sel Sertoli yang selanjutnya akan menurunkan sekresi testosteran dan masuk ke pembuluh darah yang mengakibatkan meningkatkannya ekspresi mRNA CYP2E1 dan meningkatkan kadar protein CYP2E1 sehingga dapat menurunkan jumlah spermatozoid.

Sopi Mayang yang menuju ke hipotalamus memicu terjadinya peningkatan CYP2E1 dan peningkatan R.O.S yang berdampak pada jalur HPG (*hipotalamus hipofisisgonad*) sehingga menyebabkan penurunan sekresi hormon reproduksi pria. Melalui jalur HPA (*hypothalamic pituitary adrenocortical*), ROS akan meningkatkan pelepasan hormon stress kortisol melalui jalur HPA-HPG, selanjutnya terjadi penurunan sekresi hormon LH dan hormon FSH. Hormon ini akan menuju ke testis yang akan menyebabkan peningkatan CYP2E1 dan peningkatan R.O.S yang akan berdampak pada sel Leydig, sel Sertoli sehingga dapat menurunkan sekresi testosteron yang kemudian masuk ke pembuluh darah dan dapat meningkatkan ekspresi mRNA CYP2E1, peningkatan kadar protein CYP2E1 yang berdampak pada peningkatan ROS kemudian terjadi stress oksidatif, berakibat terjadinya mutasi sperma abnormal, kerusakan ETC sehingga penurunan produk ATP dan kelainan sel germinal yang berdampak pada penurunan jumlah sperma, meiosis terhenti dan morfologi sperma abnormal.

Testis adalah organ reproduksi pria yang berfungsi untuk spermatogenesis. Penelitian oleh Devi melaporkan bahwa konsumsi alkohol pada Pria dapat menyebabkan penurunan jumlah tetosteron plasma darah, penurunan kualitas cairan semen, penurunan jumlah, motilitas, dan kualitas sperma, abnormalitas morfologi sperma, dan atrofi testis yang dapat menyebabkan infertilitas dan penurunan fungsi sistem reproduksi pria (Devi, 2016).

Jumlah Spermatozoid juga di pengaruhi oleh sel yang ada pada tubulus seminiferus yaitu sel Sertoli yang berfungsi sebagai nutrisi pada Spermatozoid, sel Sertoli jumlahnya juga dapat berkurang oleh pengaruh Sopi Mayang dikarenakan kandungan sukrosa yang di fermentasikan menjadi alkohol. Sel Sertoli yang berkurang diakibatkann oleh peningkatan R.O.S. Sel yang mengalami hipoksia akan meningkatkan radikal bebas dan menginduksi P53 pada siklus sel (Marliyati, 2016).

Stress oksidatif dapat menyebabkan kerusakan DNA spermatozoid yang di sebabkan oleh pembentukan DNA adduct, dimana hal ini dapat mempengaruhi epigenome dan genom sperma (Fatma Camak,dkk, 2023).

Hormon FSH sel germinal berfungsi untuk memulai proliferasi dan diffrensiasi serta meningkatkan sensitivitas sel Leydig terhadap LH untuk memproduksi testosteron. LH, FSH, testosteron bekerja sinergis dalam proses spermatogenesis sehingga jika terjadi penurunan LH, FSH dan testosteron maka akan mengganggu proses spermatogenesis (Zuhud, 2020).

Infertilitas pria yang terkait dengan konsumsi alkohol kronis mungkin juga disebabkan oleh regulasi ekspresi gen yang berbeda, diikuti oleh perubahan metabolisme protein spesifik yang terlibat dalam pematangan spermatozoid, sehingga mempengaruhi ekspresi spesies RNA mitokondria, fungsi motokondria sepermatozoid, dan kemampuan reproduksi pria (Renata Finelli, 2022).

Sopi Mayang dapat menurunkan jumlah spermatozoid karena mengandung sukrosa yang difermentasikan diduga menjadi alkohol pada jalur metabolisme sitosol merupakan proses oksidasi dengan melibatkan ADH yang terjadi di hepar. Metabolisme alkohol oleh ADH menghasilkan senyawa asetildehida. Senyawa ini merupakan produk yang sangat reaktif dan sangat toksik terhadap tubuh sehingga menyebabkan kerusakan beberapa jaringan atau sel, dan juga dapat menurunkan hormon testosterone serta meningkatkan stress oksidatif akibat adanya peningkatan R.O.S. Meningkatnya ROS karena senyawa asetaldehida oleh ALDH akan diubah

menjadi asam asetat, jika metabolisme alkohol meningkat dan ALDH tidak mampu merubah asetaldehida menjadi asam asetat, maka asetaldehida akan mengalami penumpukan di dalam tubuh sehingga akan mengakibatkan peningkatan radikal bebas, selanjutnya pada jalur HPG (hipotalamus hipofisigonad) terjadi penurunan sekresi hormon reproduksi pria dan penurunan sekresi LH dan FSH sehingga menurunkan sintesis testosteron yang akan mempengaruhi proses spermatogenesis dimana akan terjadi penurunan jumlah Spermatozoid, meiosis terhenti, morfologi sperma abnormal.

Berdasarkan penelitian Sri Utami, Alkohol termasuk senyawa organik dengan gugus hidroksil terikat karbon. Alkohol yang paling sering dikonsumsi adalah etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) setelah di cerna etanol dengan cepat diserap oleh sistem gastrointestinal dan sebagian besar masuk ke dalam darah kemudian di distribusikan ke seluruh tubuh. Sebagian besar metabolisme etanol terjadi di hepar. Alkohol dehydrogenase (ADH), katalase dan sitokrom P450 2E1 (CYP2E1) membantu aldehida dehydrogenase (ALDH) mengubah asetaldehida menjadi asetat (Claire Heit dkk, 2013), keadaan ini dapat menurunkan kadar testosteron pada sistem peredaran darah testis dan spermatogenesis (Hari Priya, dkk, 2014). Rusaknya mitokondria akan meningkatkan produksi ROS yang akan merusak enzim-enzim antioksidan (Sri Utami., 2010).

Hormon FSH berpengaruh langsung terhadap sel Sertoli dalam tubulus seminiferous. FSH merangsang sel Sertoli untuk mensekresikan Androgen Binding Protein (ABP) yang akan digunakan dalam proses spermatogenesis (Ni Wayan, 2016).

LH merupakan glikoprotein berikatan dengan reseptor khusus pada sel Leydig. Reseptor LH juga di temukan di organ lain seperti prostat. LH akan menempel ke resptornya pada sel Leydig untuk menginduksi sintesis testosteron. Selain itu LH berperan dalam regulasi jumlah sel Leydig. Peran LH pada organ lain belum di ketahui, LH bukan satu-satunya faktor yang menstimulasi produksi testosteron. Human *chronic gonadotropin* (hCG) dapat berikatan

dengan reseptor LH dan menstimulasi sel Leydig untuk memproduksi testosteron (Agustinus, 2018).

Penelitian dari Fatma dkk, menunjukkan bahwa stress oksidatif dapat menyebabkan kerusakan pada DNA sperma yang disebabkan oleh pembentukan DNA adduct yang akan mempengaruhi epigenome dan genom sperma (Fatma Camak, dkk, 2023).

Kerusakan Sel Sertoli mempengaruhi proses spermatogenesis, (Desak Made, 2020). Terganggunya sel-sel Sertoli mengakibatkan gangguan pada proses mitosis dan meiosis maupun proses pembentukan spermatozoid, sedangkan terganggunya sel Leydig menyebabkan penurunan hormon testosteron yang mengakibatkan penurunan jumlah lapisan sel spermatogenik dan akan mengganggu proses spermatogenesis (Ellen E, 2015).

Hormon FSH bekerja pada sel germinal yang berfungsi untuk memulai proliferasi dan difrensiasi serta meningkatkan sensitivitas sel Leydig terhadap LH untuk memproduksi testosteron. Testosteron, FSH, LH bekerja sinergis dalam proses spermatogenesis maka jika terjadi penurunan LH, FSH dan testosteron akan mengganggu proses spermatogenesis (Zuhud, 2020).

Alkohol dapat mempengaruhi spermatogenesis melalui mekanisme yang berbeda, disentral dengan mengurangi kadar testostosterone sedangkan di perifer menyebabkan kerusakan oksidatif pada jaringan testis (Lella dkk., 2021).

Mengonsumsi alkohol dalam waktu yang lama dapat menyebabkan kerusakan morfologi dan fungsi sel germinal. Pada banyak kasus, terjadi eksfoliasi masif sel germinal pada berbagai tahap diferensiasi ke dalam lumen vesikula seminalis (Dolyenko dkk., 2020).

Meningkatnya durasi intoksikasi alkohol yang kronis, perubahan patomorfologi struktur testis juga akan meningkat, yang ditandai dengan sklerosis, destruksi epitel spermatogenik dengan penurunan indeks spermatogenesis sebanyak 2 kali lipat dengan durasi intoksikasi alkohol kronis lebih dari 10 tahun (Halimova & Shokirov, 2021).

Keterbatasan Penelitian

Pada penelitian ini fungsi reproduksi hanya dinilai dari hitung jumlah spermatozoid namun tidak dilakukan penelitian terhadap morfologi dan motolitas spermatozoid yang juga sangat penting untuk menilai fungsi reproduksi pria.

BAB VI
PENUTUP
KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 KESIMPULAN

Kesimpulan dari penelitian ini yaitu :

Terjadi penurunan jumlah spermatozoid, peningkatan mRNA CYP2E1 plasma darah dan peningkatan kadar protein CYP2E1 plasma darah pada tikus yang diberikan Sopi Mayang.

6.2 SARAN

Saran dari penelitian ini yaitu :

1. Dilakukan pemeriksaan ekspresi mRNA CYP2E1 dan kadar protein CYP2E1 pada jaringan testis terhadap pengaruh pemberian minuman Sopi Mayang
2. Dilakukan pemeriksaan kerusakan sel Leydig dan sel Sertoli, serta jumlah testoteron dan motilitas spermatozoid terhadap pengaruh pemberian minuman Sopi Mayang.
3. Dilakukan penelitian pada manusia untuk melihat pengaruh peningkatan ekspresi mRNA CYP2E1 dan pengaruh kadar protein CYP2E1.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdul Fatah. 2015. Tinjauan Tanaman Aren (*Arrenga pinnata Merr*). Jurnal AGRIFOR (online), volume XIV nomor 1, Maret 2015. ISSN : 1412-6885 (media.neliti.com) diakses maret 2015.
- Adnyana Putra. 2012. Pengaruh Alkohol Terhadap Kesehatan. Jurusan Pendidikan jasmani kesehatan dan reaksi. Fakultas Olahraga dan kesehatan. Universitas Pendidikan Ganesha, Singaraja.
- Adrien Jems, Nastiti, Srihadi, Aryani., 2014. Perubahan Kualitas Spermatozoa dan Jumlah Sel-Sel Spermatogenik Tikus Yang Terpapar Asap Rokok. Jurnal Kedokteran Hewan. Vol. 8 No.2 September 2014. ISSN:1978-225X.
- Anton Robicahyadi., Herlisa Anggraini., Budi Santoso.(<http://respository.unimus.ac.id>). 9 Januari 2019. Gambaran morfologi pada pengecatan giemsa dan hematoksin eosin. Faculty of Nursing and Healthhal : 35-36.
- Agustinus ,I'Tishom,Dyah Pramesti. 2018. Spermatogenesis, Buku Biologi Reproduksi Pria. Edisi 1. hal:73-74 Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia.
- Ahmad Syauqy, 2014. Evaluasi Kromatin Sperma Sebagai Indikator Kualitas Sperma. Kekhususan Biologi Kedokteran, FK Universiatas Indonesia, Jakarta, Indonesia.
- Ali Reza Talebi, 2010. Abolghasem Abbasi, Mohammad Ali Khalili, Nasim Tabibbnejad. Effect of ethanol consumption on chromatin condensation and DNA integrity of epididymal spermatozoa in rat. Department of Anatomy, Research and Clinical Center for Infertility, Shahid Sadoughi University of Medical Satences, Yazad, Iran. Accepted 12 Oktober 2010.
- Anthony L,Atlas Histologi Junqueira, Cetakan 2017. Tubulus Seminiverus. Edisi 12. Penerbit Buku Kedokteran.EGC.
- Aubert J, Begriche,2011. Increased expression of cytochrome P450 2E1 in nonalcoholic fatty liver disease : Mechanisme and pathophysiological role. Universite de Rannes 1, France.
- Christianto, 2013. Pengaruh minuman beralkohol terhadap jumlah lapisan sel spermatogenik dan berat vascular seminalis mencit. Fakultas Ilmu pengetahuan alam. Universitas Widya Mandala Madiun.
- Christina G, Schiza, Keith Jarvi, Eleftherios P. 2014. An emerging role of TEX101 protein as a male infertility biomarker. The Jurnal of the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Departement of Laboratory Medicine and Pathobiology, University of Toronto, Toronto, On Canada. Departement of Surgery, Mount Sinal Hospital, Departement of Pathology and Laboratory Medicine, Mount Sinai Hospital, University of Toronto, Toronto ON Canada.

- Claire Heit, Hongbin Dong, Ying Chen, David C. Thomposon, Richard A. Deitrich dan Vasilis Vasililiou. The Role of CYP2E1 in alcohol Metabolim and Sensitivity in the Central Nervous System. 2013. *Jurnal Subcell Biochem*, 67:235-247. Doi: 10.1007/978-5881-0_8. Available in PMC 2015 February 02.
- Deng XS, Deitrich RA. Putative role of brain acetaldehyde in ethanol addiction. *Curr Drug Abuse Rev* 2012; 1: 3–8.
- Desak Made Malini, 2020. Pengaruh Regenerasi Sel Sertoli dan Sel Leydig Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Diabetes pasca Pemberian Ekstrak Etanol Kulit Buah Jengkol. Departemen Biologi, FMIPA, Universitas Padjadjaran, Jatinagor. *Jurnal Pro-Life Volume 7 nomor 2 Juli*. ISSN e-journal 2579-7557.
- Devi Aninditha, 2016. Efek Pemebrian Etanol 40% Peroral Terhadap Ketebalan Lapisan Sel Spermatogenik Tubulus Seminiferus Tikus Wistar Jantan Dewasa. *Universiats Kristen Maranatha*.
- Dilip Gude. 2012. Alcohol and Fertility. *Jurnal of Human Reproductive Sciences*. PMID : PMC3493844.
- Dolyenko, N., Mykytyn, T., & Bielova, N. (2020). Alcohol Intoxication and Its Influence on the Course of Male Rats Spermatogenesis. *Journal of Vasyl Stefanyk Precarpathian National University*, 7(4), 46–52. <https://doi.org/10.15330/jpnu.7.4.46-52>
- Dosumu, 2014. Alcohol induced testicular damage : Can abstinence equal recovery ? online <http://doi.org/10.1016/jmefs.2014.01.003>. *Jurnal Middle East Fertility Society*. Department of Anatomy, Faculty of basic medical Sciences, College of medicine, Universty of Lagos, Nigeria. Accepted 28 January 2014.
- Ellen E. Melmambessy, 2015. Pengaruh Pemberian Cap Tikus Terhadap Kualitas Spermatozoa Wistar Jantan (*Rattus norvegicus*). Fakultas Kedokteran Universitas Sam Ratulangi Manado. *Jurnal e-Biomedik (eBm)*, Volume 3, Nomor 1, Januari-April, 2015.
- Elizabeth Monageng, dkk, A Riview on the Impact of Oxidative Stress and Medicinal plats on Leydig Cell, Departement Biosains, Fakultas Ilmu Pengetahuan Alam Universiats Wastern Cape tam, MDPI 4.08. 2023.
- Fatma Cakmak dkk, Morin provides therapeutic effet by attenuating oxidative stress, inflammation, endoplasmic reticulum stress, autophagy, apoptosis, and axidative NDA damage in testicular toxixity caused by ifosfamide in rats. *IJBMS Iranian journal of basic midal sciences*, 16 Juli 2023.
- Felicja Lwow, 2017. The effect of occasional alcohol drinking on semen quality and sperm morphology among young and healthy polish men. *Journal of Men’s Health*. DOI : 10.22347/1875-6859.13.2.3. Published: October 16, 2017.
- Frans Salesman, Stefanus, Arman, Yonas, 2018. The Controversy between the Indonesian Government Policy and Manggarai’s Culture Value About “ Sopi” Liquor. *Jurnal*

of Drug and Alcohol Research Vol.7.doi : 10.4303/jdar/236059. Accepted 22 May 2018.

Ganna M. Shayakmetova. 2013. CYP2E1 Testis Expression And Alcohol Mediated Changes Of Rat Spermatogenesis Indices And Type I Collagen. DOI : 10.2478/10004-1254-64-2013-2313. Accepted in February 2013.

Glaucia E.M.L.2015. Spermatic and testicular damages in rats exposed to ethanol : Influence of lipid peroxidation but not testosterone. Journal homepage : www.elsevier.com/locate/toxicol. Department of general Biological Sciences. Accepted 26 January 2015.

Harasym J, Oledzki R, 2014. Effect of fruit and vegetable antioxidants on total antioxidant capacity of blood plasma. Nutrition Journal 30:511-517.

Hari Priya, Girish, 2014. Alcohol. Restraint stress exacerbates alcohol-induced reproductive toxicity in male rats. Departement of Biotechnology Sri Venkateswara University, Trirupati, India.

Hatta Mochammad, SpMK, Phd, dr, Prof. 2018. Pelatihan Aplikasi Teknik Biologi Molekuler dan Imunologi dalam Penelitian bidang Kesehatan. Laboratorium Biologi Molekuler dan Imunologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Hasanuddin, Makassar.

Herlin M. Titabano, Marcus J. Pattinama. 2017. Peran pengelolaan Sumberdaya Alam Tanaman Aren (Sageru) Terhadap Pendapatan Masyarakat Di Negeri Murnaten Kecamatan Taniwel Kabupaten Seram Bagian Barat.

Izabela Korwel. 2014. Cytochrom P450 mRNA Expression in the Rodent Brain : Species, Sex, and Region- Dependent Differences. Online <http://dmd.aspetjournals.org/content/suppl/2013/11/19dmd.113.054239.DC1.html> . Accepted November 19, 2013.

Julie Massart, 2022, Role of Mitochondria Cytochrome P450 2E1 in Healthy and Diseased Liver. PMID:350353401.PMC8774478.

Jungwirth, A.et al. A. 2015. Guidelines on Male Infertility.online.European: European Association of Urology.

Katen, A. L., Sipilä, P., Mitchell, L. A., Stanger, S. J., Nixon, B., & Roman, S. D. (2017). Epididymal CYP2E1 plays a critical role in acrylamide-induced DNA damage in spermatozoa and paternally mediated embryonic resorptions. *Biology of Reproduction*, 96(4), 921–935. <https://doi.org/10.1093/biolre/iox021>

Katzung, Bertram G. 2010. Etanol. Farmakologi Dasar dan Klinik. Edisi ke 10. Ahli bahasa : dr. Aryandhito Widhi Nugroho. Jakart :EGC, hal 371.

Ketut Sukada. 2016. Gametogenesis Oogenesis Spermatogenesis.online simdos.unud.ac.id Laboratorium Reproduksi Universitas Udayana.

- Kristina. 2019. Efek Pemberian Minuman Sopi Dibandingkan Alkohol Jenis lainnya Terhadap Gambaran Histopatologi Hati Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Galur Sprague dawley. Universitas Nusa Cendana.
- Krisna. 2018. Pengaruh Suhu Terhadap Pemeriksaan Motilitas Sperma. Karya Tulis Ilmiah. Online repository.poltekkes-denpasar.Politekes Kesehatan Kemenkes Denpasar. Jurusan Analis Kesehatan.Denpasar.
- K.Rahmat.P. 28-Juni-2019. Legalkan Miras Sopi di Maluku Timbulkan Perdebatan di Masyarakat. Kompas.com. hal: 1-2.
- Landung Hari Sutrisno. 2010. Pengaruh Hormon Testosteron Undekanoat (TU) dan Medroksiprogesteron asetat (MPA) terhadap Konsentrasi Spermatozoa dan Spermatogenesis Tikus Jantan (*Rattus novergicus*) Galur Sprague Dawley.
- Le Daré, B., Lagente, V., & Gicquel, T. (2019). Ethanol and its metabolites: update on toxicity, benefits, and focus on immunomodulatory effects. *Drug Metabolism Reviews*, 51(4), 545–561. <https://doi.org/10.1080/03602532.2019.1679169>
- Leise, M, Poterucha, J & Talwalkar, J 2014. Drug-induced liver injury. *Mayo Clin Proc.* 89,95-106.
- Lella, T., Ruckmani, A., Pandiyan Pandiyan, N., & Arunkumar, R. (2021). Semen and Spermatozoa Characteristics in Alcohol Users and Non-Users. *Journal of Pharmaceutical Research International*, 33, 102–106. <https://doi.org/10.9734/jpri/2021/v33i55b33852>
- Liangpunsakul Suthat & David W. Crabb, 2020. Natural History and Cofactor of Alcoholic Liver Disease p:346.
- M.Jin,A Ande, 2013, Regulation of cytochrome P450 2e1 expression by ethanol: role of oxidative stress-mediated pkc/jnk/sp1 pathway, Citation: Cell Death and Disease, Macmillan Publishers Limited All rights reseved.
- Mahsa Darbandi, Sara Darbandi. 2018. Reactive Oxygen Spesies and male reproductive hormones. *Reproductive Biology and Endocrinology.* <https://doi.org/10.1186/s1258-0180-0406-2>.
- Marliyati Sanaky, 2016. Pengaruh Pemberian Minuman Sopi Beralkohol terhadap jumlah Sel Sertoli Tubulus Seminiferus pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) jantan. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Marzieh Rahimpour, Ali Reza Talebi. 2013. Effect of different doses of ethanol on sperm parameters, chromatin structure and apoptosis in adult mice. *Journal. European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejogrb.2013.06.038>.accepted 27 june 2013.
- Md Saidur Rahman, 2013. Sperm Proteomics : Road to Male Fertility and contraception. *International Journal of Endocrinology.* <http://dx.doi.org/10.1155/2013/360986>. Departement of animal science and technology.

- Mentri Pertanian. 2013. Pedoman Budidaya Aren (Aren pinnata MERR). Lampiran Peraturan Mentri Pertanian Republik Indonesia. Nomor 133/Permentan/OT.140/12/2013.
- Mirtha Y. S. Risakotta., Ronaldo Talapessy, Rosita De Fretes. 2017. Alcohol Concentration Detector In Liquer Based On Microcontroller. Physics Departmen, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Pattimura University, Maluku.
- Mody Lembang. 2012. Pohon Aren dan Manfaat Produksinya. Balai Penelitian Keuhatanan Makassar. Info Teknis EBONI vol.9 No.1., Oktober 2012 hal : 37-54.
- Muslim Akmal, Dian Masyitah, Hafizuddin, Fitriani. 2015. Epididimis dan Perannya Pada Pematangan Spermatozoa. Jurnal JESBIO Vol. IV No.2. November 2015. ISSN : 2302-1705. Disetujui 18 Agustus 2015.
- Ni Wayan. 2016. Penurunan Jumlah Sel Spermatogenik setelah pemberian Alkohol Peroral Secara Kronis Pada Tikus Putih (*Rattus sp.*) Prosiding seminar Nasional Prodi Biologi F. MIPA UNHI. ISBN:978-602-9138-68-9.
- Rahima Begum, Johny Bajgai. 2018. Molecular hydrogen may enhance the production of testosterone hormone in male infertility through hormone signal modulation and redox balance. Medical Hypothese. Department of Environmental Medical Biology.
- Renata Finelli, Impact of Alcohol Cinsumption on Male Fertility Potential : A Narrative Review, International Journal of Enviromental Research and Public Health, 2022.
- Retno Anggi. 2016. Pengaruh Pemberian Dark Chocolate Terhadap jumlah Spermatozoa Mencit Balb/C Jantan Yang Dipapar Asap Rokok. Jurnal Kedokteran Dipenogoro, Volume 5, Nomor 4 Oktober 2016, Online <http://ejournal-s1.undip.ac.id/index.php/medico>. ISN 2540-8844.
- Riska Musa. 2014. Kajian Tentang Lama Fermentasi Nira Aren (*Arenga pinnata*) Terhadap Kelimpahan Mikroba dan kualitas Organoleptik Tuak. Program Studi Pendidikan Biologi, E-mail: riska_mussa@yahoo.com.
- Shayakhmetova, G. M., Bondarenko, L. B., Kovalenko, V. M., & Ruschak, V. V. (2013). CYP2E1 testis expression and alcohol-mediated changes of rat spermatogenesis indices and type I collagen. *Arhiv Za Higijenu Rada i Toksikologiju*, 64(2), 237–246. <https://doi.org/10.2478/10004-1254-64-2013-2313>
- Shayakhmetova, G. M., Bondarenko, L. B., Matvienko, A. V., & Kovalenko, V. M. (2014). Correlation between spermatogenesis disorders and rat testes CYP2E1 mRNA contents under experimental alcoholism or type I diabetes. *Advances in Medical Sciences*, 59(2), 183–189. <https://doi.org/10.1016/j.advms.2014.03.004>
- Siera Adelti, Achmad zulfa, Ika Pawitra, Histopatologi Spermatogenesis Testis Tikus Wistar Diabetes Melitus. Jurnal Kedokteran Dipenogoro. Volume 5, Nomor 4, Oktober 2016, Online <http://ejournal-s1.undip.ac.id/index.php/medico>. ISSN Online: 2540-8844.

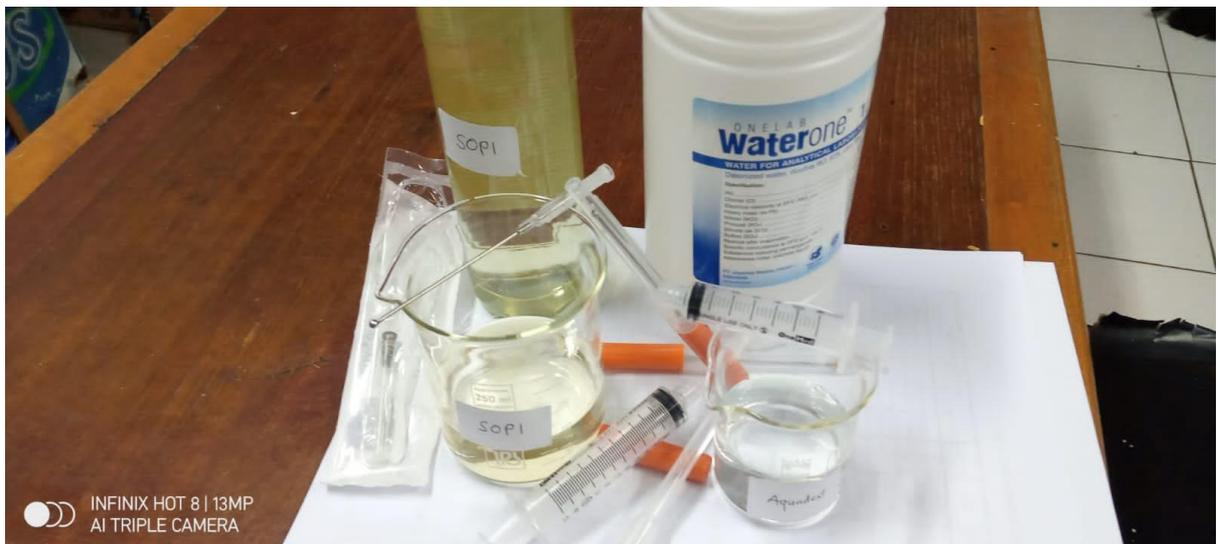
- Silvia W Lestari. 2015. Fragmentasi DNA Spermatozoa : Penyebab, Deteksi, dan Implikasinya pada Infertilitas laki-laki. Departemen Biologi Medik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Volume 3 No 2 Agustus 2015. Departemen Biologi Medik Fakultas Kedokteran Universitas Tarumanegara.
- Sinta. 2018. Penambahan Etanol dan Metanol pada Minuman Keras Oplosan dalam Mempengaruhi Penurunan Kesadaran Pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Jantan. Universitas Udayana Bali.
- Suhardi. 2011. Preferensi Peminum Alkohol Di Indonesia Menurut Riskesdas 2007. Pusat Teknologi Terapan Kesehatan dan Epidemiologi Klinik. Buku Penelitian Kesehatan. Vol.39, No 4, 2011: 154-164.
- Soheila, Parvin, Tahereh, Esmat, 2017. The etiologies of sperm DNA abnormalities in male infertility : An assessment and review. International Jurnal Repro BioMed Vol. 15 No. 6. PP : 331-344, June 2017. Accepted 20 February 2017.
- Sulagna Dutta, Ahmad Majzoub, Ashok, 2019. Oxidative stress and sperm function: A systematic review on evaluation and management. Arab Journal of Urology. Online : Journal homepage: <http://www.tandfonline.com/loi/taju20>. ISSN: 2090-598X.
- Sosa V, Molinea T, Somoza R, Paciuccib R, Kondohc H, Leonarta ME, 2013. Review Oxidative stress and cancer: An overview. Ageing Research Reviews 12:376-390.
- ST. Aisyah, Husnul, Sri Damayanti. 2017. Pengaruh Pemberian Alkohol Terhadap Organ Vital Mencit ICR. Jurnal Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, UIN Makassar. ISBN : 978-602-72245-2-0.
- Susilawati. 2011. Buku Spermatology. Perpustakaan National RI : Katalog Dalam Terbitan (KDT). Cetakan Pertama. April 2011. Penerbit Universitas Brawijaya Press (UB Press). <http://www.ubpress.ub.ac.id>. ISBN : 978-602-8960-04-5.hal 25.
- Sri Utami., 2010. Etiologi Infertilitas pada Pria Akibat dari Mutasi DNA Mitokondria (mtDNA). Vol.9 No 1 Juli 2010;hal 85-94.Fakultas Kedokteran Universitas Kristen Maranatha. Bandung. Indonesia.
- Syahran Wael, Theopilus W, Winarto. 2012. Pemberian Minyak Jintan Hitam (*Nigella sativa*) Terhadap Motilitas dan Jumlah Spermatozoa Tikus Sprague Dawley Yang Dipapar Minuman Tradisional Arak Ambon (Sopi). Program Pendidikan Biologi dan Pendidikan Dokter Universitas Pattimura. Program Ilmu Biomedik Universitas Diponegoro.. Diterima 15 Juli 2012. Dietrima 24 September 2012.
- Tod Fullston, Nicole, Deirdre and Michelle. 2017. The most common vices of men can damage fertility and the health of the next generation. Journal of Endocrinology. <http://joe.endocrinology-journal.org>. DOI: 10.1530/JOE-16-0382. Download from Bioscientifica.com at 02/13/2020 01:08:34PM.
- Topaz Kautsar. 2015. Konsumsi Alkohol dan Pengaruhnya terhadap Kesehatan. Majority. Volume 4. Nomor 8. November 2015. Fakultas Kedokteran. Universitas Lampung.

- Tri Panjiasih Susmiarsih. 2010. Peran Genetik DNA Mitokondria (mtDNA) Pada Motilitas Spermatozoa. Majalah Kesehatan PharmaMedika, No2, Bagian Anatomi Fakultas Kedokteran YARSI, Jakarta
- Tri Rini Puji Lestari. 2016. Menyoal Pengaturan Konsumsi Minuman Beralkohol Di Indonesia. Pusat Penelitian Badan Keahlian DPR RI. Diterbitkan 22 Desember 2016.
- Viona Milana, Deasy Lourens. 2016. Faktor-Faktor Yang Berhubungan Dengan Praktik Mengonsumsi Sopi (Minuman Alkohol Tradisional) Pada Remaja Di Desa Tawiri Kecamatan Teluk Ambon Kota Ambon. Fakultas Kesehatan Masyarakat Universitas Diponegoro. Jurnal Kesehatan Masyarakat (e-Journal) Volume 4, Nomor 3, April 2016 <http://ejournal-s1.undip.ac.id/index.php/jkm> (ISSN: 2356-3346).
- Yongke Lu, Artur I. Cederbaum, CYP2E1 and Oxidative Liver Injury by Alcohol. 2009. Publish in final edited form as : Free Radiac Biol Med. 2008 March 1; 44(5): 723-738. Department of Pharmacology and Systems Therapeutics, Mount Sinai School of Medicine New York, NY 10029.
- Yusmiati Liau, Dewi Muliaty. 2014. The Pharmacogenetic of Cytochrome P450 2c19 enzymes- Effects on Clopidogrel and Proton Pump Inhibitors. Indones Biomed J. 2014; 6(1): 33-44. DOI: 10.18585/inabj.v6i1.41. Prodi Clinical Laboratory. Jakarta. Indonesia.
- Zainuddin M, 2011. Konsep Dasar Rancangan Penelitian Ekperimental Metodolo Surabaya, Penelitian. Pusat Penerbit Percetakan Unair. (AUP), hal 55.
- Zuhud Zinedine. 2020. Pengaruh Paparan Kebisingan Terhadap Morfologi Spermatozoa Mencit Jantan (*mus Musculus I*) Yang Diberikan Ekstrak Biji Anggur (*Vitis Vinifera I*). UPN Veteran Jakarta, Fakultas Kedokteran, Prpgram Studi Sarjana Kedokteran.

LAMPIRAN

DOKUMENTASI PENELITIAN

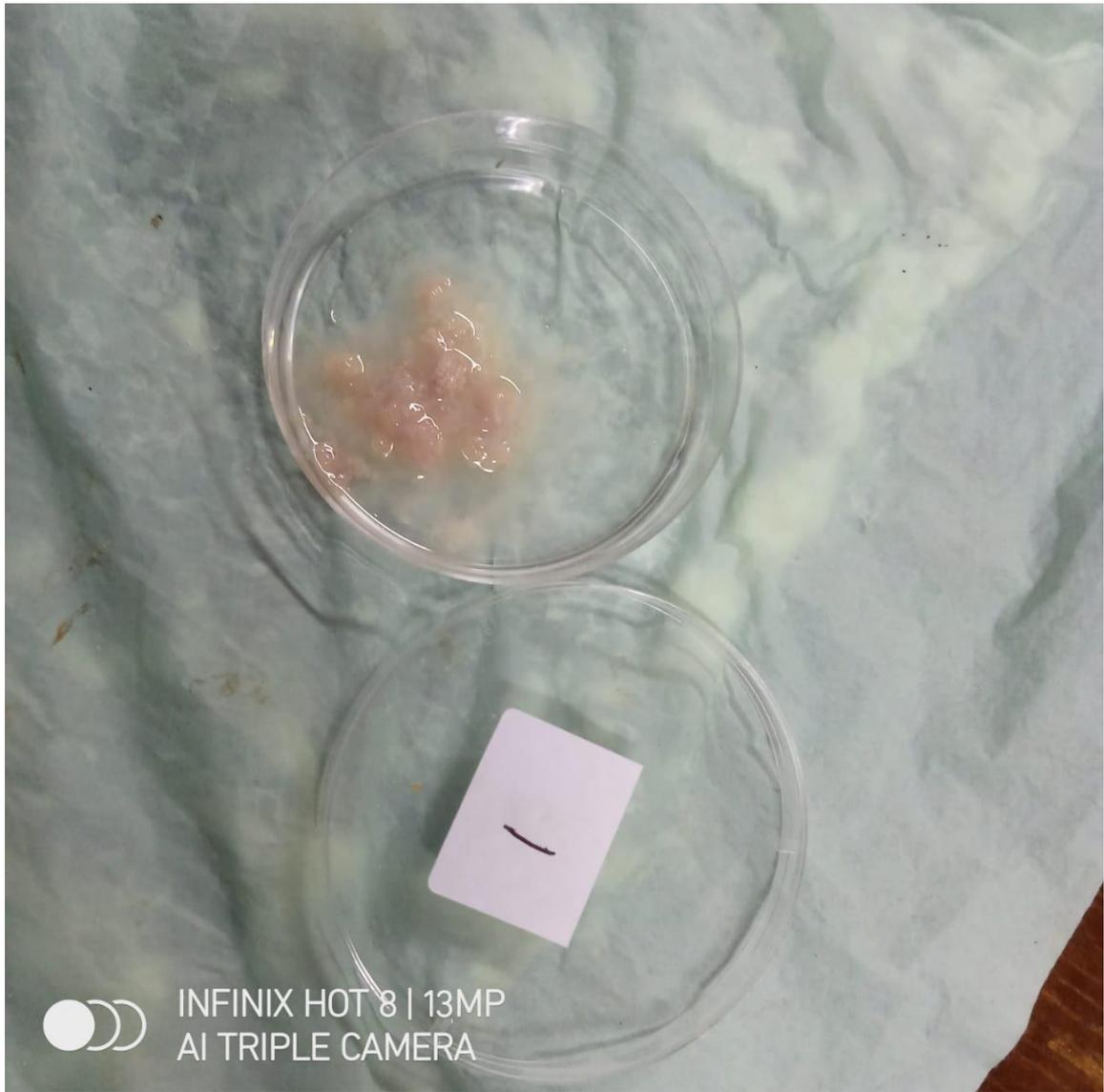














INFINIX HOT 8 | 13MP
AI TRIPLE CAMERA







	20 g mencit	200 g tikus	400 g marmut	1,5 kg kelinci	2,0 kg kucing	4,0 kg kera	12,0 g anjing	70,0 kg manusia
20 g mencit	1,0	7,0	12,25	27,8	29,7	64,1	124,2	387,9
200 g tikus	0,14	1,0	1,74	3,9	4,2	9,2	17,8	56,0
400 g marmut	0,08	0,57	1,0	2,25	2,4	5,2	10,2	31,5
1,5 kg kelinci	0,04	0,25	0,44	1,0	1,08	2,4	4,5	14,2
2,0 kg kucing	0,03	0,23	0,41	0,92	1,0	2,2	4,4	13,0
4,0 kg kera	0,016	0,11	0,19	0,42	0,45	1,0	1,9	6,1
12,0 g anjing	0,008	0,06	0,10	0,22	0,24	0,52	1,0	3,1
70,0 kg manusia	0,0026	0,018	0,031	0,07	0,076	0,16	0,32	1,0

)Laurence DR, Bacharah AL. 1964. *Evaluation of Drug Activities Pharmacometrics*. Volume 1. Academic Press. London and New York. Hlm 61.]

Deskripsi Spermatozoid

Rerata (mean) dan simpangan deviasi (SD) jumlah Spermatozoid setiap tikus pada kelompok Aquades 2 ml, kelompok Sopi Mayang 2,7 ml), kelompok Sopi Mayang 4,5, dan kelompok Sopi Mayang 5,4 ml.

Tabel 5.1 Rerata jumlah Spermatozoid pada kelompok kontrol dan perlakuan

Kelompok	Jumlah		
	Range	SD	Mean
Aquades 2ml	2950000,00	896970,20	56680000,00
Sopi 2,7 ml	3700000,00	1154231,34	338150000,00
Sopi 4,5 ml	1700000,00	530225,31	22865000,00
Sopi 5,4ml	1500000,00	449691,25	18700000,00

Tabel di atas merupakan nilai rata-rata dan distribusi dari jumlah Sperma berdasarkan kelompok perlakuan.

5.1.3 Uji Normalitas Pada Jumlah Spermatozoid

Tabel 5.2 Hasil uji normalitas Jumlah Spermatozoid Shapiro-wiks

Kelompok	p
Jumlah Spermatozoid	
Aquadest 2 ml	0,870
Sopi 2,7 ml	0,959
Sopi 4,5 ml	0,345
Sopi 5,4 ml	0,723

Tabel di atas menunjukkan nilai berdistribusi Normal pada jumlah Sperma berdasarkan kelompok perlakuan.

5.1.4 Uji Homogenitas Pada Jumlah Spermatozoid

Tabel 5.3 Hasil uji homogenitas Jumlah Spermatozoid dengan Levene test

Variabel	Levene test	P
Jumlah Spermatozoid		
Aquadest 2 ml	2,952	0,046
Sopi 2,7 ml	2,928	0,047
Sopi 4,5 ml	2,928	0,054
Sopi 5,4 ml	2,945	0,046

Tabel di atas pada Jumlah sperma data sebelumnya yaitu data distribusi normal karena nilai p semua lebih dari 0,05 tetapi tidak homogen karena nilai p 0,046 kurang dari 0,05 berarti tidak homogen, tidak terpenuhinya salah satu syarat sehingga data akan di uji lanjut dengan non parametrik yaitu uji Kruskal Wallis.

5.1.5 Uji Analisis Perbedaan Pada Jumlah Spermatozoid

Tabel 5.4 Hasil analisis perbedaan jumlah Spermatozoid dengan uji Kruskal Wallis

Kelompok	n	Rata-rata rangking	p
Aquadest 2 ml	10	35,50	
Sopi 2,7 ml	10	25,50	
Sopi 4,5 ml	10	15,50	<0,001
Sopi 5,4 ml	10	5,50	

Tabel hasil uji diatas menunjukkan nilai p <0,000 berarti signifikan, ada pengaruh perlakuan secara signifikan terhadap jumlah sperma berdasarkan kelompok perlakuan.

5.1.6 Deskriptif Ekspresi Gen CYP2E1

Rerata (mean) dan simpangan deviasi (SD) EkspresiGen CYP2E1 setiap tikus pada kelompok Aquadest 2 ml, kelompok Sopi 2,7 ml, dan kelompok Sopi 4,5 ml dan kelompok Sopi 5,4 ml

Tabel 5.5 Rerata Ekspresi Gen CYP2E1 pada kelompok kontrol dan perlakuan

Kelompok	Jumlah			
	Rerata	SD	Minimum	Maksimum
Aquadest 2 ml	5,80460	0,916179	4,586	7,247
Sopi 2,7 ml	8,62030	0,774894	7,327	9,503
Sopi 4,5 ml	11,46950	0,894041	10,263	12,651
Sopi 5,4 ml	14,21150	0,729217	13,082	15,135

Tabel di atas merupakan nilai rata-rata dan distribusi dari jumlah Ekspresi Gen CYP2E1 berdasarkan kelompok perlakuan.

Tabel 5.6 Hasil Uji Normalitas Shapiro-Wilk pada Ekspresi Gen CYP2E1

Kelompok Ekspresi Gen CYP2E1	P
K	0,676
P1	0,337
P2	0,417
P3	0,519

Pada Tabel di atas uji normalitas menunjukkan semua kelompok signifikan dengan nilai p lebih dari 0,000.

Tabel 5.7 Hasil Ekspresigen CYP2E1 Uji Homogenitas dengan Levene test

Variabel Ekspresigen CYP2E1	P
K	0,848
P1	0,866
P2	0,866
P3	0,838

Pada tabel di atas menunjukkan hasil uji homogenitas signifikan dengan nilai p kurang dari 0,000

Untuk hasil uji Ekspresigen CYP2E1 pada semua kelompok baik uji normalitas dan uji homogenitas nilai p semuanya lebih dari 0,000 berarti semua data memenuhi syarat, berdistribusi normal dan homogen, kemudian uji lanjutan dengan uji parametrik yaitu one way anova.

Tabel 5.8 Anova Ekspresigen CYP2E1

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
(PCR) RT-PCR Gen CYP450 [Fold Change]	Between Groups	393,983	3	131,328	189,580	0,000
	Within Groups	24,938	36	0,693		
	Total	418,921	39			

Pada Tabel di atas menunjukkan nilai p lebih dari 0,000 yang berarti signifikan pada jumlah Ekspresigen CYP2E1.

Multiple Comparisons

Tabel 5.9 Hasil Uji Tukey HSD_a Pada Ekspresigen CYP2E1 dan Kadar Protein CYP2E1

Dependent Variable+A572:H585			Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
(PCR) Expresigen Gen CYP2E1 [Fold Change]	Aquadest [2 mL]	Sopi [2,7 mL]	- 2.815700*	0,372217	0,000	- 3,81817	-1,81323
		Sopi [4,05 mL]	5.664900*	0,372217	0,000	6,66737	-4,66243
	Sopi [2,7 mL]	Sopi [5,4mL]	- 8.406900*	0,372217	0,000	- 9,40937	-7,40443
		Aquadest [2 mL]	2.815700*	0,372217	0,000	1,81323	3,81817
		Sopi [4,05 mL]	- 2.849200*	0,372217	0,000	- 3,85167	-1,84673
		Sopi [5,4mL]	5.591200*	0,372217	0,000	6,59367	-4,58873
	Sopi [4,05 mL]	Aquadest [2 mL]	5.664900*	0,372217	0,000	4,66243	6,66737
		Sopi [2,7 mL]	2.849200*	0,372217	0,000	1,84673	3,85167
		Sopi [5,4 mL]	- 2.742000*	0,372217	0,000	- 3,74447	-1,73953
		Aquadest [2 mL]	8.406900*	0,372217	0,000	7,40443	9,40937
	Sopi [4,5 mL]	Sopi [2,7 mL]	5.591200*	0,372217	0,000	4,58873	6,59367
		Sopi [5,4 mL]	2.742000*	0,372217	0,000	1,73953	3,74447

Tabel di atas menjelaskan dari Uji Tukey bisa dilihat selisih antar perlakuan, semakin tinggi nilai konsentrasi Sopi Mayang dibandingkan dengan Aquadest semakin tinggi nilai hitung jumlah Ekspresigen CYP2E1, menunjukkan semua nilai p lebih dari 0,000 berarti signifikan.

Tabel 5.10. Hasil Uji Pengaruh Perlakuan Ekspresigen CYP2E1

(PCR) Ekspresigen CYP2E1 [Fold Change]					
Tukey HSD _a					
Kelompok	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
Aquadest [2 mL]	10	5,80460			
Sopi [2,7 mL]	10		8,62030		
Sopi [4,05 mL]	10			11,46950	
Sopi [5,4mL]	10				14,21150
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 10.000.

Tabel di atas menunjukkan bahwa nilai p sebesar 0,000 berarti signifikan ada pengaruh perlakuan terhadap nilai Ekspresigen CYP2E1

5.1.7 Deskriptif Kadar Potein CYP2E1

Rerata (mean) dan simpangan deviasi (SD) kadar protein setiap tikus pada kelompok P1, kelompok P2, dan kelompok P3

Tabel 5.11. Rerata Kadar Protein CYP2E1 pada kelompok kontrol dan perlakuan

		N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
(ELISA)	Aquadest [2 mL]	10	6,593	3,6399	1,606	11,457
ELISA Rat	Sopi [2,7 mL]	10	27,445	3,6483	22,137	33,750
CYP1B1	Sopi [4,05 mL]	10	47,053	3,0270	42,771	52,207
[ng/mL]	Sopi [4,5 mL]	10	63,674	3,4076	57,599	68,382

Tabel di atas merupakan nilai rata-rata dan distribusi dari jumlah Kadar Protein CYP2E1 berdasarkan kelompok perlakuan.

5.1.8 Analisis Perbandingan

Tabel 5.12 Hasil uji normalitas Shapiro-Wilks Pada Kadar Protein CYP2E1

Kelompok	P
Kadar Protein CYP2E1	
Aquadest [2 mL]	0,471
Sopi [2,7 mL]	0,876
Sopi [4,05 mL]	0,917
Sopi [5,4 mL]	0,877

Hasil uji Normalitas menggunakan uji Shapiro-Wilk pada nilai (kolom sig.) menunjukkan semua nilai lebih dari 0,05, artinya seluruh data berdistribusi Normal.

Tabel Hasil 5.13 Uji homogenitas dengan Levene test pada Kadar Protein CYP2E1

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Kadar Protein CYP2E1 [ng/mL]	Based on Mean	0.288	3	36	0.834
	Based on Median	0.276	3	36	0.843
	Based on Median and with adjusted df	0.276	3	34.524	0.843
	Based on trimmed mean	0.292	3	36	0.831

Pada tabel di atas menunjukkan hasil uji homogeitas signifikan dengan nilai p kurang dari 0,000

Tabel 5.14 ANOVA Kadar Protein CYP2E1

(ELISA) Kadar Protein CYP2E1 [ng/mL]	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	18258.433	3	6086.144	514.313	0.000
Within Groups	426.008	36	11.834		
Total	18684.441	39			

Pada Tabel di atas menunjukkan nilai p lebih dari 0,000 yang berarti signifikan pada jumlah Kadar Protein CYP2E1.

Tabel 5.15 Uji Hasil Kadar Protein CYP2E1 dengan POST HOC (Tukey HSD)

(I) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Sig.	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
Aquadest [2 mL]	Sopi [2,7 mL]	0.000	-24.99549	-16.70891
	Sopi [4,05 mL]	0.000	-44.60319	-36.31661
	Sopi [5,4 mL]	0.000	-61.22459	-52.93801
Sopi [2,7 mL]	Aquadest [2 mL]	0.000	16.70891	24.99549
	Sopi [4,05 mL]	0.000	-23.75099	-15.46441
	Sopi [5,4 mL]	0.000	-40.37239	-32.08581
Sopi [4,05 mL]	Aquadest [2 mL]	0.000	36.31661	44.60319
	Sopi [2,7 mL]	0.000	15.46441	23.75099
	Sopi [4,5 mL]	0.000	-20.76469	-12.47811
Sopi [5,4 mL]	Aquadest [2 mL]	0.000	52.93801	61.22459
	Sopi [2,7 mL]	0.000	32.08581	40.37239
	Sopi [5,4mL]	0.000	12.47811	20.76469

Tabel di atas menjelaskan dari Uji Tukey bisa dilihat selisih antar perlakuan, semakin tinggi nilai konsentrasi Sopi Mayang dibandingkan dengan Aquadest semakin tinggi nilai hitung jumlah Kadar Protein CYP2E1, menunjukkan semua nilai p lebih dari 0,000 berarti signifikan.

Tabel 5.16. Uji Kadar Protein CYP2E1 Homogen (Tukey HSD)

Kelompok	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
Aquadest [2 mL]	10	6.59350			
Sopi [2,7 mL]	10		27.44570		
Sopi [4,05 mL]	10			47.05340	
Sopi [5,4mL]	10				63.67480
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Tabel di atas menunjukkan bahwa nilai p sebesar 0,000 berarti signifikan ada pengaruh perlakuan terhadap nilai Kadar Protein CYP2E1.