

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

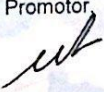
*THE EFFECT OF ALCOHOLIC BEVERAGE "SOPI MAYANG" ON
SPERMATOZOID COUNT, EXPRESSION OF CYTOCHROME P450
mRNA, AND CYTOCHROME CYP2E1 PROTEIN LEVELS
IN MALE WHITE RATS (*Rattus norvegicus*)*

Disusun dan diajukan
Oleh

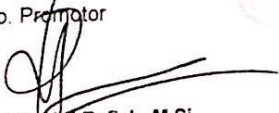
Marliyati Sanaky
C013181034

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

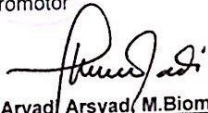
Menyetujui
Promotor,


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,



[Signature]
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 antarkelompok 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 BB/ 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 kadar 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) 586010, (0411) 586297
E-MAIL: info@kfdk.kemendikbud.go.id

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 berabagai 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 thiocyanate
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-hari 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-hari 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 yang 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 Leydig.

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 digunakan 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 suksesi 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 suksesi jika substratnya mengandung asam. Suksesi 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.	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.	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

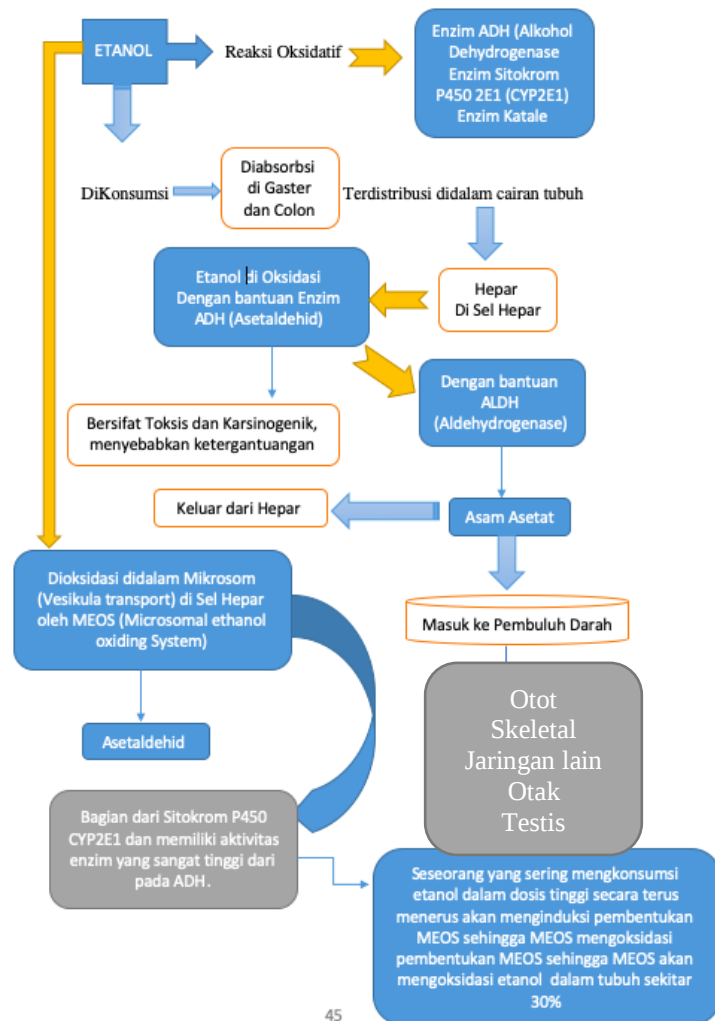
Pada sistem ini berlangsung dengan menggunakan katalase. Pada sistem diperlukan H_2O_2 . dan sistem akan berfungsi ketika kadar alkohol didalam tubuh meningkat (Marliyati., 2016).

c. Jalur Sistem Oksidasi 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, H_2O_2) (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 aldehidrogenase 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).

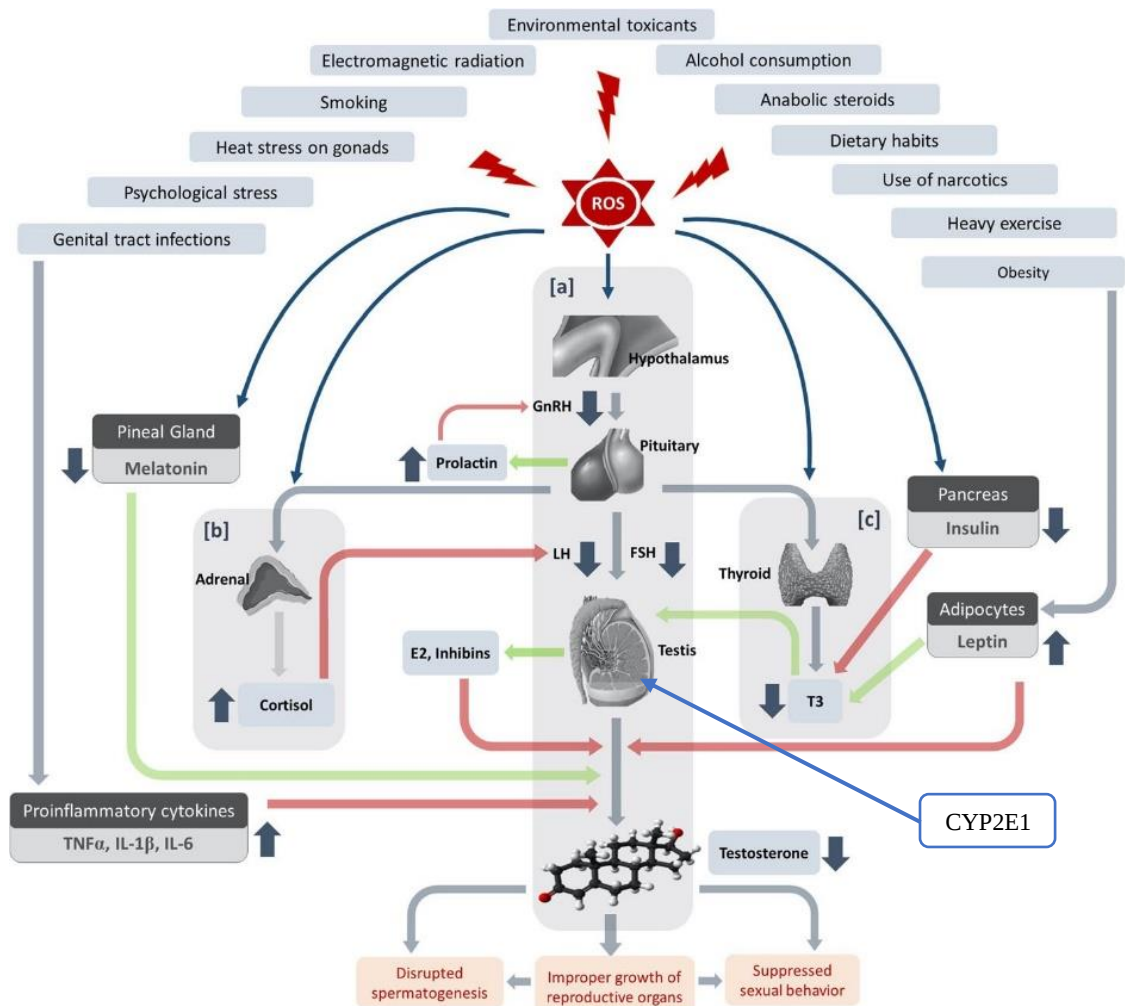
2.2.3. Hubungan Alkohol dengan Radikal Bebas

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 melekul 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 testosteron (Mahsa Darbandi,dkk.,2018).

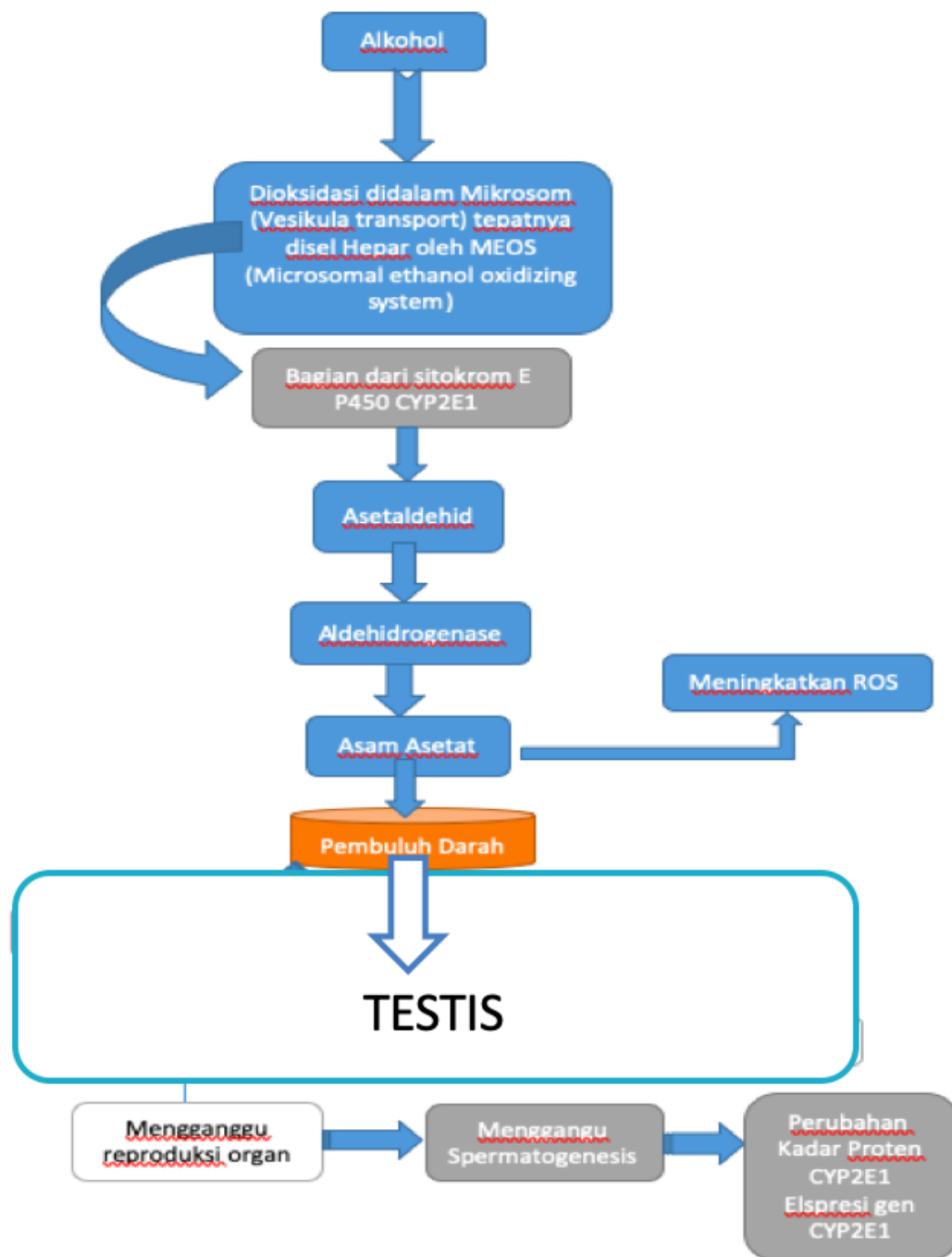
2.3 Sitokrom P450 (CYP) CYP2E1

Cytochrome P450E1 (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 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 rentang 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).

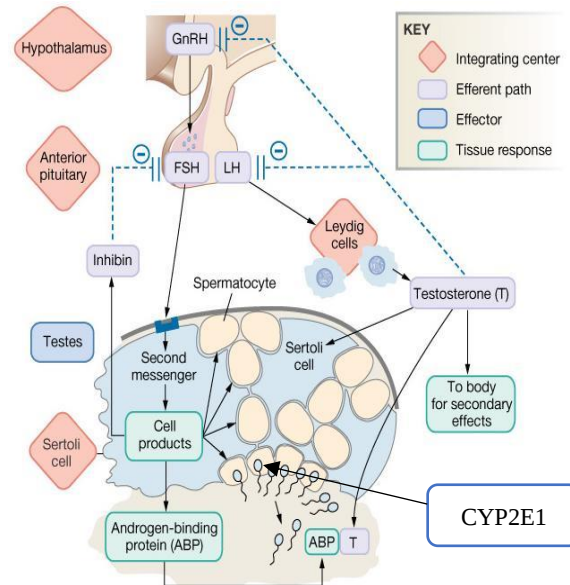
Produksi testosteron didahului beberapa tahap yang melibatkan beberapa hormon dan tahap-tahap ini bertanggung jawab atas perubahan tingkah laku. Otak

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 seminifirus 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 spermatozit primer, kemudian perkembangan berlanjut menjadi spermatozit sekunder. Pematangan spermatozit 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

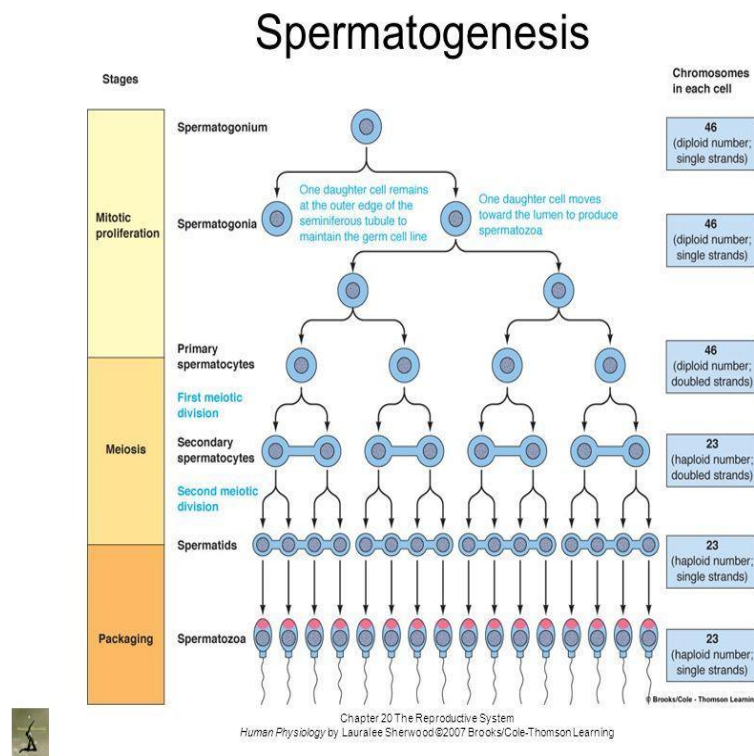
dan berfungsi sebagai tempat transportasi, pematangan, dan penyimpanan spermatozoa. Dalam fungsinya sebagai tempat sekresi dan absorpsi, epitel epididymis untuk pematangan spermatozoa. Epididimis mamalia mempunyai 2 fungsi utama, yaitu, 1) mikro yang unik di *hearts* lumen duktus yang berfungsi membantu 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 deferen 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).



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-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).

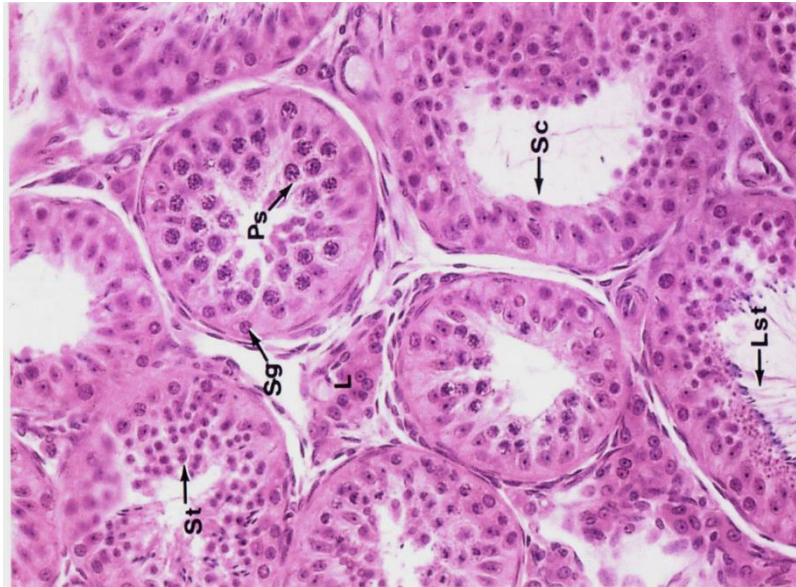
Tabel 2.4

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

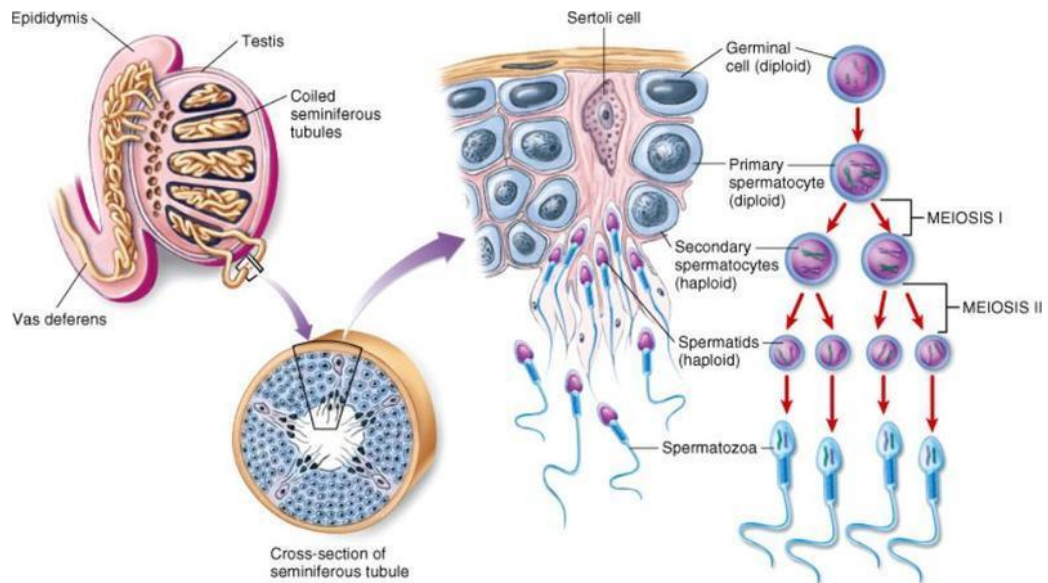
Setiap tubulus seminiferus dilapisi oleh epitel berlapis kubis dan panjangnya 30-70 cm. Panjang seluruh tubulus satu testis mencapai 250 m. Tubulus kontortus ini membentuk jalinan, tempat masing-masing tubulus berakhir buntu atau dapat bercabang. Pada ujung setiap lobulus, lumennya menyempit dan berlanjut 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

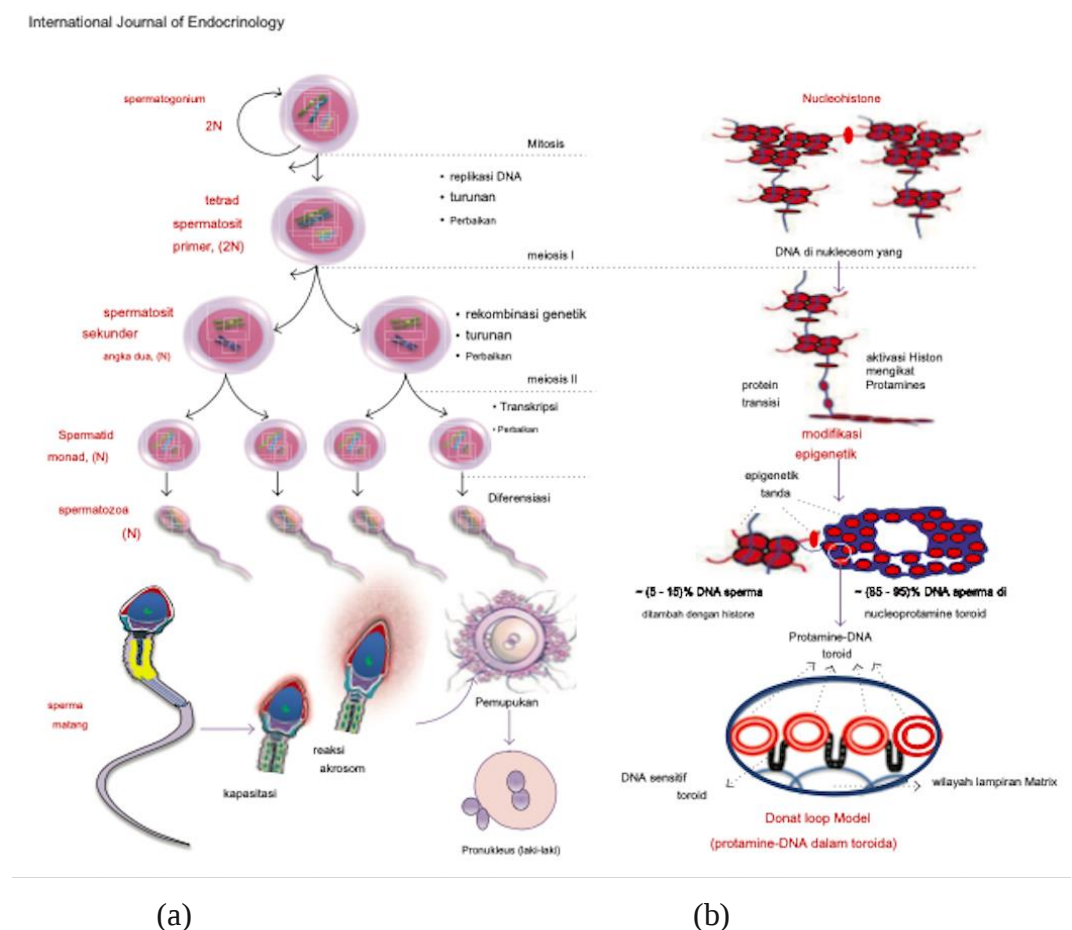
(Marliyati, 2016)

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 analisi 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).

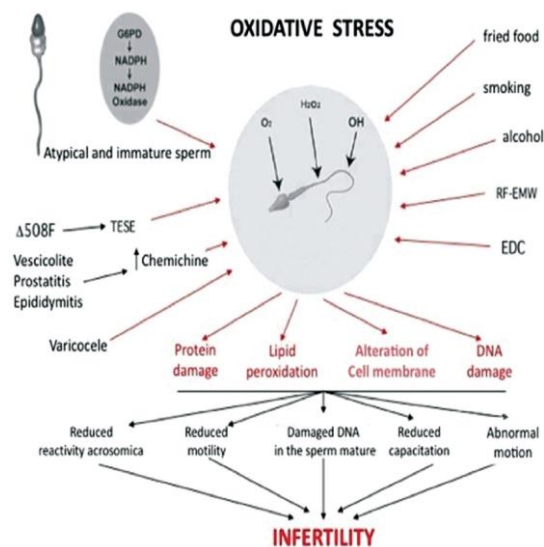
Berbagai jenis molekul, seperti gen, messenger RNA, microRNA, protein, metabolit atau kombinasi keduanya, dapat berfungsi sebagai biomarker. Meskipun pendekatan untuk penemuan dan pengembangan biomarker semakin cepat matang dan jumlah penemuan biomarker semakin meningkat, dalam ulasan oleh Kovac *et*

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).

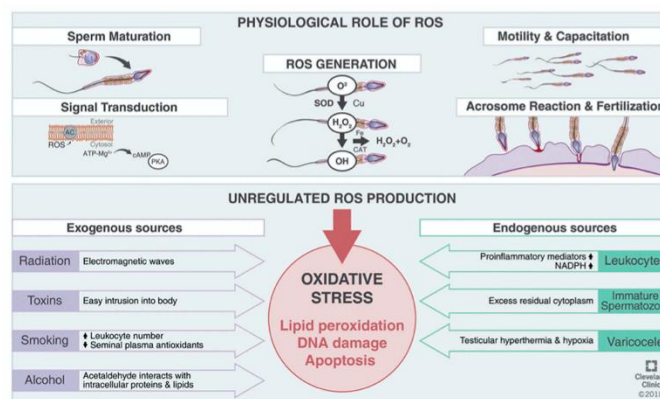


Gambar 2.10

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 membran 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. Asetaldehid, 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).

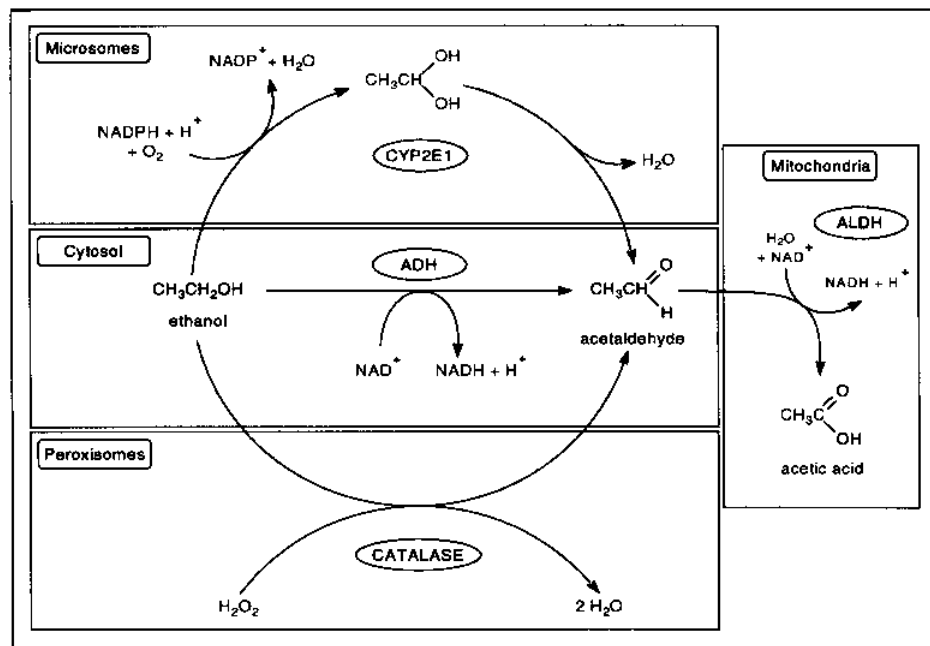
Hasil dari banyak penelitian menunjukkan bahwa toksisitas alkohol dipengaruhi oleh oksigen reaktifn spesies (ROS), yang mengarah ke stres oksidatif. ROS sangat reaktif dan tidak memiliki target spesifik, hal ini dapat menyebabkan banyak lesi saat bereaksi dengan komponen seluler seperti asam nukleat, 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.Begriche, 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).

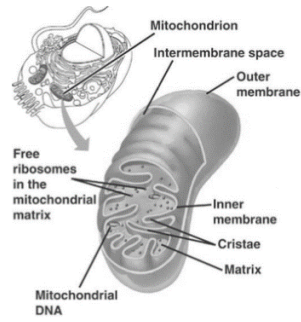


Gambar 2.12

Mekanisme Alkohol dan Mitokondria

(Sri Utamai, 2010)

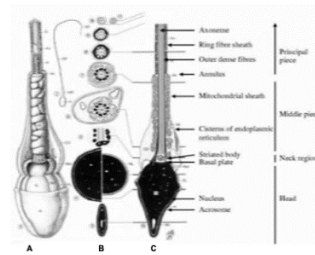
Molekul histon yang tidak terdapat pada mtDNA menyebabkan kurangnya sistem repair. mtDNA secara fisik berhubungan dengan membran dalam, memungkinkan radikal oksigen mutagenik (ROS) yang dibebaskan dari produk OXPHOS lebih meningkatkan mutasi mtDNA. Berbagai tipe mutasi gen termasuk delesi, mutasi titik, 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).

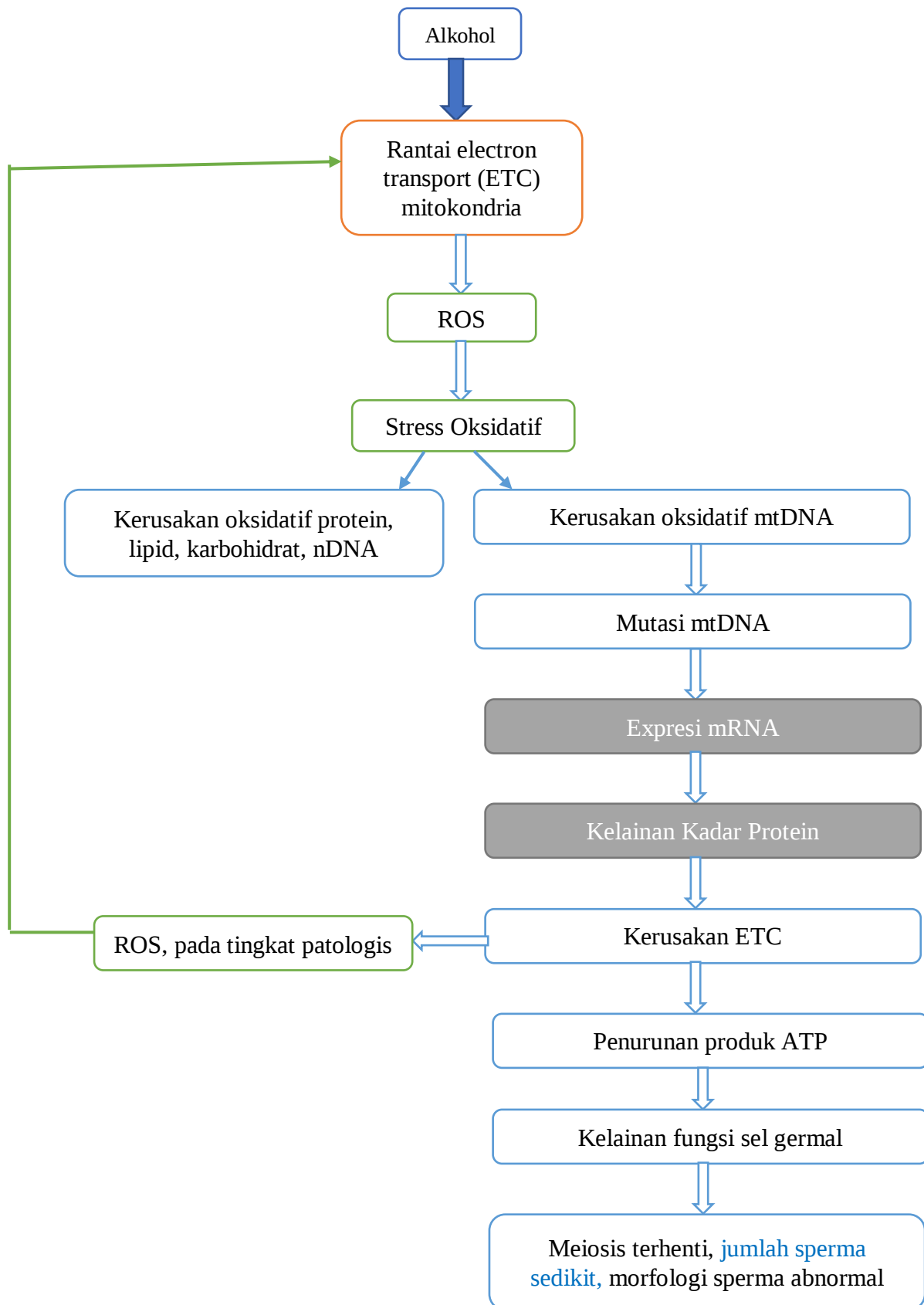


Gambar 2. Spermatozoa manusia.

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 mikrofili 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 Indicis 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-obatan tertentu.

Regulation of cytochrome P450 2e1 expression by ethanol: role of oxidative stress-mediated pkc/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.