

**PENGARUH PEMBERIAN SUSU KEDELAI
TERHADAP JUMLAH SEL SPERMATOGONIA YANG
MENGEKSPRESIKAN RESEPTOR ESTROGEN
ALPHA, JUMLAH SPERMATOZOA DENGAN
MORFOLOGI DAN PERGERAKAN NORMAL PADA
TIKUS WISTAR (*Rattus norvegicus*) JANTAN**

TESIS

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Magister**



**OLEH:
RIFZI DEVI NURVITASARI
196070400111027**

**PROGRAM STUDI MAGISTER KEBIDANAN
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

MALANG

2021

TESIS

PENGARUH PEMBERIAN SUSU KEDELAI TERHADAP JUMLAH SEL SPERMATOGONIA YANG MENGEKSPRESIKAN RESEPTOR ESTROGEN ALPHA, JUMLAH SPERMATOZOA DENGAN MORFOLOGI DAN PERGERAKAN NORMAL PADA TIKUS WISTAR (*Rattus norvegicus*) JANTAN

Oleh:
RIFZI DEVI NURVITASARI
196070400111027

Dipertahankan didepan penguji
pada tanggal: 26 Juli 2021
dan dinyatakan memenuhi syarat

KOMISI PEMBIMBING



Prof. Dr. dr. Nurdiana, M.Kes
NIP 195510151986032001
Ketua



Dr. dr. I Wayan Agung Indrawan, Sp.OG(K)
NIP 197103232006041019
Anggota

Malang, 9 Agustus 2021
Universitas Brawijaya
Fakultas Kedokteran
Dekan,



Dr. dr. Wisnu Barlianto, M.Si.Med., Sp.A(K)
NIP 197307262005011008

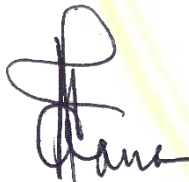
TESIS

PENGARUH PEMBERIAN SUSU KEDELAI TERHADAP JUMLAH SEL SPERMATOGONIA YANG MENGEKSPRESIKAN RESEPTOR ESTROGEN ALPHA, JUMLAH SPERMATOZOA DENGAN MORFOLOGI DAN PERGERAKAN NORMAL PADA TIKUS WISTAR (*Rattus norvegicus*) JANTAN

Oleh:
RIFZI DEVI NURVITASARI
196070400111027

Dipertahankan didepan penguji
pada tanggal: 26 Juli 2021
dan dinyatakan memenuhi syarat

KOMISI PENGUJI



Prof. Dr. dr. Nurdiana, M.Kes
NIP 195510151986032001
Ketua



Dr. dr. I Wayan Agung Indrawan, Sp.OG(K)
NIP 197103232006041019
Anggota Penguji



Dr. dr. Karyono Mintaroen, Sp.PA
NIPK 20170250111611001
Anggota Penguji



Dr.rer.nat Tri Yudani Mardining Raras, M.App.Sc
NIP 196511051993032001
Anggota Penguji

PERNYATAAN ORISINALITAS TESIS

Saya menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa sepanjang pengetahuan saya, di dalam Naskah TESIS ini tidak terdapat karya ilmiah yang pernah diajukan oleh orang lain untuk memperoleh gelar akademik di suatu Perguruan Tinggi, dan tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis di kutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka.

Apabila ternyata di dalam naskah TESIS ini dapat dibuktikan terdapat unsur-unsur PLAGIASI, saya bersedia tesis ini digugurkan dan gelar akademik yang telah saya peroleh (MAGISTER) dibatalkan, serta diproses sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku. (UU No. 20 Tahun 2003, Pasal 25 Ayat 2 dan pasal 70)

Malang, 26 Juli 2021

Mahasiswa,



Nama : Rifzi Devi Nurvitasari
NIM : 196070400111027
PS : Magister Kebidanan
Fak : Kedokteran UB



Karya tulis ilmiah ini kutujukan untuk orang tua tercinta, kakak dan adik tersayang

Atas doa, motivasi maupun pengorbanan sehingga tesis ini terselesaikan dengan lancar

Teriring doa agar karya tulis ilmiah ini dapat dijadikan motivasi untuk mendapatkan jenjang pendidikan lebih tinggi serta bermanfaat bagi bangsa, agama dan membanggakan keluarga

RINGKASAN

Rifzi Devi Nurvitasari

Pengaruh Pemberian Susu Kedelai terhadap Jumlah Sel Spermatogonia yang Mengekspresikan Reseptor Estrogen Alpha, Jumlah Spermatozoa dengan Morfologi dan Pergerakan Normal pada Tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) Jantan. Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya.

Ketua Komisi Pembimbing: Prof. Dr. dr. Nurdiana, M.Kes; Anggota: Dr. dr. I Wayan Agung Indrawan, Sp.OG(K).

Terjadinya infertilitas di Indonesia pada pria memberikan kontribusi sebesar 30% dan 20% disebabkan karena kelainan kedua pihak. Hampir setengah dari kasus infertilitas dikaitkan dengan faktor pria dengan rendahnya jumlah sperma (oligozoospermia), rendahnya motilitas sperma (asthenozoospermia) dan abnormalitas morfologi (teratozoospermia). Sehingga faktor dari suami ataupun istri memiliki kontribusi yang sama. Kasus infertilitas pada pria disebabkan oleh *endocrine disruption*, suatu zat atau campuran eksogen yang mampu mengubah fungsi sistem endokrin dan memberikan efek buruk. Gangguan endokrin dapat disebabkan oleh konsumsi makanan yang mengandung fitoestrogen, seperti susu kedelai. Susu kedelai sering digunakan sebagai alternatif pengganti susu sapi dikarenakan memiliki kandungan proteinnya yang tidak kalah dengan susu sapi. Selain memiliki kandungan gizi yang tinggi, susu kedelai juga mengandung isoflavon yang tinggi. Fitoestrogen dapat bertindak sebagai *endocrine disrupting chemicals* (EDCs), sehingga dapat mengakibatkan gangguan perkembangan seksual, perubahan terhadap mekanisme HPG axis. Pemberian fitoestrogen dalam perkembangan sistem reproduksi tikus dapat menurunkan reseptor estrogen alpha (ER α). ER α memiliki peran penting dalam regulasi spermatogenesis dan berhubungan dengan infertilitas. Proses spermatogenesis yang tidak dapat berjalan optimal dapat menyebabkan penurunan kuantitas dan kualitas spermatozoa. Analisis spermatozoa penting untuk menentukan tingkat kesuburan seorang pria. Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan pengaruh pemberian susu kedelai terhadap jumlah sel spermatogonia yang mengekspresikan reseptor estrogen alpha, jumlah spermatozoa dengan morfologi dan pergerakan normal pada tikus wistar (*Rattus norvegicus*) jantan.

Penelitian ini menggunakan true eksperimental dengan menggunakan rancangan *Post Test Only Control Group Design* dengan sampel tikus jantan (*Rattus norvegicus*) sebanyak 24 ekor. Hewan coba dibagi menjadi 4 kelompok yang terdiri dari kelompok kontrol yaitu tikus tanpa diberi susu kedelai, kelompok perlakuan 1, kelompok perlakuan 2, dan kelompok perlakuan 3 yaitu tikus yang diberi susu kedelai dengan dosis 7,1 gr/kgBB/hari, 14,2 gr/kgBB/hari, dan 21,3 gr/kgBB/hari. Susu kedelai diberikan saat berusia 4 minggu sampai usia 10 minggu kemudian dilanjutkan pembedahan. Jumlah sel spermatogonia yang mengekspresikan ER α diamati pada jaringan testis tikus wistar jantan dengan menggunakan metode Immunohistokimia (IHK). Sel spermatogonia dengan ER α akan memancarkan warna cokelat pada inti sel setelah diwarnai dengan *estrogen receptor alpha antibody* (SC-787) dari Santa Cruz. Sel spermatogonia dengan ER α dihitung dan dibandingkan dengan jumlah sel keseluruhan dalam 1 tubulus seminiferus secara manual pada 10 lapangan pandang secara random dengan perbesaran 400X melalui hasil scan dari mikroskop *Olympus BX 51*. Jumlah spermatozoa dengan morfologi normal diamati menggunakan metode pewarnaan Kristal-Violet. Setiap sampel dihitung sampai mendapatkan 100 spermatozoa dan diamati menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400X. Pengamatan dilakukan pada spermatozoa yang tidak mengalami kelainan pada kepala, leher, dan ekor. Jumlah spermatozoa dengan pergerakan normal diamati menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400X pada 100 spermatozoa. Pengamatan dilakukan pada spermatozoa dengan motilitas A (pergerakan progresif).

Data dianalisis dengan uji *One Way anova* dan didapatkan hasil, terdapat perbedaan yang bermakna pada rerata jumlah sel spermatogonia yang mengekspresikan

reseptor estrogen alpha (p -value = 0,000), terdapat perbedaan yang bermakna pada rerata jumlah spermatozoa dengan morfologi normal (p -value = 0,003) serta terdapat perbedaan yang bermakna dari rerata jumlah spermatozoa dengan pergerakan normal (p -value = 0,008) setelah diberikan susu kedelai dengan berbagai dosis. Kemudian dilanjutkan dengan uji *Least Significant Difference* (LSD) menunjukkan bahwa dosis susu kedelai yang dapat menurunkan jumlah sel spermatogonia yang mengekspresikan ER α adalah dosis perlakuan 1 (7,1 gr/kgBB/hari), dosis perlakuan 2 (14,2 gr/kgBB/hari), dan dosis perlakuan 3 (21,3 gr/kgBB/hari). Hasil uji korelasi Pearson didapatkan nilai koefisien korelasi (KK) = -0,887 dimana menggambarkan hubungan kedua variabel yang kuat, dan menunjukkan arah yang negatif. Hal ini berarti bahwa peningkatan konsentrasi susu kedelai akan diikuti dengan penurunan jumlah sel spermatogonia yang mengekspresikan ER α . Sedangkan dosis susu kedelai yang dapat menurunkan jumlah spermatozoa dengan morfologi dan pergerakan normal adalah dosis perlakuan 2 (14,2 gr/kgBB/hari) dan dosis perlakuan 3 (21,3 gr/kgBB/hari). Kesimpulan pada penelitian ini yaitu pemberian susu kedelai dapat menurunkan jumlah sel spermatogonia yang mengekspresikan reseptor estrogen alpha, jumlah spermatozoa dengan morfologi dan pergerakan normal pada tikus wistar (*Rattus norvegicus*) jantan.



SUMMARY

Rifzi Devi Nurvitasari

The Effect of Giving Soy Milk to The Number of Spermatogonia Cells Expressing The Estrogen Receptor Alpha, The Number of Spermatozoa with Normal Morphology and Movement in Male Wistar (*Rattus norvegicus*) Rats. Master Program in Midwifery, Faculty of Medicine, Universitas Brawijaya.

Chair of Supervisory Commission: Prof. Dr. dr. Nurdiana, M.Kes; Member: Dr. dr. I Wayan Agung Indrawan, Sp.OG(K).

The occurrence of infertility in Indonesia in men contributes 30% and 20% is due to abnormalities of both parties. Nearly half of infertility cases are associated with male factors with low sperm count (oligozoospermia), low sperm motility (asthenozoospermia) and morphological abnormalities (teratozoospermia). So the factor of the husband or wife has the same contribution. Infertility cases in men are caused by endocrine disruption, an exogenous substance or mixture that is able to change the function of the endocrine system and give bad effects. Endocrine disorders can be caused by the consumption of foods containing phytoestrogens, such as soy milk. Soy milk is often used as an alternative to cow's milk because it has a protein content that is not inferior to cow's milk. In addition to having a high nutritional content, soy milk also contains high isoflavones. Phytoestrogens can act as endocrine disrupting chemicals (EDCs), which can cause sexual development disorders, changes in the HPG axis mechanism. Administration of phytoestrogens in the development of the rat reproductive system can reduce estrogen receptor alpha (ER α). ER α has an important role in the regulation of spermatogenesis and is associated with infertility. The process of spermatogenesis that cannot run optimally can cause a decrease in the quantity and quality of spermatozoa. Spermatozoa analysis is important to determine the level of fertility of a man. This study aims to prove the effect of soy milk on the number of spermatogonia cells expressing the estrogen receptor alpha, the number of spermatozoa with normal morphology and movement in male Wistar (*Rattus norvegicus*) rats.

This study uses a true experimental design using Post Test Only Control Group Design with a sample of 24 male rats (*Rattus norvegicus*). Experimental animals were divided into 4 groups consisting of a control group, namely rats without soy milk, treatment group 1, treatment group 2, and treatment group 3, namely rats given soy milk at a dose of 7.1 g/kgBW/day, 14.2 g/kgBW/day, and 21.3g/kgBW/day. Soy milk is given at the age of 4 weeks until the age of 10 weeks then followed by surgery. The number of spermatogonia cells expressing ER α was observed in the testes of male wistar rats using the Immunohistochemical (IHK) method. Spermatogonia cells with ER α + will emit a brown color in the cell nucleus after staining with estrogen receptor alpha antibody (SC-787) from Santa Cruz. Spermatogonia cells with ER α + were counted and compared with the total number of cells in 1 seminiferous tubule manually in 10 random fields of view with 400X magnification through scan results from an Olympus BX 51 microscope. The number of spermatozoa with normal morphology was observed using the Crystal-Violet staining method. Each sample was counted to get 100 spermatozoa and observed using a light microscope with a magnification of 400X. Observations were made on spermatozoa without abnormalities in the head, neck, and tail. The number of spermatozoa with normal movement was observed using a light microscope with 400X magnification on 100 spermatozoa. Observations were made on spermatozoa with A motility (progressive movement).

The data were analyzed by *One way ANOVA* test and the results showed that there was a significant difference in the mean number of spermatogonia cells expressing the estrogen receptor alpha (p -value = 0.000), there was a significant difference in the mean number of spermatozoa with normal morphology (p -value = 0.003) and there was a significant difference in the mean number of spermatozoa with normal movement (p -value = 0.008) after being given soy milk with various doses. Then continued with the Least Significant Difference (LSD) test which showed that the dose of soy milk that could

reduce the number of spermatogonia cells expressing ER was treatment dose 1 (7.1 g/kgBW/day), treatment dose 2 (14.2 g/kgBW/day), and treatment dose 3 (21.3 g/kgBW/day). The results of the Pearson correlation test obtained a correlation coefficient value (KK) = -0.887 which describes a strong relationship between the two variables, and shows a negative direction. This means that an increase in the concentration of soy milk will be followed by a decrease in the number of spermatogonia cells expressing ER α . While the dose of soy milk that can reduce the number of spermatozoa with normal morphology and movement is treatment dose 2 (14.2 g/kgBW/day) and treatment dose 3 (21.3 g/kgBW/day). The conclusion of this study is that the administration of soy milk can reduce the number of spermatogonia cells expressing the estrogen receptor alpha, the number of spermatozoa with normal morphology and movement in male Wistar (*Rattus norvegicus*) rats.



KATA PENGANTAR

Penulis memanjatkan puji syukur kehadiran Allah SWT, atas limpahan rahmat, juhidayah serta kekuatan sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis dengan judul **“PENGARUH PEMBERIAN SUSU KEDELAI TERHADAP JUMLAH SEL SPERMATOGONIA YANG MENGEKSPRESIKAN RESEPTOR ESTROGEN ALPHA, JUMLAH SPERMATOZOA DENGAN MORFOLOGI DAN PERGERAKAN NORMAL PADA TIKUS WISTAR (*Rattus norvegicus*) JANTAN”**.

Penulis mengucapkan penghargaan dan ucapan terima kasih dengan sangat tulus dan mendalam kepada yang terhormat:

1. Prof. Dr. Ir. Nuhfil Hanani AR, MS, selaku Rektor Universitas Brawijaya Malang beserta segenap jajarannya atas kesempatan dan fasilitas pendidikan yang diberikan selama menempuh pendidikan di Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
2. Dr. dr. Wisnu Barlianto, M.Si.Med., Sp.A(K), selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, atas izin yang diberikan selama penulis dapat menempuh pendidikan di Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
3. Dr. dr. Sutrisno, Sp.OG(K) selaku Ketua Program Studi Magister Kebidanan yang telah memberikan dukungan selama menempuh pendidikan Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
4. Prof. Dr. dr. Nurdiana, M.Kes selaku Dosen Pembimbing I yang telah memberikan bimbingan, arahan, nasehat, saran, dan dorongan moral sehingga penulis dapat segera menyelesaikan tesis ini.

Penulis menyadari dalam penulisan tesis ini mungkin terdapat ketidaksempurnaan sehingga dalam kesempatan yang baik ini penulis berharap kritik dan saran yang bersifat konstruktif untuk perbaikan selanjutnya. Akhir kata sehingga hasil penelitian ini dapat bermanfaat bagi banyak pihak dan memberikan sumbangan pemikiran dalam kemajuan ilmu pengetahuan.

Malang, Juli 2021

Penulis



DAFTAR ISI

LEMBAR PERSETUJUAN.....	ii
LEMBAR PENGESAHAN.....	iii
PERNYATAAN ORISINALITAS TESIS.....	iv
HALAMAN PERUNTUKAN.....	v
RINGKASAN.....	vi
SUMMARY.....	viii
KATA PENGANTAR.....	x
DAFTAR ISI.....	xiii
DAFTAR TABEL.....	xvii
DAFTAR GAMBAR.....	xviii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xx
DAFTAR SINGKATAN DAN SIMBOL.....	xxi
BAB 1 PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	5
1.2.1 Rumusan Masalah Umum.....	5
1.2.2 Rumusan Sub Masalah.....	5
1.3 Tujuan Penelitian.....	6
1.3.1 Tujuan Umum.....	6
1.3.2 Tujuan Khusus.....	6
1.4 Manfaat Penelitian.....	6
1.4.1 Manfaat Teoritis.....	6
1.4.2 Manfaat Praktis.....	7
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	8
2.1 Infertilitas.....	8
2.1.1 Definisi.....	8
2.1.2 Prevalensi.....	8
2.1.3 Etiologi.....	9
2.1.4 Patofisiologi.....	9
2.1.5 Diagnosis.....	9
2.2 Kacang Kedelai.....	12
2.2.1 Taxonomy.....	12
2.3 Susu Kedelai.....	12
2.4 Fitoestrogen.....	13



2.5	Isoflavon	18
2.6	Estrogen dan Reseptor Estrogen (ER)	18
2.6.1	Biosintesis Estrogen	18
2.6.2	Reseptor Estrogen Alpha (ER α) dan Beta (ER β)	19
2.6.3	Fungsi Reseptor Estrogen Alpha (ER α) dan Beta (ER β) pada Reproduksi Jantan	22
2.7	Tikus Wistar (<i>Rattus norvegicus</i>)	24
2.7.1	Taksonomi dan Morfologi	25
2.7.2	Sistem Reproduksi Tikus Jantan	26
2.7.3	Spermatogenesis pada Tikus	29
2.7.4	Regulasi Hormonal Pada Spermatogenesis	31
2.8	Spermatozoa	33
2.8.1	Produksi Spermatozoa	33
2.8.2	Morfologi Spermatozoa	33
2.8.3	Pergerakan Spermatozoa	37
BAB 3 KERANGKA TEORI DAN KONSEP PENELITIAN		39
3.1	Kerangka Teori	39
3.2	Kerangka Konsep	42
3.3	Hipotesis Penelitian	44
3.3.1	Sub hipotesis	44
BAB 4 METODE PENELITIAN		45
4.1	Jenis dan Desain Penelitian	45
4.2	Populasi dan Sampel Penelitian	45
4.2.1	Populasi	45
4.2.2	Besar Sampel	45
4.2.3	Kriteria Inklusi dan Eksklusi	46
4.3	Tempat dan Waktu Penelitian	47
4.3.1	Tempat Penelitian	47
4.3.2	Waktu Penelitian	47
4.4	Bahan dan Alat	47
4.4.1	Persiapan Pemberian Susu Kedelai	47
4.4.2	Persiapan Diet Normal	48
4.4.3	Pemeliharaan Tikus	48
4.4.4	Pengamatan Sel Spermatogonia yang Mengekspresikan Reseptor Estrogen Alpha (ER α)	48
4.4.5	Pengamatan Pergerakan Spermatozoa	48
4.4.6	Pengamatan Morfologi Spermatozoa	48
4.5	Variabel Penelitian	49
4.5.1	Variabel Bebas	49
4.5.2	Variabel Terikat	49
4.6	Definisi Operasional	49
4.7	Prosedur Penelitian	50
4.7.1	Prosedur Pemilihan Sampel Tikus	50
4.7.2	Aklimatisasi Tikus	50
4.7.3	Pembagian Kelompok Tikus	50
4.7.4	Persiapan Susu Kedelai	51
4.7.5	Pemberian Susu Kedelai	51
4.7.5	Pembedahan Tikus Wistar dan Pengambilan Organ	52



4.7.6 Pengamatan Sel Spermatogonia yang Mengekspresikan Reseptor Estrogen Alpha (ER α) dengan Metode Imunohistokimia.....	52
4.7.7 Tahap Pembuatan Suspensi.....	56
4.7.8 Pengamatan Morfologi Spermatozoa.....	56
4.7.9 Pengamatan Pergerakan Spermatozoa.....	57
4.8 Alur Penelitian.....	58
4.9 Analisis Data.....	59
4.9.1 Uji Prasyarat Parametrik.....	59
4.9.2 Uji Beda.....	59
4.9.3 Uji Korelasi.....	60
BAB 5 HASIL PENELITIAN.....	61
5.1 Hasil Pengamatan Pengaruh Pemberian Susu Kedelai terhadap Jumlah Sel Spermatogonia yang Mengekspresikan Reseptor Estrogen Alpha pada Tikus Wistar (<i>Rattus norvegicus</i>) Jantan....	61
5.1.1 Hasil Uji Prasyarat Parametrik.....	63
5.1.2 Hasil Uji Beda Antar Kelompok Perlakuan.....	64
5.2 Hasil Pengamatan Pengaruh Pemberian Susu Kedelai terhadap Jumlah Spermatozoa dengan Morfologi Normal pada Tikus Wistar (<i>Rattus norvegicus</i>) Jantan.....	67
5.2.1 Hasil Uji Prasyarat Parametrik.....	67
5.2.2 Hasil Uji Beda Antar Kelompok Perlakuan.....	68
5.3 Hasil Pengamatan Pengaruh Pemberian Susu Kedelai terhadap Jumlah Spermatozoa dengan Pergerakan Normal pada Tikus Wistar (<i>Rattus norvegicus</i>) Jantan.....	71
5.3.1 Hasil Uji Prasyarat Parametrik.....	71
5.3.2 Hasil Uji Beda Antar Kelompok Perlakuan.....	72
BAB 6 PEMBAHASAN.....	75
6.1 Pengaruh Pemberian Susu Kedelai terhadap Jumlah Sel Spermatogonia yang Mengekspresikan Reseptor Estrogen Alpha pada Tikus Wistar (<i>Rattus norvegicus</i>) Jantan.....	75
6.2 Pengaruh Pemberian Susu Kedelai terhadap Jumlah Spermatozoa dengan Morfologi Normal pada Tikus Wistar (<i>Rattus norvegicus</i>) Jantan.....	77
6.3 Pengaruh Pemberian Susu Kedelai terhadap Jumlah Spermatozoa dengan Pergerakan Normal Pada Tikus Wistar (<i>Rattus norvegicus</i>) Jantan.....	80
6.4 Keterbatasan Penelitian.....	82
6.5 Implementasi dalam Asuhan Kebidanan.....	83
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN.....	85
7.1 Kesimpulan.....	85
7.2 Saran.....	85
DAFTAR PUSTAKA.....	86
LAMPIRAN.....	95
	XV



DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	Nilai Referensi Hasil Analisis Semen.....	10
Tabel 2.2	Data Fisiologi Umum dan Reproduksi Tikus Jantan.....	26
Tabel 4.1	Definisi Operasional	49
Tabel 5.1	Hasil Uji Normalitas Jumlah Sel Spermatogonia yang Mengekspresikan ER α pada Tikus Wistar Jantan Setelah Diberi Susu Kedelai Berbagai Dosis.....	63
Tabel 5.2	Hasil Uji Berbeda Berganda Antar Kelompok pada Jumlah Sel Spermatogonia yang Mengekspresikan ER α pada Tikus Wistar Jantan Setelah Diberi Susu Kedelai Berbagai Dosis.....	64
Tabel 5.3	Hasil Uji Normalitas Jumlah Spermatozoa dengan Morfologi Normal pada Tikus Wistar Jantan Setelah Diberi Susu Kedelai Berbagai Dosis.	68
Tabel 5.4	Hasil Uji Berbeda Berganda Antar Kelompok pada Jumlah Spermatozoa dengan Morfologi Normal pada Tikus Wistar Jantan Setelah Diberi Susu Kedelai Berbagai Dosis.....	69
Tabel 5.5	Pergerakan Spermatozoa Berdasarkan Klasifikasinya pada Tikus Wistar Jantan Setelah Diberi Susu Kedelai Berbagai Dosis.....	71
Tabel 5.6	Hasil Uji Normalitas Jumlah Spermatozoa dengan Pergerakan Normal pada Tikus Wistar Jantan Setelah Diberi Susu Kedelai Berbagai Dosis.	72
Tabel 5.7	Hasil Uji Berbeda Berganda Antar Kelompok pada Jumlah Spermatozoa dengan Pergerakan Normal pada Tikus Wistar Jantan Setelah Diberi Susu Kedelai Berbagai Dosis.....	73

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 (A) Tanaman Kacang Kedelai dan (B) Biji Kedelai..... 12

Gambar 2.2 Perbandingan struktur estrogen endogen dan fitoestrogen..... 14

Gambar 2.3 Klasifikasi fitoestrogen dan anggota setiap kelompoknya..... 14

Gambar 2.4 Mekanisme aksi fitoestrogen dan reseptor estrogen..... 17

Gambar 2.5 Jalur biokimia konversi testosteron menjadi estrogen..... 19

Gambar 2.6 Mekanisme kerja reseptor estrogen (ER)..... 21

Gambar 2.7 Perbandingan struktur ER α dan ER β 22

Gambar 2.8 Reseptor estrogen alpha (ER α) pada testis tikus dengan pewarnaan imunohistokimia..... 24

Gambar 2.9 Struktur kelenjar-kelenjar reproduksi pada tikus jantan..... 27

Gambar 2.10 Tahapan perubahan spermatogonia pada setiap siklus sel selama proses spermatogenesis pada tikus..... 31

Gambar 2.11 Interaksi parakrin antara sel Leydig dan sel Sertoli..... 32

Gambar 2.12 Struktur spermatozoa tikus..... 34

Gambar 2.13 Spermatozoa dengan morfologi normal dan abnormal pada tikus Wistar..... 36

Gambar 3.1 Kerangka Teori Penelitian..... 39

Gambar 3.2 Kerangka Konsep Penelitian..... 42

Gambar 4.1 Alur Operasional Penelitian..... 58

Gambar 5.1 Potongan melintang fotomikrograf testis tikus wistar jantan yang diberikan susu kedelai dengan berbagai dosis menggunakan pewarnaan imunohistokimia. (Perbesaran 400X)..... 62

Gambar 5.2 Histogram rerata jumlah sel spermatogonia yang mengekspresikan ER α \pm SD pada tikus wistar jantan yang diberikan susu kedelai dengan berbagai dosis..... 66

Gambar 5.3 Morfologi spermatozoa normal dan abnormal pada tikus wistar jantan yang diberikan susu kedelai dengan berbagai dosis menggunakan pewarnaan Kristal-Violet. (Perbesaran 400X)..... 67

Gambar 5.4 Histogram rerata jumlah spermatozoa dengan morfologi normal \pm SD tikus jantan. 70

Gambar 5.5 Histogram rerata jumlah spermatozoa dengan pergerakan normal \pm SD tikus jantan. 74



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Surat Keterangan Kelaikan Etik	95
Lampiran 2	Surat Keterangan Bebas Plagiasi	96
Lampiran 3	<i>Letter of Acceptance</i>	97
Lampiran 4	Hasil Uji Statistik Data Hasil Penghitungan Jumlah Sel Spermatoagonia yang Mengekspresikan Reseptor Estrogen Alpha pada Tikus Jantan yang Diberi Perlakuan Susu Kedelai	99
Lampiran 5	Hasil Uji Statistik Data Hasil Penghitungan Jumlah Spermatozoa dengan Morfologi Normal Pada Tikus Jantan yang Diberi Perlakuan Susu Kedelai	102
Lampiran 6	Hasil Uji Statistik Data Hasil Penghitungan Jumlah Spermatozoa dengan Pergerakan Normal Pada Tikus Jantan yang Diberi Perlakuan Susu Kedelai	105
Lampiran 7	Dokumentasi Penelitian.....	108
Lampiran 8	Data Sheet Antibody Estrogen Receptor α (C-311): sc-787	115



DAFTAR SINGKATAN DAN SIMBOL

ABP	:	<i>Androgen binding protein</i>
AR	:	Reseptor Androgen
ASS	:	Alergi Susu Sapi
ATP	:	<i>Adenosine triphosphate</i>
BB	:	Berat badan
BCF	:	<i>beat frequens</i>
cAMP	:	siklik adenosis monofosfat
DNA	:	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
E1	:	Estron
E2	:	17β-estradiol
E3	:	Estriol
ED	:	<i>Endocrine disruptor</i>
EDCs	:	<i>Endocrine Disrupting Chemicals</i>
EGFR	:	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
ER	:	<i>Reseptor Estrogen</i>
ERα	:	Reseptor Estrogen Alpha
ERαKO	:	Reseptor Estrogen Alpha <i>Knock Out</i>
ERβ	:	Reseptor Estrogen Beta
ERE	:	<i>Estrogen Responsive Element</i>
ERK	:	<i>Extracellular Signal-Regulated Kinase</i>
FSH	:	<i>Follicle Stimulating Hormone</i>
GnRH	:	<i>Gonadotropin Releasing Hormone</i>
HA	:	Hiperaktivasi
HPG	:	<i>Hypothalamic pituitary gonadal</i>



ITIS	:	<i>Integrated Taxonomic Information System</i>
IVF	:	<i>In Vitro Fertilization</i>
LH	:	<i>Luteinizing Hormone</i>
LIN	:	<i>linearitas</i>
ODF	:	<i>Outer Dense Fiber</i>
P13K	:	<i>Phosphatidylinositol 3- kinase</i>
P450arom	:	<i>Sitokrom P450 aromatase</i>
PASI	:	<i>Pengganti ASI</i>
PCR	:	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
pH	:	<i>Potential Hydrogen</i>
Pol.II	:	<i>RNA Polimerase II</i>
pY	:	<i>Fosforila Tirosis</i>
RNA	:	<i>Ribonucleic Acid</i>
VAP	:	<i>Velocity Average Path</i>
VCL	:	<i>Velocity Curvilinear</i>
VSL	:	<i>Veloricity Straight Line</i>



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Infertilitas merupakan kondisi yang ditandai dengan tidak terjadinya kehamilan setelah 12 bulan melakukan hubungan seksual secara teratur (2-3 kali/minggu) tanpa menggunakan kontrasepsi atau gangguan seseorang dalam bereproduksi (individu atau dengan pasangannya). Infertilitas telah mempengaruhi sekitar 8 sampai 12% pasangan usia subur di seluruh dunia (Borght dan Wyns, 2018). Infertilitas di negara berkembang terjadi lebih tinggi yaitu sekitar 30%, dibandingkan negara maju hanya 5-8%. Angka kejadian infertilitas di Asia yaitu 30,8%, di Kamboja 10% dan di Indonesia sendiri prevalensi infertilitas adalah 21,3% (Novrika, 2017). Prevalensi infertilitas di Indonesia pada pria memberikan kontribusi sebesar 30% dan 20% disebabkan karena kelainan kedua pihak. Sehingga faktor dari suami ataupun istri memiliki kontribusi yang sama (Sinaga, 2016).

Hampir setengah dari kasus infertilitas dikaitkan dengan faktor pria dengan rendahnya jumlah sperma (oligozoospermia), rendahnya motilitas sperma (asthenozoospermia) dan abnormalitas morfologi (teratozoospermia). Motilitas atau pergerakan sperma merupakan salah satu penentu utama kesuburan pria dan diperlukan untuk keberhasilan dalam pembuahan (Wongsodiharjo, 2017).

Infertilitas pada pria disebabkan oleh *endocrine disruption*, salah satu penyebabnya yaitu suatu zat yang mampu mengubah fungsi sistem endokrin dan memberikan efek buruk terhadap organisme, keturunan serta subpopulasinya (Slama *et al.*, 2016). Zat yang dapat menyebabkan gangguan endokrin dapat

bersumber dari zat alami (hormon, fitoestrogen) dan buatan manusia (pestisida, bifenil poliklorasi, senyawa diaoksin) (Monneret, 2017).

Gangguan endokrin dapat disebabkan oleh konsumsi makanan yang mengandung fitoestrogen, seperti susu kedelai sehingga dapat mengakibatkan gangguan perkembangan seksual, perubahan terhadap mekanisme HPG (*Hypothalamic pituitary gonada*) axis (Kim dan Park, 2012). Kedelai (*Glycine max Merr.*) merupakan salah satu tanaman *Leguminoceae* dan salah satu komoditi pangan utama di Indonesia (Adriani dan Nita, 2015). Susu kedelai adalah minuman yang berasal dari ekstrak kedelai dan merupakan minuman yang mudah didapat dan ditemukan dalam kehidupan sehari-hari di masyarakat Indonesia, bahkan dijadikan sebagai salah satu pengganti ASI (PASI). Susu kedelai sering digunakan sebagai alternatif pengganti susu sapi dikarenakan susu kedelai memiliki kandungan proteinnya yang tidak kalah dengan susu sapi serta harga relatif lebih murah (Yoon dan Park, 2014; Soleha *et al.*, 2018).

Selain memiliki kandungan gizi yang tinggi, susu kedelai juga mengandung isoflavon yang tinggi. Isoflavon adalah flavonoid utama dalam biji kedelai yang memiliki potensi sebagai antioksidan yang mampu mengikat radikal bebas dan mencegah reaksi berantainya (Yoon dan Park, 2014). Jumlah kandungan fitoestrogen dalam susu kedelai yang beredar di masyarakat, beraneka ragam tergantung dari proses pembuatannya. Menurut Dinsdale dan Ward (2010), kadar isoflavon dalam susu formula berbasis kedelai bervariasi, dari 32 hingga 47 mg isoflavon / L formula. Sedangkan dalam bentuk bubuk, kandungan isoflavon pada susu kedelai adalah sebanyak 0,7 – 10,73 mg/ 100 g (Bhagwat dan Haytowitz, 2015).

Selain memiliki efek kesehatan yang bermanfaat, sifat estrogenik fitoestrogen juga menimbulkan kekhawatiran karena dapat bertindak sebagai *endocrine disrupting chemicals* (EDCs), yang memiliki potensi untuk

menyebabkan efek merugikan bagi kesehatan. Fitoestrogen sangat mirip dalam struktur kimianya dengan estrogen mamalia, estradiol, dan mengikat reseptor estrogen α (alpha) dan β (beta) (Paterni *et al.*, 2014; Rietjens *et al.*, 2013). ED merupakan senyawa alami atau sintesis yang dapat merubah fungsi hormonal dengan berbagai mekanisme. Berdasarkan sifat aktifnya tersebut, asupan kedelai memiliki potensi untuk menyebabkan efek merugikan pada kesehatan dalam keadaan tertentu, terutama ketika paparan terjadi selama masa perkembangan (Patisaul, 2016).

Berbagai penelitian yang berkaitan dengan pengaruh kedelai terhadap fungsi reproduksi telah banyak diteliti. Tikus jantan yang diberi paparan jangka panjang dari kedelai yang mengandung isoflavin dapat mengakibatkan penurunan pada jumlah spermatozoa dan kesuburan (Cederroth *et al.*, 2010).

Selain itu, penelitian Nurdiana *et al.* (2016) juga menemukan efek ekstrak kedelai terhadap perubahan hormon dan spermatogenesis anak tikus *wistar* jantan yang induknya diberikan ekstrak kedelai saat bunting dan menyusui anaknya sampai usia 2 bulan. Hasil penelitian menunjukkan adanya penurunan kadar LH (*Luteinizing Hormone*), FSH (*Follicle Stimulating Hormone*) dan testosteron serta menghambat proses spermatogenesis.

Proses spermatogenesis yang tidak dapat berjalan optimal dapat menyebabkan penurunan kuantitas dan kualitas spermatozoa (Adriani dan Nita, 2015). Spermatozoa merupakan hasil dari proses spermatogenesis. Analisis spermatozoa penting untuk menentukan tingkat kesuburan seorang pria. Jumlah spermatozoa yang dihasilkan tidak cukup untuk mendiagnosa apakah seseorang infertil atau tidak, karena apabila jumlah spermatozoa yang normal tetapi bila morfologi dan kecepatan kurang baik akan bisa menyebabkan infertil (Sinaga, 2016; Susanti *et al.*, 2019).

Estrogen, dan reseptor utamanya ($ER\alpha$) memiliki peran penting dalam regulasi spermatogenesis (Chieffi *et al.*, 2002). Reseptor estrogen memainkan peran penting sebagai mediator aksi estrogen pada jaringan target dan berhubungan dengan infertilitas (Li *et al.*, 2014). Isoflavon dalam kedelai merupakan fitoestrogen yang struktur kimianya mirip dengan estrogen sehingga dapat berikatan dengan reseptor estrogen (Dinsdale dan Ward, 2010; Dinastiti *et al.*, 2019). Hasil penelitian yang dilakukan oleh Zin *et al.* (2013) bahwa pemberian fitoestrogen dalam perkembangan sistem reproduksi tikus dapat menurunkan $ER\alpha$. Penghambatan pada $ER\alpha$ menyebabkan penurunan pergerakan spermatozoa sehingga menurunkan fertilitas pada mencit dan tikus (Zhao *et al.*, 2020). Sehingga $ER\alpha$ berperan penting dalam kesuburan hewan jantan.

Konsumsi kedelai yang mengandung isoflavon memberikan pengaruh yang bervariasi terhadap kesehatan reproduksi pria. Bayi dan anak kecil yang mengonsumsi isoflavon perlu khusus karena organ mereka yang sensitif akan hormon, termasuk otak dan sistem reproduksi, masih mengalami pematangan seksual. Akibatnya, asupan kedelai memiliki potensi untuk menyebabkan efek merugikan dalam keadaan tertentu, terutama ketika paparan terjadi selama masa perkembangan. Sehingga sangat penting untuk mengetahui kapan waktu pemberian yang memiliki efek pada kesehatan dan berapa lama pemakaian yang dapat mempengaruhi organ perkembangan tubuh, khususnya perkembangan organ reproduktif (Dinsdale dan Ward, 2010; Patisaul dan Jefferson, 2011).

Akan tetapi, berbeda dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Astuti dan Sutyarso (2010) bahwa terjadi peningkatan kadar testosteron serum, jumlah sel Leydig dan jumlah sel spermatogenik setelah diberi tepung kedelai kaya isoflavon pada tikus. Secara keseluruhan, manfaat atau risiko kesehatan dari isoflavon dan fitoestrogen lainnya masih kontroversial (Rietjens *et al.*, 2013).

Sehingga sampai saat ini, pengaruh fitoestrogen terhadap reproduksi laki-laki masih terjadi pro dan kontra.

Oleh karena itu, peneliti tertarik melakukan penelitian tentang pengaruh pemberian susu kedelai terhadap jumlah sel spermatogonia yang mengekspresikan reseptor estrogen alpha, jumlah spermatozoa dengan morfologi dan pergerakan normal pada tikus wistar (*Rattus norvegicus*) jantan.

1.2 Rumusan Masalah

1.2.1 Rumusan Masalah Umum

Apakah pemberian susu kedelai dapat menyebabkan penurunan jumlah sel spermatogonia yang mengekspresikan reseptor estrogen alpha, penurunan jumlah spermatozoa dengan morfologi dan pergerakan normal pada tikus wistar (*Rattus norvegicus*) jantan?

1.2.2 Rumusan Sub Masalah

1. Apakah pemberian susu kedelai dapat menyebabkan penurunan jumlah sel spermatogonia yang mengekspresikan reseptor estrogen alpha pada tikus wistar (*Rattus norvegicus*) jantan?
2. Apakah pemberian susu kedelai dapat menyebabkan penurunan jumlah spermatozoa dengan morfologi normal pada tikus wistar (*Rattus norvegicus*) jantan?
3. Apakah pemberian susu kedelai dapat menyebabkan penurunan jumlah spermatozoa dengan pergerakan normal pada tikus wistar (*Rattus norvegicus*) jantan?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Membuktikan dan menganalisa pengaruh pemberian susu kedelai terhadap penurunan jumlah sel spermatogonia yang mengekspresikan reseptor estrogen alpha, penurunan jumlah spermatozoa dengan morfologi, dan pergerakan normal pada tikus wistar (*Rattus norvegicus*) jantan.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Menganalisa penurunan jumlah sel spermatogonia yang mengekspresikan reseptor estrogen alpha pada tikus wistar (*Rattus norvegicus*) jantan yang diberikan susu kedelai dengan berbagai dosis
2. Menganalisa penurunan jumlah spermatozoa dengan morfologi normal pada tikus wistar (*Rattus norvegicus*) jantan yang diberikan susu kedelai dengan berbagai dosis
3. Menganalisa penurunan jumlah spermatozoa dengan pergerakan normal pada tikus wistar (*Rattus norvegicus*) jantan yang diberikan susu kedelai dengan berbagai dosis

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Teoritis

1. Menambah khasanah ilmu pengetahuan dan meningkatkan perkembangan ilmu kebidanan mengenai konsumsi susu kedelai pada masa perkembangan dan efeknya terhadap sistem kesehatan.
2. Menjadi referensi tentang fitoestrogen susu kedelai dapat menyebabkan *endocrine disrupting chemicals* (EDCs).
3. Sebagai dasar pengembangan ilmiah lebih lanjut tentang pengaruh konsumsi susu kedelai terhadap fungsi organ reproduksi yang lain.

1.4.2 Manfaat Praktis

1. Menjadi referensi bagi tenaga kesehatan khususnya bidan sebagai upaya meningkatkan kualitas sumber daya manusia.
2. Memberikan informasi dasar pada masyarakat untuk lebih berhati-hati dalam mengonsumsi susu kedelai.



BAB 2**TINJAUAN PUSTAKA****2.1 Infertilitas****2.1.1 Definisi**

Infertilitas merupakan penyakit klinis yang ditandai dengan tidak terjadinya kehamilan setelah 12 bulan melakukan hubungan seksual secara teratur dan tanpa kontrasepsi. Infertilitas telah mempengaruhi sekitar 8 sampai 12% pasangan usia subur di seluruh dunia (Borghet dan Wyns, 2018).

Secara garis besar infertilitas dapat diklasifikasikan menjadi dua yaitu infertilitas primer dan infertilitas sekunder. Infertilitas primer apabila pasangan suami istri belum pernah mengalami kehamilan selama satu tahun atau lebih dengan hubungan seksual yang teratur tanpa kontrasepsi, sedangkan infertilitas sekunder apabila pasangan suami istri setelah satu tahun pasca persalinan atau pasca abortus telah gagal mengalami kehamilan tanpa menggunakan kontrasepsi. Kasus infertilitas dapat disebabkan oleh pihak suami maupun istri (Khaidir, 2006; Prawirohardjo, 2011).

2.1.2 Prevalensi

Infertilitas telah mempengaruhi sekitar 8 sampai 12% pasangan usia subur di seluruh dunia (Borghet dan Wyns, 2018). Tingkat infertilitas pria tertinggi ada di Afrika dan Eropa Tengah atau Timur, sedangkan Amerika Utara, Australia dan Eropa Tengah dan Timur masing-masing 4,6 – 6 %, 9% dan 9 – 12 %.

(Agarwal *et al.*, 2015). Prevalensi infertilitas di Indonesia meningkat sebesar 15-20% dari sekitar 50 juta pasangan dengan kelainan pada pria memberikan kontribusi sebesar 30% dan 20% disebabkan karena kelainan kedua pihak. Sehingga faktor dari suami ataupun istri mempunyai kontribusi yang sama (Sinaga, 2016).

2.1.3 Etiologi

Penyebab infertilitas pada pria 90% disebabkan karena jumlah sperma yang rendah, kualitas sperma yang buruk atau keduanya. Penyebab yang lain seperti masalah anatomi, ketidakseimbangan hormon dan masalah genetik (Leaver, 2016). Disfungsi seksual (71,7%) menjadi penyebab terjadinya aspermia, sedangkan azoospermia ditemukan pada 86,4% kasus hipogonadisme dan 97,1% pada obstruksi saluran mani (Punab *et al.*, 2017).

2.1.4 Patofisiologi

Patofisiologi infertilitas disesuaikan dengan penyebabnya, salah satunya disebabkan oleh *endocrine disruptor* (gangguan endokrin). Gangguan endokrin disebabkan oleh zat atau campuran eksogen yang mampu mengubah fungsi sistem endokrin dan berefek buruk terhadap organisme, keturunan serta populasinya (Slama *et al.*, 2016). *Endocrine Disrupting chemicals* (EDCs) dapat mengubah fungsi hormonal dengan berbagai mekanisme, termasuk: 1) stimulasi atau penghambatan langsung sistem endokrin; 2) meniru atau memblokir respons tubuh terhadap hormon steroid endogen; atau 3) mengubah biosintesis, sekresi, transportasi, pengikat, aksi, degradasi atau penghapusan hormon endogen yang bertanggung jawab untuk pemeliharaan homeostasis, reproduksi, perkembangan dan / atau perilaku (Retana-Márquez *et al.*, 2012).

2.1.5 Diagnosis

Pada manusia, prognosis dan diagnosis kesuburan pria terdapat beberapa cara yang dapat dilakukan:

2.1.5.1 Memantau Hiperaktivasi (HA)

Salah satu indikator kapasitas adalah tampilan HA oleh spermatozoa. Motilitas sperma, hiperaktivasi dan parameter kinematik motilitas terkait seperti kecepatan rata-rata (VAP/ *velocity average path*); kecepatan kurva (VCL/ *velocity curvilinear*); kecepatan garis lurus (VSL/ *velocity straight line*), linearitas (LIN)

dan *beat frequens* (BCF). Berdasarkan parameter kinematic tersebut, dapat dibedakan antara spermatozoa hiperaktif (menunjukkan pola motilitas melingkar/heliks) dan non hiperaktif (menunjukkan pola motilitas planar) dengan melihat VCL, LIN, dan ALH (Singh dan Singh, 2017).

Hiperaktivasi sperma yang terganggu telah diamati pada manusia (Wiser *et al.*, 2014) telah melakukan evaluasi terhadap spermatozoa pasien normal yang menjalani IVF dan menemukan bahwa pasien dengan peningkatan motilitas hiperaktif memiliki tingkat pembuahan yang secara signifikan lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok tanpa peningkatan motilitas hiperaktif. Oleh karena itu, HA dapat digunakan sebagai parameter diagnosis untuk kesuburan pria.

2.1.5.2 Analisis Semen

Analisis semen digunakan sebagai pemeriksaan kesuburan pada pria karena dapat memberikan informasi tentang fungsi sel germinal testis laki-laki, fungsi organ sekretori, dan potensi saluran reproduksi pria (WHO, 2010). Sampel semen harus diperiksa di laboratorium dalam waktu satu jam setelah pengambilan guna mencegah kesalahan (Wall dan Jayasena, 2018).

Tabel 2.1 Nilai Referensi Hasil Analisis Semen

Parameter	Nilai Referensi
Volume semen	1,5 mL
pH	≥ 7,2
Konsentrasi sperma	≥ 15 x 10 ⁶ / mL
Jumlah sperma per ejakulat	≥ 39 x 10 ⁶ / mL
Motilitas total	≥ 40 %
Motilitas progresif	≥ 32 %
Bentuk Normal	≥ 4 %
Leukosit	≤ 1 x 10 ⁶ / mL

Sumber: WHO (2010)

Hasil analisa semen dapat dikategorikan dengan nomenklatur yang akan mengklasifikasikan kuantitas kualitas sperma. Menurut WHO (2010), berikut adalah kategori dari hasil analisis semen:

1. Normozoospermia : semua parameter dalam keadaan normal atau lebih dari nilai normal (konsentrasi, morfologi, motilitas)
2. Oligozoospermia : jumlah sperma yang kurang dari nilai referensi
3. Asthenozoospermia : penurunan motilitas sperma
4. Oligoasthenozoospermia : berkurangnya jumlah dan motilitas sperma
5. Teratozoospermia : meningkatnya jumlah sperma abnormal
6. Aspermia : tidak ada sperma yang dikeluarkan
7. Leukositospermia : peningkatan sel darah putih dalam air mani, dapat mengindikasi infeksi dan berhubungan dengan penurunan fungsi dan motilitas sperma

2.1.5.3 Mengamati Fosforilasi Tirosin (pY)

Mengamati fosforilasi tirosin (pY) pada spermatozoa manusia, jika terjadi peningkatan fosforilasi protein tirosin selama kapasitas, maka ini berkorelasi dengan kemampuan spermatozoa dalam melakukan fertilisasi (Kwon *et al.*, 2014). Namun pemeriksaan pY sangat jarang dilakukan dalam menentukan kesuburan pria (Singh dan Singh, 2017).

2.1.5.4 Uji Genetik

Infertilitas pria dapat dikaitkan dengan berbagai faktor genetik, termasuk penyimpangan kromosom, perubahan genetic dan mikordelesi kromosom Y.

Penyimpangan kromosom dinilai melalui kariotipe G-band. Mutasi genetik dan mikordelesi kromosom Y dapat dinilai melalui pemeriksaan analisis darah perifer dan dapat diperkuat dengan pemeriksaan *polymerase chain reaction* (PCR) (Esteves *et al.*, 2011). Uji genetik tidak hanya menentukan penyebab, namun

juga dapat digunakan untuk memprediksi penurunan kelainan tersebut terhadap keturunannya (Ceylan dan Ceylan, 2015).

2.2 Kacang Kedelai

2.2.1 Taxonomy

- Kingdom : Plantae
- Subkingdom : Viridaeplantae
- Infrakingdom : Streptophyta
- Divisi : Tracheophyta
- Subdivisi : Spermatophytina
- Kelas : Magnolopsida
- Ordo : Fabales
- Famili : Fabaceae
- Genus : Glycine
- Spesies : Glycine max (ITIS, 2020).



Gambar 2.1 (A) Tanaman Kacang Kedelai dan (B) Biji Kedelai (Yuniarsih, 2017).

2.3 Susu Kedelai

Susu kedelai merupakan salah satu olahan kedelai yang bebas laktosa dan bisa dikonsumsi untuk orang dewasa, anak maupun bayi. Susu kedelai telah banyak digunakan diseluruh dunia lebih dari 100 tahun dan dapat menjadi alternatif bagi bayi yang mengalami alergi susu sapi yang dimediasi oleh kadar

alergi IgE, diare pasca infeksi, intoleransi laktosa, galaktosemia, serta pada bayi yang orang tuanya lebih memilih diet vegetarian (Dinsdale dan Ward, 2010).

Manajemen kasus pada bayi dengan alergi susu sapi (ASS) yakni mencakup penghindaran konsumsi susu sapi dan makanan yang mengandung susu sapi dan susu kedelai digunakan sebagai susu pengganti sampai terjadi toleransi terhadap susu sapi (Koletzko *et al.*, 2012; Siregar dan Munasir, 2016).

Berdasarkan perbandingan komposisi susu kedelai dan susu sapi, susu kedelai memiliki kandungan gizi yang hampir sama dengan susu sapi terutama protein, yaitu 3,2 – 3,5 gr/ 100gram (Ramadhan *et al.*, 2014). Selain itu susu kedelai juga mengandung fitoestrogen dan dapat mengganggu sistem endokrin atau disebut dengan *endocrine disrupting chemicals* (EDCs) (Shibayama *et al.*, 2001).

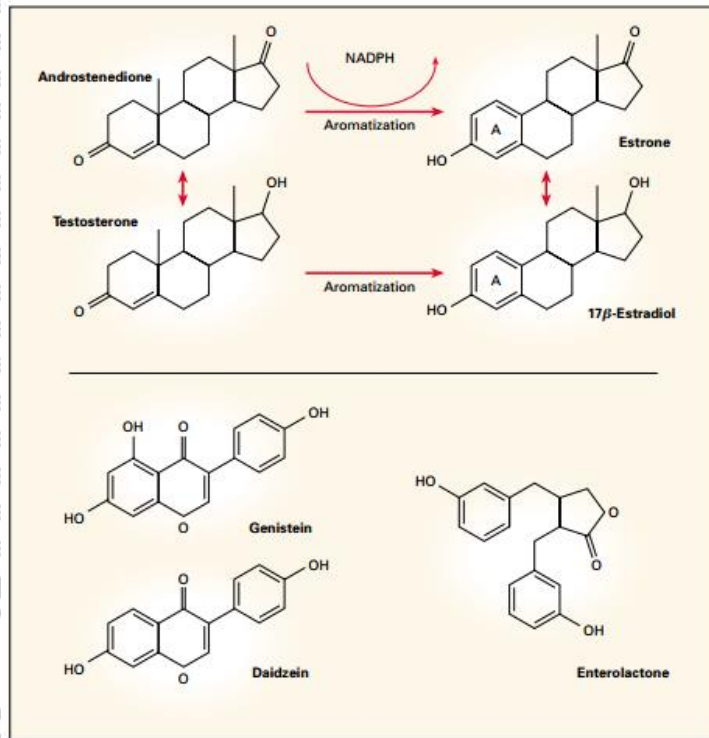
2.4 Fitoestrogen

Fitoestrogen merupakan kelompok senyawa non steroid yang memiliki komposisi yang mirip dengan estrogen alami didalam tubuh sehingga dapat berikatan dengan ER α dan ER β yang disebabkan karena struktur kimianya mirip dengan estradiol (Gambar 2.2) (Lehraiki *et al.*, 2011; Dinastiti *et al.*, 2019).

Fitoestrogen memiliki struktur yang menyerupai estrogen dan terdiri dari empat tipe yaitu isoflavon, kumestan, lignan dan prenilflafonoid (Hasanah *et al.*, 2020).

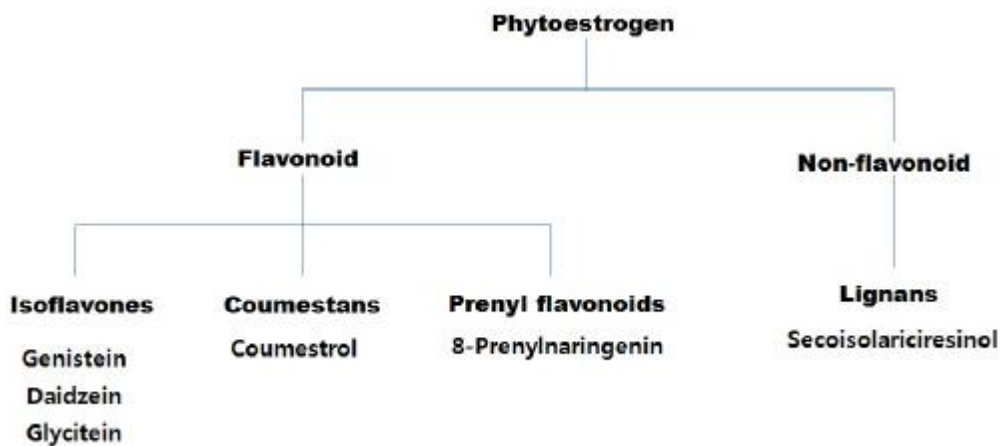
Kelompok-kelompok dalam varian jenis fitoestrogen dapat dilihat pada gambar

2.3. Sumber fitoestrogen yang paling umum adalah produk kedelai dan isoflavon adalah yang paling tinggi konsentrasinya (Kim dan Park, 2012; Hasanah *et al.*, 2020).



Gambar 2.2 Perbandingan struktur estrogen endogen dan fitoestrogen.

Keterangan: Androstenedion dan testosteron merupakan prekursor wajib estrogen dan dikonversi oleh enzim aromatase P450. Genistein dan daidzein merupakan isoflavonoid, serta enterolactone adalah lignan (panel bawah). Pada isoflavonoid, jumlah dan posisi hidroksil menentukan derajat homologi sterik dengan 17β-estradiol sehingga memiliki afinitas dalam mengikat reseptor estrogen (Gruber *et al.*, 2002).



Gambar 2.3 Klasifikasi fitoestrogen dan anggota setiap kelompoknya.

Keterangan: Beberapa senyawa yang ada didalam tanaman telah diidentifikasi memiliki efek estrogenik, senyawa kimia ini disebut fitoestrogen. Tiga kelas flavonoid yaitu isoflavon, coumestans, dan flavonoid terprenilasi merupakan kelompok fitoestrogen yang memiliki aktivitas estrogenik yang paling kuat. Selain itu kelompok fitoestrogen non flavonoid juga telah diidentifikasi dan dikelompokkan kedalam lignans (Kim dan Park, 2012).

Isoflavon kedelai merupakan salah satu dari fitoestrogen yang terdiri atas tiga senyawa yaitu genistein, daidzein, dan glisitein dengan perbandingan 1:1:0,2 (Dafriani, 2015). Fitoestrogen dapat berikatan dengan reseptor estrogen karena memiliki struktur yang sama dengan hormon estrogen dan memberikan efek yang merugikan terutama pada organ reproduksi di sebagian besar spesies hewan jantan (Adriani dan Nita, 2015).

2.4.1 Mekanisme Kerja Fitoestrogen Terhadap Reseptor Estrogen (ER)

Fitoestrogen dikenal sebagai *endocrine disruptor compounds* (EDCs). EDC merupakan senyawa alami atau sintetik yang dapat mengubah fungsi hormonal dengan berbagai mekanisme, termasuk: 1) stimulasi atau penghambatan langsung sistem endokrin; 2) meniru atau memblokir respons tubuh terhadap hormon steroid endogen; atau 3) mengubah biosintesis, sekresi, transportasi, pengikat, aksi, degradasi atau penghapusan hormon endogen yang bertanggung jawab untuk pemeliharaan homeostasis, reproduksi, perkembangan dan / atau perilaku (Retana-Márquez *et al.*, 2012). Berdasarkan sifat aktifnya tersebut, asupan kedelai memiliki potensi untuk menyebabkan efek kesehatan yang merugikan dalam keadaan tertentu, terutama ketika paparan terjadi selama masa perkembangan (Patisaul, 2016).

Struktur fitoestrogen yang mirip dengan struktur estrogen dapat berikatan dengan reseptor estrogen (Dinastiti *et al.*, 2019). Elemen struktural utama yang memungkinkan fitoestrogen mengikat afinitas tinggi ke reseptor estrogen dan menampilkan efek seperti estradiol adalah: (1) adanya cincin fenolik yang sangat diperlukan untuk mengikat reseptor estrogen; (2) cincin isoflavon yang meniru cincin estrogen di tempat pengikatan reseptor; (3) berat molekul rendah, mirip dengan estrogen (berat molekul = 272); (4) jarak antara dua gugus hidroksil

dalam inti isoflavon serupa dengan jarak di estradiol; dan (5) pola hidroksilasi optimal (Yildiz, 2019).

Reseptor estrogen, setelah berikatan dengan ligan, dapat berpindah dari sitoplasma ke nukleus, mengikat dan mempengaruhi daerah kontrol transkripsi DNA atau RNA, dan maka dari itu dapat mempengaruhi ekspresi gen tertentu.

Steroid juga mampu mengikat reseptor permukaan sel, mendorong pembentukan nukleotida siklik sitoplasma dan protein kinase terkait, yang mengontrol ekspresi gen target melalui faktor transkripsi. Oleh karena itu, fitoestrogen berpotensi

mempengaruhi semua proses yang diatur oleh estrogen termasuk induksi

pengikat hormon seks globulin dan penghambatan aromatase. Reseptor

estrogen terdapat pada beberapa jaringan dalam tubuh mamalia, antara lain:

sistem saraf pusat (termasuk sumbu hipotalamus-hipofisial), gonad, saluran

reproduksi, plasenta, kelenjar susu, tulang, saluran pencernaan, paru-paru. Hal

ini menunjukkan bahwa fitoestrogen dapat memberikan efek hormonal pada

jaringan tertentu (Sirotkin dan Harrath, 2014), walaupun diyakini bahwa jalur

pensinyalan (*signaling pathway*) yang diinduksi oleh fitoestrogen tidak

sepenuhnya identik dengan yang diinduksi oleh estrogen (Lecomte *et al.*, 2017).

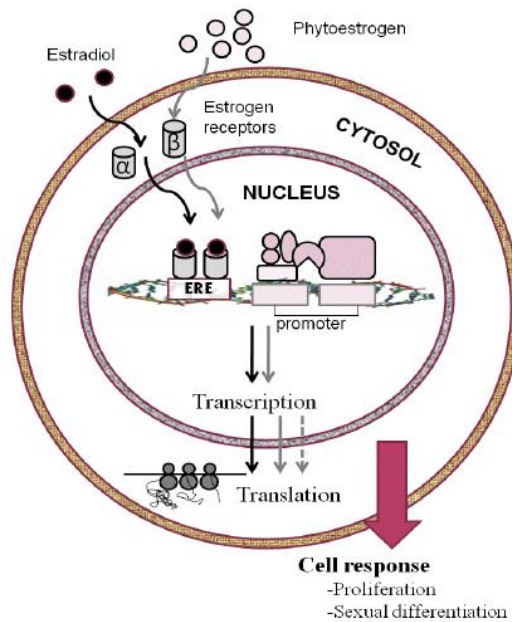
Fitoestrogen memiliki afinitas yang lebih rendah dari pada estradiol untuk

mengikat ER, dan kebanyakan dari mereka menunjukkan afinitas yang lebih

tinggi untuk ER β daripada untuk ER α sekitar 30 kali lipat. Kompleks reseptor

ligan yang dihasilkan mampu menginduksi aktivitas transkripsi (Retana-Márquez

et al., 2012) (Gambar 2.4).



Gambar 2.4 Mekanisme aksi fitoestrogen dan reseptor estrogen.

Keterangan: Fitoestrogen menunjukkan afinitas yang lebih tinggi untuk ERβ daripada untuk ERα tetapi dengan aktivitas yang lebih rendah dari E2. ERE = elemen respons estrogen. Garis hitam: mekanisme kerja estradiol. Garis abu-abu padat dan terputus-putus: mekanisme aksi fitoestrogen (Retana-Márquez *et al.*, 2012).

Namun konsentrasi yang dibutuhkan isoflavon (genistein, daidzein, glicetin dan equol) untuk menginduksi aktivitas transkripsi adalah 104 kali lebih tinggi dari E2. Aktivitas transkripsi yang lebih rendah dari fitoestrogen diimbangi dengan bioavailabilitas yang lebih tinggi, karena fraksi bebas yang bersirkulasi lebih dari 50%, dibandingkan dengan 4,5% untuk E2. Lebih lanjut, tingkat sirkulasi fitoestrogen satu urutan lebih tinggi daripada tingkat E2 (ng / ml versus pg / ml). Aksesibilitas yang lebih besar ke ER ini menjelaskan mengapa dengan adanya estrogen endogen, isoflavon berperilaku sebagai antagonis estrogenik, sedangkan dengan tidak adanya estrogen mereka berperilaku sebagai agonis lemah (Retana-Márquez *et al.*, 2012).

2.5 Isoflavon

Pada kedelai atau produk dari kedelai, isoflavon merupakan konsentrasi yang paling tinggi. Tiap 1 kg kedelai segar mengandung 0,6-3,8 g isoflavon (Hasanah *et al.*, 2020). Akan tetapi, jumlah ini juga bergantung pada produk-produk olahan lainnya (Adriani dan Nita, 2015). Isoflavon dalam kedelai merupakan fitoestrogen dengan aktivitas hormon potensial dikarenakan struktur kimianya mirip dengan 17β -estradiol (Dinsdale dan Ward, 2010). Isoflavon termasuk genistein, daidzein dan glycitein dapat mengikat ER (An *et al.*, 2018).

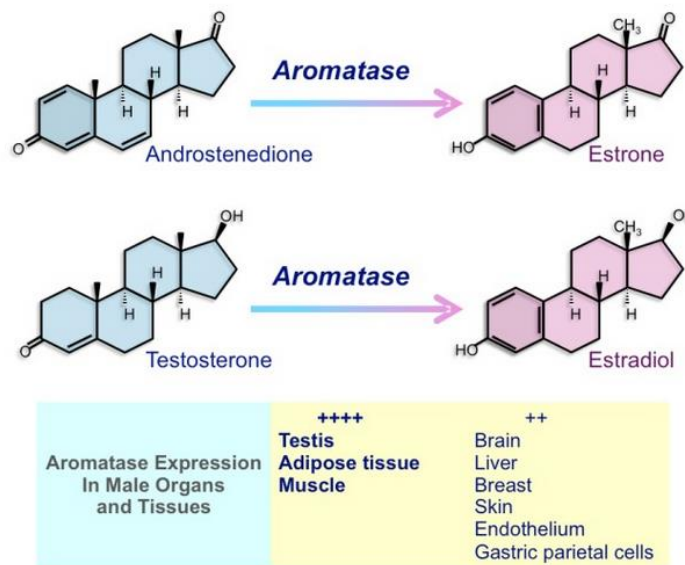
Isoflavon dapat berikatan dengan reseptor estrogen dan dapat menyebabkan efek yang potensial karena reseptor estrogen akan diblok oleh isoflavon sehingga tidak dapat diduduki oleh estrogen. Senyawa ini dapat membahayakan sistem endokrin tubuh karena kemungkinan efek buruknya pada fungsi reproduksi (Dinastiti *et al.*, 2019). Konsumsi makanan dengan bahan kedelai kaya isoflavon dapat terjadi gangguan aktivitas hormon dalam tubuh dan merangsang proses spermatogenesis, yang dapat menyebabkan penurunan jumlah spermatozoa (An *et al.*, 2018).

2.6 Estrogen dan Reseptor Estrogen (ER)

2.6.1 Biosintesis Estrogen

Pada manusia, terdapat tiga estrogen endogen utama yaitu estron (E1), estradiol (E2) dan estriol (E3). Estrogen pada pria ditemukan sekitar tahun 1930.

Kunci dalam biosintesis estrogen adalah aromatisasi androgen C19, yaitu testosteron dan androstenedion yang masing-masing diperlukan untuk membentuk estradiol dan estron. 17β -estradiol (estradiol) adalah bentuk estrogen endogen yang umum pada mamalia (Vincenzo *et al.*, 2016).



Gambar 2.5 Jalur biokimia konversi testosteron menjadi estrogen.

Keterangan: Testosteron dan androstenedion masing-masing diubah menjadi estradiol dan estron oleh aktivitas enzim aromatase (Vincenzo *et al.*, 2016).

Pembentukan estrogen dari testosteron dan androstenedion membutuhkan aktivitas enzim aromatase. Sitokrom P450 aromatase (P450arom) merupakan produk dari gen unik yang disebut CYP19 (Carreau dan Levallet, 2000). Mekanisme kerja estrogen melalui 2 subtipe reseptornya, yaitu reseptor estrogen alpha (ER α) dan reseptor estrogen beta (ER β) (Kim dan Park, 2012).

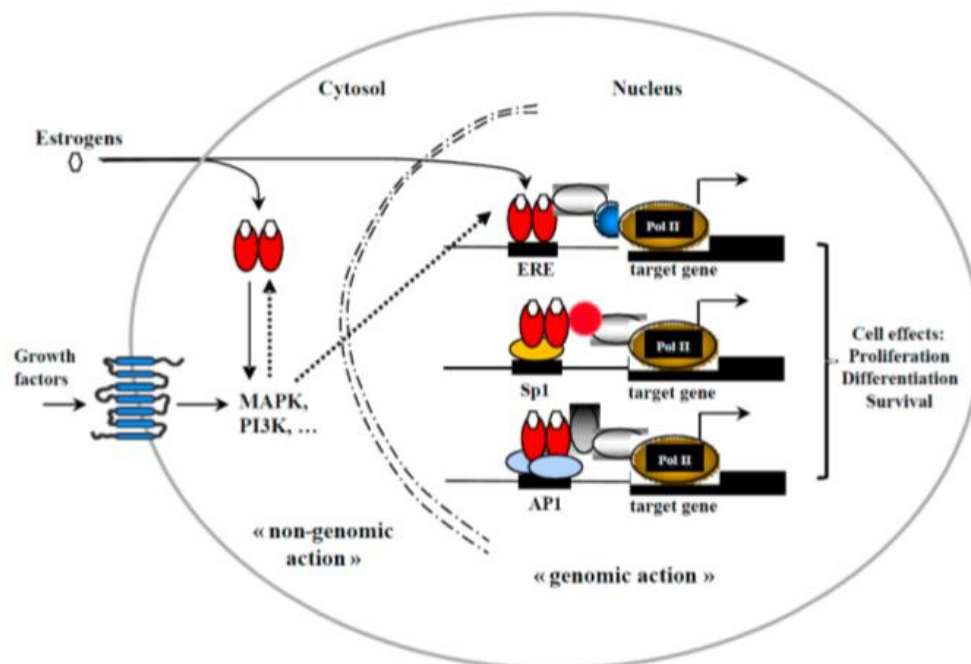
2.6.2 Reseptor Estrogen Alpha (ER α) dan Beta (ER β)

Estrogen memainkan peran mendasar dalam mengatur aktivitas reproduksi di semua vertebrata. Efek ini pada dasarnya dimediasi oleh reseptor estrogen, yaitu faktor transkripsi dari superfamili hormon steroid (Tohyama *et al.*, 2017). ER terletak di organ reproduksi jantan yaitu testis dan epididimis (Krejčířová *et al.*, 2018). Fungsi fisiologis estrogen melibatkan reseptor estrogen.

Reseptor estrogen teridentifikasi menjadi 2 subtipe yaitu ER α dan ER β . Reseptor tersebut dapat berikatan baik secara agonis maupun antagonis. ER α merupakan protein asam amino 595 dan dikode oleh gen *ESR1* pada kromosom 6q25,

sedangkan ER β merupakan protein asam amino 530 dan dikode oleh gen *ESR2* pada kromosom 14q22-24 (Broström, 2007; Li *et al.*, 2014).

ER α ditemukan pada tahun 1958, sekitar hampir 40 tahun sebelum ditemukannya ER β , karena ER α telah ditemukan di berbagai jaringan pada wanita. Kedua reseptor terletak di beberapa tipe sel yang berbeda dalam mengaktifkan jalur pensinyalan. Estrogen bekerja dengan berinteraksi pada reseptor estrogen yang dapat memodulasi transkripsi gen target (efek genom) dan/ aktivasi jalur pensinyalan berbeda yang terletak di membran (efek non genomik) (Broström, 2007; Carreau *et al.*, 2012). Estrogen di testis berinteraksi dengan reseptor estrogen yang akan memodulasi transkripsi gen target melalui salah satu elemen responsif estrogen spesifik (ERE) atau perekrutan co-faktor (Carreau *et al.*, 2011). Reseptor estrogen, setelah berikatan dengan ligan, dapat berpindah dari sitoplasma ke nukleus, mengikat dan mempengaruhi daerah kontrol transkripsi DNA atau RNA, dan maka dari itu dapat mempengaruhi ekspresi gen tertentu. Steroid juga mampu mengikat reseptor permukaan sel, mendorong pembentukan nukleotida siklik sitoplasma dan protein kinase terkait, yang mengontrol ekspresi gen target melalui faktor transkripsi (Sirotkin dan Harrath, 2014).



Gambar 2.6 Mekanisme kerja reseptor estrogen (ER).

Keterangan: E2 memasuki sel melalui membran lipid dan mengikat ER di dalam sitoplasma atau nukleus. ER memediasi efek E2 melalui beragam mekanisme transkripsi. Di dalam nukleus, ER yang diaktifkan membentuk dimer untuk mengikat DNA secara langsung di situs ERE atau secara tidak langsung di situs Sp1 atau Ap1. ER yang diaktifkan kemudian dapat merekrut kofaktor dan RNA polimerase II (pol. II), yang memungkinkan transkripsi gen target (aksi genomik). Lebih lanjut, ER dapat menggunakan aksi non-genomik melalui aktivasi kinase intraseluler yang berhubungan atau tidaknya dengan pensinyalan *growth factor* (Lecomte *et al.*, 2017).

Gambar 2.7 menunjukkan perbedaan struktur ER α (595 aa) dan ER β (530 aa). Reseptor ini memiliki lima domain struktural dan fungsional yang berbeda: domain pengikat DNA (DBD; domain C), domain *hinge* (D), domain pengikat ligan (LBD; domain E / F), dan dua domain fungsi aktivasi transkripsi AF-1 (dalam domain A/B) dan AF-2 (dalam domain F). Pengikatan ligan (estrogen) ke domain E menghasilkan perubahan konformasi pada reseptor (dimerisasi homo/ hetero). Dimer reseptor kemudian melakukan translokasi di dalam inti dengan bantuan domain D. Domain ini juga penting untuk modifikasi reseptor pasca-translasi dengan asetilasi, gugus lipofilik, dan ubiquitination.

Domain C kemudian mengenali dan mengikat elemen respons-estrogen (ERE)

dalam DNA. Region AF-2 berinteraksi dengan protein co-regulator di jalur yang bergantung pada ligan. Sedangkan region AF-1 diaktifkan dengan cara yang tidak bergantung pada ligan (Khan dan Ahmed, 2016).



Gambar 2.7 Perbandingan struktur ERα dan ERβ.

Keterangan: Reseptor estrogen memiliki beberapa domain yakni N terminal region (A/B domain), C Domain, D Domain, E Domain, dan F Domain (Khan dan Ahmed, 2016).

Pada kondisi normal (dibawah pengaruh estradiol endogen), transkripsi ERα lebih aktif dibandingkan ERβ. Aktivitas transkripsi ERα terutama dimediasi melalui N-terminal AF-1, dimana region ini terdapat perbedaan antara ERα dan ERβ (Adibnia *et al.*, 2016). ER memainkan peran penting dalam memediasi aksi estrogen pada jaringan target dan berhubungan dengan infertilitas pria (Li *et al.*, 2014). Lokasi ER yang terletak di dalam testis menunjukkan peran estrogen dalam regulasi proses spermatogenesis meliputi proliferasi, apoptosis maupun pematangan (An *et al.*, 2018).

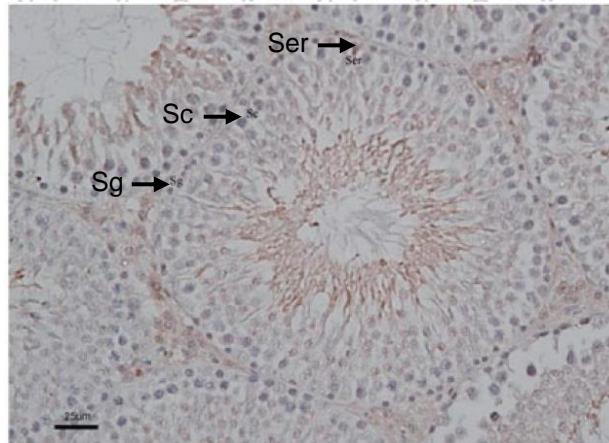
2.6.3 Fungsi Reseptor Estrogen Alpha (ERα) dan Beta (ERβ) pada Reproduksi Jantan

Peran estrogen dan reseptornya sangat penting untuk menjaga keseimbangan dan pemeliharaan spermatogenesis normal (Zhao *et al.*, 2020). Estrogen berperan dalam proliferasi dan diferensiasi pada sel germinal selama perkembangan serta menghambat apoptosis yang dimediasi oleh reseptor spesifik seperti ERα, ERβ, dan GPER (Chimento *et al.*, 2014; Nudmamud-Thanoi *et al.*, 2016).

ER terletak di sel somatik maupun sel germinal pada testis di berbagai spesies termasuk manusia dan tikus. Berbeda dengan reseptor androgen (AR) yang hanya terletak di sel somatik (Carreau *et al.*, 2011). Estrogen juga

memainkan peran penting dalam perkembangan sperma dengan mempengaruhi proses transkripsi gen target melalui ER α maupun ER β (An *et al.*, 2018). ER berinteraksi dengan aromatase (enzim sitokrom P450) dan terlibat dalam jalur yang diinduksi oleh estrogen untuk mengontrol proses spermatogenesis maupun spermiogenesis (Adibnia *et al.*, 2016). Selain itu, estrogen berperan dalam umpan balik negatif pada kelenjar pituitari dalam mengatur sekresi gonadotropin, oleh karena itu tidak adanya estrogen ataupun paparan estrogen yang berlebihan menyebabkan gangguan pada keseimbangan sumbu hipotalamus-hipofisis-testis (Aryani *et al.*, 2019).

Estrogen, dan reseptor utamanya (ER α) memiliki peran penting dalam regulasi spermatogenesis. Peran penting estrogen dalam proliferasi sel spermatogonia telah dibuktikan dengan keterlibatannya pada pensinyalan ERK/c-fos pada tingkat molekuler (Chieffi *et al.*, 2002). Estradiol merangsang mitosis pada spermatogonia melalui ER α sehingga menunjukkan peran dalam perkembangan siklus sel. Estradiol secara cepat mengaktifkan jalur EGFR/ERK/fos/cyclin D1 yang bertanggung jawab dalam proliferasi sel spermatogonia (Sirianni *et al.*, 2008; Sharma, 2017). Selain itu, ER α yang diaktifkan oleh ligananya secara cepat menginduksi jalur EGFR/ERK1/2 dan P13K sehingga meningkatkan ekspresi cyclin D1 yang berperan dalam proliferasi sel Sertoli (Chimento *et al.*, 2014). ER β mendorong siklus sel keluar dan maturasi sel melalui aktivasi dengan cara yang bergantung pada PI3K dan ini mengarah pada ekspresi dari marker diferensiasi sel Sertoli yaitu -p27Kip , GATA1, dan DMRT1 (Meroni *et al.*, 2019).



Gambar 2.8 Reseptor estrogen alpha ($ER\alpha$) pada testis tikus dengan pewarnaan imunohistokimia.

Keterangan: Imunostaining positif untuk $ER\alpha$ teramati pada Spermatozoa (Sg), Spermatozoa (Sc), dan Sel Sertoli (ser) (Nudmamud-Thanoi *et al.*, 2016).

ER juga berperan penting dalam kualitas parameter sperma. Hasil penelitian sebelumnya dengan menggunakan hewan coba model knockout $ER\beta$ tidak menunjukkan perubahan parameter sperma, sehingga peran $ER\alpha$ lebih menonjol dibandingkan $ER\beta$ pada tingkat sperma (Adibnia *et al.*, 2016). $ER\alpha$ memainkan peran penting dalam modulasi metabolisme sperma, apabila terjadi gangguan pada fungsinya dapat menyebabkan penurunan persentase densitas sperma, motilitas sperma serta sperma dengan morfologi normal (Abhari *et al.*, 2014). Lokalisasi $ER\alpha$ yang ditemukan di seluruh spermatozoon terutama pada bagian tengah (*midpiece*) dan terlokalisasi di dalam mitokondria yang mana menyediakan energi (ATP) yang dibutuhkan untuk pergerakan sperma (Carreau *et al.*, 2010; Nudmamud-Thanoi *et al.*, 2016).

2.7 Tikus Wistar (*Rattus norvegicus*)

Pada penelitian ini menggunakan tikus putih karena mudah didapat dalam jumlah banyak, berespon cepat, dapat memberikan gambaran ilmiah yang mungkin terjadi pada manusia dan harganya relatif murah (Sihombing dan Raflizar, 2010).

2.7.1 Taksonomi dan Morfologi

Klasifikasi tikus putih adalah sebagai berikut (Krinke, 2000):

- Kingdom : Animalia
- Filum : Chordata
- Kelas : Mammalia
- Ordo : Rodentia
- Subordo : Odontoceti
- Familia : Muridae
- Genus : Rattus
- Spesies : *Rattus norvegicus*

Tikus putih memiliki beberapa sifat yang menguntungkan sebagai hewan uji penelitian di antaranya perkembangbiakan cepat, mempunyai ukuran yang lebih besar dari mencit, mudah dipelihara dalam jumlah yang banyak. Tikus putih juga memiliki ciri-ciri morfologis seperti albino, kepala kecil, dan ekor yang lebih panjang dibandingkan badannya, pertumbuhannya cepat, temperamennya baik, kemampuan laktasi tinggi, dan tahan terhadap arsenik tiroksid (Akbar, 2013).

Karakteristik umum dan reproduksi tikus wistar jantan dapat dilihat dalam tabel

2.2.

Tabel 2.2 Data Fisiologi Umum dan Reproduksi Tikus Jantan

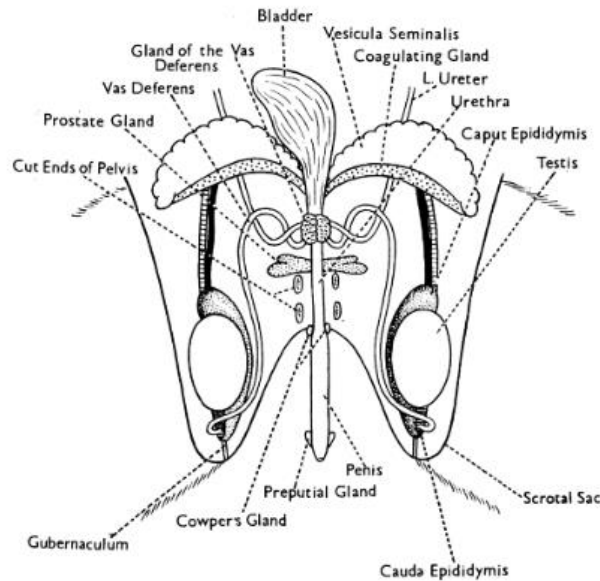
Parameter	Nilai
Temperatur tubuh	37°C
Laju respirasi	75 - 115 kali/ menit
Detak jantung	260 - 400 detak/menit
Konsumsi air/hari	10 - 12 ml/ 100 gram BB
Konsumsi makanan/hari	10 gram/ 100 gram BB
Berat lahir	5 gram
Usia penyapihan	21 hari
Berat badan tikus jantan dewasa	450 - 550 gram
Lama hidup	2,3 - 3,5 tahun
Usia dikawinkan	8 - 10 minggu

Sumber: Sengupta (2013)

2.7.2 Sistem Reproduksi Tikus Jantan

Pada sistem reproduksi tikus jantan, testis merupakan kelenjar utama yang bertanggung jawab terhadap produksi gamet jantan (spermatozoa) pada proses spermatogenesis dan sintesis hormon jantan/ androgen (proses steroidogenesis). Testis berjumlah sepasang, tersimpan dalam kantung skrotum dan terletak di inguinal. Pada mammal, testis turun dan keluar dari rongga abdomen (peritoneal) menuju posisi ekstrakorporeal dan akhirnya masuk ke dalam skrotum (inguinoskrotal). Proses ini dikenal sebagai *descensus testicularum* yang dikendalikan oleh androgen. Dengan posisi ini temperatur testis menjadi lebih rendah daripada temperatur tubuh (sekitar 2-4°C) yang diperlukan untuk spermatogenesis (Hughes dan Acerini, 2008; Fitria *et al.*, 2015). Testis 90% tersusun oleh tubulus seminiferus, sedangkan 10% nya adalah sel interstitial (sel Leydig) dan jaringan ikat (Susilawati, 2011). Selain testis, terdapat kelenjar-kelenjar kelamin pelengkap (*accessory sex glands*), yaitu: vesikula seminalis, kelenjar koagulasi, prostat, bulbouretralis (kelenjar Cowper), dan ampula (Gambar 2.9). Sekret yang dihasilkan *accessory sex glands* bersama-

sama dengan spermatozoa dan sekret epididimis disebut semen (Chughtai *et al.*, 2005; Gofur *et al.*, 2014).



Gambar 2.9 Struktur kelenjar-kelenjar reproduksi pada tikus jantan (Fitria *et al.*, 2015).

2.7.2.1 Sel Leydig

Sel Leydig merupakan penghasil utama testosteron. Sel yang terletak di kompartemen interstitial testis ini memproduksi sekitar 95% testosteron. Sel Leydig mengonversikan kolesterol menjadi testosteron. Di dalam sel ini, testosteron juga dapat diubah menjadi dihidrotestosteron atau estradiol. Sel Leydig memproduksi estradiol tetapi dalam jumlah yang kecil, sekitar 20 % dari aromatisasi peripheral (Agustinus *et al.*, 2018).

2.7.2.2 Sel Sertoli

Sel Sertoli merupakan sel somatik yang terletak di membran basal dan meluas hingga ke lumen tubulus seminiferus. Sel ini dapat dianggap sebagai struktur penunjang sel germinal. Sepanjang badan sel, terdapat sel germinal dengan berbagai tingkat diferensiasi. Sel sertoli berperan sebagai penopang dan penyedia makanan (nutrisi) untuk spermatozoa yang sedang berkembang serta mengoordinasi spermatogenesis (Cheng, 2008; Agustinus *et al.*, 2018). Sel

Sertoli memproduksi piruvat, asetat dan laktat yang diperlukan untuk metabolisme sel germinal (Oliveira dan Alves, 2015).

Sel Sertoli yang berdekatan akan membentuk *Sertoli cells tight junction* yang termasuk *blood-testis-barrier* atau sawar darah testis. Penutupan sawar darah testis ini terjadi saat meiosis sel benih telah terjadi dan proliferasi sel Sertoli telah berhenti. Sawar darah testis membagi epitel seminiferus menjadi dua bagian, yaitu regio basal tempat sel benih stadium awal dan regio adluminal tempat sel benih stadium lanjut (Agustinus *et al.*, 2018).

Selama perkembangannya, sel benih berpindah dari basal menuju adluminal. Proses ini terjadi melalui disolusi dan perakitan kembali *tight junction* di atas dan di bawah sel benih yang berpindah. Sawar darah testis berfungsi sebagai isolasi fisik sel haploid (pembelahan meiosis menyebabkan spermatosit primer dari keadaan diploid akan berubah menjadi haploid pada tahap selanjutnya) untuk mencegah pengenalan sel haploid oleh sistem imun dan persiapan lingkungan khusus untuk proses meiosis dan perkembangan sperma (Agustinus *et al.*, 2018).

2.7.2.3 Sel Benih (Sel Germinal)

Beragam sel benih tersusun dalam hubungan selular yang tipikal di dalam tubulus seminiferus. Sel ini terdiri dari sel punca pada bagian basal hingga spermatozoa pada lumen. Spermatogonia terletak pada bagian basal epitel seminiferus dan diklasifikasikan menjadi tiga jenis yaitu tipe A, tipe intermediet dan tipe B. Spermatogonia dianggap sebagai sel punca testicular (Krinke, 2000; Agustinus *et al.*, 2018)

Dari spermatogonium B, spermatosit preleptoten dihasilkan sebelum permulaan pembelahan meiosis. Spermatid merupakan hasil akhir pembelahan meiosis dan mengalami serangkaian perubahan menjadi spermatozoa yang dikenal sebagai spermiogenesis dan dilepas dari melalui spermiasi. Spermatozoa

merupakan bentuk sel matur dari sel germinal yang terdapat dalam tubulus seminiferus (Agustinus *et al.*, 2018).

2.7.3 Spermatogenesis pada Tikus

Spermatogenesis merupakan proses perkembangan yang kompleks dimana melibatkan perubahan bentuk sel germinal progenitor diploid menjadi spermatozoa matur yang terjadi di tubulus seminiferus yang terletak pada testis. (Susilawati, 2011; Keber *et al.*, 2013). Proses spermatogenesis pada manusia memerlukan waktu 74 hari, sedangkan pada tikus jantan memerlukan waktu 48 hari yang dibagi menjadi 14 tahap serta dibutuhkan waktu 12 hari untuk menyelesaikan satu siklus (Susilawati, 2011; Mäkelä dan Toppari, 2017).

Spermatogenesis menghasilkan sekitar 256 spermatid (haploid, $1n$) yang berasal dari spermatogonia tipe A1 (diploid, $2n$). Satu spermatogonia (diploid, $2n$) akan menghasilkan 8 spermatid (haploid, $1n$) selama proses spermatogenesis. Proses spermatogenesis dimulai ketika spermatogonia mengalami proliferasi dan diferensiasi melalui mitosis menjadi spermatosit primer, yang selanjutnya diikuti oleh meiosis yang menghasilkan *round* spermatid haploid. Selanjutnya *round* spermatid mengalami perubahan morfologi yang dramatis hingga menjadi spermatozoa yang matur (Wang *et al.*, 2012; Akmal *et al.*, 2015). Proses spermatogenesis dibagi menjadi 4 fase (Weinbauer *et al.*, 2010), yaitu:

2.7.3.1 Proliferasi mitosis dan diferensiasi sel germinal diploid (spermatogonia) (spermatositogenesis)

Fase pertama adalah fase proliferasi, dimana sel induk spermatogonia mengalami pembelahan mitosis untuk mempertahankan populasi sel induk dan menghasilkan sel spermatogonia yang siap dilanjutkan untuk spermatogenesis.

Pada spermatogenesis, fase pertama dikenal sebagai spermatositogenesis dan fungsinya untuk mempertahankan populasi sel induk dan memproduksi sel spermatogonia untuk proliferasi dan diferensiasi lebih lanjut (Singh, 2020).

Spermatogonia dibedakan menjadi tiga jenis yaitu tipe A, tipe intermediet dan tipe B. Spermatogonia tipe A dibagi menjadi tipe AO (sel induk) dan tipe A1-A4. Spermatogonia AO terletak pada membrane basal tubulus seminiferus dan dapat membelah menjadi dua sel anak, salah satu hasilnya adalah spermatogonia A1 yang kemudian akan terus berlanjut pada proses spermatogenesis. Sedangkan yang lain tahap sebagai sel induk (Krinke, 2000; Mäkelä dan Toppari, 2017). Penurunan proliferasi sel spermatogonia menyebabkan penurunan rasio sel germinal/ sel Sertoli, penurunan spermatogenesis, serta infertilitas jantan (Liberal *et al.*, 2010).

2.7.3.2 Pembelahan sel germinal (spermatisit) secara meiosis menjadi sel germinal haploid (spermatid)

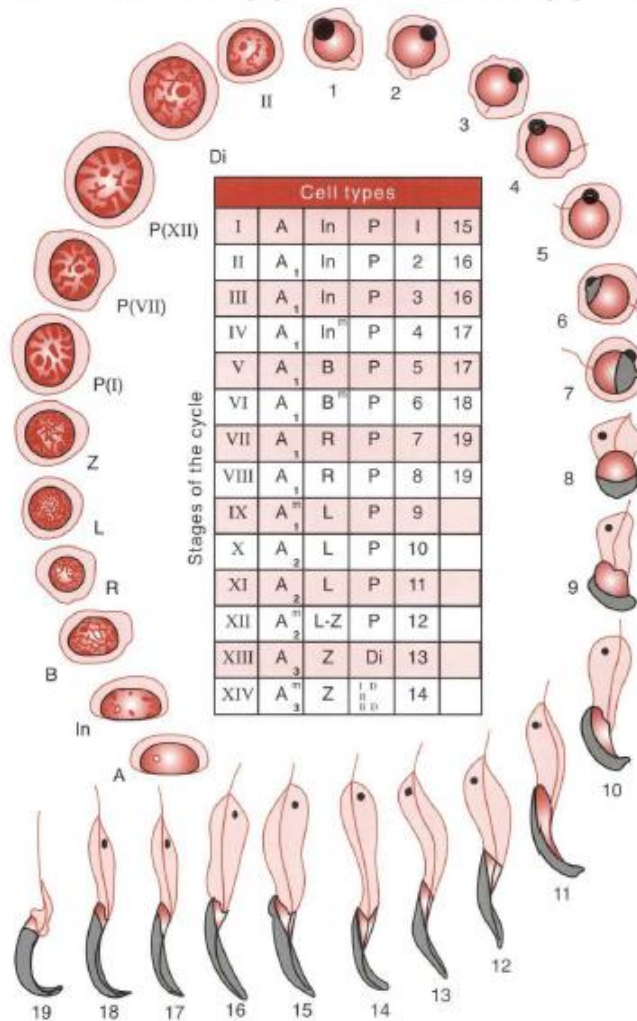
Pada tikus jantan spermatogonia A1 selanjutnya akan mengalami enam pembelahan mitosis yang hasilnya adalah spermatisit preleptoten. Pada fase meiosis akan berkembang menjadi leptoten, zygoten, pakiten dan spermatisit sekunder. Spermatisit sekunder akan membelah secara meiosis hingga menjadi spermatid (Gambar 2.10) (Krinke, 2000; Mäkelä dan Toppari, 2017).

2.7.3.3 Transformasi spermatid menjadi spermatozoa (spermiogenesis)

Spermatid selanjutnya akan mengalami perubahan morfologi menjadi spermatozoa melalui proses spermiogenesis. Spermiogenesis terjadi dalam lumen tubulus seminiferus. Perubahan yang terjadi pada tahap ini yaitu (1) pembentukan akrosom, yang menutupi separuh dari nucleus dan mengandung enzim-enzim untuk membantu penetrasi ke ovum, (2) kondensasi nukleus, (3) pembentukan leher, bagian tengah dan ekor sperma, serta (4) terjadinya pengelupasan sebagian besar sitoplasma sebagai residu yang difagosit oleh sel Sertoli (Luthfi dan Noor, 2015).

2.7.3.4 Spermiasi

Tahap ini merupakan pelepasan spermatozoa dari epitelium germinal menuju tubular (Weinbauer *et al.*, 2010).



Gambar 2.10 Tahapan perubahan spermatogonia pada setiap siklus sel selama proses spermatogenesis pada tikus.

Keterangan: A: spermatogonia tipe A; In: spermatogonia tipe intermediet; B: spermatogonia tipe B; R: Resting spermatosit primer; L: Leptotene; Z: Zygotene; P(I), P(VII), P(VIII), awal, pertengahan dan akhir spermatosit pachytene; Di: diplotene; m: mitosis (Krinke, 2000).

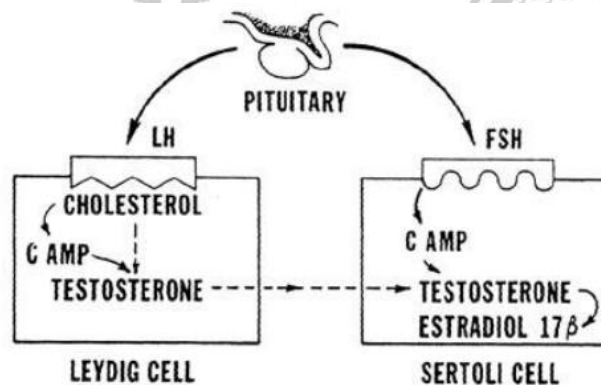
2.7.4 Regulasi Hormonal Pada Spermatogenesis

Regulasi proses spermatogenesis melibatkan berbagai macam hormone yang diatur melalui mekanisme HPG (*Hypothalamic, pituitary, gonadal*) axis.

Hipotalamus mensekresi *gonadotropin-releasing hormone* (GnRH) yang memicu

hipofisis anterior untuk mensekresi *luteinizing hormone* (LH) dan *follicle-stimulating hormone* (FSH). Kerja utama LH adalah berikatan dengan reseptor khusus pada sel Leydig dan meningkatkan siklik adenosin monofosfat (cAMP) yang menginduksi konversi kolesterol menjadi testosteron. Selain itu LH juga berperan dalam regulasi jumlah sel Leydig. Sedangkan FSH berikatan dengan reseptor spesifik pada sel-sel Sertoli di tubulus seminiferus dan merangsang produksi *Androgen binding protein* (ABP), inhibin, aromatase dan protein lainnya. FSH mempengaruhi sel Sertoli di tubulus seminiferus untuk merangsang terjadinya spermatogenesis (Kumar dan Sharma, 2017; Agustinus *et al.*, 2018).

Testosteron sebagai androgen utama yang diproduksi oleh sel-sel interstitial (sel Leydig) berperan dalam regulasi spermatogenesis yaitu memacu pertumbuhan dan diferensiasi sel-sel spermatogenik (Gofur *et al.*, 2014). Sebagian testosteron yang dihasilkan sel Leydig akan diikat oleh ABP yang diproduksi oleh sel Sertoli, sementara sebagian kecil akan masuk ke sirkulasi. Pengikatan testosteron oleh ABP membantu testosteron masuk kedalam tubulus seminiferus untuk proses spermatogenesis. Testosteron yang dihasilkan sel Leydig oleh parakrin sel Sertoli dirubah menjadi 17β -estradiol karena pengaruh FSH (Susilawati, 2011; Agustinus *et al.*, 2018) (Gambar 2.11).



Gambar 2.11 Interaksi parakrin antara sel Leydig dan sel Sertoli.

Keterangan: *Pituitary* mensekresi LH dan FSH. LH meningkatkan cAMP sehingga menginduksi konversi kolesterol menjadi testosteron pada sel Leydig. Sebagian testosteron yang dihasilkan sel Leydig oleh parakrin sel Sertoli diubah menjadi 17β -estradiol (Susilawati, 2011).

2.8 Spermatozoa

Spermatozoa merupakan hasil dari proses spermatogenesis, sehingga dengan menganalisis kuantitas dan kualitas spermatozoa dapat mencerminkan proses-proses yang terjadi selama pembentukannya, termasuk melakukan diagnosis apabila terjadi kerusakan atau kelainan pada morfologi spermatozoa.

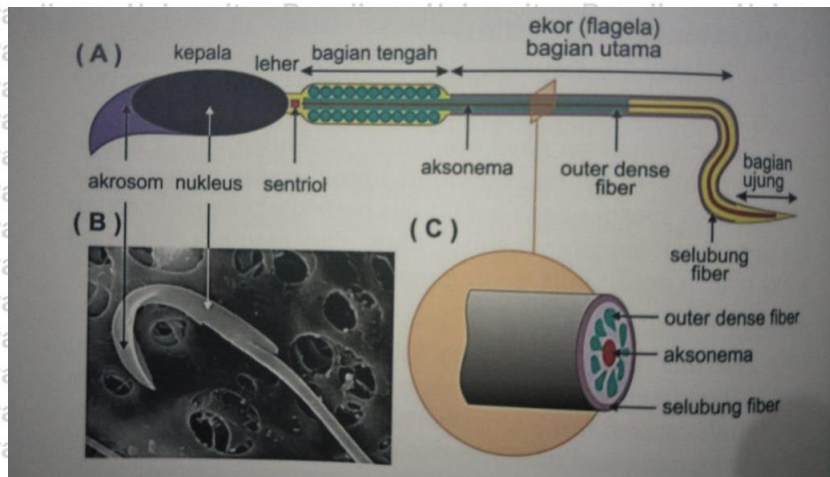
(Fitria *et al.*, 2015). Spermatozoa pada tikus lebih panjang dibandingkan dengan spesies mamalia lainnya dan panjangnya sekitar 150-200 μm . Kepala sperma pada tikus berbentuk kait, sama seperti hewan pengerat lainnya (Krinke, 2000).

2.8.1 Produksi Spermatozoa

Tiap hari per testis pada tikus memproduksi sperma sebanyak $35,4 \times 10^6/\text{mL}$, perbedaan yang tidak signifikan jika dibandingkan dengan manusia yakni $45,5 \times 10^6/\text{mL}$. Pada tikus tubulus seminiferus lebih tebal daripada manusia yaitu $347 \pm 5 \mu\text{m}$ vs $262 \pm 9 \mu\text{m}$, akan tetapi pembatas tubulus jauh lebih tipis pada tikus dibandingkan manusia ($1,4 \pm 1 \mu\text{m}$ vs $15,9 \pm 3,4 \mu\text{m}$). Epitel seminiferus pada tikus mengandung 40% lebih sel spermatogenik dari volumenya, 2 kali lebih banyak dari manusia (Krinke, 2000).

2.8.2 Morfologi Spermatozoa

Salah satu parameter yang paling penting dalam menilai fertilitas individu jantan adalah morfologi spermatozoa (Sudatri *et al.*, 2019). Spermatozoa merupakan sel memanjang, terdiri dari dua bagian utama yaitu kepala yang mengandung inti dan flagella (ekor) yang mengandung perangkat yang diperlukan untuk pergerakannya (motilitas) (Agustinus *et al.*, 2018). Pada kepala sperma terdapat nucleus, akrosom dan membrane plasma sperma. Secara struktur, flagella dibagi menjadi 4 bagian, yaitu: bagian leher, bagian tengah, bagian utama dan bagian ujung. Leher melekatkan flagella pada kepala sperma (Gambar 2.12) (Luthfi dan Noor, 2015).



Gambar 2.12 Struktur spermatozoa tikus.

Keterangan: (A) Gambar skematik. (B) Gambar mikroskop elektron imbasan sperma *Rattus norvegicus*. (C) Skema irisan melintang bagian ekor (Luthfi dan Noor, 2015).

Kepala sperma dibagi menjadi dua bagian utama yaitu nukleus dan struktur membran. Nukleus mengandung kromosom haploid dan nukleoprotein.

Struktur membran sperma terdiri dari (1) membran plasma yang menutup seluruh permukaan kepala sperma; (2) akrosom, yaitu struktur disebelah dalam membran plasma yang menutup bagian anterior nukleus; dan (3) *Postnuclear cap*, yaitu selubung sitoplasma yang menutup bagian posterior akrosom (Luthfi dan Noor, 2015).

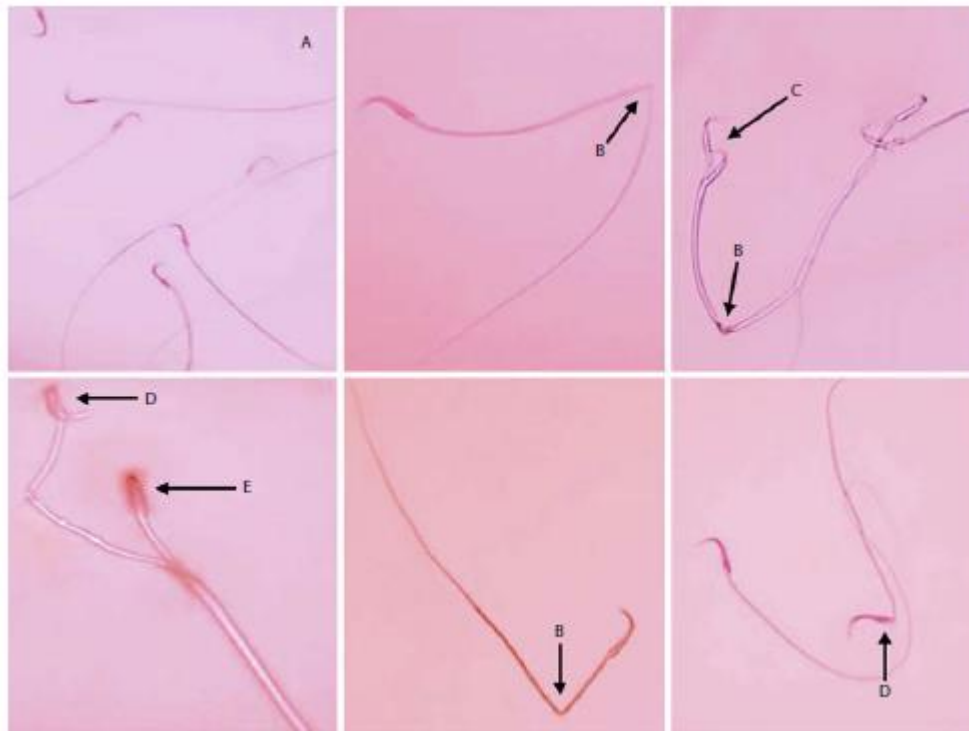
Akrosom yang mengandung enzim pada kepala sperma penting untuk proses penembusan sel telur. Sperma yang diejakulasi harus mengalami proses kapabilitas agar dapat membuahi oosit. Kapabilitas merupakan proses yang menyebabkan perubahan fisiologi pada membran plasma kepala sperma sebelum mengalami reaksi akrosom. Proses ini melibatkan penyingkiran protein dan glikoprotein plasma semen yang melekat pada permukaan sperma dan selanjutnya terjadi rangkaian perubahan biokimia dan fisiologi pada sperma (Luthfi dan Noor, 2015).

Flagela merupakan bagian yang bertanggungjawab dalam pergerakan (motilitas) dan kemampuan sperma dalam membuahi. Flagela dibagi menjadi 4

bagian yaitu bagian leher, bagian tengah (*midpiece*), bagian utama (*principal*) dan bagian ujung (*endpiece*). Inti flagela adalah struktur mikrotubul yang dikenali sebagai aksonema yang memanjang dari bagian penghubung hingga bagian akhir flagela. Aksonema dikelilingi oleh sembilan serat kasar atau padat luat (*outer dense fiber* atau ODF). ODF berfungsi menyediakan struktur sokongan untuk ekor sperma yang panjang. Aksonema dan serat padat pada middle piece diselubungi oleh sejumlah mitokondria. Mitokondria menyediakan energi (ATP) yang dibutuhkan untuk pergerakan sperma (Luthfi dan Noor, 2015; Agustinus et al., 2018).

Pada flagela terdapat enzim-enzim yang berperan penting dalam produksi tenaga sperma yang diperlukan untuk pergerakan sperma dan pembuahan. Enzim-enzim tersebut merupakan enzim yang terlibat dalam glikolisis dan fosforilasi oksidatif. Kedua proses tersebut merupakan sumber penghasilan tenaga pada sperma. Diantara enzim yang terlibat dalam glikolisis ialah enolase, fosfoglisarat kinase 2, dan laktat dehidrogenase, sedangkan enzim yang terlibat dalam oksidasi fosforilasi adalah ATP sintase, enolase, fosfoglisarat kinase 2, dan laktat dehidrogenase terdapat pada selubung fiber, sedangkan ATP sintase terdapat pada mitokondria yang terletak dalam selubung mitokondria (Luthfi dan Noor, 2015).

Ciri spermatozoa dengan morfologi normal mempunyai bentuk kepala seperti kait dan ekor panjang lurus, sedangkan sperma yang abnormal mempunyai bentuk kepala tidak beraturan, dapat berbentuk seperti pisang atau tidak beraturan (*amorphous*), atau terlalu bengkok, dan ekornya tidak lurus bahkan tidak berekor, atau hanya terdapat ekornya saja tanpa kepala (Sinaga, 2016).



Gambar 2.13 Spermatozoa dengan morfologi normal dan abnormal pada tikus Wistar.

Keterangan: A: Morfologi normal; B: ekor bengkok; C: kepala ganda; D: leher bengkok; E: kepala yang rata (Abbasi *et al.*, 2011).

Spermatozoa dengan morfologi abnormal dapat disebabkan karena proses spermatogenesis yang tidak dapat berjalan optimal, yaitu gangguan pada tahap pembelahan sel-sel spermatogonia sebelum terbentuknya kepala, leher dan ekor. Sehingga pembentukan morfologi yang normal akan mengalami gangguan (Ermiza, 2012). Spermatogenesis merupakan proses perkembangan yang kompleks dimana melibatkan perubahan bentuk sel germinal progenitor diploid menjadi spermatozoa matur yang terjadi di tubulus seminiferus yang terletak pada testis (Susilawati, 2011; Keber *et al.*, 2013). Gangguan pada proses spermatogenesis menyebabkan kerusakan pada hasil sel spermatogenik, termasuk jumlah tetesan sitoplasma dan gangguan selama spermiogenesis. Gangguan pada proses spermiogenesis mengakibatkan kelainan pembentukan sperma, seperti kepala spermatozoa menjadi lebih kecil atau lebih besar dari biasanya, ekor bengkok atau patah, dan lain-lain (Antari *et al.*, 2016).

2.8.3 Pergerakan Spermatozoa

Pergerakan (motilitas) spermatozoa sangat penting karena menunjukkan kemampuan spermatozoa dalam melakukan proses fertilisasi (Adriani dan Nita, 2015). Gerakan progresif merupakan gerakan spermatozoa yang normal. Gerakan melingkar dan gerak reverse seringkali merupakan tanda terjadinya *cold shock* karena abnormalitas morfologi sperma (Luthfi dan Noor, 2015). Sumber tenaga sperma adalah ATP. ATP terutama digunakan untuk pergerakan spermatozoa. Berbeda dengan sel somatik, sel sperma memerlukan lebih banyak ATP untuk menyediakan tenaga bagi pergerakan sperma, kapasitas, dan proses pembuahan. Sperma menggunakan kedua jalur yaitu glikolisis dan fosforilasi oksidatif untuk produksi ATP. Mitokondria terletak dibagian flagella terutama dibagian tengah (*midpiece*) dan merupakan tempat produksi tenaga untuk pergerakan sperma (Luthfi dan Noor, 2015; Agustinus *et al.*, 2018).

Pergerakan spermatozoa dipengaruhi oleh morfologi spermatozoa itu sendiri, dimana dengan adanya morfologi yang normal dapat mengakibatkan peningkatan motilitas. Meskipun ekor sperma sangat penting untuk motilitas, akan tetapi morfologi kepala sperma juga sangat penting (Gundogan *et al.*, 2010). Abnormalitas morfologi pada sperma dapat menyebabkan gangguan pada motilitasnya, yaitu kemampuan gerak dari spermatozoa (Ermiza, 2012). Pergerakan spermatozoa berasal dari gerakan ekor dan berhubungan erat dengan viabilitas maupun morfologi yang normal. Hal ini disebabkan karena pergerakan dapat terjadi jika didukung oleh morfologi dari spermatozoa itu sendiri (Adriani dan Nita, 2015).

Selain itu, adanya peningkatan suhu dapat menyebabkan adanya gangguan fungsi mitokondria yaitu organel yang terdapat dalam sel sperma yang fungsinya adalah menghasilkan energi dan menyebabkan kerusakan enzim

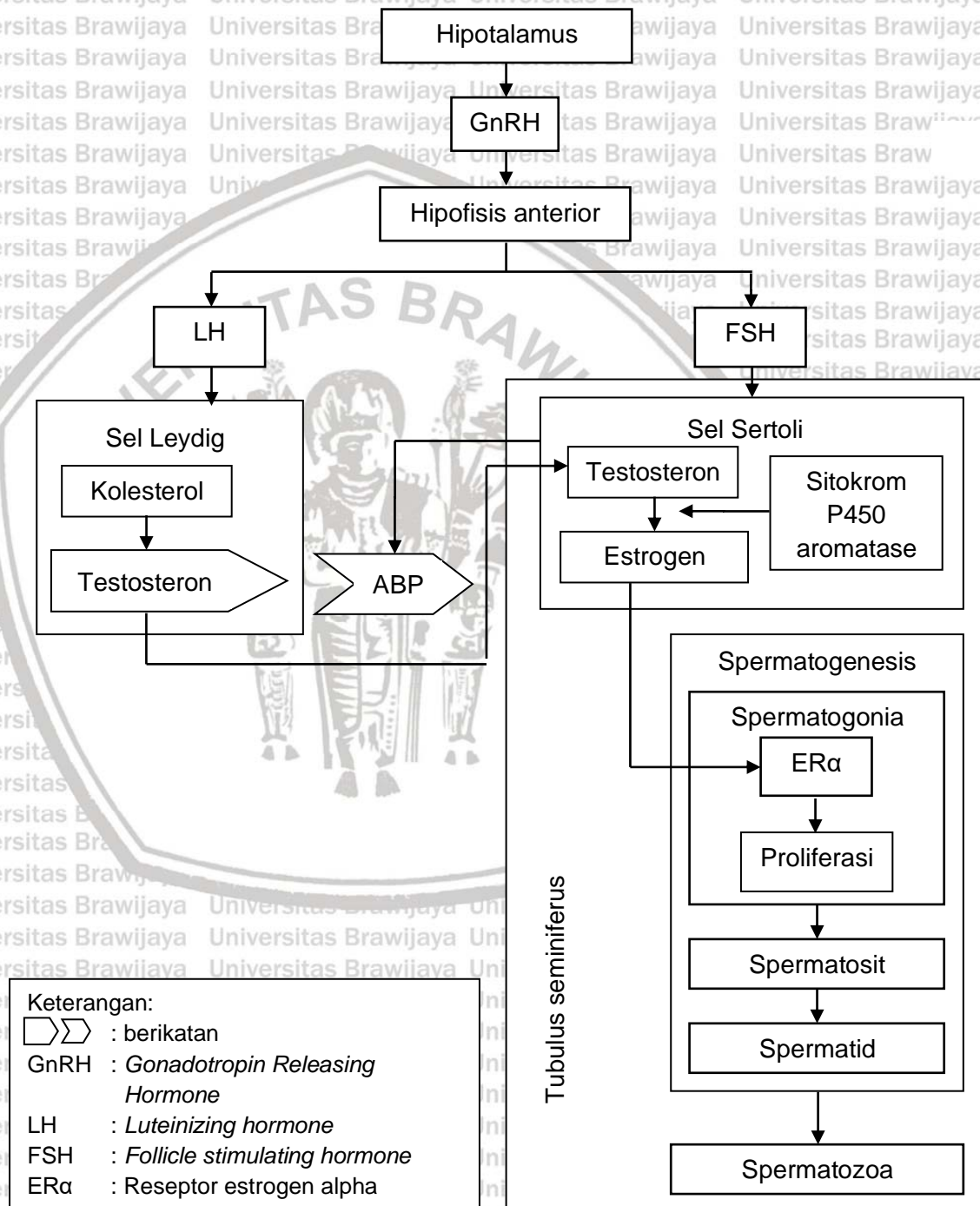
karena pada suhu yang lebih tinggi terjadi denaturasi. Denaturasi enzim spermatozoa akan mengganggu metabolisme spermatozoa dalam menghasilkan energi untuk pergerakan spermatozoa sehingga menyebabkan terjadinya penurunan motilitas spermatozoa (Ermiza, 2012).



BAB 3

KERANGKA TEORI DAN KONSEP PENELITIAN

3.1 Kerangka Teori



Gambar 3.1 Kerangka Teori Penelitian

Penjelasan Kerangka Teori

Mekanisme normal pengaturan hormon tikus jantan dimulai dari hipotalamus mensekresikan *Gonadotropin Releasing Hormone* (GnRH) untuk merangsang pengeluaran *Lutenising Hormone* (LH) dan *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) dari hipofisis anterior. (Oliveira dan Alves, 2015). LH berikatan dengan reseptor khusus pada sel Leydig dan menginduksi konversi kolesterol menjadi testosteron. Sedangkan FSH berikatan dengan reseptor spesifik pada sel-sel Sertoli di tubulus seminiferus dan merangsang produksi *Androgen binding protein* (ABP), inhibin, aromatase dan protein lainnya. FSH mempengaruhi sel Sertoli di tubulus seminiferus untuk merangsang terjadinya spermatogenesis (Kumar dan Sharma, 2017; Agustinus *et al.*, 2018).

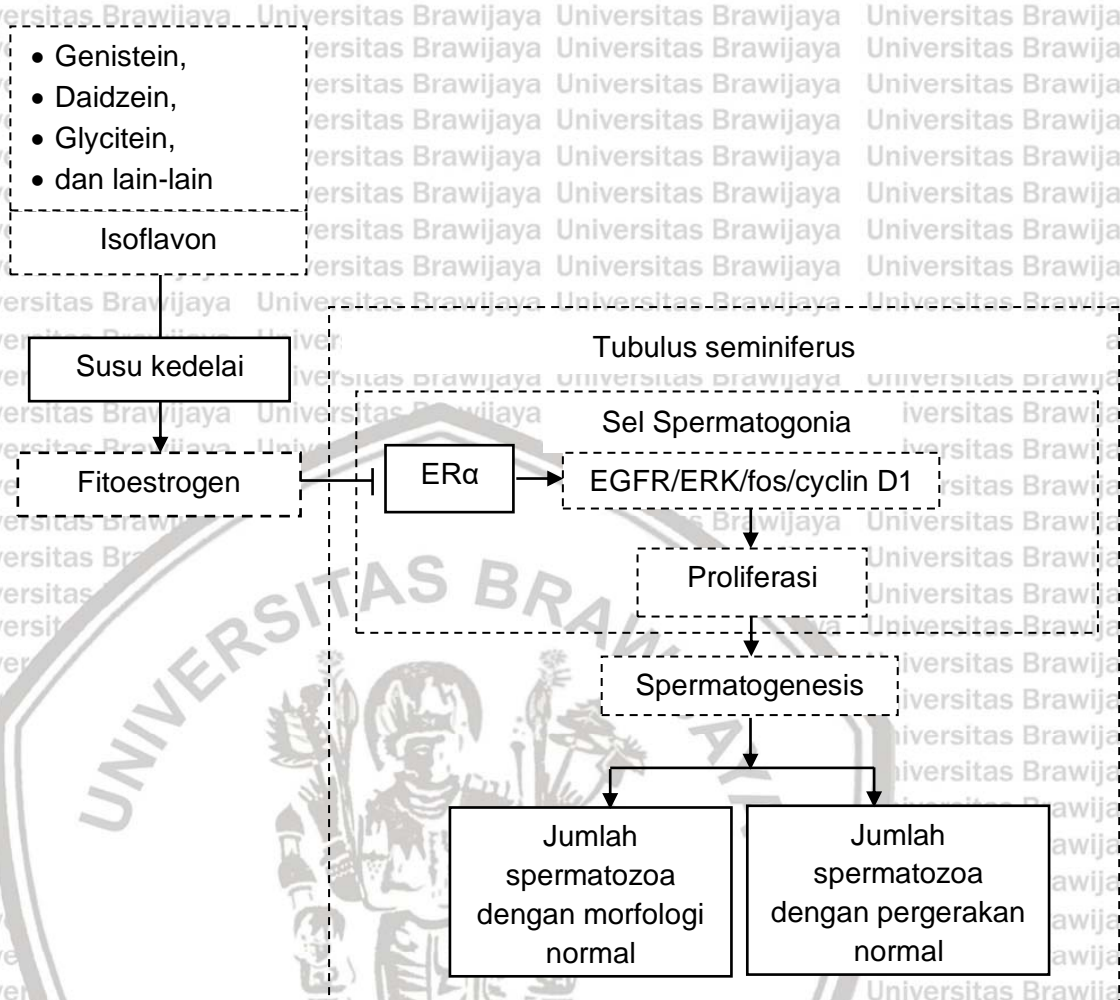
Pengikatan testosteron oleh ABP membantu testosteron masuk kedalam tubulus seminiferus untuk proses spermatogenesis. Testosteron yang dihasilkan sel Leydig oleh parakrin sel Sertoli dirubah menjadi 17β -estradiol karena pengaruh FSH (Susilawati, 2011; Agustinus *et al.*, 2018). Pembentukan estrogen dari testosteron membutuhkan aktivitas enzim aromatase yaitu sitokrom P450 aromatase (P450arom) (Carreau dan Levallet, 2000).

Estrogen, dan reseptor utamanya ($ER\alpha$) memiliki peran penting dalam regulasi spermatogenesis. Peran penting estrogen dalam proliferasi sel spermatogonia telah dibuktikan dengan keterlibatannya pada pensinyalan ERK/c-fos pada tingkat molekuler (Chieffi *et al.*, 2002). Estradiol merangsang mitosis pada spermatogonia melalui $ER\alpha$ sehingga menunjukkan peran dalam perkembangan siklus sel. Estradiol secara cepat mengaktifkan jalur EGFR/ERK/fos/cyclin D1 yang bertanggung jawab dalam proliferasi sel spermatogonia (Sirianni *et al.*, 2008; Sharma, 2017).

Spermatogenesis merupakan proses perubahan bentuk sel germinal progenitor diploid menjadi spermatozoa. Proses spermatogenesis dimulai ketika spermatogonia mengalami proliferasi dan diferensiasi melalui mitosis menjadi spermatosit primer, yang selanjutnya diikuti oleh meiosis yang menghasilkan *round* spermatid haploid. Selanjutnya *round* spermatid mengalami perubahan morfologi yang dramatis hingga menjadi spermatozoa yang matur (Wang *et al.*, 2012; Akmal *et al.*, 2015). Keberhasilan proses spermatogenesis dipengaruhi oleh jumlah sel germinal pada tubulus seminiferus. Spermatogenesis dan degenerasi sel germinal dapat diukur dari jumlah sel germinal dalam berbagai tahap perkembangan selama spermatogenesis, dan secara kuantitatif berkaitan dengan jumlah spermatozoa yang dihasilkan (Johnson *et al.*, 2000).



3.2 Kerangka Konsep



Keterangan :
[Solid Box] : Variabel yang diteliti
[Dashed Box] : Variabel yang tidak diteliti
[T-bar] : Menghambat

Gambar 3.2 Kerangka Konsep Penelitian

Penjelasan Kerangka Konsep

Kedelai diketahui merupakan salah satu sumber fitoestrogen karena struktur molekul isoflavon kedelai mirip dengan struktur molekul estrogen, sehingga dapat berikatan dengan reseptor estrogen (RE) (Madianung *et al.*, 2016). Pemberian susu kedelai yang mengandung fitoestrogen tercatat sebagai

senyawa estrogenik sehingga dapat mengganggu sistem endokrin atau disebut dengan *endocrine disrupting chemicals* (EDCs) (Shibayama *et al.*, 2001).

Hasil penelitian yang dilakukan oleh Zin *et al.* (2013) bahwa pemberian fitoestrogen dalam perkembangan sistem reproduksi tikus dapat menurunkan ER α . Estradiol menginduksi terjadinya proses spermatogenesis yang dimediasi oleh ER α (Allan *et al.*, 2010). Estradiol secara cepat mengaktifkan jalur

EGFR/ERK/fos/cyclin D1 yang bertanggung jawab dalam proliferasi sel spermatogonia (Sirianni *et al.*, 2008; Sharma, 2017). Proses spermatogenesis

dimulai ketika spermatogonia mengalami proliferasi dan diferensiasi melalui mitosis menjadi spermatosit primer, yang selanjutnya diikuti oleh meiosis yang menghasilkan *round* spermatid haploid. Selanjutnya *round* spermatid mengalami perubahan morfologi yang dramatis hingga menjadi spermatozoa yang matur (Wang *et al.*, 2012; Akmal *et al.*, 2015). Lokalisasi ER α yang ditemukan di seluruh spermatozoon terutama pada bagian tengah (*midpiece*) dan terlokalisasi di dalam mitokondria sebagai penyedia energi (ATP) yang dibutuhkan untuk pergerakan sperma (Carreau *et al.*, 2010; Nudmamud-Thanoi *et al.*, 2016).

Spermatogenesis merupakan proses perubahan bentuk sel germinal progenitor diploid menjadi spermatozoa. Keberhasilan proses spermatogenesis dipengaruhi oleh jumlah sel germinal pada tubulus seminiferus (Johnson *et al.*, 2000). Penurunan proliferasi sel spermatogonia menyebabkan penurunan rasio sel germinal/ sel Sertoli, penurunan spermatogenesis, sehingga menyebabkan infertilitas pada jantan (Liberal *et al.*, 2010). Proses spermatogenesis yang tidak dapat berjalan optimal dapat menyebabkan penurunan morfologi normal dan pergerakan (motilitas) spermatozoa (Adriani dan Nita, 2015).

3.3 Hipotesis Penelitian

Adapun hipotesis pada penelitian ini, yakni sebagai berikut :

Pemberian susu kedelai dapat menyebabkan penurunan jumlah sel spermatogonia yang mengekspresikan reseptor estrogen alpha, penurunan jumlah spermatozoa dengan morfologi dan pergerakan normal pada tikus wistar (*Rattus norvegicus*) jantan.

3.3.1 Sub hipotesis:

3.3.1.1 Terjadi penurunan jumlah sel spermatogonia yang mengekspresikan reseptor estrogen alpha pada tikus wistar (*Rattus norvegicus*) jantan yang diberi susu kedelai dengan berbagai dosis

3.3.1.2 Terjadi penurunan jumlah spermatozoa dengan morfologi normal pada tikus wistar (*Rattus norvegicus*) jantan yang diberi susu kedelai dengan berbagai dosis

3.3.1.3 Terjadi penurunan jumlah spermatozoa dengan pergerakan normal pada tikus wistar (*Rattus norvegicus*) wistar jantan yang diberi susu kedelai dengan berbagai dosis

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis dan Desain Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah *true experimental* dengan pendekatan *post test only control group design*. Penelitian *true experimental* ini bertujuan untuk menyelidiki hubungan sebab akibat untuk membandingkan kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Sedangkan *post test only control group design* merupakan rancangan penelitian yang pengambilan data hanya dilakukan pada akhir penelitian setelah perlakuan (Sastroasmoro, 2011).

4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

4.2.1 Populasi

Populasi yang dipakai dalam penelitian ini adalah hewan coba tikus wistar (*Rattus norvegicus*) jantan yang dipilih dengan berat sekitar 62 – 70 gram dan umur 4 minggu, setiap tikus diberi tempat yang cukup untuk menghindari ketidaknyamanan maupun sakit. Penelitian hewan coba ini berdasarkan pertimbangan bahwa tikus wistar (*Rattus norvegicus*) dapat memberikan gambaran ilmiah yang mungkin terjadi pada manusia (Sihombing dan Raflizar, 2010).

4.2.2 Besar Sampel

Menurut Hanafiah (2012), penghitungan besarnya pengulangan pemeriksaan ditentukan berdasarkan rumus :

$$(t-1)(r-1) \geq 15$$

t = jumlah perlakuan

r = jumlah pengulangan atau sampel dalam tiap kelompok

Penelitian ini menetapkan 4 kelompok, jadi total jumlah sampel yang diperlukan dihitung dengan rumus :

$$(t-1) (r-1) \geq 15$$

$$(4-1) (r-1) \geq 15$$

$$3 (r-1) \geq 15$$

$$3r-3 \geq 15$$

$$3r \geq 15+3$$

$$r \geq 6$$

Maka dengan perhitungan matematis didapatkan hasil 6 kali pengulangan per kelompok penelitian. Jumlah sampel secara keseluruhan adalah jumlah perlakuan dikalikan jumlah pengulangan $4 \times 6 = 24$ tikus, sehingga sampel yang diperlukan berjumlah dua puluh empat. Berarti setiap kelompoknya memerlukan sedikitnya enam tikus. Tikus terbagi menjadi 4 kelompok yaitu kelompok control dan kelompok perlakuan (P1, P2, P3). Namun masing-masing kelompok dilebihkan 1 ekor untuk menghindari kemungkinan sampel mati sehingga jumlah sampel keseluruhan 28 ekor tikus.

- Kelompok I : Kontrol (Kontrol) tikus jantan tanpa diberi perlakuan

- Kelompok II : Perlakuan 1 (P1) tikus jantan yang diberi susu kedelai 7,1 gr/kgBB/hari.

- Kelompok II : Perlakuan 2 (P2) tikus jantan yang diberi susu kedelai 14,2 gr/kgBB/hari.

- Kelompok III : Perlakuan 3 (P3) tikus jantan yang diberi susu kedelai 21,3 gr/kgBB/hari.

4.2.3 Kriteria Inklusi dan Eksklusi

Penelitian pada hewan coba menggunakan tikus yang memenuhi kriteria yaitu:

a. Kriteria Inklusi

1. Tikus wistar (*Rattus norvegicus*) jantan
2. Berumur 4 minggu
3. Berat tubuh sekitar 62-70 gram
4. Kondisi sehat dan tidak cacat dengan indikasi bergerak aktif, bulu bersih dan mata jernih.

b. Kriteria eksklusi:

1. Tikus yang sudah pernah digunakan dalam penelitian lain
2. Tikus yang mati saat proses penelitian berlangsung

4.3 Tempat dan Waktu Penelitian

4.3.1 Tempat Penelitian

Penelitian akan dilakukan di Laboratorium Farmakologi, Laboratorium Patologi Anatomi dan Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang sebagai tempat pemeliharaan tikus wistar (*Rattus norvegicus*) jantan, pembedahan, proses pengamatan jumlah sel spermatogonia yang mengekspresikan reseptor estrogen alpha dengan metode imunohistokimia serta pengamatan jumlah spermatozoa dengan morfologi dan pergerakan normal pada tikus wistar (*Rattus norvegicus*) jantan.

4.3.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Maret sampai Mei 2021.

4.4 Bahan dan Alat

4.4.1 Persiapan Pemberian Susu Kedelai

Alat yang dibutuhkan yaitu alat timbangan, tabung erlenmeyer, corong, dan batang pengaduk. Dan bahan yang dibutuhkan yaitu bubuk susu kedelai dan air aquades. Pemberian susu kedelai menggunakan alat sonde.

4.4.2 Persiapan Diet Normal

Alat yang dibutuhkan yaitu alat timbangan, wadah/tempat makanan.

Bahan yang dibutuhkan yaitu makanan ternak PAR-S, tepung terigu, dan air secukupnya.

4.4.3 Pemeliharaan Tikus

Alat pengukur berat badan (sartorius), kandang tikus, penutup kandang, sekam/serbuk kayu, botol minuman.

4.4.4 Pengamatan Sel Spermatogonia yang Mengekspresikan Reseptor Estrogen Alpha (ER α)

Bahan : *Estrogen receptor alpha antibody* nomor katalog SC-787, ethanol (70%, 80%, 90%), Xilol, buffer sitrat, Aquades, H₂O₂ (endogen peroksidase), PBS (Phosphate Buffer Saline), Biotin Conjugate, SA-HRP (Streptavidine horseradish peroxidase), DAB (Chromagen diaminobenzidine), Mayer's Hematoxilen, sampel jaringan testis. Alat : slide object, waterbath, mikroskop, pipet

4.4.5 Pengamatan Pergerakan Spermatozoa

Alat yang dibutuhkan adalah mikroskop cahaya, objek glass, cover glass, white tip dan mikropipet.

4.4.6 Pengamatan Morfologi Spermatozoa

Alat yang dibutuhkan adalah mikroskop cahaya, objek *glass*, *pipet disposable*, *white tip* dan mikropipet. Bahan yang dibutuhkan adalah methanol 99%, safranin, buffer fosfat pH 6.8 dan kristal violet 0.25 gr% buffer acetat pH

2.4.

4.5 Variabel Penelitian

4.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah pemberian susu kedelai dengan berbagai dosis.

4.5.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah jumlah spermatogonia yang mengekspresikan reseptor estrogen alpha, jumlah spermatozoa dengan morfologi dan pergerakan normal tikus wistar (*Rattus norvegicus*) jantan.

4.6 Definisi Operasional

Tabel 4.1 Definisi Operasional

Variabel Penelitian	Definisi Operasional	Skala Ukur
Susu Kedelai	Bubuk kedelai yang diencerkan dengan air dan diberikan secara peroral menggunakan sonde dengan dosis 7,1 gr/kgBB/hari, 14,2 gr/kgBB/hari dan 21,3 gr/kgBB/hari yang diadaptasi dari penelitian Nurdiana <i>et al.</i> (2015).	Rasio
Jumlah Sel Spermatogonia yang Mengekspresikan Reseptor Estrogen Alpha	Banyaknya sel spermatogonia yang mengekspresikan ER α ditandai dengan memberikan warna coklat setelah diwarnai dengan <i>estrogen receptor alpha antibody</i> (SC-787) dari Santa Cruz menggunakan metode immunohistokimia dan dihitung dibawah mikroskop cahaya.	Rasio
Jumlah Spermatozoa dengan Morfologi Normal	Banyaknya spermatozoa yang ditandai dengan kepala berbentuk kait, leher, dan ekor yang lurus. Pengamatan dengan pewarnaan Safranin-Kristal Violet dan menggunakan mikroskop cahaya pada 100 spermatozoa dengan pembesaran 400 kali (Malini, 2013; Rompis <i>et al.</i> , 2018). Jumlah spermatozoa dengan morfologi normal dinyatakan dalam persentase.	Rasio
Jumlah Spermatozoa Dengan Pergerakan	Banyaknya spermatozoa dengan morfologi lengkap meliputi kepala, leher dan ekor serta mampu bergerak sesuai klasifikasinya, yaitu: <ul style="list-style-type: none"> • Motilitas A : gerakan spermatozoa maju lurus 	Rasio

Normal

dan cepat (progresif)

- Motilitas B : gerakan spermatozoa bergerak ditempat (non progresif)
- Motilitas C : spermatozoa diam atau tidak bergerak

Pengamatan menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400 kali pada 100 spermatozoa (Rompis *et al.*, 2018). Jumlah spermatozoa dengan pergerakan progresif dinyatakan dalam persentase.

4.7 Prosedur Penelitian**4.7.1 Prosedur Pemilihan Sampel Tikus**

Tikus wistar (*Rattus norvegicus*) jantan dipilih dengan berat sekitar 62 - 70 gr dan berumur 4 minggu.

4.7.2 Aklimatisasi Tikus

Tikus dipelihara dan diadaptasikan dalam laboratorium Farmakologi selama tujuh hari pada temperatur ruangan konstan (20-25°C) dengan siklus terang-gelap. Untuk tempat pemeliharaan digunakan box plastik, masing-masing untuk empat sampai lima ekor tikus, ditutup dengan kawat kassa dan diberi alas sekam yang diganti setiap tiga hari untuk mencegah infeksi yang dapat terjadi akibat kotoran tikus tersebut. Kebutuhan makanan tikus dewasa adalah 45 gr/hari/ekor. Diet normal terdiri 67% Comfeed PAR-S, 33% terigu dan air yang diberikan secara *ad libitum*.

4.7.3 Pembagian Kelompok Tikus

Tikus wistar (*Rattus norvegicus*) jantan dibagi menjadi empat kelompok. Dengan satu kelompok sebagai kontrol (tanpa perlakuan) dan ketiga lainnya diberi susu kedelai dengan dosis yang berbeda. Dosis susu kedelai yang diberikan kepada masing-masing kelompok (P1, P2, dan P3) diambil dari penelitian Nurdiana *et al.* (2015) dimana susu kedelai dengan kandungan

isoflavon 3,53 mg/ 100 g susu memberikan efek penurunan spermatogenesis pada tikus jantan. Rincian pembagian kelompok sebagai berikut:

- Kelompok Kontrol (Kontrol) – Akan diberikan diet normal.
- Kelompok P1 – Akan diberikan diet normal dan susu kedelai dengan dosis 7,1 gr/kgBB/hari.
- Kelompok P2 – Akan diberikan diet normal dan susu kedelai dengan dosis 14,2 gr/kgBB/hari.
- Kelompok P3 – Akan diberikan diet normal dan susu kedelai dengan dosis 21,3 gr/kgBB/hari.

4.7.4 Persiapan Susu Kedelai

Susu kedelai dibuat dengan mencampur susu kedelai bubuk yang memiliki kandungan isoflavon dengan air secukupnya. Pada penelitian ini menggunakan bubuk kedelai merk Afis dengan kandungan isoflavon pada susu yang digunakan yaitu 3,8 mg per 100 gram susu kedelai. Dosis susu kedelai diberikan dalam 3 kelompok perlakuan, yaitu: kelompok P1 = 7,1 gr/kgBb/hari, P2 = 14,2 gr/kgBb/hari, dan P3 = 21,3 gr/kgBb/hari. Susu kedelai dilarutkan dalam air hangat dengan perbandingan 2:1. Setiap dua gram susu kedelai dilarutkan dalam satu mililiter air.

4.7.5 Pemberian Susu Kedelai

Awalnya semua kelompok tikus akan diberi diet standar selama masa adaptasi yang dilakukan selama satu minggu. Pemberian susu kedelai dilakukan per oral. Tiga dosis berbeda diberikan kepada tiga kelompok tikus. Susu kedelai diberikan saat berusia 4 minggu dan diberikan selama 6 minggu sampai usia 10 minggu. Penentuan waktu tersebut berdasarkan usia tikus muda saat disapih (4 minggu), dan usia tikus dewasa saat mencapai kematangan reproduksi dan seksual (10 minggu) menurut Sengupta (2013). Pemberian susu kedelai

dilakukan dengan alat berupa sonde, dan diberikan paling banyak dua kali dalam satu hari (pagi dan sore).

4.7.5 Pembedahan Tikus Wistar dan Pengambilan Organ

Tikus wistar (*Rattus norvegicus*) jantan dikorbankan setelah perlakuan selesai, pada usia 10 minggu dengan pemberian anestesi. Obat anestesi yang digunakan adalah ketamine dengan dosis 0,2 mL, tikus yang sudah dalam pengaruh anestesi kemudian ditempatkan pada meja bedah dan difiksasi.

Kemudian dilakukan pembedahan dan pengambilan organ testis tikus. Testis diambil dengan cara memotong bagian epididymis dan dibersihkan dari jaringan ikat serta lemak. Setelah itu organ testis dimasukkan ke dalam wadah yang sudah terisi formalin 10% dan dilabel.

4.7.6 Pengamatan Sel Spermatogonia yang Mengekspresikan Reseptor Estrogen Alpha (ER α) dengan Metode Imunohistokimia

Slide berisi jaringan testis yang sudah mengalami persiapan preparat histopatologi, selanjutnya dilakukan identifikasi dan pemeriksaan ekspresi reseptor estrogen alpha. Prosedur dilakukan sebagai berikut :

a. Deparafinisasi: untuk menghilangkan parafin. Slide dipanaskan pada suhu 60°C selama 60 menit. Kemudian direndam dalam larutan-lauratn dibawah ini secara berurutan:

1. Slide jaringan testis tikus pada objek glass direndam dalam *Xylene/Xylo* I, didiamkan selama 10 menit.
2. Slide dipindahkan dan direndam dalam *Xylene/Xylo* II, didiamkan selama 10 menit
3. Lalu Slide dipindahkan dan direndam dalam *Xylene/Xylo* III, didiamkan selama 10 menit.

b. Rehidrasi: dengan memasukkan ke dalam alkohol seri menurun.

1. Slide dipindahkan kedalam ke dalam wadah berisi EtOH 98% (alkohol absolut) I dan didiamkan selama 10 menit.
2. Slide dipindahkan kedalam ke dalam wadah berisi EtOH 98% (alkohol absolut) II dan didiamkan selama 10 menit.
4. Slide yang telah direndam di dalam alkohol absolut kemudian di masukkan ke dalam larutan alkohol 96%, 90%,80%,70% masing-masing selama 5 menit.
5. Slide dipindahkan ke wadah aquades steril sebanyak 2 kali dengan masing-masing selama 5 menit.
6. Setelah itu dibilas menggunakan air mengalir selama 5 menit.

c. Antigen Retrieval dengan Buffer Sitrat

1. Slide direndam dalam chamber berisi buffer sitrat pH 6,0 ; kemudian dimasukkan dalam waterbath suhu 95°C selama 20 menit.
2. Slide dikeluarkan dari waterbath, ditunggu sampai suhu ruang ± 20 menit.

d. Pewarnaan Imunohistokimia

Selanjutnya siap untuk pewarnaan ER α , adapun urutannya adalah sebagai berikut:

Hari ke-1

a) *Blocking* endogen peroksidase

1. Slide jaringan yang telah dikeringkan, ditetaskan larutan hydrogen peroksida (3% H₂O₂ dalam methanol) dan diinkubasi selama 20 menit pada suhu ruang.
2. Kemudian slide direndam dengan *trypsin* (0,025%) selama 15 menit dalam inkubator dengan suhu 37°C.
3. Kemudian slide dicuci dengan PBS sebanyak 3 kali dengan masing-masing selama 2 menit.

b) *Blocking* Unspesifik Protein

1. Slide kemudian ditetaskan Blocking Buffer (Background Sniper) dan diinkubasi selama 60 menit pada suhu ruang.

2. Kemudian slide dicuci dengan PBS sebanyak 3 kali dengan masing-masing selama 2 menit.

c) Inkubasi Antibodi Primer

1. Setelah itu diberikan Antibodi primer *estrogen receptor alpha antibody* (SC-787) dari Santa Cruz yang dilarutkan dalam Blocking Buffer.

2. Dilakukan inkubasi overnight pada 4°C.

3. Esok harinya dikeluarkan dari 4°C, ditunggu sampai suhu ruang kemudian dicuci dengan PBS sebanyak tiga kali dengan masing-masing selama 2 menit.

Hari ke-2

a) Inkubasi Antibodi Sekunder

1. Slide yang telah diberikan antibodi, kemudian di tetaskan antibodi sekunder (*Biotin Conjugate*), dan diinkubasi selama 60 menit pada suhu ruangan.

2. Setelah itu slide dicuci dengan PBS sebanyak tiga kali dengan masing-masing selama 2 menit.

b) Inkubasi SA-HRP (*Streptavidin Horseradish Peroxidase*)

1. Slide ditetaskan *streptavidin drops (yellow)* dan diinkubasi selama 40 menit pada suhu ruang.

2. Setelah itu dicuci dengan PBS sebanyak tiga kali dengan masing-masing selama 2 menit

3. Kemudian dibilas dengan aquades.

c) Aplikasi Chromagen DAB (*Diaminobenzidine*)

1. Slide diberikan DAB (3,3 *diamninobenzea*) Chromogen yang diencerkan dengan *diluent* 2% dan diinkubasi selama 6-10 menit pada suhu ruang.

2. Kemudian dicuci dengan PBS sebanyak 2 kali dengan masing-masing selama 4 menit.

3. Dan dicuci dengan aquades sebanyak 3 kali dengan masing-masing selama 2 menit.

d) Counterstain dengan Mayer's Hematoxilen

1. Slide yang telah dilakukan *staining*, kemudian dilakukan *counterstain* dengan menggunakan pewarna *Mayer's Hematoxilen* (*Mayer's Hematoxilen* : aquades= 1:3) selama 3-10 menit. Setelah itu dicuci dengan menggunakan air mengalir selama 5 menit.

2. Slide kemudian direndam dengan amoniak air selama 3 menit. Setelah itu dibilas dengan aquades.

e) Mounting dengan entellan

Jaringan yang telah diwarnai kemudian ditempatkan pada kaca obyek (*object glass*) yang ditutup dengan kaca penutup (*cover glass*) yang sebelumnya telah ditetesi dengan *entellan*.

f) Langkah penghitungan jumlah sel spermatogonia yang mengekspresikan reseptor estrogen alpha (ER α)

1. Sebelum penghitungan dilakukan secara manual, preparat yang sudah diwarnai dengan imunohistokimia (IHK) terlebih dahulu dikonsultasikan kepada ahli patologi anatomi. Apabila pewarnaan preparat sudah benar maka sudah bisa dihitung.

2. Kemudian preparat yang sudah diwarnai discan menggunakan mikroskop *Olympus BX 51* dan diamati dengan perbesaran 400X pada 10 lapangan pandang secara random.

3. Pengamatan sel spermatogonia yang mengekspresikan ER α pada preparat yang sudah di IHK didampingi konsultan spesialis Patologi Anatomi.

4. Hasil penghitungan perlapangan pandang kemudian dijumlahkan dan dihitung reratanya sehingga menghasilkan 1 data untuk kelompok perlakuan.

4.7.7 Tahap Pembuatan Suspensi

Kauda epididimis diambil, dimasukkan kedalam cawan petri berisi larutan NaCl 0,9%, dicacah dengan skapel hingga cairan keruh. Suspensi spermatozoa yang diperoleh digunakan untuk analisis morfologi dan pergerakan spermatozoa.

4.7.8 Pengamatan Morfologi Spermatozoa

Pengamatan morfologi akan dilakukan dengan menggunakan preparat basah merujuk pada penelitian Rompis *et al.* (2018) menggunakan metode pewarnaan Safranin-Kristal Violet. Langkah-langkahnya sebagai berikut:

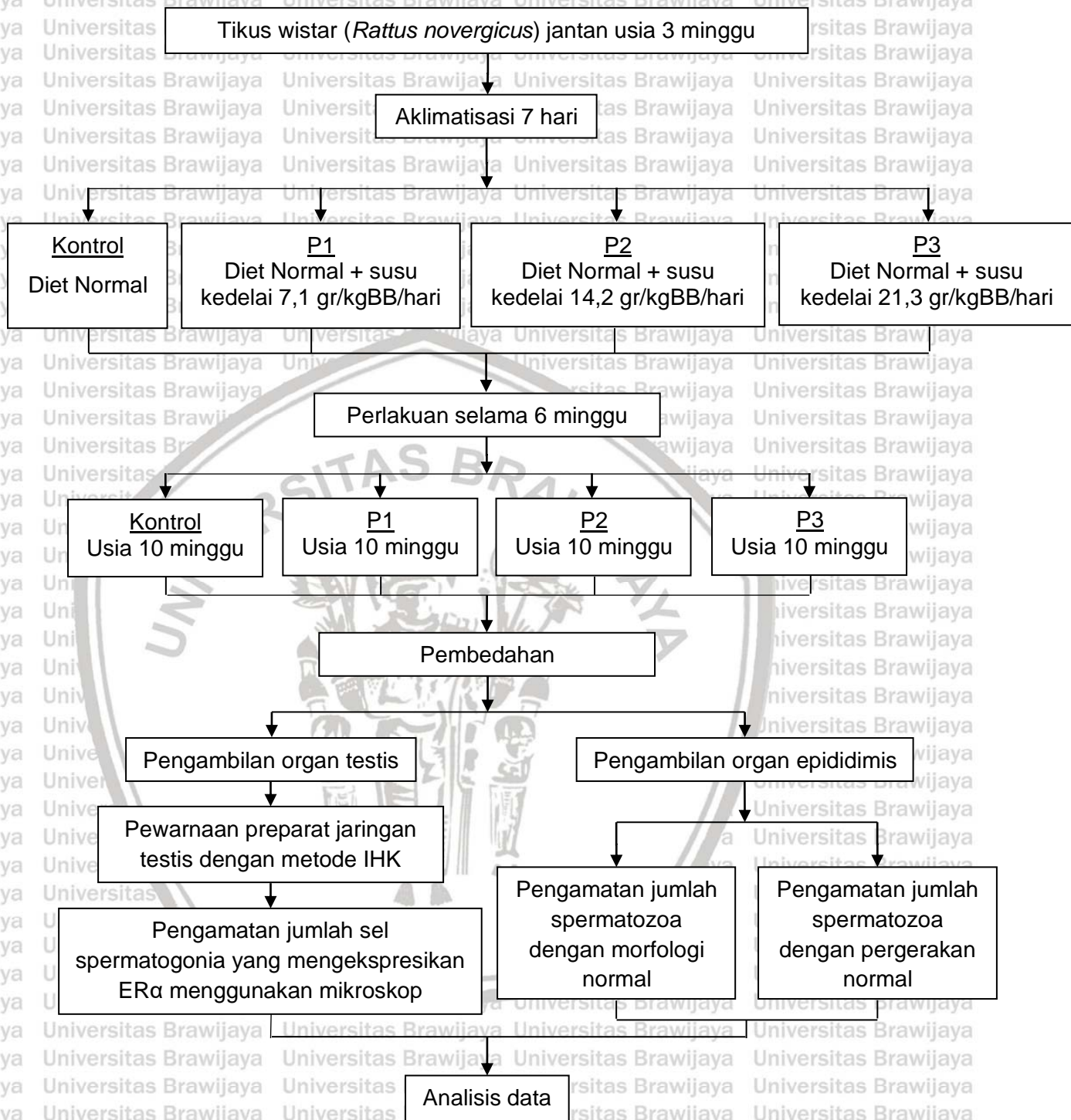
1. Membuat hapusan sperma 5 ul pada objek *glass* lalu membuat hapusan.
2. Memfiksasi hapusan dengan menggunakan methanol 99% selama 5 menit.
3. Meratakan safranin selama 5 menit.
4. Mencelupkan ke buffer fosfat pH 6.8 kemudian langsung diangkat.
5. Meratakan kristal violet 0.25 gr% buffer acetat Ph 2.4 selama 5 menit.
6. Dibilas, ditunggu sehingga kering dan amati dengan mikroskop (400x).
7. Menghitung 4-6 bidang lapang pandang sampai mendapatkan 100 spermatozoa, kemudian mengklasifikasikan morfologi spermatozoa dan dinyatakan dalam persentase.
8. Persentase kelompok spermatozoa dengan morfologi normal digunakan analisa data.

4.7.9 Pengamatan Pergerakan Spermatozoa

Pengamatan pergerakan spermatozoa merujuk pada Rompis *et al.* (2018). Langkah-langkahnya sebagai berikut:

1. 10 mikroliter suspensi spermatozoa diteteskan pada objek glass dan ditutup dengan *cover glass*,
 2. Membiarkan selama 1 menit agar stabil,
 3. Kemudian diamati menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400 kali pada 100 spermatozoa,
 4. Menilai pergerakan spermatozoa dan diklasifikasikan menjadi 3 kategori, yaitu:
 - Motilitas A : gerakan spermatozoa maju lurus dan cepat (progresif)
 - Motilitas B : gerakan spermatozoa bergerak ditempat (non progresif)
 - Motilitas C : spermatozoa diam atau tidak bergerak
3. Persentase kelompok spermatozoa dengan pergerakan progresif digunakan dalam analisa data.

4.8 Alur Penelitian



Gambar 4.1 Alur Operasional Penelitian

4.9 Analisis Data

Penelitian ini menggunakan beberapa teknik analisa data, yaitu (1) uji data sampel dengan menggunakan *Saphiro Wilk*, (2) Uji beda dan (3) Uji korelasi.

4.9.1 Uji Prasyarat Parametrik

Untuk membuktikan hipotesis penelitian, maka dipilih pendekatan uji statistic, yaitu uji statistic parametric. Sebelum dilakukan uji statistik parametric maka data akan dianalisis terlebih dahulu dengan uji prasyarat parametrik, yaitu data sampel dari variable terukur diuji terlebih dahulu apakah data terdistribusi normal. Uji normalitas data dalam penelitian ini menggunakan uji *Saphiro Wilk*.

Pada uji ini, kriteria keputusan dilihat nilai probabilitas kesalahan empiric pada nilai signifikan atau *p-value*. Jika signifikansi atau *p-value* menunjukkan nilai lebih besar dari taraf signifikan $\alpha > 0,05$ maka disimpulkan data terdistribusi normal sehingga uji parametrik dapat digunakan (Santoso, 2005). Adapun variable yang dapat diukur dengan prasyarat parametrik adalah jumlah sel spermatogonia yang mengekspresikan reseptor estrogen alpha, jumlah spermatozoa dengan morfologi dan pergerakan normal.

4.9.2 Uji Beda

Uji beda digunakan untuk membandingkan variable terukur antara kelompok control dengan kelompok perlakuan. Analisis ini digunakan terhadap jumlah sel spermatogonia yang mengekspresikan reseptor estrogen alpha, jumlah spermatozoa dengan morfologi dan pergerakan normal dengan menggunakan uji *One Way ANOVA*. Tujuan teknik analisis ini adalah mengetahui ada atau tidaknya pengaruh pemberian susu kedelai berbagai dosis dengan syarat data bersifat normal dan homogen. Apabila pada uji *One Way ANOVA* menghasilkan H_0 ditolak atau kesimpulan ada perbedaan yang bermakna (signifikan), maka dapat dilakukan dengan uji analisa post hoc multiple

comparasion test. Metode post hoc yang digunakan adalah uji LSD (*Least Significant Difference*). Pada uji post hoc LSD, suatu data dikatakan berbeda secara bermakna dengan nilai signifikasi $P < 0,05$. Jika data tidak berdistribusi normal atau tidak homogen maka dapat menggunakan uji non parametrik yaitu uji *Kruskal Wallis* dan dapat dilanjutkan dengan uji *post hoc Man Whitney*. Analisa statistic ini menggunakan software SPSS 16.

4.9.3 Uji Korelasi

Uji korelasi digunakan untuk untuk menguji ada atau tidaknya tingkat keeratan hubungan antar variable terukur (minimal berskala interval) yaitu korelasi antara dosis susu kedelai dengan jumlah sel spermatogonia yang mengekspresikan reseptor estrogen alpha, jumlah spermatozoa dengan morfologi dan pergerakan normal. Pada penelitian ini akan menggunakan uji korelasi pearson jika data terdistribusi normal, tetapi jika tidak maka menggunakan uji spearman's rho. Jika nilai signifikan (nilai sig) atau p-value $\geq 0,05$ maka disimpulkan data tidak ada korelasi yang bermakna antar variable, jika p-value $\leq 0,05$ maka dapat disimpulkan ada korelasi yang bermakna antar variable. Analisa statistic ini menggunakan software SPSS 16.

Selanjutnya tingkat keeratan hubungan (koefisien korelasi/ KK) dapat ditarik diartikan ke dalam tujuh tingkatan (Hasan, 2012) sebagai berikut:

KK = 0, tidak ada korelasi

$0 < KK \leq 0,20$, korelasi sangat rendah/lemah tapi pasti

$0,20 < KK \leq 0,40$, korelasi rendah/ lemah tapi pasti

$0,40 < KK \leq 0,70$, korelasi yang cukup berarti

$0,70 < KK \leq 0,90$, korelasi yang tinggi; kuat

$0,90 < KK \leq 1,00$, korelasi sangat tinggi; kuat sekali; dapat diandalkan

KK = 1, korelasi sempurna

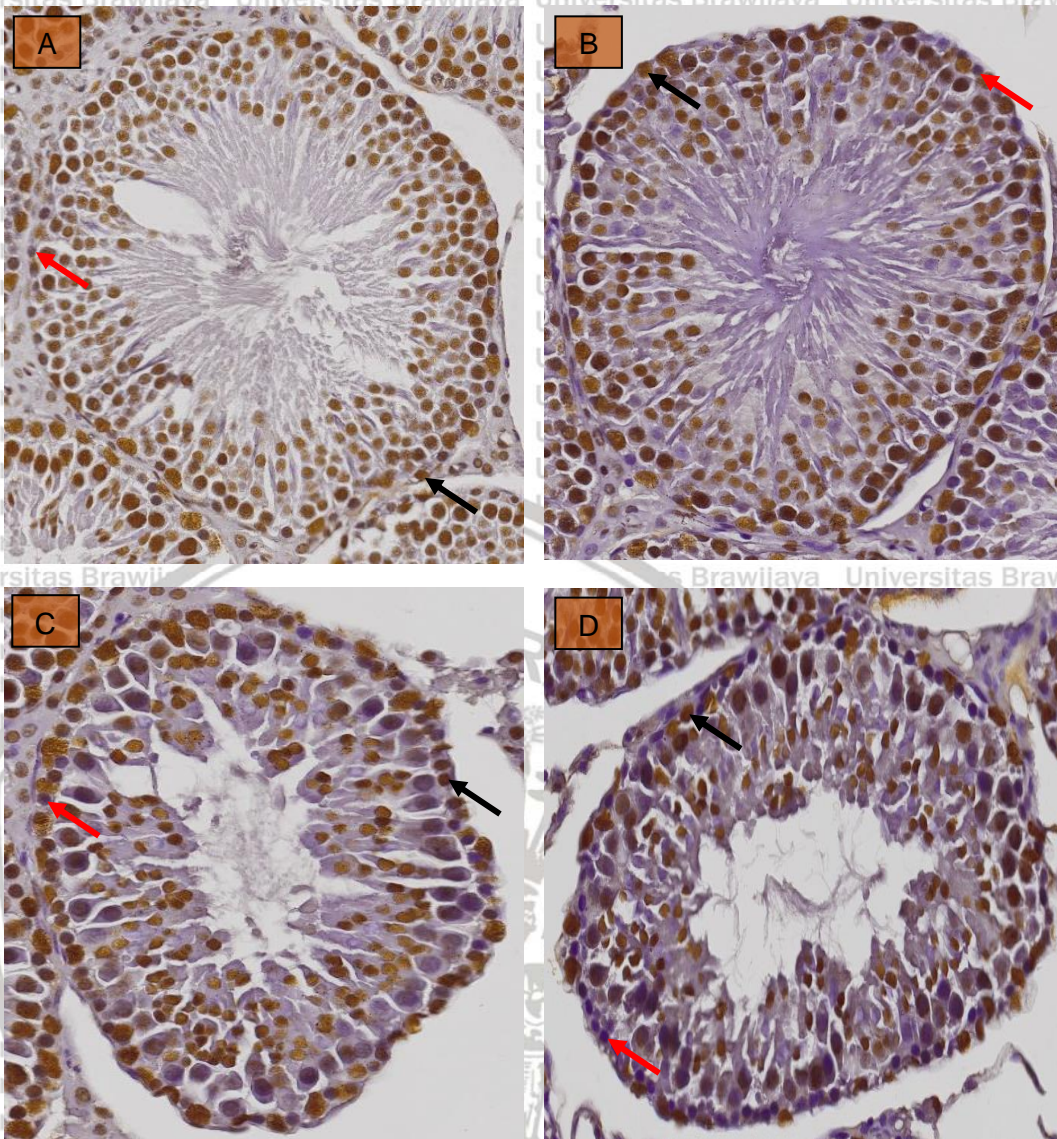
BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Hasil Pengamatan Pengaruh Pemberian Susu Kedelai terhadap Jumlah Sel Spermatogonia yang Mengekspresikan Reseptor Estrogen Alpha pada Tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) Jantan

Gambaran jumlah sel spermatogonia yang mengekspresikan reseptor estrogen alpha dapat dilihat pada Gambar 5.1. Pada gambar ditemukan sel Leydig dan sel Sertoli serta beberapa jenis sel spermatogenik pada tubulus seminiferus, antara lain sel spermatogonia, spermatosit, spermatid dan spermatozoa.





Gambar 5.1 Potongan melintang fotomikrograf testis tikus wistar jantan yang diberikan susu kedelai dengan berbagai dosis menggunakan pewarnaan imunohistokimia. (Perbesaran 400X)

Keterangan: Panah hitam menunjukkan pewarnaan sel spermatogonia ER α positif dengan warna coklat dan panah merah menunjukkan pewarnaan sel spermatogonia ER α negatif dengan warna biru. A : Kelompok kontrol (tanpa perlakuan susu kedelai), B : Perlakuan 1 (diberi susu kedelai dosis 7,1 gr/kgBB/hari), C : Perlakuan 2 (diberi susu kedelai dosis 14,2 gr/kgBB/hari), D : Perlakuan 3 (diberi susu kedelai dosis 21,3 gr/kgBB/hari).

Selanjutnya, dilakukan penghitungan sel spermatogonia yang mengekspresikan ER α (ER α ⁺) dan yang tidak mengekspresikan ER α (ER α ⁻) secara manual. Sel spermatogonia dikatakan mengekspresikan ER α (ER α ⁺) apabila memancarkan warna cokelat pada intinya. Pengamatan sel

spermatogonia ER α pada 10 lapangan pandang secara random. Jumlah sel ER α positif dibandingkan dengan jumlah sel keseluruhan dalam 1 tubulus seminiferus pada satu lapangan pandang dan akan didata dalam bentuk persentase, setelah itu dilakukan analisa statistik pada data hasil.

5.1.1 Hasil Uji Prasyarat Parametrik

Uji prasyarat parametrik dilakukan dengan uji normalitas dan homogenitas. Perhitungan uji normalitas hasil pengamatan jumlah sel spermatogonia yang mengekspresikan reseptor estrogen alpha menggunakan *Shaphiro-Wilk test*, sedangkan untuk uji homogenitas menggunakan *Levene test*.

Uji normalitas dan homogenitas dikatakan memenuhi syarat apabila nilai signifikansi (*p-value*) > 0,05. Hasil uji normalitas data jumlah sel spermatogonia yang mengekspresikan reseptor estrogen alpha dapat dilihat pada Tabel 5.1.

Tabel 5.1 Hasil Uji Normalitas Jumlah Sel Spermatogonia yang Mengekspresikan ER α pada Tikus Wistar Jantan Setelah Diberi Susu Kedelai Berbagai Dosis.

Kelompok Perlakuan	<i>p-value</i>	Distribusi
Kontrol	0,58	Normal
P1 (susu kedelai 7,1 gr/kgBB/hari)	0,48	Normal
P2 (susu kedelai 14,2 gr/kgBB/hari)	0,45	Normal
P3 (susu kedelai 21,3 gr/kgBB/hari)	0,90	Normal

Keterangan: Jika *p-value* <0,05 data tidak terdistribusi normal dan jika *p-value* >0,05 maka data terdistribusi normal.

Berdasarkan uji *Shaphiro-Wilk*, Tabel 5.1 menunjukkan *p-value* data jumlah sel spermatogonia yang mengekspresikan ER α masing-masing kelompok perlakuan >0,05, maka, semua data terdistribusi normal sehingga prasyarat parametrik terpenuhi. Hasil uji data homogen menggunakan *Lavene Statistic* menunjukkan *p-value* = 0,52 (*p*>0,05) pada data jumlah sel spermatogonia yang mengekspresikan reseptor estrogen alpha masing-masing kelompok perlakuan, maka semua data homogen sehingga prasyarat parametrik terpenuhi.

Selanjutnya, data dianalisis lebih lanjut dengan uji statistik parametrik untuk membuktikan hipotesis penelitian yang telah diajukan.

5.1.2 Hasil Uji Beda Antar Kelompok Perlakuan

Perhitungan uji beda dilakukan dengan menggunakan *One Way ANOVA test*, menunjukkan perbedaan yang bermakna dengan nilai $p\text{-value} = 0,000$, ($p > 0,05$) pada rerata jumlah sel spermatogonia yang mengekspresikan reseptor estrogen alpha keempat kelompok perlakuan. Selanjutnya, dilakukan uji perbandingan berganda (*multiple comparison*) dengan *LSD (Least Significant Difference)* untuk mengetahui signifikansi perbedaan antar kelompok perlakuan ditampilkan secara lengkap pada Tabel 5.2.

Tabel 5.2 Hasil Uji Berbeda Berganda Antar Kelompok pada Jumlah Sel Spermatogonia yang Mengekspresikan ER α pada Tikus Wistar Jantan Setelah Diberi Susu Kedelai Berbagai Dosis.

Kelompok Perlakuan	N	Rerata \pm SD	<i>p-value</i> ANOVA
Kontrol	6	58,45 \pm 9,35 ^a	0,000
P1 (susu kedelai 7,1 gr/kgBB/hari)	6	46,12 \pm 6,13 ^b	
P2 (susu kedelai 14,2 gr/kgBB/hari)	6	32,17 \pm 8,84 ^c	
P3 (susu kedelai 21,3 gr/kgBB/hari)	6	22,82 \pm 5,42 ^d	

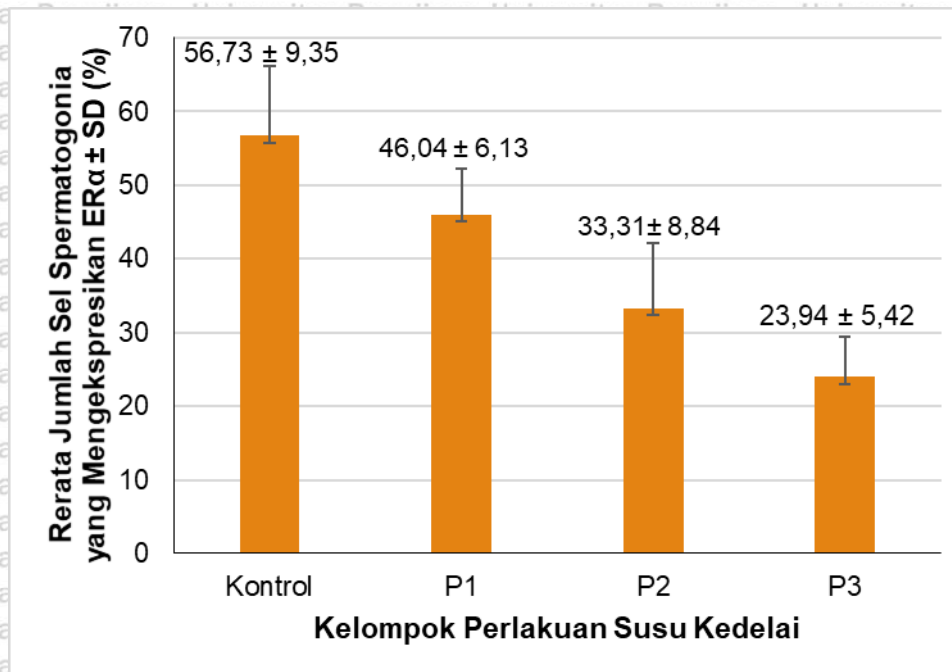
Keterangan: Hasil uji *LSD* ditunjukkan pada kolom rerata \pm SD jika memuat huruf yang berbeda berarti ada perbedaan yang bermakna ($p\text{-value} < 0,05$) dan jika memuat huruf yang sama berarti tidak ada perbedaan yang bermakna ($p\text{-value} > 0,05$)

Berdasarkan Tabel 5.2 hasil uji perbandingan berganda dengan uji *LSD* menunjukkan ada perbedaan yang bermakna pada rerata jumlah sel spermatogonia yang mengekspresikan ER α antar kelompok kontrol (58,45 \pm 9,35^a) dengan kelompok perlakuan yang diberi susu kedelai 7,1 gr/kgBB/hari (46,12 \pm 6,13^b), kelompok perlakuan yang diberi susu kedelai 14,2 gr/kgBB/hari (32,17 \pm 8,84^c), dan kelompok perlakuan yang diberi susu kedelai 21,3 gr/kgBB/hari (22,82 \pm 5,42^d).

Selanjutnya, terdapat perbedaan bermakna rerata jumlah sel spermatogonia yang mengekspresikan ER α pada kelompok perlakuan yang

diberi susu kedelai 7,1 gr/kgBB/hari ($46,12 \pm 6,13^b$) dengan kelompok kontrol ($58,45 \pm 9,35^a$), kelompok perlakuan yang diberi susu kedelai 14,2 gr/kgBB/hari ($32,17 \pm 8,84^c$) dan kelompok perlakuan yang diberi susu kedelai 21,3 gr/kgBB/hari ($22,82 \pm 5,42^d$). Selain itu, rerata jumlah sel spermatogonia yang mengekspresikan ER α pada kelompok perlakuan yang diberi susu kedelai 14,2 gr/kgBB/hari ($32,17 \pm 8,84^c$) berbeda secara bermakna dengan kelompok kontrol ($58,45 \pm 9,35^a$), kelompok perlakuan yang diberi susu kedelai 7,1 gr/kgBB/hari ($46,12 \pm 6,13^b$) dan kelompok perlakuan yang diberi susu kedelai 21,3 gr/kgBB/hari ($22,82 \pm 5,42^d$). Rerata jumlah sel spermatogonia yang mengekspresikan ER α pada kelompok perlakuan yang diberi susu kedelai 21,3 gr/kgBB/hari ($22,82 \pm 5,42^d$) juga terdapat perbedaan bermakna dengan kelompok kontrol ($58,45 \pm 9,35^a$), kelompok perlakuan yang diberi susu kedelai 7,1 gr/kgBB/hari ($46,12 \pm 6,13^b$) dan kelompok perlakuan yang diberi susu kedelai 14,2 gr/kgBB/hari ($32,17 \pm 8,84^c$).

Berdasarkan uraian di atas, dapat diartikan bahwa hipotesis penelitian diterima, yaitu pemberian susu kedelai dengan dosis 7,1; 14,2; dan 21,3 gr/kgBB/hari dapat menurunkan jumlah sel spermatogonia yang mengekspresikan ER α pada tikus jantan secara signifikan. Selanjutnya rerata jumlah sel spermatogonia yang mengekspresikan ER α pada keempat kelompok sampel disajikan secara lengkap tampak pada Gambar 5.2.



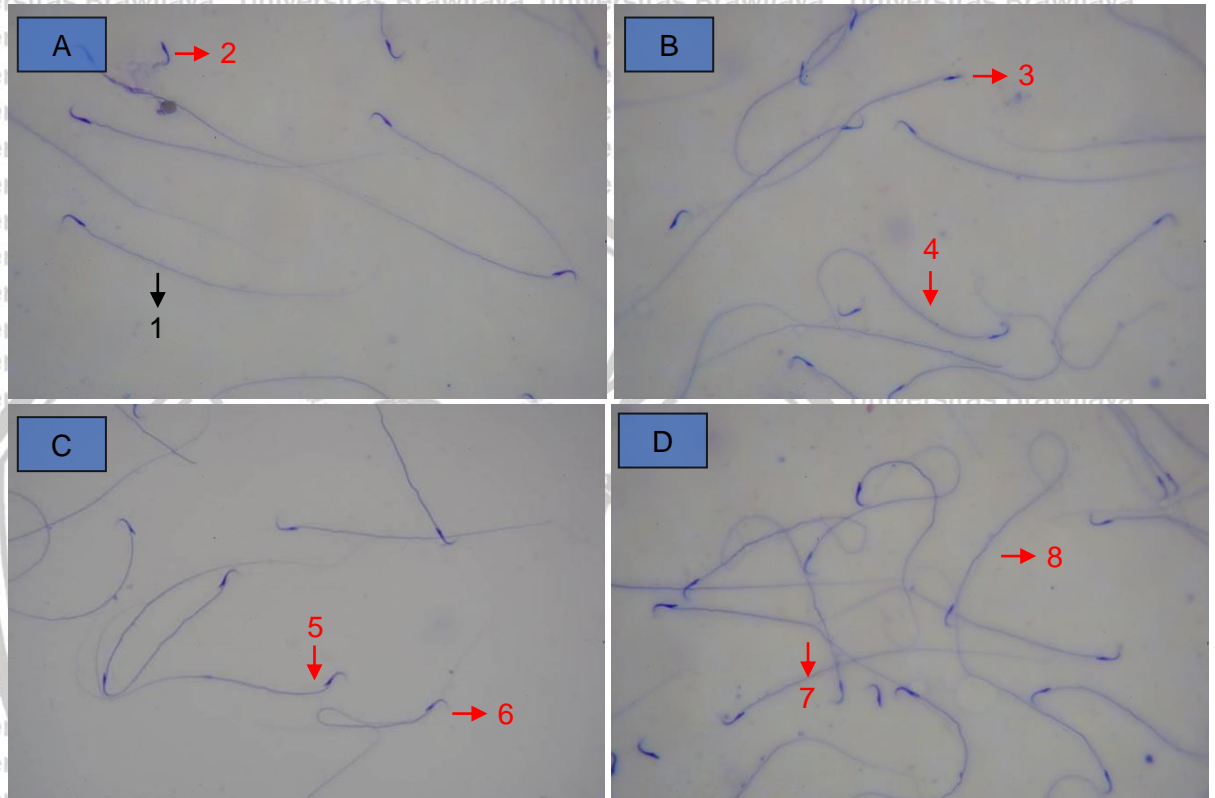
Gambar 5.2 Histogram rerata jumlah sel spermatogonia yang mengekspresikan ERα ± SD pada tikus wistar jantan yang diberikan susu kedelai dengan berbagai dosis.

Keterangan: Rerata jumlah sel spermatogonia yang mengekspresikan ERα pada kelompok kontrol (tanpa perlakuan susu kedelai), P1 : Perlakuan 1 (diberi susu kedelai dosis 7,1 gr/kgBB/hari), P2 : Perlakuan 2 (diberi susu kedelai dosis 14,2 gr/kgBB/hari), P3 : Perlakuan 3 (diberi susu kedelai dosis 21,3 gr/kgBB/hari). SD = standar deviasi.

Selanjutnya, dilakukan uji korelasi untuk mengetahui hubungan keeratan antara dosis susu kedelai dan jumlah sel spermatogonia yang mengekspresikan ERα. Hasil uji korelasi *Pearson* didapatkan nilai koefisien korelasi (KK) = -0,887, dimana menggambarkan hubungan kedua variable yang kuat, dan menunjukkan arah yang negatif. Hal ini berarti bahwa peningkatan konsentrasi susu kedelai akan diikuti dengan penurunan jumlah sel spermatogonia yang mengekspresikan ERα.

5.2 Hasil Pengamatan Pengaruh Pemberian Susu Kedelai terhadap Jumlah Spermatozoa dengan Morfologi Normal pada Tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) Jantan

Gambaran jumlah spermatozoa dengan morfologi normal dapat dilihat pada Gambar 5.3. Pada gambar ditemukan berbagai macam morfologi spermatozoa tiap kelompok perlakuan.



Gambar 5.3 Morfologi spermatozoa normal dan abnormal pada tikus wistar jantan yang diberikan susu kedelai dengan berbagai dosis menggunakan perwarnaan Kristal-Violet. (Perbesaran 400X)

Keterangan: Panah hitam: 1. Spermatozoa dengan morfologi normal; Panah merah: Spermatozoa dengan morfologi abnormal, meliputi: 2. Spermatozoa tanpa ekor; 3. Kepala yang rata; 4. Ekor melengkung; 5. Leher bengkok; 6. Ujung ekor dan kepala bertemu; 7. Ekor bengkok; 8. Ekor melingkar. A: Kelompok kontrol (tanpa perlakuan susu kedelai), B: Perlakuan 1 (diberi susu kedelai dosis 7,1 gr/kgBB/hari), C: Perlakuan 2 (diberi susu kedelai dosis 14,2 gr/kgBB/hari), D: Perlakuan 3 (diberi susu kedelai dosis 21,3 gr/kgBB/hari).

5.2.1 Hasil Uji Prasyarat Parametrik

Uji prasyarat parametrik dilakukan dengan uji normalitas dan homogenitas. Perhitungan uji normalitas hasil pengamatan jumlah spermatozoa dengan morfologi normal menggunakan *Shaphiro-Wilk test*, sedangkan untuk uji

homogenitas menggunakan *Levene test*. Uji normalitas dan homogenitas dikatakan memenuhi syarat apabila nilai signifikansi (*p-value*) > 0,05. Hasil uji normalitas data jumlah spermatozoa dengan morfologi normal dapat dilihat pada

Tabel 5.3.

Tabel 5.3 Hasil Uji Normalitas Jumlah Spermatozoa dengan Morfologi Normal pada Tikus Wistar Jantan Setelah Diberi Susu Kedelai Berbagai Dosis.

Kelompok Perlakuan	<i>p-value</i>	Distribusi
Kontrol	0,77	Normal
P1 (susu kedelai 7,1 gr/kgBB/hari)	0,07	Normal
P2 (susu kedelai 14,2 gr/kgBB/hari)	0,94	Normal
P3 (susu kedelai 21,3 gr/kgBB/hari)	0,47	Normal

Keterangan: Jika *p-value* <0,05 data tidak terdistribusi normal dan jika *p-value* >0,05 maka data terdistribusi normal.

Hasil uji *Shaphiro-Wilk* menunjukkan *p-value* >0,05 data jumlah spermatozoa dengan morfologi normal pada masing-masing kelompok perlakuan, maka semua data terdistribusi normal sehingga prasyarat parametrik terpenuhi (Tabel 5.3). Berdasarkan hasil uji data homogen menggunakan *Lavene Statistic*, menunjukkan *p-value* = 0,62 (*p*>0,05) pada data jumlah spermatozoa dengan morfologi normal pada masing-masing kelompok perlakuan, maka semua data homogen sehingga prasyarat parametrik terpenuhi. Selanjutnya, data dianalisis lebih lanjut dengan uji statistik parametrik untuk membuktikan hipotesis penelitian yang telah diajukan.

5.2.2 Hasil Uji Beda Antar Kelompok Perlakuan

Perhitungan uji beda jumlah spermatozoa dengan morfologi normal menggunakan *One Way ANOVA test*, didapatkan perbedaan yang bermakna dengan nilai *p-value* = 0,003 (*p*<0,05) pada rerata jumlah spermatozoa dengan morfologi normal keempat kelompok perlakuan. Selanjutnya, dilakukan uji perbandingan berganda (*multiple comparison*) dengan *LSD (Least Significant Difference)* untuk mengetahui signifikansi perbedaan antar kelompok perlakuan ditampilkan secara lengkap pada Tabel 5.4.

Tabel 5.4 Hasil Uji Berbeda Berganda Antar Kelompok pada Jumlah Spermatozoa dengan Morfologi Normal pada Tikus Wistar Jantan Setelah Diberi Susu Kedelai Berbagai Dosis.

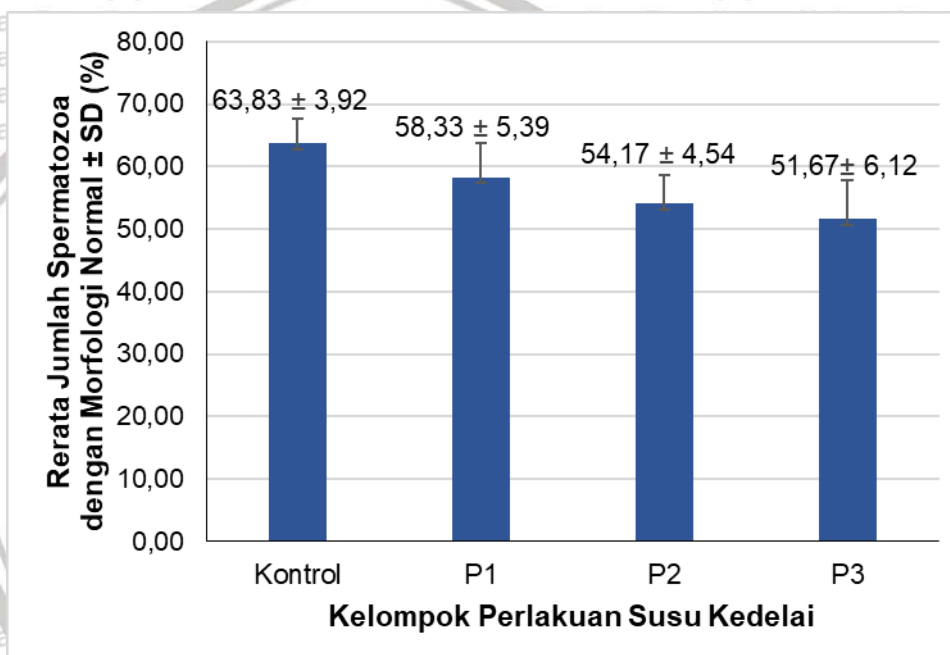
Kelompok Perlakuan	N	Rerata ± SD	p-value ANOVA
Kontrol	6	63,83 ± 3,92 ^a	0,003 < α
P1 (susu kedelai 7,1 gr/kgBB/hari)	6	58,33 ± 5,39 ^{ab}	
P2 (susu kedelai 14,2 gr/kgBB/hari)	6	54,17 ± 4,54 ^{bc}	
P3 (susu kedelai 21,3 gr/kgBB/hari)	6	51,67 ± 6,12 ^c	

Keterangan: Hasil uji *LSD* ditunjukkan pada kolom rerata ± SD jika memuat huruf yang berbeda berarti ada perbedaan yang bermakna ($p\text{-value} < 0,05$) dan jika memuat huruf yang sama berarti tidak ada perbedaan yang bermakna ($p\text{-value} > 0,05$)

Berdasarkan hasil uji perbandingan berganda dengan uji *LSD* pada Tabel 5.4 menunjukkan ada perbedaan yang bermakna pada rerata pada jumlah spermatozoa dengan morfologi normal antar kelompok kontrol ($63,83 \pm 3,92^a$) dengan kelompok perlakuan yang diberi susu kedelai dosis 14,2 gr/kgBB/hari ($54,17 \pm 4,54^{bc}$) dan kelompok perlakuan yang diberi susu kedelai dosis 21,3 gr/kgBB/hari ($51,67 \pm 6,12^c$). Hal ini berarti ada pengaruh perlakuan pemberian susu kedelai dosis 14,2 gr/kgBB/hari dan susu kedelai dosis 21,3 gr/kgBB/hari terhadap jumlah spermatozoa dengan morfologi normal, tetapi tidak ada perbedaan yang bermakna secara statistik antara kedua dosis tersebut.

Selanjutnya tidak ada perbedaan yang bermakna dari rerata pada jumlah spermatozoa dengan morfologi normal antar kelompok kontrol ($63,83 \pm 3,92^a$) dengan kelompok perlakuan yang diberi susu kedelai dosis 7,1 gr/kgBB/hari ($58,33 \pm 5,39^{ab}$). Berdasarkan uraian diatas dapat diartikan bahwa perlakuan pemberian susu kedelai dosis 14,2 gr/kgBB/hari dan pemberian susu kedelai dosis 21,3 gr/kgBB/hari berpengaruh terhadap penurunan jumlah spermatozoa dengan morfologi normal pada tikus jantan. Sehingga hipotesis penelitian terbukti yaitu pemberian susu kedelai dapat menurunkan jumlah spermatozoa dengan morfologi normal pada tikus jantan.

Rerata jumlah spermatozoa dengan morfologi normal pada keempat kelompok perlakuan disajikan secara lengkap tampak pada Gambar 5.4 dibawah ini. Gambar 5.4 menunjukkan histogram rerata jumlah spermatozoa dengan morfologi normal pada kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan tikus jantan yang diberi susu kedelai dosis 7,1 gr/kgBB/hari, dosis 14,2 gr/kgBB/hari dan dosis 21,3 gr/kgBB/hari. Tampak adanya penurunan rerata jumlah spermatozoa dengan morfologi normal dengan pertambahan dosis susu kedelai yang diberikan.



Gambar 5.4 Histogram rerata jumlah spermatozoa dengan morfologi normal ± SD tikus jantan.

Keterangan: Rerata jumlah spermatozoa dengan morfologi normal pada kelompok kontrol (tanpa perlakuan susu kedelai), P1 : Perlakuan 1 (diberi susu kedelai dosis 7,1 gr/kgBB/hari), P2 : Perlakuan 2 (diberi susu kedelai dosis 14,2 gr/kgBB/hari), P3 : Perlakuan 3 (diberi susu kedelai dosis 21,3 gr/kgBB/hari). SD = standar deviasi.

5.3 Hasil Pengamatan Pengaruh Pemberian Susu Kedelai terhadap Jumlah Spermatozoa dengan Pergerakan Normal pada Tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) Jantan

Pengamatan pada jumlah spermatozoa dengan pergerakan normal diklasifikasikan sesuai dengan pergerakannya. Pada penelitian ini menggunakan persentase kelompok spermatozoa dengan pergerakan kategori motilitas A (pergerakan progresif) sebagai analisa data. Gambaran pergerakan spermatozoa berdasarkan klasifikasinya pada tiap-tiap kelompok perlakuan dapat dilihat pada

Tabel 5.5.

Tabel 5.5 Pergerakan Spermatozoa Berdasarkan Klasifikasinya pada Tikus Wistar Jantan Setelah Diberi Susu Kedelai Berbagai Dosis.

Kelompok Perlakuan	Pergerakan Spermatozoa (%)		
	A	B	C
Kontrol	65,50	21,67	12,83
Perlakuan 1 (susu kedelai 7,1 gr/kgBB/hari)	57,67	25,83	16,50
Perlakuan 2 (susu kedelai 14,2 gr/kgBB/hari)	54,50	27,17	18,33
Perlakuan 3 (susu kedelai 21,3 gr/kgBB/hari)	47,33	27,67	25,00

5.3.1 Hasil Uji Prasyarat Parametrik

Uji prasyarat parametrik dilakukan dengan uji normalitas dan homogenitas. Perhitungan uji normalitas hasil pengamatan jumlah spermatozoa dengan pergerakan normal menggunakan *Shaphiro-Wilk test*, sedangkan untuk uji homogenitas menggunakan *Levene test*. Uji normalitas dan homogenitas dikatakan memenuhi syarat apabila nilai signifikansi (*p-value*) > 0,05. Hasil uji normalitas data jumlah spermatozoa dengan pergerakan normal dapat dilihat pada Tabel 5.6.

Tabel 5.6 Hasil Uji Normalitas Jumlah Spermatozoa dengan Pergerakan Normal pada Tikus Wistar Jantan Setelah Diberi Susu Kedelai Berbagai Dosis.

Kelompok Perlakuan	<i>p-value</i>	Distribusi
Kontrol	0,95	Normal
P1 (susu kedelai 7,1 gr/kgBB/hari)	0,09	Normal
P2 (susu kedelai 14,2 gr/kgBB/hari)	0,70	Normal
P3 (susu kedelai 21,3 gr/kgBB/hari)	0,64	Normal

Keterangan: Jika *p-value* <0,05 data tidak terdistribusi normal dan jika *p-value* >0,05 maka data terdistribusi normal.

Berdasarkan hasil uji *Shaphiro-Wilk* menunjukkan *p-value* >0,05 data jumlah spermatozoa dengan pergerakan normal pada masing-masing kelompok perlakuan, maka semua data terdistribusi normal sehingga prasyarat parametrik terpenuhi (Tabel 5.6). Hasil uji data homogen menggunakan *Lavene Statistic*, menunjukkan *p-value* = 0,75 (*p*>0,05) pada data jumlah spermatozoa dengan pergerakan normal pada masing-masing kelompok perlakuan >0.05, maka, semua data homogen sehingga prasyarat parametrik terpenuhi. Selanjutnya, data dianalisis lebih lanjut dengan uji statistik parametrik untuk membuktikan hipotesis penelitian yang telah diajukan.

5.3.2 Hasil Uji Beda Antar Kelompok Perlakuan

Perhitungan uji beda jumlah spermatozoa dengan pergerakan normal menggunakan *One Way ANOVA test*, data dikatakan berbeda signifikan apabila didapatkan nilai signifikansi (*p-value*) kurang dari 0,05. Hasil uji ANOVA data jumlah spermatozoa dengan pergerakan normal dapat dilihat pada Tabel 5.8.

Berdasarkan hasil uji *One Way Annova* pada data jumlah spermatozoa dengan pergerakan normal diperoleh perbedaan yang bermakna dengan nilai *p-value* = 0,008 (*p*<0,05) pada dari rerata jumlah spermatozoa dengan pergerakan normal keempat kelompok pengamatan. Selanjutnya pada uji perbandingan berganda (*Multiple Comparisons*) dengan uji *LSD* yang ditampilkan secara lengkap pada tabel dibawah ini.

Tabel 5.7 Hasil Uji Berbeda Berganda Antar Kelompok pada Jumlah Spermatozoa dengan Pergerakan Normal pada Tikus Wistar Jantan Setelah Diberi Susu Kedelai Berbagai Dosis.

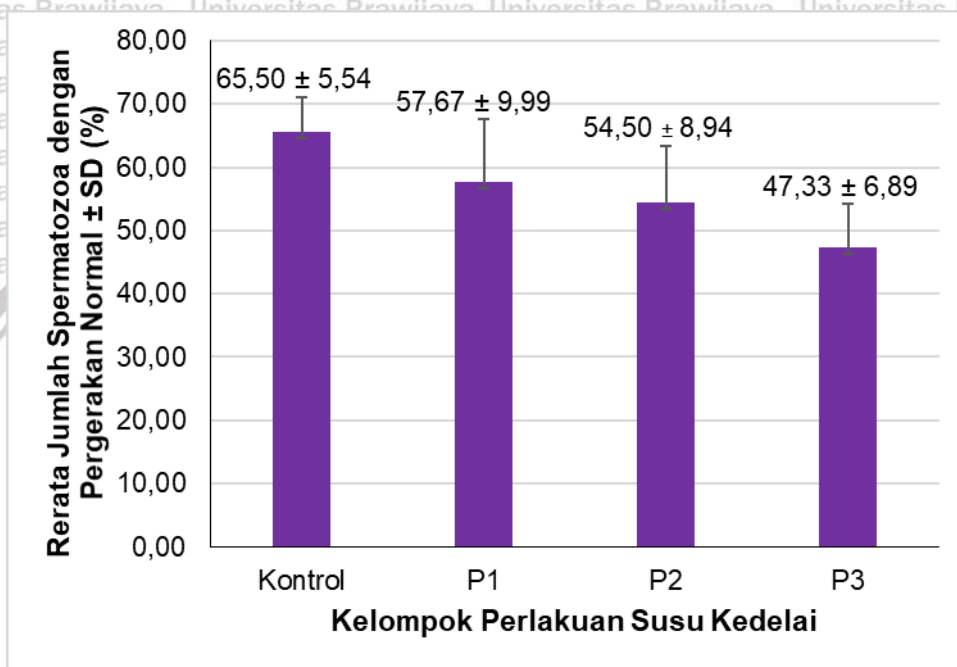
Kelompok Perlakuan	N	Rerata ± SD	p-value ANOVA
Kontrol	6	65,50 ± 5,54 ^a	0,008 < α
P1 (susu kedelai 7,1 gr/kgBB/hari)	6	57,67 ± 9,99 ^{ab}	
P2 (susu kedelai 14,2 gr/kgBB/hari)	6	54,50 ± 8,94 ^{bc}	
P3 (susu kedelai 21,3 gr/kgBB/hari)	6	47,33 ± 6,89 ^c	

Keterangan: Hasil uji *LSD* ditunjukkan pada kolom rerata ± SD jika memuat huruf yang berbeda berarti ada perbedaan yang bermakna ($p\text{-value} < 0,05$) dan jika memuat huruf yang sama berarti tidak ada perbedaan yang bermakna ($p\text{-value} > 0,05$).

Hasil uji perbandingan berganda dengan uji *LSD* menunjukkan ada perbedaan yang bermakna pada rerata pada jumlah spermatozoa dengan pergerakan normal antar kelompok kontrol ($65,50 \pm 5,54^a$) dengan kelompok perlakuan yang diberi susu kedelai dosis 14,2 gr/kgBB/hari ($54,50 \pm 8,94^{bc}$) dan kelompok perlakuan yang diberi susu kedelai dosis 21,3 gr/kgBB/hari ($47,33 \pm 6,89^c$). Hal ini berarti ada pengaruh perlakuan pemberian susu kedelai dosis 14,2 gr/kgBB/hari dan susu kedelai dosis 21,3 gr/kgBB/hari terhadap jumlah spermatozoa dengan pergerakan normal, tetapi tidak ada perbedaan yang bermakna secara statistik antara kedua dosis tersebut.

Selanjutnya tidak ada perbedaan yang bermakna dari rerata pada jumlah spermatozoa dengan pergerakan normal antar kelompok kontrol ($65,50 \pm 5,54^a$) dengan kelompok perlakuan yang diberi susu kedelai dosis 7,1 gr/kgBB/hari ($57,67 \pm 9,99^{ab}$). Berdasarkan uraian diatas dapat diartikan bahwa perlakuan pemberian susu kedelai dosis 14,2 gr/kgBB/hari dan pemberian susu kedelai dosis 21,3 gr/kgBB/hari berpengaruh terhadap penurunan jumlah spermatozoa dengan pergerakan normal pada tikus jantan. Sehingga hipotesis penelitian terbukti yaitu pemberian susu kedelai dapat menurunkan jumlah spermatozoa dengan pergerakan normal pada tikus jantan.

Gambar 5.5 menunjukkan histogram rerata jumlah spermatozoa dengan morfologi normal pada kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan tikus jantan yang diberi susu kedelai dosis 7,1 gr/kgBB/hari, dosis 14,2 gr/kgBB/hari dan dosis 21,3 gr/kgBB/hari. Tampak ada penurunan rerata jumlah spermatozoa dengan pergerakan normal dengan pertambahan dosis susu kedelai yang diberikan.



Gambar 5.5 Histogram rerata jumlah spermatozoa dengan pergerakan normal ± SD tikus jantan.

Keterangan: Rerata jumlah spermatozoa dengan pergerakan normal pada kelompok kontrol (tanpa perlakuan susu kedelai), P1 : Perlakuan 1 (diberi susu kedelai dosis 7,1 gr/kgBB/hari), P2 : Perlakuan 2 (diberi susu kedelai dosis 14,2 gr/kgBB/hari), P3 : Perlakuan 3 (diberi susu kedelai dosis 21,3 gr/kgBB/hari). SD = standar deviasi.

BAB 6

PEMBAHASAN

6.1 Pengaruh Pemberian Susu Kedelai terhadap Jumlah Sel Spermatozoa yang Mengekspresikan Reseptor Estrogen Alpha pada Tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) Jantan

Susu kedelai mengandung fitoestrogen dan dapat mengganggu sistem endokrin atau disebut dengan *endocrine disrupting chemicals* (EDCs) (Shibayama *et al.*, 2001). Isoflavon merupakan fitoestrogen yang struktur kimianya mirip dengan estrogen sehingga dapat berikatan dengan reseptor estrogen (Dinsdale and Ward, 2010; Dinastiti *et al.*, 2019). Isoflavon dapat berperilaku sebagai antagonis estrogenik (dengan adanya estrogen endogen), sedangkan dengan tidak adanya estrogen mereka berperilaku sebagai agonis lemah (Retana-Márquez *et al.*, 2012).

Reseptor estrogen, setelah berikatan dengan ligan, dapat berpindah dari sitoplasma ke nukleus, mengikat dan mempengaruhi daerah kontrol transkripsi DNA atau RNA, sehingga dapat mempengaruhi ekspresi gen tertentu. Steroid juga mampu mengikat reseptor permukaan sel, mendorong pembentukan nukleotida siklik sitoplasma dan protein kinase terkait, yang mengontrol ekspresi gen target melalui faktor transkripsi (Sirotkin dan Harrath, 2014).

ER terletak di sel somatik maupun sel germinal pada testis di berbagai spesies termasuk manusia dan tikus. Berbeda dengan reseptor androgen (AR) yang hanya terletak di sel somatik (Carreau *et al.*, 2011). Lokasi ER yang terletak di dalam testis menunjukkan peran estrogen dalam regulasi proses spermatogenesis meliputi proliferasi, apoptosis maupun pematangan (An *et al.*, 2018) dan berhubungan dengan infertilitas pria (Li *et al.*, 2014).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa jumlah sel spermatogonia yang mengekspresikan ER α antar kelompok pada tikus jantan setelah diberikan susu kedelai dengan dosis 7,1; 14,2; dan 21,3 gr/kgBB/hari memperlihatkan adanya penurunan secara signifikan. Estrogen, dan reseptor utamanya (ER α) memiliki peran penting dalam regulasi spermatogenesis dan berhubungan dengan infertilitas pria (Chieffi *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2014). Estradiol merangsang mitosis pada spermatogonia melalui ER α dengan mengaktifkan jalur EGFR/ERK/fos/cyclin D1 yang bertanggung jawab dalam proliferasi sel spermatogonia (Sirianni *et al.*, 2008; Kumar dan Sharma, 2017). Penurunan proliferasi sel spermatogonia menyebabkan penurunan rasio sel germinal atau sel Sertoli, penurunan spermatogenesis, sehingga menyebabkan infertilitas pada jantan (Liberal *et al.*, 2010).

Fitoestrogen memiliki afinitas yang lebih rendah daripada estradiol untuk mengikat ER, dan kebanyakan dari mereka menunjukkan afinitas yang lebih tinggi untuk ER β daripada ER α sekitar 30 kali lipat (Retana-Márquez *et al.*, 2012). Isoflavon secara invitro berkompetisi dengan estradiol dalam berinteraksi dengan ER. Tetapi secara in vivo, isoflavon diketahui mempunyai afinitas terhadap ER β lebih besar daripada ER α . Itulah sebabnya isoflavon dapat memberikan efek antiproliferasi melalui ikatannya dengan ER β . Besarnya afinitas masing-masing jenis isoflavon terhadap ER β juga bervariasi. Genisterin mempunyai afinitas 10 kali lebih besar terhadap ER β dibandingkan daidzein (Safithri *et al.*, 2010).

Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Glover dan Assinder (2006) dimana pemberian fitoestrogen pada tikus jantan menyebabkan perubahan pada reseptor androgen (AR) dan reseptor estrogen (ER). Ekspresi AR dan ER α pada cauda epididimis tikus mengalami penurunan setelah diberikan perlakuan fitoestrogen selama 25 hari. Sama halnya dengan

hasil penelitian yang dilakukan oleh Zin *et al.* (2013) bahwa pemberian fitoestrogen dalam perkembangan sistem reproduksi tikus dapat menurunkan ER α .

Isoflavon kedelai merupakan salah satu dari fitoestrogen yang terdiri atas tiga senyawa yaitu genistein, daidzein, dan glisitein dengan perbandingan 1:1:0,2 (Dafriani, 2015). Pemberian genistein selama 12 minggu menyebabkan penurunan ekspresi AR and ER α pada testis. Ekspresi AR dan ER α merupakan salah satu penanda biologis untuk memperediksi efek paparan terhadap senyawa ekstrogenik eksogen pada tikus (Adachi *et al.*, 2004). Kelompok tikus jantan dengan diet isoflavon menyebabkan adanya perubahan ekspresi LHR, AR, dan ESR1 (Sherrill *et al.*, 2010). Gangguan yang terjadi pada ESR1 menyebabkan gangguan fertilitas. Pada tikus model *knockout* ER α menyebabkan tikus mengalami infertil (Kolasa *et al.*, 2003). Sehingga ER α merupakan kandidat yang penting dalam fertilitas khususnya jantan (Gunawan *et al.*, 2011).

6.2 Pengaruh Pemberian Susu Kedelai terhadap Jumlah Spermatozoa dengan Morfologi Normal pada Tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) Jantan

Spermatozoa merupakan hasil dari proses spermatogenesis, sehingga dengan menganalisis kuantitas dan kualitas spermatozoa dapat mencerminkan proses-proses yang terjadi selama pembentukannya, termasuk melakukan diagnosis apabila terjadi kerusakan atau kelainan pada morfologi spermatozoa. (Fitria *et al.*, 2015). Konsumsi makanan dengan bahan kedelai kaya isoflavon dapat terjadi gangguan aktivitas hormon dalam tubuh dan proses spermatogenesis, yang dapat menyebabkan penurunan jumlah spermatozoa (An *et al.*, 2018).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian susu kedelai dapat menurunkan jumlah spermatozoa dengan morfologi normal pada tikus jantan

secara signifikan yang ditunjukkan dengan adanya perbedaan yang bermakna pada jumlah spermatozoa dengan morfologi normal antar kelompok setelah diberikan susu kedelai dengan dosis 7,1; 14,2; dan 21,3 gr/kgBB/hari. Penurunan jumlah spermatozoa dengan morfologi normal salah satunya dapat disebabkan karena adanya gangguan pada proses spermatogenesis akibat dari kandungan isoflavon yang terdapat pada susu kedelai. Sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Nurdiana *et al.* (2015) dimana pemberian susu kedelai memberikan efek penurunan spermatogenesis pada tikus jantan.

Adanya penurunan jumlah spermatozoa dengan morfologi normal menunjukkan bahwa telah terjadi gangguan pada proses spermatogenesis terutama pada tahap spermiogenesis (Sinaga, 2016). Spermatogenesis merupakan proses perkembangan yang kompleks dimana melibatkan perubahan bentuk sel germinal progenitor diploid menjadi spermatozoa matur yang terjadi di tubulus seminiferus yang terletak pada testis (Susilawati, 2011; Keber *et al.*, 2013).

Proses spermatogenesis dimulai ketika spermatogonia mengalami proliferasi dan diferensiasi melalui mitosis menjadi spermatosit primer, yang selanjutnya diikuti oleh meiosis yang menghasilkan *round* spermatid haploid. Selanjutnya *round* spermatid mengalami perubahan morfologi yang dramatis hingga menjadi spermatozoa yang matur (Wang *et al.*, 2012; Akmal *et al.*, 2015).

Berkurangnya persentase spermatozoa dengan morfologi normal dapat disebabkan karena proses spermatogenesis yang tidak dapat berjalan optimal, yaitu gangguan pada tahap pembelahan sel-sel spermatogonia sebelum terbentuknya kepala, leher dan ekor. Sehingga pembentukan morfologi yang normal akan mengalami gangguan (Ermiza, 2012). Gangguan pada proses spermatogenesis menyebabkan kerusakan pada hasil sel spermatogenic sehingga mengakibatkan kelainan pembentukan spermatozoa, seperti kepala

spermatozoa menjadi lebih kecil atau lebih besar dari biasanya, ekor bengkok atau patah, dan lain-lain (Antari *et al.*, 2016).

Proses spermatogenesis ini sangat sensitif terhadap segala gangguan terutama pada gangguan hormonal, seperti pada penurunan kadar testosteron (Malini, 2013). Hasil penelitian yang dilakukan oleh Margo *et al.* (2019) bahwa tikus jantan yang diberi susu kedelai menyebabkan penurunan kadar hormon testosteron, penurunan berat testis, penurunan diameter tubulus seminiferous serta penurunan spermatogenesis. Hormon testosteron sangat diperlukan untuk mengawali dan mempertahankan proses spermatogenesis, serta mempertahankan kualitas spermatozoa hingga dikeluarkan dari tubuh. Akan tetapi, selain hormon testosteron, ER α juga memiliki peranan penting dalam proses spermatogenesis.

Tikus dengan model *knockout* ER α (KOER α) menyebabkan infertil dan menunjukkan terjadinya dismorfogenesis pada tubulus seminiferus. Perubahan ini menyebabkan penurunan spermatogenesis (Aquila *et al.*, 2003; Carreau dan Hess, 2010). ER juga berperan penting dalam kualitas spermatozoa. Hasil penelitian sebelumnya dengan menggunakan hewan coba model *knockout* ER β tidak menunjukkan perubahan kualitas spermatozoa, sehingga peran ER α lebih menonjol dibandingkan ER β pada tingkat spermatozoa (Adibnia *et al.*, 2016). ER α memainkan peran penting dalam modulasi metabolisme spermatozoa, apabila terjadi gangguan pada fungsinya dapat menyebabkan penurunan persentase densitas spermatozoa, motilitas spermatozoa serta spermatozoa dengan morfologi normal (Abhari *et al.*, 2014).

6.3 Pengaruh Pemberian Susu Kedelai terhadap Jumlah Spermatozoa dengan Pergerakan Normal Pada Tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) Jantan

Pergerakan spermatozoa berasal dari gerakan ekor spermatozoa dan sangat berhubungan erat dengan viabilitas dan morfologi normal spermatozoa.

Hal ini disebabkan karena hanya spermatozoa yang hidup yang dapat menghasilkan energi sehingga dapat terus bergerak. (Adriani dan Nita, 2015).

Penurunan pergerakan spermatozoa juga berkaitan erat dengan meningkatnya persentase spermatozoa dengan morfologi abnormal, hal ini dapat dilihat pada

Gambar 5.4 yang menunjukkan berkurangnya persentase spermatozoa dengan morfologi normal seiring dengan peningkatan dosis susu kedelai yang diberikan.

Morfologi spermatozoa yang abnormal atau mengalami kelainan, akan menghambat pergerakan spermatozoa, melemahkan pergerakan spermatozoa menjadi lemah, bergerak ditempat, berputar-putar atau bergerak mundur (Malini, 2013).

Penghitungan jumlah spermatozoa dengan pergerakan normal antar kelompok setelah diberikan susu kedelai dengan dosis 7,1; 14,2; dan 21,3 gr/kgBB/hari memperlihatkan penurunan jumlah spermatozoa dengan pergerakan normal pada tikus jantan secara signifikan. Berdasarkan hasil penelitian, penurunan pergerakan spermatozoa disebabkan adanya pengaruh gangguan pada proses spermatogenesis akibat isoflavon yang terkandung dalam ekstrak kedelai. Pergerakan (motilitas) spermatozoa sangat penting karena berhubungan dengan kemampuan spermatozoa dalam melakukan proses fertilisasi (Adriani dan Nita, 2015).

Pergerakan spermatozoa akan dapat terjadi jika didukung dengan morfologi dari spermatozoa itu sendiri. Bagian ekor spermatozoa merupakan bagian terpenting dari spermatozoa untuk dapat melakukan pergerakan, terdiri atas dua bagian yaitu bagian pangkal dan bagian ujung. Pada bagian pangkal

ekor spermatozoa terdapat mitokondria yang bentuknya memanjang, dan tersusun rapi berbentuk spiral yang berfungsi penting dalam metabolisme spermatozoa untuk menghasilkan energi berupa Adenosin Tri Phosphat (ATP) (Gundogan *et al.*, 2010; Adriani dan Nita, 2015). Pergerakan spermatozoa menggunakan energi yang dihasilkan oleh mitokondria, yang akan menghasilkan energi melalui proses dimana pergerakan hidrolisis ATP terjadi dengan mengubah energi kimia menjadi energi kinetik melalui enzim ATP-ase (Antari *et al.*, 2016).

Pemberian susu kedelai menyebabkan penurunan proses spermatogenesis, yang pada akhirnya menurunkan kualitas spermatozoa. Pada spermatozoa yang belum mengalami kematangan sempurna maka energi yang dihasilkan akan lebih sedikit, sehingga pergerakan spermatozoa tersebut menjadi kurang baik (Adriani dan Nita, 2015; Nurdiana *et al.*, 2015; Sinaga, 2016).

Gangguan pada proses spermatogenesis akan menyebabkan penurunan pergerakan spermatozoa. Penurunan pergerakan spermatozoa diduga disebabkan oleh senyawa flavonoid yang dapat mengganggu aktifitas enzim ATP-ase pada membran sel spermatozoa dibagian tengah ekor. Enzim ATP-ase tersebut berfungsi mempertahankan homeostasis internal untuk ion natrium dan kalium. Jika aktivitas enzim ATP-ase terganggu, maka homeostasis ion natrium dan kalium akan terganggu sehingga konsentrasi Na intrasel meningkat, gradien Na⁺ melintasi membran sel akan menurun sehingga pengeluaran Ca juga akan mengalami penurunan. Apabila ion Ca²⁺ berkurang maka membran akan kehilangan kemampuannya untuk mengangkut bahan-bahan terlarut ke dalam sitoplasma. Terganggunya permeabilitas membran spermatozoa akan menyebabkan terganggunya transpor nutrisi yang diperlukan oleh spermatozoa untuk pergerakannya (Malini, 2013; Carolin *et al.*, 2019).

ER juga berperan penting dalam kualitas spermatozoa. Hasil penelitian sebelumnya dengan menggunakan hewan coba model knockout ER β tidak menunjukkan perubahan kualitas spermatozoa, sehingga peran ER α lebih menonjol dibandingkan ER β pada tingkat spermatozoa (Adibnia *et al.*, 2016). ER α memainkan peran penting dalam modulasi metabolisme spermatozoa, apabila terjadi gangguan pada fungsinya dapat menyebabkan penurunan persentase densitas spermatozoa, motilitas spermatozoa serta spermatozoa dengan morfologi normal (Abhari *et al.*, 2014).

Berdasarkan hasil penelitian ini, pemberian susu kedelai dapat menurunkan ekspresi ER α . Penghambatan pada ER α menyebabkan penurunan pergerakan spermatozoa sehingga menurunkan fertilitas pada mencit dan tikus (Zhao *et al.*, 2020). Lokalisasi ER α yang ditemukan di seluruh spermatozoon terutama pada bagian tengah (*midpiece*) dan terlokalisasi di dalam mitokondria yang mana menyediakan energi (ATP) yang dibutuhkan untuk pergerakan spermatozoa (Carreau *et al.*, 2010; Nudmamud-Thanoi *et al.*, 2016).

6.4 Keterbatasan Penelitian

6.4.1 Penelitian ini menggunakan susu kedelai yang sudah beredar dikalangan masyarakat dengan kandungan isoflavon yang sudah diketahui, tanpa melakukan uji fitokimia untuk mengetahui kandungan jenis isoflavon yang ada pada susu kedelai.

6.4.2 Pengamatan kualitas spermatozoa pada penelitian ini hanya menggunakan parameter jumlah spermatozoa dengan morfologi dan pergerakan normal, tanpa melakukan pemeriksaan viabilitas spermatozoa yaitu melihat apakah spermatozoa tersebut masih hidup ataupun sudah mati.

6.5 Implementasi dalam Asuhan Kebidanan

Penelitian ini menunjukkan pemberian susu kedelai menyebabkan terjadinya gangguan pada sistem reproduksi sehingga dapat terjadi penurunan jumlah sel spermatogonia yang mengekspresikan reseptor estrogen alpha, penurunan jumlah spermatozoa dengan morfologi dan pergerakan normal, sehingga berakibat pada menurunnya fertilitas. Pada penelitian ini pemberian susu kedelai dosis 7,1 gr/KgBB/hari, dosis 14,2 gr/KgBB/hari dan dosis 21,3 gr/KgBB/hari mampu menurunkan jumlah sel spermatogonia yang mengekspresikan reseptor estrogen alpha, dan pemberian susu kedelai dosis 14,2 gr/KgBB/hari dan dosis 21,3 gr/KgBB/hari mampu menurunkan jumlah spermatozoa dengan morfologi dan pergerakan normal pada tikus wistar (*Rattus norvegicus*) jantan. Penelitian lanjutan masih sangat diperlukan untuk dapat diterapkan kepada manusia.

Implementasi hasil penelitian ini terhadap dunia kebidanan bahwa pengaruh pemberian susu kedelai yang mengandung isoflavon terutama pada laki-laki akan mengganggu sistem reproduksi sehingga dapat menurunkan jumlah sel spermatogonia yang mengekspresikan reseptor estrogen alpha, jumlah spermatozoa dengan morfologi dan pergerakan normal. Orang tua yang memiliki bayi atau anak yang mengalami alergi susu sapi seringkali menggunakan susu kedelai sebagai susu pengganti. Sehingga perlu adanya pemberian informasi kebidanan kepada masyarakat untuk berhati-hati dan menyarankan untuk memilih susu kedelai yang kandungan isoflavonnya sudah dihilangkan. Selain itu, isoflavon yang ada pada susu kedelai dapat menyebabkan gangguan kesuburan karena kondisi spermatozoa yang kurang baik atau mengalami kelainan sehingga dapat menyebabkan spermatozoa gagal untuk membuahi sel telur. Oleh karena itu perlu adanya pemberian informasi kebidanan berdasarkan bukti penelitian terkini sebagai upaya dalam

meningkatkan kesehatan reproduksi pasangan usia subur khususnya pada pria dengan memberikan informasi mengenai bahaya susu kedelai bagi kesehatan reproduksi.



BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

1. Susu kedelai mampu menurunkan jumlah sel spermatogonia yang mengekspresikan reseptor estrogen alpha pada tikus wistar (*Rattus norvegicus*) jantan
2. Susu kedelai mampu menurunkan jumlah spermatozoa dengan morfologi normal pada tikus wistar (*Rattus norvegicus*) jantan
3. Susu kedelai mampu menurunkan jumlah spermatozoa dengan pergerakan normal pada tikus wistar (*Rattus norvegicus*) jantan

7.2 Saran

1. Penelitian selanjutnya disarankan dilakukan uji fitokimia untuk mengetahui jenis isoflavon yang ada pada susu kedelai.
2. Penelitian selanjutnya disarankan untuk melengkapi pemeriksaan kualitas spermatozoa dengan menambahkan pemeriksaan viabilitas spermatozoa.
3. Penelitian selanjutnya disarankan untuk dilakukan pengukuran ekspresi atau aktivitas pada enzim ATP-ase yang berpengaruh terhadap pergerakan spermatozoa.

DAFTAR PUSTAKA

Abbasi, M., Alizadeh, R., Abolhassani, F., Amidi, F., Hassanzadeh, G., Ejtemaei Mehr, S. and Dehpour, A.R. (2011), "Aminoguanidine improves epididymal sperm parameters in varicocele rats", *Urologia Internationalis*, Vol. 86 No. 3, pp. 302–306.

Abhari, A., Zarghami, N., Shahnazi, V. and Nouri, M. (2014), "The survey of microRNA-196, microRNA-99a and estrogen receptor alpha expression levels in oligospermic infertile men", *Journal of Society for Development in New Net Environment in B&H*, Vol. 8 No. 1, pp. 35–41.

Adachi, T., Ono, Y., Koh, K.-B., Takashima, K., Tainaka, H., Matsuno, Y., Nakagawa, S., *et al.* (2004), "Long-term alteration of gene expression without morphological change in testis after neonatal exposure to genistein in mice: toxicogenomic analysis using cDNA microarray", *Food and Chemical Toxicology*, Elsevier, Vol. 42 No. 3, pp. 445–452.

Aadibnia, E., Razi, M. and Malekinejad, H. (2016), "Zearalenone and 17 β -estradiol induced damages in male rats reproduction potential; evidence for ER α and ER β receptors expression and steroidogenesis", *Toxicol*, Elsevier Ltd, Vol. 120, pp. 133–146.

Adriani and Nita, S. (2015), "Pengaruh Pemberian Ekstrak Kedelai (*Glycine max*) Terhadap Kuantitas dan Kualitas Spermatozoa Tikus Putih Jantung (*Rattus norvegicus*) Strain Sprague Dawley", *Jurnal Kedokteran YARSI*, Vol. 23 No. 1, pp. 12–27.

Agarwal, A., Mulgund, A., Hamada, A. and Chyatte, M.R. (2015), "A unique view on male infertility around the globe", *Reproductive Biology and Endocrinology*, Vol. 13 No. 1, pp. 1–9.

Agustinus, R. I. and M. D., P. (2018), *BIOLOGI REPRODUKSI PRIA*, Airlangga University Press, Surabaya, available at: <http://library1.nida.ac.th/termpaper6/sd/2554/19755.pdf>.

Akbar, B. (2013), "Tumbuhan dengan kandungan senyawa aktif yang berpotensi sebagai bahan antifertilitas".

Akmal, M., Masyitah, D., Hafizuddin and Fitriani. (2015), "EPIDIDIMIS DAN PERANNYA PADA PEMATANGAN SPERMATOZOA", *Jesbio*, Vol. IV No. 2, pp. 1–9.

Allan, C.M., Couse, J.F., Simanainen, U., Spaliviero, J., Jimenez, M., Rodriguez, K., Korach, K.S., *et al.* (2010), "Estradiol induction of spermatogenesis is mediated via an estrogen receptor- α mechanism involving neuroendocrine activation of follicle-stimulating hormone secretion", *Endocrinology*, Vol. 151 No. 6, pp. 2800–2810.

An, E.S., Park, D., Ban, Y.H., Choi, J., Seo, D.W., Lee, Y.B., Shon, M.Y., *et al.* (2018), "Effects of a soybean milk product on fetoneonatal development in rats", *Journal of Biomedical Research*, Vol. 32 No. 1, pp. 51–57.

Antari, N.W.S., Hayati, A. and Winarni, D. (2016), "PROVISION OF ARAK BALI REDUCES SPERMATOZOA QUALITY OF WHITE RATS (*Rattus norvegicus*)", *Folia Medica Indonesiana*, Vol. 52 No. 4, pp. 235–240.

Aquila, S., Sisci, D., Gentile, M., Carpino, A., Middea, E., Catalano, S., Rago, V., et al. (2003), "Towards a physiological role for cytochrome P450 aromatase in ejaculated human sperm", *Human Reproduction*, Vol. 18 No. 8, pp. 1650–1659.

Aryani, R., Manuring, H., Moeljopawiro, S., Nugroho, L.H. and Astuti, P. (2019), "The effect of methanol extract of soybean (*Glycine max* L. Merr.) on rat testicular steroid hormones", *Journal of Physics: Conference Series*, Vol. 1277 No. 1, available at: <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1277/1/012012>.

Astuti, S. and Sutyarso. (2010), "Pengaruh Tepung Kedelai Kaya Isoflavon terhadap Testosteron Serum, Jumlah Sel Leydig dan Jumlah Sel Spermatogenik pada Tubuli Seminiferi Testis Tikus (*Rattus norvegicus*)", Vol. 15 No. 1, pp. 31–40.

Bhagwat, S. and Haytowitz, D.B. (2015), "USDA database for the isoflavone content of selected foods", *U.S Department of Agriculture, Agricultural Research Service*, p. 69.

Borghot, V.M. and Wyns, C. (2018), "Fertility and infertility: Definition and epidemiology", *Clinical Biochemistry*, Vol. 62 No. March, pp. 2–10.

Broström, A. (2007), *Effects of Exposure to Estrogen-like Compounds during Embryogenesis in the Chicken*, Uppsala.

Carolin, B.T., Salni and Nita, S. (2019), "Pengaruh Ekstrak Bunga Kembang Sepatu (*Hibiscus Rosa-Sinensis* Linn.) terhadap Epididimis, Prostat dan Vesikula Seminalis", *Biomedical Journal of Indonesia: Jurnal Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya*, Vol. 5 No. 1, pp. 1–10.

Carreau, S., Bouraima-Lelong, H. and Delalande, C. (2011), "Estrogens in male germ cells", *Spermatogenesis*, Vol. 1 No. 2, pp. 90–94.

Carreau, S., Bouraima-Lelong, H. and Delalande, C. (2012), "Estrogen, a female hormone involved in spermatogenesis", *Advances in Medical Sciences, Medical University of Bialystok*, Vol. 57 No. 1, pp. 31–36.

Carreau, S. and Hess, R.A. (2010), "Oestrogens and spermatogenesis", *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, Vol. 365 No. 1546, pp. 1517–1535.

Carreau, S. and Levallet, J. (2000), "Testicular estrogens and male reproduction", *News in Physiological Sciences*, Vol. 15 No. 4, pp. 195–198.

Carreau, S., Wolczynski, S. and Galeraud-Denis, I. (2010), "Aromatase, oestrogens and human male reproduction", *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, Vol. 365 No. 1546, pp. 1571–1579.

Cederroth, C.R., Zimmermann, C., Beny, J.L., Schaad, O., Combevine, C.,

- Descombes, P., Doerge, D.R., et al. (2010), "Potential detrimental effects of a phytoestrogen-rich diet on male fertility in mice", *Molecular and Cellular Endocrinology*, Vol. 321 No. 2, pp. 152–160.
- Ceylan, G.G. and Ceylan, C. (2015), "Genetics and male infertility", *World Journal of Clinical Urology*, Vol. 4 No. 1, pp. 38–47.
- Cheng, C.Y. (2008), *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis*, *Journal of Chemical Information and Modeling*, Vol. 53, Landes Bioscience and Springer Science+Business Media, LLC, USA, available at:<https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-0-387-09597-4>.
- Chieffi, P., D'Amato, L.C., Guarino, F., Salvatore, G. and Angelini, F. (2002), "17 β -estradiol induces spermatogonial proliferation through mitogen-activated protein kinase (extracellular signal-regulated kinase 1/2) activity in the lizard (*Podarcis s. sicula*)", *Molecular Reproduction and Development*, Vol. 61 No. 2, pp. 218–225.
- Chimento, A., Sirianni, R., Casaburi, I. and Pezzi, V. (2014), "Role of estrogen receptors and G protein-coupled estrogen receptor in regulation of hypothalamus-pituitary-testis axis and spermatogenesis", *Frontiers in Endocrinology*, Vol. 5 No. JAN, pp. 1–9.
- Chughtai, B., Sawas, A., O'Malley, R.L., Naik, R.R., Khan, S.A. and Pentylala, S. (2005), "A neglected gland: A review of Cowper's gland", *International Journal of Andrology*, Vol. 28 No. 2, pp. 74–77.
- Dafriani, P. (2015), "POTENSI KEDELAI SEBAGAI NUTRISI UNTUK PENCEGAHAN NEFROPATI DIABETES PADA PENDERITA DIABETES MELITUS", *NERS JURNAL KEPERAWATAN*, Vol. 11 No. 1, pp. 52–63.
- Dinastiti, V.B., Nurdiana, N. and Dwijayasa, P.M. (2019), "Pengaruh Susu Kedelai terhadap Ekspresi Reseptor Estrogen-B Uterus pada Masa Reproduksi Awal Rattus Norvegicus Betina", *Jurnal Kebidanan Midwifera*, Vol. 5 No. 1, p. 17.
- Dinsdale, E.C. and Ward, W.E. (2010), "Early exposure to soy isoflavones and effects on reproductive health: A review of human and animal studies", *Nutrients*, Vol. 2 No. 11, pp. 1156–1187.
- Ermiza. (2012), "Pengaruh Paparan Suhu Terhadap Kualitas Spermatozoa Mencit Jantan (Mus, Musculus) Strain Jepang", *Sainstis*, Vol. 1 No. 2, pp. 19–28.
- Esteves, S.C., Miyaoka, R. and Agarwal, A. (2011), "An update on the clinical assessment of the infertile male", *Clinics*, Vol. 66 No. 4, pp. 691–700.
- Fitria, L., Mulyati, Tiraya, C.M. and Budi, A.S. (2015), "Profil Reproduksi Jantan Tikus (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769) Galur Wistar Stadia Muda, Pradewasa, dan Dewasa", *Jurnal Biologi Papua*, Vol. 7 No. 1, pp. 29–36.
- Glover, A. and Assinder, S.J. (2006), "Acute exposure of adult male rats to dietary phytoestrogens reduces fecundity and alters epididymal steroid hormone receptor expression", *Journal of Endocrinology*, Vol. 189 No. 3, pp. 565–573.



Gofur, M.R., Hossain, K.M.M., Khaton, R. and Hasan, M.R. (2014), "Effect of testosterone on physio-biochemical parameters and male accessory sex glands of black bengal goat", *International Journal of Emerging Technology and Advanced Engineering*, Vol. 9 No. September, pp. 456–465.

Gruber, C.J., Tschugguel, W., Schneeberger, C. and Huber, J.C. (2002), "PRODUCTION AND ACTIONS OF ESTROGENS", *The New England Journal of Medicine Review*, Vol. 346 No. 5, pp. 340–352.

Gunawan, A., Kaewmala, K., Uddin, M.J., Cinar, M.U., Tesfaye, D., Phatsara, C., Tholen, E., *et al.* (2011), "Association study and expression analysis of porcine ESR1 as a candidate gene for boar fertility and sperm quality", *Animal Reproduction Science*, Vol. 128 No. 1–4, pp. 11–21.

Gundogan, M., Yeni, D., Avdatek, F. and Fidan, A.F. (2010), "Influence of sperm concentration on the motility, morphology, membrane and DNA integrity along with oxidative stress parameters of ram sperm during liquid storage", *Animal Reproduction Science*, Elsevier B.V., Vol. 122 No. 3–4, pp. 200–207.

Hanafiah, K.. (2012), *Rancangan Percobaan Teori Dan Aplikasi*, Ketiga, Raja Grafindo Persada, Jakarta.

Hasanah, S.U., Sukrasno, S. and Hartati, R. (2020), "Perbandingan Kandungan Genistein Pada Berbagai Varietas Kedelai (*Glycine max*) Di Indonesia", *Jurnal Penelitian Pertanian Tanaman Pangan*, Vol. 4 No. 2, pp. 113–118.

Hughes, I.A. and Acerini, C.L. (2008), "Factors controlling testis descent", *European Journal of Endocrinology*, Vol. 159 No. SUPPL. 1, pp. 75–82.

ITIS. (2020), "Glycine max (L.) Merr.", *International Taxonomic Information System*, available at: https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=26716#null.

Johnson, L., Ing, N.H., Welsh, T.H., Varner, D.D., Scrutchfield, W.L. and Martin, M.T. (2000), "Efficiency of spermatogenesis in animals and humans", *Journal of Animal Science*, Vol. 77 No. E-Suppl, pp. 1–47.

Keber, R., Rozman, D. and Horvat, S. (2013), "Sterols in spermatogenesis and sperm maturation", *Journal of Lipid Research*, Vol. 54 No. 1, pp. 20–33.

Khaidir, M. (2006), "Penilaian tingkat fertilitas dan penatalaksanaannya pada pria", *Jurnal Kesehatan Masyarakat Andalas*, Vol. 1 No. 1, pp. 30–34.

Khan, D. and Ahmed, S.A. (2016), "The immune system is a natural target for estrogen action: Opposing effects of estrogen in two prototypical autoimmune diseases", *Frontiers in Immunology*, Vol. 6 No. 635, pp. 1–8.

Kim, S.H. and Park, M.J. (2012), "Effects of phytoestrogen on sexual development", *Korean Journal of Pediatrics*, Vol. 55 No. 8, pp. 265–271.

Kolasa, A., Wiszniewska, B., Marchlewicz, M. and Wenda-Rózewicka, L. (2003), "Localisation of oestrogen receptors (ER α and ER β) in the human and rat

- epididymides”, *Folia Morphologica*, Vol. 62 No. 4, pp. 467–469.
- Koletzko, S., Niggemann, B., Arato, A., Dias, J.A., Heuschkel, R., Husby, S., Mearin, M.L., *et al.* (2012), “Diagnostic approach and management of cow’s-milk protein allergy in infants and children: Espghan gi committee practical guidelines”, *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, Vol. 55 No. 2, pp. 221–229.
- Krejčířová, R., Postlerová, P. and Rajmon, R. (2018), “Localization of Estrogen Receptors in Male Reproductive Tissues and Sperm Cells - A Review”, *Scientia Agriculturae Bohemica*, Vol. 49 No. 4, pp. 274–284.
- Krinke, G.J. (2000), “The Laboratory Rat”, Elsevier.
- Kumar, A. and Sharma, M. (2017), *Basics of Human Andrology, Basics of Human Andrology*, Springer Nature Singapore, Singapore, available at:<https://doi.org/10.1007/978-981-10-3695-8>.
- Kwon, W.S., Rahman, M.S. and Pang, M.G. (2014), “Diagnosis and prognosis of male infertility in mammal: The focusing of tyrosine phosphorylation and phosphotyrosine proteins”, *Journal of Proteome Research*, Vol. 13 No. 11, pp. 4505–4517.
- Leaver, R.B. (2016), “of Causes and Treatment Options”, *British Journal of Nursing*, Vol. 25 No. 18, pp. 35–41.
- Lecomte, S., Demay, F., Ferrière, F. and Pakdel, F. (2017), “Phytochemicals targeting estrogen receptors: Beneficial rather than adverse effects?”, *International Journal of Molecular Sciences*, Vol. 18 No. 7, pp. 1–19.
- Lehraiki, A., Chamailard, C., Krust, A., Habert, R. and Levacher, C. (2011), “Genistein impairs early testosterone production in fetal mouse testis via estrogen receptor alpha”, *Toxicology in Vitro*, Elsevier Ltd, Vol. 25 No. 8, pp. 1542–1547.
- Li, T.F., Wu, Q.Y., Zhang, C., Li, W.W., Li, N., Cui, Y.X., Li, X.J., *et al.* (2014), “Polymorphisms in estrogen receptors predict the risk of male infertility: A meta-analysis”, *Reproductive Biology and Endocrinology*, Vol. 12 No. 1, available at:<https://doi.org/10.1186/1477-7827-12-79>.
- Liberal, V., De Miguel, M.P., Henze, M., Nistal, M. and Reed, S.I. (2010), “Reduced spermatogonial proliferation and decreased fertility in mice overexpressing cyclin E in spermatogonia”, *Cell Cycle*, Vol. 9 No. 20, pp. 4222–4227.
- Luthfi, M. Ja’far and Noor, M.M. (2015), *ANALISIS KUALITAS SPERMA TIKUS PERCOBAAN (Jumlah, Motilitas, Dan Morfologi)*, UNS Press, Surakarta.
- Madianung, V., Satiawati, L. and Tendean, L. (2016), “Pengaruh Susu Kacang Kedelai (GLYCINE MAX (L.) MERR.) Terhadap Kualitas Spermatozoa Tikus Wistar (*Rattus Norvegicus*)”, *Jurnal E-Biomedik*, Vol. 4 No. 1, pp. 188–192.
- Mäkelä, J.-A. and Toppari, J. (2017), *Spermatogenesis*, edited by Simoni M., H.I., Endocrinol., Endocrinology. Springer, Cham, Turku, Finland, available

- at:https://doi.org/10.1007/978-3-319-44441-3_13.
- Malini, D.M. (2013), "Pengaruh Ekstrak Etanol dan Spinasterol Daun Senggugu (Clerodendron Serratum L.) terhadap Kualitas Sperma Mencit (Mus Musculus L.)", *Indonesian Journal of Applied Sciences*, Vol. 3 No. 3, pp. 49–54.
- Margo, E., Pangkahila, W. and Aman, I.G.M. (2019), "Soymilk Formula Increases Estrogen and Reduces Testosterone Level in Male Infant White Wistar Rats", *Molecular and Cellular Biomedical Sciences*, Vol. 3 No. 1, pp. 22–25.
- Meroni, S.B., Galardo, M.N., Rindone, G., Gorga, A., Riera, M.F. and Cigorraga, S.B. (2019), "Molecular mechanisms and signaling pathways involved in Sertoli cell proliferation", *Frontiers in Endocrinology*, Vol. 10 No. MAR, pp. 1–22.
- Monneret, C. (2017), "What is an endocrine disruptor?", *Comptes Rendus - Biologies*, Academie des sciences, Vol. 340 No. 9–10, pp. 403–405.
- Novrika, B. (2017), "Hubungan mekanisme koping dengan tingkat kecemasan pada pasangan infertil di RSIA Annisa Jambi tahun 2015", *Riset Informasi Kesehatan*, Vol. 6 No. 2, pp. 184–190.
- Nudmamud-Thanoi, S., Sueudom, W., Tangsriskda, N. and Thanoi, S. (2016), "Changes of sperm quality and hormone receptors in the rat testis after exposure to methamphetamine", *Drug and Chemical Toxicology*, Vol. 39 No. 4, pp. 432–438.
- Nurdiana, N., Mayangsari, E., Lestari, B. and Setiawan, B. (2016), "Hormonal changes and spermatogenesis of male rat puppies born by mothers consuming soybean extract", *Asian Pacific Journal of Reproduction*, Elsevier (Singapore) Pte Ltd, Vol. 5 No. 6, pp. 506–509.
- Nurdiana, N., Sarwono, I., Setyohadi, R., Harsono, S., Budiutomo, P., Adiguna, F. and Aung, Z.M. (2015), "Effect of soybean milk for 12 weeks in six-weeks-old male rats' testis, prostate, epididymis, seminal vesicles and testosterone", *Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology*, Vol. 29 No. Suppl 1.
- Oliveira, P.F. and Alves, M.G. (2015), *Sertoli Cell Metabolism and Spermatogenesis*, SpringerBriefs in Cell Biology, Portugal, available at:https://doi.org/10.1007/978-3-319-19791-3_2.
- Paterni, I., Granchi, C., Katzenellenbogen, J.A. and Minutolo, F. (2014), "Estrogen receptors alpha (ER α) and beta (ER β): Subtype-selective ligands and clinical potential", *Steroids*, Elsevier Inc., Vol. 90 No. June, pp. 13–29.
- Patisaul, H.B. (2016), "Endocrine disruption by dietary phyto-oestrogens: Impact on dimorphic sexual systems and behaviours", *Proceedings of the Nutrition Society*, Vol. 76 No. 2, pp. 130–144.
- Patisaul, H.B. and Jefferson, W. (2011), "The pros and cons of phytoestrogens", *Front Neuroendocrinol*, Vol. 31 No. 4, pp. 400–419.

Prawirohardjo. (2011), *Ilmu Kandungan*, 3rd ed., PT. Bina Pustaka Sarwono Prawirohardjo, Jakarta.

Punab, M., Poolamets, O., Paju, P., Vihljajev, V., Pomm, K., Ladva, R., Korrovits, P., *et al.* (2017), "Causes of male infertility: A 9-year prospective monocentre study on 1737 patients with reduced total sperm counts", *Human Reproduction*, Vol. 32 No. 1, pp. 18–31.

Ramadhan, R., Indriani, Y. and Kalsum, U. (2014), "Analisis Pengetahuan dan Sikap Konsumen dalam Membeli Susu Kedelai di Bandar Lampung", *JIIA*, Vol. 2 No. 4, pp. 357–364.

Retana-Márquez, S., Hernández, H., Flores, J.A., Muñoz-Gutiérrez, M., Duarte, G., Vielma, J., Fitz-Rodríguez, G., *et al.* (2012), "Effects of phytoestrogens on mammalian reproductive physiology", *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, Vol. 15 No. SUPPL. 1, pp. S129–S145.

Rietjens, I.M.C.M., Sotoca, A.M., Vervoort, J. and Louisse, J. (2013), "Mechanisms underlying the dualistic mode of action of major soy isoflavones in relation to cell proliferation and cancer risks", *Molecular Nutrition and Food Research*, Vol. 57 No. 1, pp. 100–113.

Rompis, S.A., Tendean, L.E.N. and Rumbajan, J.M. (2018), "Pengaruh Kelebihan Berat Badan terhadap Kualitas Spermatozoa Tikus Wistar (*Rattus Norvegicus*)", *Jurnal E-Biomedik*, Vol. 6 No. 1, pp. 39–44.

Safithri, F., Ali, M., Hidayat, A. and Setyawati, S. (2010), "EFEK ISOFLAVON FITOESTROGEN DARI EKSTRAK *Pueraria lobata* TERHADAP MEMORI DAN AKTIVITAS KOLINERGIK DI HIPPOKAMPUS CA1 PADA TIKUS HIPOESTROGEN", *Jurnal Ilmu Kesehatan Dan Kedokteran Keluarga*, Vol. 6 No. 2, pp. 29–42.

Sastroasmoro, S. (2011), *Dasar-Dasar Metodologi Penelitian Klinis*, CV. Sagung Seto, Jakarta.

Sengupta, P. (2013), "The laboratory rat: Relating its age with human's", *International Journal of Preventive Medicine*, Vol. 4 No. 6, pp. 624–630.

Sharma, M.K.G. (2017), "Spermatogenesis Read between the Lines: A Biochemical Perspective on Sertoli-Germ Cell Crosstalk", *EC Endocrinology and Metabolic Research*, Vol. 2, pp. 68–79.

Sherrill, J.D., Sparks, M., Dennis, J., Mansour, M., Kemppainen, B.W., Bartol, F.F., Morrison, E.E., *et al.* (2010), "Developmental exposures of male rats to soy isoflavones impact leydig cell differentiation", *Biology of Reproduction*, Vol. 83 No. 3, pp. 488–501.

Shibayama, T., Fukata, H., Sakura, K., Adachi, T., Komiyama, M., Iguchi, T. and Mori, C. (2001), "Neonatal exposure to genistein reduces expression of estrogen receptor alpha and androgen receptor in testes of adult mice", *Endocrine Journal*, Vol. 48 No. 6, pp. 655–663.

Sihombing, M. and Rafilizar. (2010), "Status gizi dan fungsi hati mencit galur.pdf", *Media Litbangkes*.

Sinaga, E.S. (2016), "Pengaruh Isoflavon Kedelai Terhadap Jumlah Kecepatan dan Morfologi Spermatozoa Tikus Putih Jantan (*Rattus Norvegicus*)", *Jurnal Ilmiah Kebidanan IMELDA*, Vol. 2 No. 2, pp. 73–85.

Singh, R. (2020), *Molecular Signaling in Spermatogenesis and Male Infertility*, Taylor and Francis Group, United States, available at: <http://library1.nida.ac.th/termpaper6/sd/2554/19755.pdf>.

Singh, R. and Singh, K. (2017), *Male Infertility: Understanding, Causes and Treatment, Medicine*, Vol. 29, Springer Nature Singapore, Singapore, available at: <https://doi.org/10.1007/978-981-10-4017-7>.

Siregar, S.P. and Munasir, Z. (2016), "Pentingnya Pencegahan Dini dan Tata laksana Alergi Susu Sapi", *Sari Pediatri*, Vol. 7 No. 4, pp. 237–243.

Sirianni, R., Chimento, A., Ruggiero, C., De Luca, A., Lappano, R., Andò, S., Maggiolini, M., *et al.* (2008), "The novel estrogen receptor, G protein-coupled receptor 30, mediates the proliferative effects induced by 17 β -estradiol on mouse spermatogonial GC-1 cell line", *Endocrinology*, Vol. 149 No. 10, pp. 5043–5051.

Sirotkin, A. V and Harrath, A.H. (2014), "Phytoestrogens and their effects", *European Journal of Pharmacology*, Elsevier, Vol. 741, pp. 230–236.

Slama, R., Bourguignon, J.P., Demeneix, B., Ivell, R., Panzica, G., Kortenkamp, A. and Zoeller, R.T. (2016), "Scientific issues relevant to setting regulatory criteria to identify endocrine-disrupting substances in the european union", *Environmental Health Perspectives*, Vol. 124 No. 10, pp. 1497–1503.

Soleha, M., Maligan, J.M. and Yuniarta, Y. (2018), "The Effect of Papain Enzyme Addition on the Physical, Chemical, and Organoleptic Characteristic of Soy Milk (Study of Soybean Type and Enzyme Papain Concentration)", *Food and Agroindustry Journal*, Vol. 6 No. 3, pp. 18–29.

Sudatri, N. W., Yulihastiti D.A., and Suartini, N.M. (2019), "Penurunan Kualitas Sperma Tikus (*Rattus norvegicus*) yang Diinjeksi Vitamin C Dosis Tinggi dalam Jangka Waktu Lama", *The Journal of Biological Sciences*, Vol. 6 No. 1, pp. 7–13.

Susanti, E., Permana, A. and Suryantiningsih, S. (2019), "Perbandingan Hasil Pemeriksaan Hasil Konsentrasi Sperma Berdasarkan Metode WHO 1993 dan WHO 2010 Di Rumah Sakit Hermina Jatinegara", *Anakes : Jurnal Ilmiah Analisis Kesehatan*, Vol. 5 No. 2, pp. 128–133.

Susilawati, T. (2011), *SPERMATOLOGI*, Universitas Brawijaya Press, Malang.

Tohyama, S., Ogino, Y., Lange, A., Myosho, T., Kobayashi, T., Hirano, Y., Yamada, G., *et al.* (2017), "Establishment of estrogen receptor 1 (ESR1)-knockout medaka: ESR1 is dispensable for sexual development and reproduction in medaka, *Oryzias latipes*", *Development Growth and Differentiation*, Vol. 59 No. 6, pp. 552–561.

Vincenzo, R., Madeo, B., Diazzi, C., Lucia, Z., Daniele, S. and Cesare, C. (2016), "Estrogens and male reproduction", *Endotext [Internet]*, available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK278933/>.

Wall, J. and Jayasena, C.N. (2018), "Diagnosing male infertility", *BMJ (Online)*, Vol. 363 No. October, pp. 3–5.

Wang, J., Gu, H., Lin, H. and Chi, T. (2012), "Essential roles of the chromatin remodeling factor BRG1 in spermatogenesis in mice.", *Biology of Reproduction*, Vol. 86 No. 6, pp. 1–10.

Weinbauer, G.F., Luetjens, C.M., Simoni, M. and Nieschlag, E. (2010), *Andrology: Male Reproductive Health and Dysfunction*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, available at: https://doi.org/10.1007/978-3-540-78355-8_2.

WHO. (2010), "WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen (5th edition)", *World Health Organization*, pp. 1–271.

Wiser, A., Sachar, S., Ghetler, Y., Shulman, A. and Breitbart, H. (2014), "Assessment of sperm hyperactivated motility and acrosome reaction can discriminate the use of spermatozoa for conventional in vitro fertilisation or intracytoplasmic sperm injection: Preliminary results", *Andrologia*, Vol. 46 No. 3, pp. 313–315.

Wongsodiharjo, T. (2017), "Analisa Karakteristik Cairan Semen Pada Pasien Varikukel di Rumah Sakit Angkatan Laut dr. Ramelan Surabaya Tahun 2015", *Hang Tuah Medical Journal*, Vol. 15 No. 1, pp. 84–92.

Yildiz, F. (2019), *Phytoestrogens in Functional Foods*, CRC Press.

Yoon, G.A. and Park, S. (2014), "Antioxidant action of soy isoflavones on oxidative stress and antioxidant enzyme activities in exercised rats", *Nutrition Research and Practice*, Vol. 8 No. 6, pp. 618–624.

Yuniarsih, D. (2017), "Pengaruh Cekaman Air terhadap Kandungan Protein Kacang Kedelai", *Prosiding Seminar Nasional Pendidikan Biologi Dan Biologi*, pp. B111-b122.

Zhao, H., You, X., Chen, Q., Yang, S., Ma, Q., He, Y., Liu, C., *et al.* (2020), "Icariin Improves Age-Related Testicular Dysfunction by Alleviating Sertoli Cell Injury via Upregulation of the ER α /Nrf2-Signaling Pathway", *Frontiers in Pharmacology*, Vol. 11 No. May, pp. 1–14.

Zin, S.R.M., Omar, S.Z., Ali Khan, N.L., Musameh, N.I., Das, S. and Kassim, N.M. (2013), "Effects of the phytoestrogen genistein on the development of the reproductive system of Sprague Dawley rats", *Clinics*, Vol. 68 No. 2, pp. 253–262.

LAMPIRAN

Lampiran 1 Surat Keterangan Kelaikan Etik



KEMENTERIAN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
FAKULTAS KEDOKTERAN
Jalan Veteran Malang – 65145, Jawa Timur - Indonesia
Telp. (0341) 551611 Pes. 213.214; 569117, 567192 – Fax. (62) (0341) 564755
http://www.fk.ub.ac.id e-mail : sekr.fk@ub.ac.id

KETERANGAN KELAIKAN ETIK
("ETHICAL CLEARANCE")

No. 140 / EC / KEPK / 07 / 2020

KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA, SETELAH MEMPELAJARI DENGAN SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG DIUSULKAN, DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA PENELITIAN DENGAN

- JUDUL : Pengaruh Pemberian Susu Kedelai terhadap Perubahan Hormonal, Sexual Behavior, Spermatozoa, serta Ekspresi Reseptor Hormon Reproduksi Tikus Wistar (Rattus norvegicus) Jantan.
PENELITI UTAMA : Prof. Dr. dr. Nurdiana, M.Kes
ANGGOTA : dr. Elly Mayangsari, M.Biomed, Made Pradnyawati Chania, Rizki Devi Nurvitasari, Azmiatun Nisa, Styan Wahyu Diana, Evalina Izzatur Rochmah, Nadya Neyza Shalshabilla
UNIT / LEMBAGA : Fakultas Kedokteran - Universitas Brawijaya Malang.
TEMPAT PENELITIAN : Laboratorium Farmakologi, Biokimia dan Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

DINYATAKAN LAIK ETIK.

Malang,
Ketua,



Prof. Dr. dr. Moch. Istiadid ES, SpS, SpBS(K), SH, M.Hum, Dr(Hk)
NIPK. 20180246051611001

Catatan :
Keterangan Laik Etik Ini Berlaku 1 (Satu) Tahun Sejak Tanggal Dikeluarkan
Pada Akhir Penelitian, Laporan Hasil Penelitian Wajib Diserahkan Kepada KEPK-FKUB Dalam Bentuk Hard Copy. Jika Ada Perubahan Protokol Dan / Atau Perpanjangan Penelitian, Harus Mengajukan Kembali Permohonan Kajian Etik Penelitian (Amandemen Protokol).

Lampiran 2 Surat Keterangan Bebas Plagiasi



KEMENTERIAN PENDIDIKAN, KEBUDAYAAN,
RISET, DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
FAKULTAS KEDOKTERAN
Jalan Veteran, Malang 65145, Indonesia
Telp. +62341 551611 Pes. 213.214; 569117, 567192, Fax. +62341 565420
E-mail : sekr.fk@ub.ac.id <http://fk.ub.ac.id>

SURAT KETERANGAN

Nomor 340 /UN10.F08.08/ PK.03.08.3/2021

Yang bertanda tangan dibawah ini,

nama : dr. Aulia Rahmi Pawestri, Ph.D.(Trop.Med.)
NIP/NIK : 2012018705212001
pangkat dan golongan : Penata Muda Tk. I, III/b
jabatan : Ketua Badan Penerbitan Jurnal Fakultas Kedokteran

dengan ini menerangkan bahwa,

nama : Rifzi Devi Nurvitasari
NIM : 196070400111027
program studi : Magister Kebidanan
judul : Pengaruh Pemberian Susu Kedelai terhadap Jumlah Sel Spermatoagonia yang Mengekspresikan Reseptor Estrogen Alpha, Jumlah Spermatozoa dengan Morfologi dan Pergerakan Normal pada Tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) Jantan
jenis Artikel : Tesis
jumlah halaman : 85

berdasarkan pemindaian dengan perangkat lunak Turnitin, Badan Penerbitan Jurnal Fakultas Kedokteran menyatakan bahwa Artikel Ilmiah tersebut diatas memiliki kemiripan 3 %

Demikian surat keterangan ini agar dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

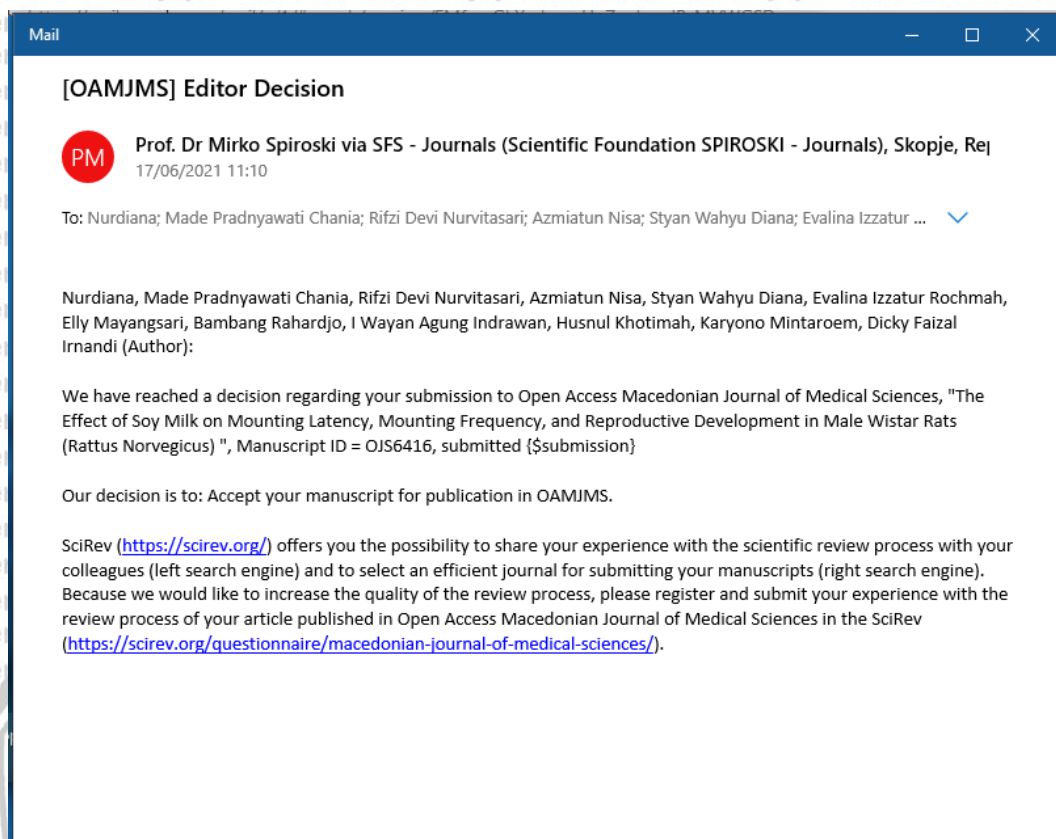
Malang, 6 Juli 2021

Ketua Badan Penerbitan Jurnal,



dr. Aulia Rahmi Pawestri, Ph.D.(Trop.Med.)
NIP/NIK: 2012018705212001

Lampiran 3 Letter of Acceptance



20/7/2021

ICoLiST 2021 - Letter of Acceptance

Print this page



ICoLiST 2021

4th International Conference on Life Sciences and Technology
Universitas Negeri Malang, 31 August 2021
Website: <http://icolist.biologi.um.ac.id/2021>
Email: icolist.biologi@um.ac.id

Date: 20 July 2021

Letter of Acceptance for Abstract

Dear Authors: Nurdiana Nurdiana, Made Pradnyawati Chania, Rifzi Devi Nurvitasari, Azmiatun Nisa, Styan Wahyu Diana, Evalina Izzatur Rochmah, Elly Mayangsari, Bambang Rahardjo, I Wayan Agung Indrawan, Husnul Khotimah, Karyono Mintaroem, Eviana Norahmawati, Tri Yudani Mardining Raras

We are pleased to inform you that your abstract (ABS-12, Oral Presentation), entitled:

"The Effect of Soy Milk on Estrogen Receptor Alpha Expression in Medial Preoptic Area (MPOA) and in Spermatogonia, Testosterone Levels, and Androgen Receptors Expression in Male Wistar Rats (*Rattus norvegicus*)"

has been reviewed and accepted to be presented at ICoLiST 2021 conference to be held on 31 August 2021 in Malang, Indonesia.

Please submit your full paper and make the payment for registration fee before the deadlines, visit our website for more information.

Thank You.

Best regards,



Assist. Prof. Hendra Susanto, S.Pd., M.Kes., Ph.D.
ICoLiST 2021 Chairperson



Konfrenzi.com - Conference Management System

Lampiran 4 Hasil Uji Statistik Data Hasil Penghitungan Jumlah Sel Spermatogetonia yang Mengekspresikan Reseptor Estrogen Alpha pada Tikus Jantan yang Diberi Perlakuan Susu Kedelai

1. Hasil Uji Normalitas dan Homogenitas Data

Tests of Normality

Kelompok_Perlakuan	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Persentase_Sel_Spermatogetonia_Positif_ERalpha_Kontrol	.273	6	.184	.930	6	.579
Perlakuan 1	.177	6	.200*	.916	6	.480
Perlakuan 2	.191	6	.200*	.913	6	.454
Perlakuan 3	.149	6	.200*	.971	6	.899

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

Test of Homogeneity of Variances

Persentase_Sel_Spermatogetonia_Positif_ERalpha			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.772	3	20	.523

2. Hasil Uji Beda Antar Kelompok

Descriptives

Persentase_Sel_Spermatogetonia_Positif_ERalpha

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Kontrol	6	58.4453	9.34970	3.81700	48.6334	68.2572	45.47	72.87
Perlakuan 1	6	46.1217	6.13135	2.50311	39.6872	52.5561	39.16	53.87
Perlakuan 2	6	32.1687	8.83643	3.60746	22.8954	41.4419	20.00	41.87
Perlakuan 3	6	22.8167	5.41925	2.21240	17.1295	28.5038	15.88	30.81
Total	24	39.8881	15.55889	3.17594	33.3181	46.4580	15.88	72.87

ANOVA

Percentase_Sel_Spermatogonia_Positif_ERalpha

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4405.510	3	1468.503	25.269	.000
Within Groups	1162.305	20	58.115		
Total	5567.816	23			

3. Hasil Uji Perbandingan Berganda (Multiple Comparison)

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Percentase_Sel_Spermatogonia_Positif_ERalpha

	(I)	(J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
LSD	Kelompok_Perlakuan	Kelompok_Perlakuan 1	12.32367*	4.40134	.011	3.1426	21.5047
		Perlakuan 2	26.27667*	4.40134	.000	17.0956	35.4577
		Perlakuan 3	35.62867*	4.40134	.000	26.4476	44.8097
	Perlakuan 1	Kontrol	-12.32367*	4.40134	.011	-21.5047	-3.1426
		Perlakuan 2	13.95300*	4.40134	.005	4.7720	23.1340
		Perlakuan 3	23.30500*	4.40134	.000	14.1240	32.4860
	Perlakuan 2	Kontrol	-26.27667*	4.40134	.000	-35.4577	-17.0956
		Perlakuan 1	-13.95300*	4.40134	.005	-23.1340	-4.7720
		Perlakuan 3	9.35200*	4.40134	.046	.1710	18.5330
Perlakuan 3	Kontrol	-35.62867*	4.40134	.000	-44.8097	-26.4476	
	Perlakuan 1	-23.30500*	4.40134	.000	-32.4860	-14.1240	
	Perlakuan 2	-9.35200*	4.40134	.046	-18.5330	-.1710	

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Percentase_Sel_Spermatogonia_Positif_ERalpha

Kelompok_Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
Duncan ^a	Perlakuan 3	6	22.8167		
	Perlakuan 2	6		32.1687	
	Perlakuan 1	6			46.1217

Kontrol	6				58.4453
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6,000.

4. Hasil Uji Korelasi

Correlations

		Kelompok_ Perlakuan	Persentase_Sel_Spermatogonia_Positif_ERAlpha
Kelompok_Perlakuan	Pearson Correlation	1	-.887**
	Sig. (2-tailed)		.000
	N	24	24
Persentase_Sel_Spermatogonia_Positif_ERAlpha	Pearson Correlation	-.887**	1
	Sig. (2-tailed)	.000	
	N	24	24

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).



Lampiran 5 Hasil Uji Statistik Data Hasil Penghitungan Jumlah Spermatozoa dengan Morfologi Normal Pada Tikus Jantan yang Diberi Perlakuan Susu Kedelai

1. Hasil Uji Normalitas dan Homogenitas Data

Tests of Normality

Kelompok	Perlakuan	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Morfologi Normal	Kontrol	.216	6	.200*	.953	6	.766
	Perlakuan 1	.309	6	.076	.811	6	.073
	Perlakuan 2	.184	6	.200*	.978	6	.940
	Perlakuan 3	.274	6	.179	.915	6	.472

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

Test of Homogeneity of Variances

Morfologi Normal

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.612	3	20	.615

2. Hasil Uji Beda Antar Kelompok

Descriptives

Morfologi Normal

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Kontrol	6	63.83	3.920	1.600	59.72	67.95	58	70
Perlakuan 1	6	58.33	5.391	2.201	52.68	63.99	48	63
Perlakuan 2	6	54.17	4.535	1.851	49.41	58.93	48	61
Perlakuan 3	6	51.67	6.121	2.499	45.24	58.09	45	61
Total	24	57.00	6.666	1.361	54.19	59.81	45	70

ANOVA

Morfologi Normal

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	509.667	3	169.889	6.632	.003
Within Groups	512.333	20	25.617		
Total	1022.000	23			

3. Hasil Uji Perbandingan Berganda (Multiple Comparison)

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Morfologi Normal

(I)	Kelompok (J) Kelompok Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval		
					Lower Bound	Upper Bound	
LSD	Kontrol	Perlakuan 1	5.500	2.922	.074	-.60	11.60
		Perlakuan 2	9.667*	2.922	.004	3.57	15.76
		Perlakuan 3	12.167*	2.922	.000	6.07	18.26
1	Perlakuan	Kontrol	-5.500	2.922	.074	-11.60	.60
		Perlakuan 2	4.167	2.922	.169	-1.93	10.26
		Perlakuan 3	6.667*	2.922	.034	.57	12.76
2	Perlakuan	Kontrol	-9.667*	2.922	.004	-15.76	-3.57
		Perlakuan 1	-4.167	2.922	.169	-10.26	1.93
		Perlakuan 3	2.500	2.922	.402	-3.60	8.60
3	Perlakuan	Kontrol	-12.167*	2.922	.000	-18.26	-6.07
		Perlakuan 1	-6.667*	2.922	.034	-12.76	-.57
		Perlakuan 2	-2.500	2.922	.402	-8.60	3.60

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Morfologi Normal

Kelompok Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Duncan ^a	Perlakuan 3	6	51.67	
	Perlakuan 2	6	54.17	54.17
	Perlakuan 1	6		58.33

Kontrol	6			63.83
Sig.		.402	.169	.074

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

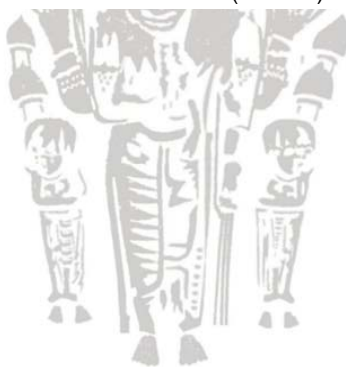
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6,000.

4. Hasil Uji Korelasi

Correlations

		Kelompok Perlakuan	Morfologi Normal
Kelompok Perlakuan	Pearson Correlation	1	-.697**
	Sig. (2-tailed)		.000
	N	24	24
Morfologi Normal	Pearson Correlation	-.697**	1
	Sig. (2-tailed)	.000	
	N	24	24

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).



Lampiran 6 Hasil Uji Statistik Data Hasil Penghitungan Jumlah Spermatozoa dengan Pergerakan Normal Pada Tikus Jantan yang Diberi Perlakuan Susu Kedelai

1. Hasil Uji Normalitas dan Homogenitas Data

Tests of Normality

	Kelompok Perlakuan	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Pergerakan Normal	Kontrol	.131	6	.200*	.979	6	.947
	Perlakuan 1	.307	6	.081	.820	6	.089
	Perlakuan 2	.152	6	.200*	.945	6	.702
	Perlakuan 3	.186	6	.200*	.938	6	.642

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

Test of Homogeneity of Variances

Pergerakan Normal

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.408	3	20	.749

2. Hasil Uji Beda Antar Kelompok

Descriptives

Pergerakan Normal

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Kontrol	6	65.50	5.541	2.262	59.69	71.31	58	73
Perlakuan 1	6	57.67	9.993	4.080	47.18	68.15	39	66
Perlakuan 2	6	54.50	8.939	3.649	45.12	63.88	45	69
Perlakuan 3	6	47.33	6.890	2.813	40.10	54.56	40	59
Total	24	56.25	10.023	2.046	52.02	60.48	39	73

ANOVA

Pergerakan Normal

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1020.833	3	340.278	5.277	.008
Within Groups	1289.667	20	64.483		
Total	2310.500	23			

3. Hasil Uji Perbandingan Berganda (*Multiple Comparison*)

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Pergerakan Normal

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
LSD	Perlakuan 1	7.833	4.636	.107	-1.84	17.50
	Perlakuan 2	11.000*	4.636	.028	1.33	20.67
	Perlakuan 3	18.167*	4.636	.001	8.50	27.84
1	Kontrol	-7.833	4.636	.107	-17.50	1.84
	Perlakuan 2	3.167	4.636	.502	-6.50	12.84
	Perlakuan 3	10.333*	4.636	.037	.66	20.00
2	Kontrol	-11.000*	4.636	.028	-20.67	-1.33
	Perlakuan 1	-3.167	4.636	.502	-12.84	6.50
	Perlakuan 3	7.167	4.636	.138	-2.50	16.84
3	Kontrol	-18.167*	4.636	.001	-27.84	-8.50
	Perlakuan 1	-10.333*	4.636	.037	-20.00	-.66
	Perlakuan 2	-7.167	4.636	.138	-16.84	2.50

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Pergerakan Normal

Kelompok	Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05		
			1	2	3
Duncan ^a	Perlakuan 3	6	47.33		
	Perlakuan 2	6	54.50	54.50	
	Perlakuan 1	6		57.67	57.67

Kontrol	6			65.50
Sig.		.138	.502	.107

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6,000.

4. Hasil Uji Korelasi

Correlations

		Kelompok Perlakuan	Pergerakan Normal
Kelompok Perlakuan	Pearson Correlation	1	-.657**
	Sig. (2-tailed)		.000
	N	24	24
Pergerakan Normal	Pearson Correlation	-.657**	1
	Sig. (2-tailed)	.000	
	N	24	24

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).



Lampiran 7 Dokumentasi Penelitian

A. Pemeliharaan Hewan Coba



Keterangan: Penempatan hewan coba dalam kandang, pemberian pakan dan minum



Keterangan: Penimbangan susu Kedelai dengan timbangan digital



Keterangan: Persiapan pemberian susu



Keterangan: Pemberian susu kedelai menggunakan sonde

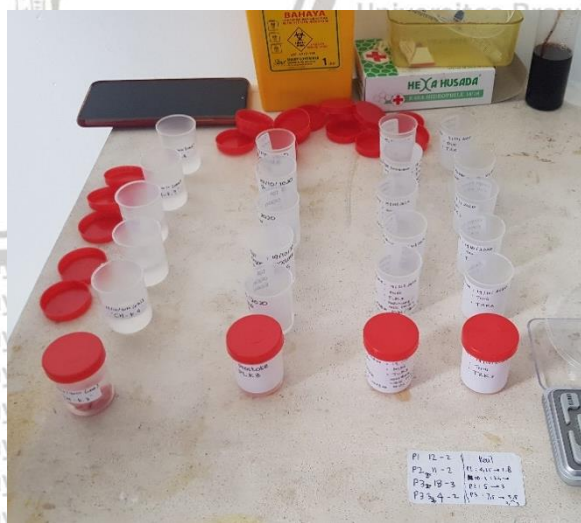
C. Pembedahan Hewan Coba



Keterangan: Alat dan bahan pembedahan



Keterangan: Injeksi hewan coba dengan ketamin-xylazine 0,1%

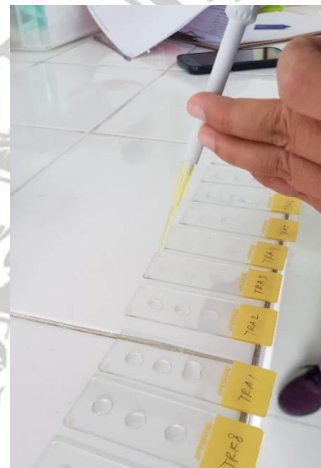


Keterangan: Meletakkan organ di dalam botol organ untuk selanjutnya dijadikan paraffin blok dan preperat jaringan testis

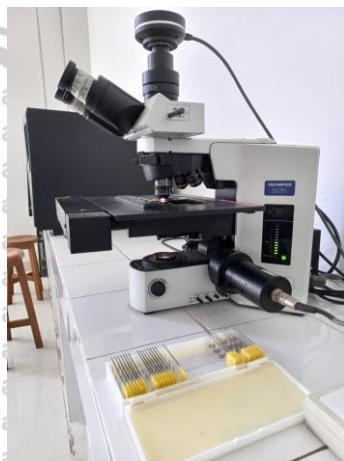
D. Pengamatan Sel Spermatogonia yang Mengekspresikan ER α dengan Pewarnaan Imunohistokimia (IHK)



Keterangan: Antibody *Antibody Estrogen Receptor α (C-311):sc-787*



Keterangan: Proses pewarnaan preparat jaringan testis dengan metode imunohistokimia

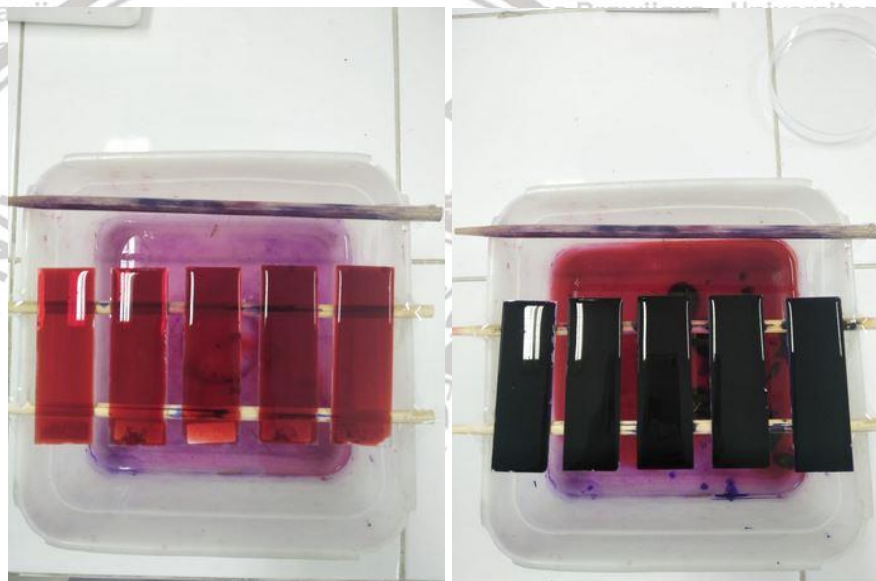


Keterangan: Preparat jaringan testis yang sudah diwarnai discan menggunakan mikroskop *Olympus BX 51*

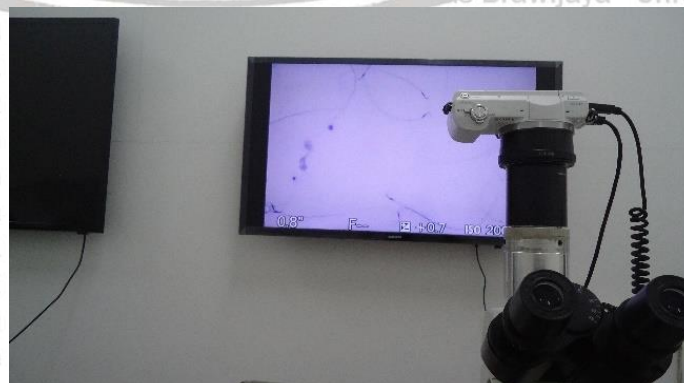
E. Pengamatan Morfologi Spermatozoa



Keterangan: Membuat hapusan sperma pada objek *glass*



Keterangan: Proses pewarnaan morfologi spermatozoa dengan metode pewarnaan Kristal-Violet



Keterangan: Pengamatan dengan mikroskop trinokuler

F. Pengamatan Pergerakan Spermatozoa



Keterangan: Suspensi diletakkan pada objek *glass*



Keterangan: Suspensi ditutup cover *glass*



Keterangan: Pengamatan dengan mikroskop



Lampiran 8 Data Sheet Antibody Estrogen Receptor α (C-311): sc-787

SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC.



The Power to Question

Estrogen Receptor α (C-311): sc-787

BACKGROUND

Estrogen receptors (ER) are members of the steroid/thyroid hormone receptor superfamily of ligand-activated transcription factors. Estrogen receptors, including ER α and ER β , contain DNA binding and ligand binding domains and are critically involved in regulating the normal function of reproductive tissues. They are located in the nucleus, though some estrogen receptors associate with the cell surface membrane and can be rapidly activated by exposure of cells to estrogen. ER α and ER β have been shown to be differentially activated by various ligands. Receptor-ligand interactions trigger a cascade of events, including dissociation from heat shock proteins, receptor dimerization, phosphorylation and the association of the hormone activated receptor with specific regulatory elements in target genes. Evidence suggests that ER α and ER β may be regulated by distinct mechanisms even though they share many functional characteristics.

REFERENCES

- Mason, B.H., et al. 1983. Progesterone and estrogen receptors as prognostic variables in breast cancer. *Cancer Res.* 43: 2985-2990.
- Evans, R.M. 1988. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240: 889-895.
- Danielian, P.S., et al. 1992. Identification of a conserved region required for hormone dependent transcriptional activation by steroid hormone receptors. *EMBO J.* 11: 1025-1033.

CHROMOSOMAL LOCATION

Genetic locus: ESR1 (human) mapping to 6q25.1; Esr1 (mouse) mapping to 10 A1.

APPLICATIONS

Estrogen Receptor α (C-311) is recommended for detection of Estrogen Receptor α of mouse, rat and human origin by Western Blotting (starting dilution 1:200, dilution range 1:100-1:1000), immunoprecipitation [1-2 μ g per 100-500 μ g of total protein (1 ml of cell lysate)], immunofluorescence (starting dilution 1:50, dilution range 1:50-1:500) and immunohistochemistry (including paraffin-embedded sections) (starting dilution 1:50, dilution range 1:50-1:500). ER α (C-311) is also recommended for detection of ER α in additional species, including bovine.

Estrogen Receptor α (C-311) is also recommended for detection of Estrogen Receptor α in additional species, including bovine.

Suitable for use as control antibody for Estrogen Receptor α siRNA (h): sc-29305, Estrogen Receptor α siRNA (m): sc-29306, Estrogen Receptor α siRNA (r): sc-45949, Estrogen Receptor α shRNA Plasmid (h): sc-29305-SH, Estrogen Receptor α shRNA Plasmid (m): sc-29306-SH, Estrogen Receptor α shRNA Plasmid (r): sc-45949-SH, Estrogen Receptor α shRNA (h) Lentiviral Particles: sc-29305-V, Estrogen Receptor α shRNA (m) Lentiviral Particles: sc-29306-V and Estrogen Receptor α shRNA (r) Lentiviral Particles: sc-45949-V.

Estrogen Receptor α (C-311) X TransCruz antibody is recommended for Gel Supershift and ChIP applications.

Molecular Weight of Estrogen Receptor α long isoform: 66 kDa.

Molecular Weight of Estrogen Receptor α short isoform: 54 kDa.

Molecular Weight of ER46: 48 kDa.

Molecular Weight of ER36: 36 kDa.



RIWAYAT HIDUP

Rifzi Devi Nurvitasari, lahir di Malang, Provinsi Jawa Timur pada tanggal 9 April 1997 dari pasangan Bapak Sugiyat dan Ibu Dra. Erna Yulaika. Penulis adalah anak kedua dari tiga bersaudara. Penulis menyelesaikan pendidikan sekolah dasar di SD Negeri 1 Pagentan pada tahun 2009. Selanjutnya penulis menyelesaikan studi sekolah menengah pertama di SMP Negeri 1 Singosari pada tahun 2012, dan menyelesaikan studi sekolah menengah atas di SMA Negeri 1 Lawang pada tahun 2014. Tahun 2014 penulis berkesempatan menjadi mahasiswa D-IV Program Studi Sarjana Terapan Kebidanan di Politeknik Kesehatan Kementerian Kesehatan Malang dan menyelesaikan studi pada tahun 2018. Penulis berkesempatan bekerja di STIKes Satria Bhakti Nganjuk dan melanjutkan pendidikan S2 jurusan Program Studi Magister Kebidanan di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang di tahun 2019.

