

Kualitas Spermatozoa Tikus yang Diberi Tepung Kedelai Kaya Isoflavon, Seng (Zn) dan Vitamin E

The Quality of Rats Spermatozoa Fed Isoflavone-Riched Soybean Flour, Zinc (Zn) and Vitamin E

S. Astuti^{a*}, D. Muchtadi^b, M. Astawan^b, B. Purwantara^{c#} & T. Wresdiyati^{d#}

^a Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung
Jln. Prof. Sumantri Brojonegoro No. 1 Bandar Lampung 35144

^b Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor
PO Box 220, Kampus IPB Darmaga Bogor 16680

^c Departemen Klinik, Reproduksi, dan Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor

^d Departemen Anatomi, Fisiologi dan Farmakologi, Fakultas Kedokteran Hewan,
Institut Pertanian Bogor

[#] Jln. Agatis Kampus IPB Darmaga Bogor 16680

(Diterima 30-10-2008; disetujui 07-01-2009)

ABSTRACT

The objective of this experiment was to evaluate the effects of isoflavone-riched soybean flour, zinc (Zn) and vitamin E on quality of rats spermatozoa as animal model. Diet was given as isonitrogen and isocaloric with 15% of dietary protein. Thirty male Sprague Dawley post weaning rats (21 days old) were divided into six groups and treated with isoflavone-riched soybean flour, Zn and vitamin E in different combination. Isoflavone-riched soybean flour (3 mg/day) was given by oral administration, whereas Zn and vitamin E were mixed with the basic diet. The treatments were given for 2 months. Thirty female Sprague Dawley post weaning rats (21 days old) were used to observe male fertility. Results indicated that synergic interaction between isoflavone-riched soybean flour, Zn and vitamin E increased motility and concentration of rats spermatozoa. The treatment was not significant on relative weight of testis, conception rate and foetus size. The best results was shown by the group which was given isoflavone-riched soybean flour with diet containing both Zn and vitamin E, i.e. motility rate of $79.50 \pm 1.12\%$, sperm concentration of 1636.90 ± 87.95 million/ml, and abnormality rate of $9.00 \pm 0.70\%$. Conception rate and the number of foetus on female rats were 100% and 11 ± 0.71 , respectively. It is concluded that combination treatment of isoflavone-riched soybean flour, Zn and vitamin E on male rats showed the best fertility in comparison with single treatment and the other combination.

Key words: isoflavone-riched soybean, Zn, vitamin E, quality of spermatozoa, rat

* Korespondensi:
Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Pertanian,
Universitas Lampung
Jln. Prof. Sumantri Brojonegoro No. 1 Bandar Lampung 35144

PENDAHULUAN

Kerusakan membran spermatozoa merupakan salah satu penyebab infertilitas pada pria. Kemampuan spermatozoa untuk mengadakan fertilisasi harus didukung oleh membran spermatozoa yang memiliki integritas (keutuhan) dan fluiditas (kelenturan) optimum. Integritas serta fluiditas yang baik diperlukan untuk berlangsungnya proses kapasitas, reaksi akrosom serta terjadinya fusi antara membran sperma dengan membran ovum sehingga fertilisasi berlangsung dengan sempurna. Terdapatnya radikal bebas pada jaringan yang memproduksi spermatozoa ditandai dengan meningkatnya pembentukan senyawa spesies oksigen reaktif (ROS) sehingga menyebabkan kerusakan membran spermatozoa, serta mengubah kestabilan dan fungsi membran (Sikka, 2004). Saleh & Agarwal (2002) menyatakan bahwa ROS pada level tinggi berpotensi toksik terhadap kualitas dan fungsi spermatozoa. Menurut Sikka (2004), terdapatnya *radical scavenger* diduga akan membersihkan radikal bebas pada jaringan-jaringan yang memproduksi spermatozoa.

Sistem pertahanan tubuh yang dapat digunakan untuk melawan radikal bebas dipengaruhi oleh tersedianya zat-zat gizi yang berasal dari bahan pangan yang memiliki potensi sebagai antioksidan. Usaha untuk mempertahankan kadar antioksidan endogen di dalam jaringan tubuh tetap tinggi dapat dilakukan dengan mengkonsumsi pangan kaya antioksidan. Kedelai dilaporkan memiliki senyawa bioaktif isoflavon (salah satu golongan flavonoid) yang bersifat sebagai antioksidan (Toda & Shirataki, 1999). Aktivitas antioksidan flavonoid ditentukan oleh jumlah dan posisi gugus hidroksil aromatik yang mampu mendonorkan ion hidrogen (Toda & Shirataki, 1999), dan sebagai penangkap (scavenger) radikal bebas yang terbentuk selama terjadi peroksidasi lipida (Nijveldt *et al.*, 2001; Amic *et al.*, 2003; Heim *et al.*, 2002).

Pengaruh konsumsi isoflavon terhadap kualitas spermatozoa telah diteliti Habito *et al.* (2000); Mitchell *et al.* (2001); dan Nagata *et al.*

(2001) yang melaporkan bahwa pada pria umur 18-46 tahun, konsumsi isoflavon dengan dosis 40-70 mg/hari tidak mempengaruhi kualitas spermatozoa. Hasil penelitian Astuti (1999) pada tikus jantan menunjukkan sebaliknya, yaitu bahwa pemberian pakan berbasis kedelai (tepung tempe) yang mengandung isoflavon 2,77 mg/ekor/hari selama 45 hari memberikan efek positif terhadap kualitas spermatozoa. Hal tersebut ditandai dengan kecenderungan terjadinya peningkatan motilitas spermatozoa, konsentrasi spermatozoa dan bobot testis. Pemberian isoflavon dalam bentuk isolat isoflavon murni (genistein) pada konsentrasi tinggi menyebabkan pengaruh negatif, yaitu menyebabkan atrofi testis pada dosis 9 mg/ekor/hari (Martin, 1983). Mengingat pengaruh isoflavon terhadap fertilitas jantan masih menimbulkan kontroversi, dipandang perlu untuk dilakukan penelitian lebih lanjut.

Zn diperlukan untuk perkembangan organ reproduksi pria (Taneja *et al.*, 1995). Suplementasi Zn secara oral dilaporkan mampu meningkatkan motilitas spermatozoa pasien astenozoospermia atau oligozoospermia (Hunt *et al.*, 1992) dan meningkatkan jumlah spermatozoa (Oteiza *et al.*, 1995). Zn juga dibutuhkan untuk mempertahankan integritas sel dan stabilisasi membran sel (Taylor *et al.*, 1988). Vitamin E yang berperan sebagai antioksidan dilaporkan juga mampu melindungi spermatozoa terhadap kerusakan peroksidatif dan penurunan motilitas (Therond *et al.*, 1996). Regina & Traber (1999) menyatakan bahwa defisiensi vitamin E pada testis tikus menyebabkan degenerasi epitel tubuli seminiferi dan menghentikan produksi spermatozoa. Pemberian vitamin E secara oral pada pasien astenospermia dilaporkan mampu meningkatkan motilitas spermatozoa secara signifikan (Suleiman *et al.*, 1996).

Sejauh ini, pengaruh isoflavon kedelai yang dikombinasikan dengan Zn dan vitamin E secara *in vivo* terhadap kualitas spermatozoa belum pernah dilaporkan. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengamati ada tidaknya efek sinergi antara tepung kedelai kaya isoflavon, Zn dan vitamin E terhadap

berbagai peubah yang diuji untuk mengetahui fertilitas tikus jantan sebagai model.

MATERI DAN METODE

Bahan Penelitian

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian adalah tepung kedelai kaya isoflavon (TKI) dari perusahaan SoyLife Extra ORFFA BELGIUM NV, Ambachtsstraat 6-B-1840 LONDERZEEL; seng sulfat ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$), dan dl- α -tokoferol asetat (Merck). Kadar lemak pada TKI dikurangi dengan menggunakan heksan sehingga diperoleh TKI rendah lemak (TKI-RL) sesuai dengan penelitian Astuti *et al.* (2008).

Tikus jantan dan betina strain *Sprague Dawley* (SD) umur 21 hari yang diperoleh dari PT Indoanilab Bogor, digunakan untuk studi *in vivo*. Bahan penyusun ransum adalah kasein, mineral *mix*, vitamin *mix*, minyak jagung, selulosa, air dan pati jagung/maizena. Analisis kualitas spermatozoa pada tikus jantan menggunakan NaCl, eosin, nigrosin, giemsa dan metanol. NaCl, alkohol, metanol dan giemsa digunakan untuk mengetahui kondisi estrus dan mendeteksi ada tidaknya spermatozoa pada tikus betina.

Metode Penelitian

Perlakuan hewan percobaan (*in vivo*) dan sampling. Percobaan menggunakan tikus putih jantan dan betina strain *Sprague Dawley* umur sapih (21 hari), masing-masing sebanyak 30 ekor. Adaptasi di lingkungan laboratorium tempat percobaan selama satu minggu. Ransum basal kasein untuk tikus jantan dan betina disusun isonitrogen dan isokalori, kadar protein 15% modifikasi AOAC (1990) dan diberikan *ad libitum*. Bahan penyusun ransum tikus jantan dan tikus betina adalah kasein, mineral *mix*, vitamin *mix*, minyak jagung, selulosa, air dan pati jagung/maizena. Setelah masa adaptasi, tikus jantan dibagi dalam 6 kelompok, yaitu: (1) ransum basal kasein, cekok akuades (kontrol/K), (2) ransum basal kasein; tanpa cekok TKI-RL,

Zn dan vitamin E (N-IZE), (3) ransum basal kasein dengan cekok TKI-RL; tanpa Zn dan vitamin E (I-NZE), (4) ransum basal kasein dengan cekok TKI-RL dan Zn; tanpa vitamin E (IZ), (5) ransum basal kasein dengan cekok TKI-RL dan vitamin E; tanpa Zn (IE), dan (6) ransum basal kasein dengan cekok TKI-RL, Zn dan vitamin E (IZE).

TKI-RL dengan dosis 3 mg/ekor/hari diberikan pada tikus jantan dengan cara dicekok menggunakan sonde lambung, dengan melarutkan TKI-RL dalam 1 ml akuades. Pemberian TKI-RL pada tikus jantan secara *in vivo* dilakukan berdasarkan pengukuran kandungan total senyawa isoflavon TKI-RL. Hasil analisis HPLC menunjukkan terdapat tiga komponen senyawa isoflavon yaitu daidzein, genistein, dan glisitein dengan kandungan total senyawa isoflavon sebesar 2,22 g/100 g bb (Astuti *et al.*, 2008). Pemberian Zn dan vitamin E dilakukan dengan mencampur Zn dan vitamin E ke dalam ransum. Pemberian Zn (elemental) sebesar 6,14 mg/kg ransum dihitung dari $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ sebesar 27 mg/kg ransum, sedangkan vitamin E yang ditambahkan 100 mg/kg ransum. Perlakuan diberikan selama 2 bulan. Ransum yang dikonsumsi ditimbang setiap hari, sedangkan bobot badan tikus jantan ditimbang 2 hari sekali. Ransum yang diberikan pada tikus betina adalah ransum basal kasein yang mengandung $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ sebanyak 27 mg/kg ransum dan vitamin E 100 mg/kg ransum.

Tikus jantan digabung dengan tikus betina pada akhir perlakuan, dengan sistem perkawinan *monogamous mating* (1:1). Usap vagina pada tikus betina dilakukan setiap pagi dengan pewarnaan giemsa untuk mengetahui kondisi estrus dan mendeteksi ada tidaknya spermatozoa. Setelah terdeteksi adanya spermatozoa pada vagina tikus betina (dihitung sebagai H1 kebuntingan), tikus jantan dimatikan dengan dipatahkan tulang leher (*dislocasio cervicalis*). Bagian testis dikoleksi dan dilakukan pengamatan terhadap bobotnya. Kualitas spermatozoa diamati dari bagian *cauda epididimis*. Tikus betina dimatikan pada umur kebuntingan 15 hari (H15) untuk pengamatan terhadap angka konsepsi dan jumlah fetus.

Bobot relatif testis. Pengukuran bobot relatif testis tikus dilakukan terhadap bobot badan tikus [bobot testis (g)/bobot badan (g) x 100%].

Motilitas spermatozoa. Perhitungan motilitas spermatozoa dilakukan dengan metode Partodiharjo (1992). Sperma tikus diambil dari bagian *cauda epididimis* dengan disayat dan dipencet perlahan. Satu tetes sperma ditempatkan pada gelas obyek, ditambah satu tetes larutan NaCl fisiologis 0,9%, dicampur merata menggunakan satu batang gelas steril, dan ditutup gelas penutup. Persentase spermatozoa motil dihitung dalam satu luasan bidang pandang menggunakan mikroskop cahaya pada pembesaran 400x dengan menaksir spermatozoa yang bergerak progresif dari keseluruhan lapangan pandang dan daerah taksir, kemudian dikali 100%.

Konsentrasi spermatozoa. Perhitungan konsentrasi spermatozoa dilakukan dengan metode Partodiharjo (1992) menggunakan *slide* hemositometer. Pipet eritrosit diisi dengan spermatozoa yang belum diencerkan sampai tanda 0,5. Selanjutnya, larutan eosin 0,2% dihisap sampai tanda 101 pada pipet eritrosit. Campuran dikocok hati-hati tetapi cukup cepat menurut angka 8 selama 2-3 menit. Beberapa tetes dibuang dan dikocok lagi, beberapa tetes dibuang lagi, kemudian satu tetes ditempatkan dibawah gelas penutup (*slide*) hemositometer pada ketebalan 0,1 mm. Konsentrasi spermatozoa selanjutnya dihitung pada kamar hitung neubauer.

Sel spermatozoa dalam kamar dihitung menurut arah diagonal (5 kamar). Masing-masing kamar terdapat 80 ruang kecil karena setiap kamar mempunyai 16 ruang kecil. Seluruh gelas hemositometer memiliki 400 ruangan kecil. Volume setiap ruangan kecil adalah 0,1 mm³. Pengenceran 200 kali (101/0,5). Jika dalam 5 kamar atau 80 ruang kecil terdapat Z spermatozoa, maka konsentrasi spermatozoa yang diperiksa adalah :

$$Z \times 400/80 \times 10 \times 200 = 10000 =$$

$$Z \times 0,01 \text{ juta spermatozoa per mm}^3$$

atau:

$$Z \times 10 \text{ juta sperma per ml} =$$

$$Z \times 10^7 \text{ spermatozoa/ml}$$

Morfologi abnormalitas spermatozoa. Satu tetes suspensi spermatozoa dibuat sediaan ulas, difiksasi dengan metanol dan diwarnai dengan teknik pewarnaan giemsa. Pemeriksaan morfologi abnormalitas spermatozoa dilakukan berdasarkan jumlah spermatozoa normal dan abnormal (Partodiharjo, 1992).

Abnormalitas spermatozoa =

$$\frac{\Sigma \text{ spermatozoa abnormal} \times 100\%}{\Sigma \text{ spermatozoa abnormal} + \text{normal}}$$

Angka konsepsi dan jumlah fetus pada tikus betina. Terjadinya kopulasi diamati dengan terdeteksinya spermatozoa pada vagina tikus betina dan dihitung sebagai hari pertama kebuntingan. Tikus betina dimatikan pada umur kebuntingan 15 hari (H15) dengan cara mematahkan tulang leher (*dislocasio cervicalis*). Jumlah tikus betina bunting (dalam persen) dinyatakan sebagai angka kebuntingan (angka konsepsi), serta dilakukan penghitungan terhadap jumlah fetus pada uterus kiri dan kanan.

Analisis Data

Data diolah dengan sidik ragam menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) untuk mengetahui pengaruh perlakuan terhadap peubah yang diuji. Data yang menunjukkan pengaruh nyata selanjutnya diuji dengan *duncan multiple range test* (DMRT) untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Bobot Badan dan Konsumsi Ransum Tikus Jantan Selama Perlakuan

Tikus jantan mengalami penambahan bobot badan selama masa perlakuan yaitu sebesar 3,68 g/hari pada kelompok kontrol/K, 2,95 g/hari pada kelompok N-IZE, 4,25 g/hari pada kelompok I-NZE, 3,47 g/hari pada kelompok IZ, 3,91 g/hari pada kelompok IE, dan 3,45 g/hari pada kelompok IZE (Gambar 1). Jumlah pakan yang dikonsumsi berturut-turut untuk kelompok kontrol/K, N-IZE, I-NZE, IZ, IE dan IZE adalah 13,05; 11,74; 13,59; 12,61;

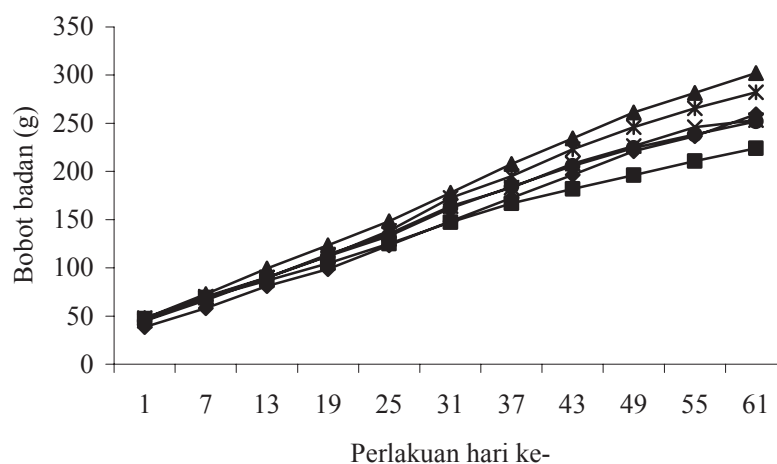
13,16 dan 12,10 g/hari. Hal ini menunjukkan bahwa keenam kelompok tikus jantan dalam kondisi sehat selama perlakuan. Secara umum, nampak bahwa peningkatan bobot badan berlangsung secara normal, dan bobot badan keenam kelompok tikus meningkat sampai akhir penelitian.

Pengaruh Jenis Ransum terhadap Kualitas Spermatozoa

Secara keseluruhan, kualitas spermatozoa akibat pemberian ransum meliputi motilitas, konsentrasi dan abnormalitas, serta bobot relatif testis tikus jantan terdapat pada Tabel 1. Hasil analisis menunjukkan bahwa kelompok IZE dan IE menghasilkan motilitas spermatozoa yang nyata paling tinggi ($P < 0,05$) bila dibandingkan kelompok lain, sedangkan motilitas spermatozoa terendah dihasilkan kelompok N-IZE. Perbedaan motilitas spermatozoa tidak terlihat pada kelompok K, I-NZE dan IZ. Hasil analisis konsentrasi spermatozoa menunjukkan bahwa konsentrasi terendah dihasilkan kelompok N-IZE, sedangkan kelompok IZE menghasilkan konsentrasi yang paling tinggi ($P < 0,05$) bila dibanding kelompok lain. Perbedaan konsentrasi spermatozoa pada kelompok K, I-NZE dan IZ tidak terlihat. Evaluasi terhadap abnor-

malitas spermatozoa memperlihatkan bahwa abnormalitas N-IZE lebih tinggi ($P < 0,05$) bila dibanding kelompok lainnya. Tidak terlihat pengaruh nyata antar perlakuan terhadap bobot relatif testis (Tabel 1).

Motilitas spermatozoa sangat tergantung pada suplai energi berupa ATP hasil metabolisme. Metabolisme akan berlangsung dengan baik apabila membran plasma sel berada dalam keadaan yang utuh, sehingga mampu mengatur lalu lintas masuk dan keluar substrat dan elektrolit yang dibutuhkan dalam proses metabolisme. Spermatozoa membutuhkan energi (ATP) untuk memperoleh kemampuan gerak, yang diperoleh dari proses respirasi (glikolisis atau fruktolisis) dalam mitokondria pada bagian *midpiece* spermatozoa, sedangkan bagian *principal piece* dan *end piece* berfungsi dalam pergerakan spermatozoa. Setelah disintesa di dalam mitokondria, ATP ditransportasikan ke aksonem pada bagian ekor spermatozoa, selanjutnya dikonversikan oleh dinein (enzim ATPase) pada aksonem yang akan menguraikan ATP menjadi energi untuk pergerakan spermatozoa (Bourgeron, 2000). Terhambatnya pelepasan ATP ke bagian aksonem mengakibatkan tidak terpenuhinya atau berkurangnya kebutuhan energi untuk menggerakkan ekor, selanjutnya mengakibatkan spermatozoa tidak



Gambar 1. Bobot badan tikus jantan selama perlakuan dengan ransum basal kasein: kontrol (◆); tanpa cekok TKI-RL, Zn dan vitamin E (■); cekok TKI-RL, tanpa Zn dan vitamin E (▲); cekok TKI-RL dan Zn, tanpa vitamin E (x); cekok TKI-RL dan vitamin E, tanpa Zn (*); cekok TKI-RL, Zn dan vitamin E (●).

Tabel 1. Rataan kualitas spermatozoa tikus setelah 2 bulan perlakuan

Perlakuan	Motilitas spermatozoa (%)	Konsentrasi spermatozoa (juta/ml)	Abnormalitas spermatozoa (%)	Bobot relatif testis (%)
K	73,50±2,24 ^b	1137,50±20,69 ^b	8,09±0,44 ^b	0,56±0,03 ^a
N-IZE	66,50±4,18 ^a	1182,50±65,31 ^a	13,49±1,59 ^a	0,53±0,04 ^a
I-NZE	73,00±2,74 ^b	1359,75±68,68 ^b	9,40±0,93 ^b	0,57±0,04 ^a
IZ	74,00±4,18 ^b	1377,50±66,97 ^b	8,58±0,76 ^b	0,57±0,03 ^a
IE	78,00±2,74 ^c	1485,00±88,12 ^c	8,75±1,00 ^b	0,55±0,04 ^a
IZE	79,50±1,12 ^c	1636,90±87,95 ^d	9,00±0,70 ^b	0,55±0,03 ^a

Keterangan: superskrip berbeda pada kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata ($P < 0,05$); K=ransum basal kasein, cekok aquadest (kontrol); N-IZE=ransum basal kasein, tanpa cekok TKI-RL, Zn dan vitamin E; I-NZE=ransum basal kasein dengan cekok TKI-RL, tanpa Zn dan vitamin E; IZ=ransum basal kasein dengan cekok TKI-RL dan Zn, tanpa vitamin E; IE=ransum basal kasein dengan cekok TKI-RL dan vitamin E, tanpa Zn; IZE=ransum basal kasein dengan cekok TKI-RL, Zn dan vitamin E.

dapat bergerak cepat atau tidak bergerak sama sekali (Asmarinah, 2005).

Hafez & Hafez (2000) menyatakan bahwa faktor endogen yang mempengaruhi motilitas spermatozoa antara lain persediaan energi (ATP), pematangan spermatozoa serta integritas membran sel, sedangkan faktor ekso-gen dari nutrisi yang mempengaruhi motilitas spermatozoa adalah ketersediaan ion anorganik (Cu, Zn, Mn). Oleh karena itu, Zn merupakan salah satu mineral penting yang dibutuhkan untuk motilitas spermatozoa. Hidiroglou & Knipfel (1984) menyatakan bahwa kontrol motilitas spermatozoa oleh Zn meliputi penggunaan dan pengaturan energi melalui sistem ATP yang dibutuhkan untuk kontraksi/pergerakan spermatozoa, sehingga Zn esensial untuk mekanisme aksi dari sistem ATP yang terlibat dalam kontraksi fibriler. Zn dilaporkan terlibat dalam katabolisme lipida yang merupakan sumber energi utama yang dibutuhkan untuk pergerakan spermatozoa.

Mitokondria sebagai pusat respirasi adalah organel sel spermatozoa yang memproduksi energi dalam bentuk ATP (Agarwal *et al.*, 2005). Struktur internal dan respirasi mitokondria yang tidak sempurna sebagai organel sel spermatozoa yang memproduksi energi dalam bentuk ATP mengakibatkan terganggu-

nya proses metabolisme sel spermatozoa dan menurunkan motilitas spermatozoa (Kao *et al.*, 1998; O'Connell *et al.*, 2002). Membran plasma mitokondria spermatozoa tersusun oleh asam lemak tidak jenuh yang bersifat sangat rentan terhadap oksidasi. Sekitar 50% asam lemak tidak jenuh yang ditemukan dalam sebuah sel spermatozoa adalah dekosa-heksaenoat (DHA) yang bersifat sangat rentan terhadap oksidasi dan mudah mengalami kerusakan akibat reaksi berantai antara radikal bebas dengan asam lemak tidak jenuh sehingga meningkatkan peroksidasi lipida (Sanocka & Kurpisz, 2004). Peroksidasi lipida dilaporkan Villegas *et al.* (2003) berkorelasi dengan penurunan fosforilasi protein pada aksonem dan berkurangnya ATP intrasel. Menurut Tremellen (2008), terjadinya proses peroksidasi pada spermatozoa akan diikuti oleh perubahan struktur membran plasma spermatozoa sehingga mengubah kestabilan dan fungsi membran, serta menurunkan fluiditas membran spermatozoa. Rusaknya membran plasma mitokondria spermatozoa mengakibatkan terganggunya metabolisme sel spermatozoa, sehingga menyebabkan penurunan motilitas spermatozoa.

Terbentuknya radikal peroksi lipida dapat dihentikan oleh antioksidan yang mempunyai kemampuan memutus reaksi berantai yaitu

vitamin E, atau antioksidan yang mampu berperan sebagai penangkap (scavenger) radikal bebas seperti isoflavon. Sebagai antioksidan, vitamin E berperan dalam memperlambat berlangsungnya reaksi peroksidasi lipida karena mampu menangkap radikal bebas dan memutus berantai proses peroksidasi lipida di dalam membran sel. Aksi vitamin E adalah dengan menyumbangkan satu atom hidrogen dari gugus OH pada cincinnya ke radikal bebas yang dibutuhkan untuk menstabilkan sebuah elektron yang tidak berpasangan akibat pembentukan radikal bebas. Hal ini menyebabkan terbentuknya radikal vitamin E yang stabil dan tidak merusak, serta menghentikan reaksi rantai propagasi yang bersifat merusak pada proses peroksidasi lipida (Almatsier, 2002; Landvik *et al.*, 2002). Suleiman *et al.* (1996) melaporkan bahwa vitamin E memainkan peran penting dalam menurunkan peroksidasi lipida dan melindungi spermatozoa dari kerusakan oksidatif; dan dibutuhkan untuk memelihara integritas membran spermatozoa (Therond *et al.*, 1996).

Sebagai salah satu kelompok flavonoid, mekanisme isoflavon untuk berperan sebagai antioksidan adalah melalui penangkapan (scavenger) radikal bebas secara langsung (Nijveldt *et al.*, 2001; Amic *et al.*, 2003; Heim *et al.*, 2002). Awalnya, flavonoid teroksidasi oleh senyawa radikal, kemudian berubah menjadi stabil karena bereaksi dengan radikal flavonoid lain sehingga membentuk senyawa radikal fenoksil yang kurang reaktif, sehingga reaktivitas radikal bebas dapat diredam.

Kelima perlakuan menghasilkan motilitas yang lebih tinggi dibanding kelompok N-IZE. Hal ini diduga karena rendahnya kadar Zn dan vitamin E dalam ransum, serta tidak adanya isoflavon yang mampu berperan sebagai antioksidan untuk mencegah oksidasi pada membran sel spermatozoa pada kelompok N-IZE. Hal ini menyebabkan kerusakan membran sel dan mengganggu proses metabolisme sel spermatozoa akibat rusaknya membran sel spermatozoa, yang meningkatkan proses peroksidasi lipida sehingga motilitas spermatozoa menurun. Tingginya proses peroksidasi lipida juga

dilaporkan oleh Sanocka & Kurpisz (2004) dapat mengganggu proses spermatogenesis. Terganggunya proses spermatogenesis pada kelompok N-IZE diduga menyebabkan gangguan produksi spermatozoa, sehingga akhirnya juga mengakibatkan berkurangnya konsentrasi spermatozoa.

Motilitas dan konsentrasi spermatozoa kelompok I-NZE dan IZ tidak berbeda dengan kelompok yang dalam ransumnya hanya diberi Zn dan vitamin E saja (kontrol), namun lebih rendah dibandingkan kelompok tikus yang mendapat kombinasi ketiganya (IZE). Hal ini menunjukkan bahwa pemberian cekok TKI-RL secara tunggal (I-NZE), cekok TKI-RL dengan Zn (IZ), atau Zn dan vitamin E saja (kontrol) belum mampu menghambat proses peroksidasi lipida akibat oksidasi oleh radikal bebas sehingga kerusakan membran plasma mitokondria spermatozoa juga tidak dapat dicegah, proses spermatogenesis tidak dapat dihambat, sehingga produksi spermatozoa terganggu.

Kombinasi cekok TKI-RL, Zn dan vitamin E pada kelompok IZE diduga mampu menetralkan lebih banyak radikal bebas yang terbentuk. Hal ini disebabkan oleh terjadinya interaksi secara sinergis antara isoflavon dan vitamin E yang dapat bertindak sebagai antioksidan, didukung oleh peran Zn dalam mempertahankan integritas sel (Corah, 1996) dan stabilisasi membran sel (Taylor *et al.*, 1988), sehingga kombinasi ketiganya bekerja lebih baik dalam menghambat dan mencegah terbentuknya hasil peroksidasi lipida asam lemak tidak jenuh. Pencegahan peroksidasi lipida akibat pemberian secara lengkap TKI-RL, Zn dan vitamin E menyebabkan proses spermatogenesis menjadi tidak terhambat, dan produksi spermatozoa tidak terganggu, sehingga mengakibatkan kelompok IZE menghasilkan motilitas dan konsentrasi spermatozoa yang lebih tinggi dibanding kelima perlakuan yang lain.

Pemeriksaan terhadap morfologi spermatozoa diperlukan dalam penilaian kualitasnya. Setiap ejakulat terdapat beberapa spermatozoa yang abnormal. Semen dengan proporsi abnor-

malitas yang tinggi memberikan hasil fertilitas yang rendah. Evaluasi terhadap abnormalitas spermatozoa memperlihatkan bahwa abnormalitas N-IZE nyata lebih tinggi ($P < 0,05$) bila dibanding kelompok lainnya. Kisaran abnormalitas akibat perlakuan antara 8,09%-13,49%. Menurut Toelihere (1985), spermatozoa yang mengalami kelainan morfologi (abnormalitas) kurang dari 20% masih dianggap normal. Mengacu pada kriteria tersebut, keenam kelompok tikus perlakuan memiliki spermatozoa pada kategori normal.

Hasil pengamatan terhadap bobot relatif testis menunjukkan tidak ada pengaruh yang nyata antar perlakuan. Pemberian pakan pada tikus jantan dengan jumlah kasein dan kadar protein yang tinggi (15%), serta cekok TKI-RL, Zn dan vitamin E secara tunggal, kombinasi keduanya maupun pemberian secara lengkap mendukung berlangsungnya perkembangan organ-organ tubuh secara normal, sehingga tidak mempengaruhi bobot testis pada keenam kelompok tikus perlakuan. Perlakuan cekok TKI-RL pada dosis 3 mg/ekor/hari diduga masih tergolong dalam konsentrasi rendah sehingga tidak mempengaruhi bobot testis. Menurut Martin (1983), atrofi testis pada mencit terjadi apabila genistein (salah satu komponen isoflavon) diberikan dalam bentuk isolat isoflavon murni pada dosis 9 mg/ekor/hari.

Angka Konsepsi dan Jumlah Fetus pada Tikus Betina

Kemampuan fungsional spermatozoa adalah kemampuan spermatozoa untuk melakukan fertilisasi. Uji fungsional spermatozoa secara *in vivo* pada hewan percobaan dilakukan dengan cara mengawinkan jantan dengan betina dewasa. Hasil penelitian menunjukkan bahwa semua tikus betina yang dikawinkan dengan keenam tikus jantan perlakuan menghasilkan angka konsepsi 100% (Tabel 2). Tikus betina yang digunakan untuk melihat fertilitas tikus jantan mendapat kasein sebagai sumber protein ransum dalam jumlah dan kadar yang tinggi (15%), dan selama percobaan berada dalam kondisi sehat. Sumber protein ransum yaitu kasein dengan kualitas, jumlah dan kadar yang tinggi (15%) diduga menyebabkan keberhasilan fertilisasi pada keenam jantan. Menurut Baker (1979), kadar protein ransum dari sumber protein hewani sebesar 10% telah mencukupi untuk proses reproduksi dan pertumbuhan tikus.

Kelompok tikus jantan perlakuan mendapat TKI-RL bentuk tunggal, atau kombinasi dengan Zn atau vitamin E. Angka konsepsi 100% juga terlihat pada tikus betina yang dikawinkan dengan tikus jantan kelompok N-IZE yang tidak dicekok TKI-RL dan dalam ransum-

Tabel 2. Angka konsepsi (%) dan jumlah anak pada tikus betina

Ransum perlakuan (jantan)	Angka konsepsi	Jumlah anak
Ransum basal kasein, cekok aquades (kontrol)	100	10,40±1,82 ^a
Ransum basal kasein, tanpa cekok TKI-RL, Zn dan vitamin E (N-IZE)	100	9,60±1,14 ^a
Ransum basal kasein dengan cekok TKI-RL, tanpa Zn dan vitamin E (I-NZE)	100	10,80±2,28 ^a
Ransum basal kasein dengan cekok TKI-RL dan Zn, tanpa vitamin E (IZ)	100	11,40±1,52 ^a
Ransum basal kasein dengan cekok TKI-RL dan vitamin E, tanpa Zn (IE)	100	9,40±2,30 ^a
Ransum basal kasein dengan cekok TKI-RL, Zn dan vitamin E (IZE)	100	11,00±0,71 ^a

Keterangan: superskrip berbeda pada kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata ($P < 0,05$).

nya tidak diberi Zn dan vitamin E. Tikus jantan kelompok N-IZE diduga tidak berada pada kondisi defisien Zn dan vitamin E yang sangat ekstrim. Tikus N-IZE kemungkinan masih mendapat asupan Zn yang berasal dari kasein sebagai sumber protein ransum, serta mendapat vitamin E yang terkandung dalam minyak jagung sebagai komponen penyusun ransum. Namun demikian, Zn dan vitamin E mungkin terdapat pada konsentrasi rendah. Perlakuan pada tikus jantan tidak menunjukkan pengaruh yang nyata terhadap jumlah fetus pada tikus betina.

KESIMPULAN

Terjadi interaksi secara sinergis antara tepung kedelai kaya isoflavon, Zn dan vitamin E pada tikus jantan yang mengakibatkan peningkatan motilitas dan konsentrasi spermatozoa. Pemberian tepung kedelai kaya isoflavon, Zn dan vitamin E pada tikus jantan tidak berpengaruh terhadap bobot testis, serta angka kebuntingan dan jumlah fetus pada tikus betina. Fertilitas tikus jantan terbaik adalah perlakuan dengan pemberian secara lengkap: tepung kedelai kaya isoflavon dengan dosis isoflavon 3 mg/ekor/hari, Zn 6,14 mg/kg ransum, dan vitamin E 100 mg/kg ransum.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai oleh Program Hibah Bersaing XIV DIKTI, Departemen Pendidikan Nasional RI.

DAFTAR PUSTAKA

- AOAC.** 1990. Official Methods of Analysis of the AOAC. AOAC, Inc. Arlington, Virginia.
- Agarwal, A., S.A. Prabakaran, & T.M. Said.** 2005. Prevention of oxidative stress injury to sperm. *J. Androl* 26: 654-669.
- Almatsier, S.** 2002. Prinsip Dasar Ilmu Gizi. PT Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Amic, D., D. Beslo & N. Trinajstic.** 2003. Structure-radical scavenging activity relationship of flavonoids. *Croat Chem. Acta* 76:56-61.
- Asmarinah.** 2005. Mutasi gen pada pria infertil dengan astenozoospermia. Di dalam Buku Kumpulan Makalah/Abstrak. *Andrologi: Sesuatu yang Hilang dalam Kesehatan Reproduksi untuk Meningkatkan Kualitas Hidup Manusia. Kongres Pandi IX dan Kongres Persandi I.* 19-23 April. Jakarta.
- Astuti, S.** 1999. Pengaruh tepung kedelai dan tempe dalam ransum terhadap fertilitas tikus percobaan. Tesis. Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Astuti, S., D. Muchtadi, M. Astawan, B. Purwantara & T. Wresdiyati.** 2008. Kadar peroksida lipid dan aktivitas superoksida dismutase (SOD) testis tikus yang diberi tepung kedelai kaya isoflavon, seng (Zn) dan vitamin E. *Majalah Kedokteran Bandung* 40(2) (In Press).
- Baker, D.E. J.** 1979. Reproduction and Breeding. In: H.J. Baker, J.R. Lindsey & S.H. Weisbroth (Eds.). *The Laboratory Rat. Vol I. Biology and Diseases.* Academic Press Inc., San Diego.
- Bourgeron, T.** 2000. Mitochondrial function and male fertility. *Results Probl. Cell Differ.* 28: 187-210.
- Corah, L.** 1996. Trace mineral requirement of grazing cattle. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 59:61-70.
- Habito, R.C., J. Montalto, E. Leslie & M.J. Ball.** 2000. Effect of replacing meat with soybean in the diet on sex hormone concentration in healthy adult males. *Br. J. Nutr.* 84:557-563.
- Hafez, B. & E.S.E. Hafez.** 2000. Reproduction in Farm Animals. Lea and Febiger, Philadelphia.
- Heim K.E., A.R. Tagliaferro & D.J. Bobilya.** 2002. Flavonoid: chemistry, metabolism and structure-activity relationship. *J. Nutr. Biochem.* 13:572-584.
- Hidiroglou, M. & J.E. Knipfel.** 1984. Zinc in mammalian sperm: a review. *J. Dairy Sci.* 67:11476-1156.
- Hunt, C.D., P.E. Johnson, J.L. Herbel & L.K. Mullen.** 1992. Effects of dietary zinc depletion on seminal volume and zinc loss, serum testosterone concentrations, and sperm morphology in young men. *Am. J. Clin. Nutr.* 56:148-157.
- Kao, S. H., H.T. Chao & Y.H. Wei.** 1998. Multiple deletions of mitochondrial DNA are associated with the decline of motility and fertility of human spermatozoa. *Mol. Hum. Reprod.* 4:657-666.
- Landvik, S.V., A.T. Diplock & L. Packer.** 2002. Efficacy of Vitamin E in Human Health and Disease. In: E. Cadenas & L. Packer (Eds).

- Handbook of Antioxidants. Marcel Dekker, Inc., New York. p.75-90.
- Martin, S.** 1983. Naturally Occuring Food Toxicans: Estrogens. In: Miloslav, R. Jr (eds). Handbook of Naturally Occuring Food Toxicans. CRC Press, Boca Raton Florida.
- Mitchell, J.H., C. Elizabeth, D. Kinniburgh, A. Provan, A.R. Collins & D.S. Irvine.** 2001. Effect of a phytoestrogen food supplement on reproductive health in normal males. Clin. Sci. 100:613-618.
- Nagata, C., N. Takatsuka, H. Shimizu, H. Hayashi, T. Akamatsu & K. Murase.** 2001. Effect of soymilk consumption on serum estrogen and androgen concentrations in Japanese men. Cancer. Epidemiol. Biom. Prev. 10:178-184.
- Nijveldt, R.J., E. van Nood, D.E.C van Hoorn, P.G. Boelens, K. Van Norren & P.A.M. van Leeuwen.** 2001. Flavonoids: a review of probable mechanism of action and potential applications. Am. J. Clin. Nutr. 74:418-425.
- O'Connell M., N. McClure, S.E. Lewis.** 2002. Mitochondrial DNA deletions and nuclear DNA fragmentation in testicular and epididymal human sperm. Hum. Reprod. 17:1565-1570.
- Oteiza, P.I., K.L. Olin, C.G. Fraga & C.L. Keen.** 1995. Zinc deficiency causes oxidative damage to proteins, lipids and DNA in rat testes. J. Nutr. 125:823-929.
- Partodihardjo, S.** 1992. Ilmu Reproduksi Hewan. Mutiara Sumber Widya, Jakarta
- Regina, B.F. & M.G. Traber.** 1999. Vitamin E: function and metabolism. Faseb J. 13:1145-1155.
- Saleh R.A. & A. Agarwal.** 2002. Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. J. Androl. 23:737-752.
- Sanocka, D. & M. Kurpisz.** 2004. Reactive oxygen species and sperm cells. Reprod. Biol. Endocrinol. 2:12.
- Sikka, S.C.** 2004. Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. J. Androl. 25:5-18.
- Suleiman, S.A., M.E. Ali, Z.M. Zaki, E.M. el-Manik & M.A. Nasr.** 1996. Lipid peroxidation and human sperm motility: protective role of vitamin E. J. Androl. 17:530-537.
- Taneja, S.K., S. Chadha & P. Arya.** 1995. Lipid-zinc interaction: its effect on the testes of mice. Br. J. Nutr. 73:723-731.
- Taylor, C.G., W.J. Bettger & T.M. Bray.** 1988. Effect of dietary zinc or copper deficiency on the primary free radical defense system in rats. J. Nutr. 118:613-621.
- Toelihere, M.R.** 1985. Fisiologi Reproduksi pada Ternak. Angkasa, Bandung.
- Toda, S. & Y. Shirataki.** 1999. Inhibitory effect of isoflavones on lipid peroxidation by reactive oxygen species. Phytother. Res. 13:163-165.
- Therond, P., J. Auger, A. Legrand & P. Jouannet.** 1996. Alpha-tocopherol in human spermatozoa and seminal plasma relationship with motility antioxidant enzymes and leukocytes. Mol. Hum. Reprod. 2: 739-744.
- Tremellen, K.** 2008. Oxidative stress and male infertility – a clinical perspective. Hum. Reprod. Update 14:243-258.
- Villegas, J., K. Kehr, L. Soto, R. Henkel, W. Miska & R. Sanchez.** 2003. Reactive oxygen species induce reversible capacitation in human spermatozoa. Androlog 35:227-232.