

IR - PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

TESIS

**EFEK PEMBERIAN VITAMIN E (α TOCOPHEROL) PADA
PERUBAHAN MOTILITAS DAN MORFOLOGI SPERMA TIKUS
STRAIN *SPRAGUE DAWLEY* YANG TERPAPAR CISPLATIN
(Penelitian Prospektif Eksperimental)**



Dimas Visa Aditya

PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN KLINIK JENJANG MAGISTER

FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS AIRLANGGA

SURABAYA

2018

TESIS

EFEK PEMBERIAN VITAMIN E (α TOCOPHEROL) PADA
PERUBAHAN MOTILITAS DAN MORFOLOGI SPERMA TIKUS
STRAIN *SPRAGUE DAWLEY* YANG TERPAPAR CISPLATIN
(Penelitian Prospektif Eksperimental)



Dimas Visa Aditya

011318196304

PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN KLINIK JENJANG MAGISTER

FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS AIRLANGGA

SURABAYA

2018

TESIS

Untuk Memperoleh Gelar **Magister Kedokteran Klinik**

dalam

PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN KLINIK JENJANG MAGISTER

FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS AIRLANGGA

Oleh:

Dimas Visa Aditya, dr.

PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN KLINIK JENJANG MAGISTER

FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS AIRLANGGA

SURABAYA

2018

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Tesis ini adalah hasil karya saya sendiri, dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk telah saya nyatakan dengan benar.

Nama : Dimas Visa Aditya

NIM : 011318196304

Tanda Tangan :



Tanggal : 15 November 2018

TESIS INI TELAH DISETUJUI PADA TANGGAL 15 NOVEMBER 2018

Oleh:

Pembimbing I



DR. dr. Tarmono, Sp.U (K)
NIP. 19620604 198812 1 002

Pembimbing II



Prof. DR. Doddy M. Soebadi, dr., Sp.B, Sp.U (K)
NIP. 19490906 197703 1 001

Mengetahui,
Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Klinik Jenjang Magister



Dr. Aditiawarman, dr., Sp. OG(K)
NIP. 19581101 198610 1 002

Halaman Pengesahan Panitia Penguji Tesis

Tesis ini diajukan oleh

Nama : Dimas Visa Aditya

NIM : 011318196304

Program Studi : Urologi

Judul :

EFEK PEMBERIAN VITAMIN E (α *TOCOPHEROL*) PADA PERUBAHAN MOTILITAS DAN MORFOLOGI SPERMA TIKUS *STRAIN SPRAGUE DAWLEY* YANG TERPAPAR CISPLATIN

Tesis ini telah diuji dan dinilai

Oleh panitia penguji pada

PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN KLINIK JENJANG MAGISTER Universitas

Airlangga

Pada Tanggal 15 November 2018

Panitia Penguji

Ketua	: Dr. Wahjoe Djatisoesanto, dr., Sp.U (K)	()
Anggota	: Prof. Dr. Doddy M. Soebadi, dr., Sp.B., Sp.U (K)	()
Penguji 1	: Dr. Tarmono, dr., Sp. U (K)	()
Penguji 2	: Prof. Dr. I Ketut Suidiana, Drs., M.Si	()
Penguji 3	: Budiono, dr., M. Kes	()

KATA PENGANTAR

Dengan mengucapkan puji syukur kehadirat Tuhan Yang Maha Esa, yang berkat rahmat dan karuniaNya, saya dapat menyelesaikan karya akhir ini. Saya sadar sepenuhnya semua ini dapat terlaksana dengan baik atas bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, oleh karena itu dengan hati yang tulus saya haturkan rasa terima kasih yang sedalam-dalamnya kepada:

1. Rektor Universitas Airlangga Surabaya, Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya, Direktur Rumah Sakit Umum Daerah Dr. Soetomo Surabaya, serta Ketua Program Pendidikan Dokter Spesialis I Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya yang telah memberikan kesempatan dan kepercayaan kepada saya untuk mengikuti dan menyelesaikan program pendidikan dokter spesialis I ini.
2. Kepala Departemen Urologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga / RSUD Dr. Soetomo Surabaya **Dr. Wahdjoe Djatisoesanto, dr., Sp.U (K)** yang telah memberikan kesempatan, bimbingan dan dorongan selama saya mengikuti pendidikan.
3. Koordinator Program Studi Urologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga / RSUD Dr. Soetomo Surabaya **Lukman Hakim, dr., Sp.U., MARS., PhD**, atas segala arahan, bimbingan dan asuhan terhadap saya selama pendidikan.
4. Koordinator Penelitian dan Guru Besar Departemen Urologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga **Prof. Dr. Doddy M Soebadi, dr., Sp.B., Sp.U (K)** sebagai pembimbing dalam penelitian ini yang dengan penuh perhatian telah memberikan bantuan, dorongan, petunjuk serta koreksi atau saran perbaikan kepada saya sehingga akhirnya karya akhir penelitian ini dapat diselesaikan.
5. **Dr. Tarmono, dr., Sp.U** sebagai pembimbing dalam penelitian ini dan dosen pengampu, yang telah memberikan dorongan, bimbingan dan saran yang bermanfaat untuk penyelesaian penelitian ini.
6. **Budiono, dr., MKES** yang telah meluangkan waktu untuk memberikan bimbingan serta membantu saya dalam memecahkan masalah statistik sampai selesainya penulisan karya akhir penelitian ini.
7. **Para Guru Besar dan seluruh staf pengajar Departemen Urologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga / RSUD DR. Soetomo Surabaya**, yang telah mendidik, membimbing serta membantu saya selama mengikuti masa pendidikan, saya ucapkan terima kasih dan rasa hormat sebesar-besarnya atas segala yang telah diberikan.
8. **Dr. Widjiati, drh., M.Si.** sebagai konsultan penelitian dari Fakultas Kedokteran Hewan yang telah membantu memberikan saran, menyiapkan

prasarana dan sarana penelitian dan teknis pelaksanaan hewan coba serta kelancaran penelitian ini.

9. **Teman-teman sejawat PPDS I** Departemen Urologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga atas kerja sama yang diberikan selama masa pendidikan ini.
10. Teman-teman PPDS I Urologi periode Juli 2013 Achmad Nugroho dr., Widya Sakti P. dr., Ananta Cahyo dr., Hasroni Fathurrahman dr., yang selalu memberikan rasa kebersamaan dan kekompakan selama masa pendidikan ini.
11. Teman sejawat grup penelitian Achmad Nugroho dan Dian Kartika R. atas kerja sama, inspirasi, masukan serta saran yang membangun dalam menyelesaikan penelitian ini.
12. Ayah & Ibu mertua saya Rochmanto dan T. Handayanti beserta saudara ipar saya Dian Permanasari serta Imam Caca Setiawan yang telah banyak membantu dan mendukung saya selama masa pendidikan ini.

Akhirnya saya ucapkan terima kasih yang setulus-tulusnya kepada kedua orang tua saya, yang saya hormati dan cintai Mariono dan Iriani S.Apt, yang dengan penuh kesabaran dan kasih sayang telah mendidik saya dan juga kepada istri saya tercinta Intan Pangastuti dr, yang selalu membantu dan mendukung saya dan memberikan semangat selama masa pendidikan ini. Kakak saya Lengkung Kusumo dr., Pramadita Wara Nandhini dr. Sp.M dan adik – adik saya Nino Mayang Sari drg. Sp. Pros., Rio Pandu Jatmiko S.H. dan Nonidha Tindie yang telah memberikan dorongan dan semangat serta do'a sehingga saya dapat menyelesaikan program pendidikan ini.

Akhir kata sebagai manusia biasa yang tak lepas dari segala kekurangan dan kesalahan, saya mohon maaf yang sebesar-besarnya apabila ada kesalahan dalam pembuatan karya kahir ini dan segala kritik dan saran yang sifatnya membangun akan saya terima dengan senang hati.

Semoga Allah S.W.T selalu melimpahkan rahmat dan karuniaNya kepada kita semua.

Surabaya, 15 November 2018

Dimas Visa Aditya

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR
UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademik Universitas Airngga, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Dimas Visa Aditya, dr.
NIM : 011318196304
Program Studi : ILMU KEDOKTERAN KLINIK JENJANG MAGISTER
Departemen : Urologi
Fakultas : Kedokteran Universitas Airlangga
Jenis karya : Tesis

demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Airlangga **Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty-Free Right*)** atas karya ilmiah saya yang berjudul:

**EFEK PEMBERIAN VITAMIN E (α TOCOPHEROL) PADA
PERUBAHAN MOTILITAS DAN MORFOLOGI SPERMA TIKUS
STRAIN *SPRAGUE DAWLEY* YANG TERPAPAR CISPLATIN**

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Airlangga berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan mempublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya

Dibuat di Surabaya

Pada tanggal 15 November 2018

Yang menyatakan



Dimas Visa Aditya, dr.

**EFEK PEMBERIAN VITAMIN E (α TOCOPHEROL) PADA
PERUBAHAN MOTILITAS DAN MORFOLOGI SPERMA TIKUS
STRAIN *SPRAGUE DAWLEY* YANG TERPAPAR CISPLATIN**

Dimas Visa Aditya¹, Tarmono¹, Doddy M. Soebadi¹

¹ Departemen Urology, Fakultas Kedokteran, Universitas Airlangga – RSUD Dr Soetomo Surabaya

ABSTRAK

Tujuan: Untuk mengevaluasi efek protektif dari isomer α -tocopherol vitamin E terhadap toksisitas cisplatin pada motilitas sperma dan morfologi pada tikus Sprague Dawley.

Bahan dan Metode: Dua puluh empat sampel dibagi secara acak menjadi 4 kelompok (n=6). Kelompok kontrol (CN) mendapat injeksi *normal saline* 0.9% 1 cc, kelompok kedua (CP) diberikan injeksi cisplatin 5 mg/kgBB, kelompok ketiga (P1) diberikan injeksi cisplatin 5 mg/kgBB dan vitamin E 50 mg/kgBB, kelompok keempat (P2) diberikan vitamin E 200 mg/kgBW selama 7 minggu per sonde dan injeksi cisplatin 5 mg/kgBW di minggu ketiga, 1x i.p. Vitamin E diberikan dari 3 minggu sebelum injeksi cisplatin dan 4 minggu sesudahnya. Di akhir minggu ke 7 dilakukan orkidektomi analisa sperma. Vitamin E yang digunakan pada penelitian ini adalah isomer α -tocopherol.

Hasil: Cisplatin menurunkan motilitas dan morfologi yang signifikan terhadap kelompok kontrol. Vitamin E 50 mg/kgBB dan 200 mg/kgBB meningkatkan motilitas sel sperma secara signifikan ($p<0.05$) dibandingkan dengan kelompok dengan perlakuan cisplatin saja. Pada aspek morfologi sperma, Vitamin E 50 mg/kgBB dan 200 mg/kgBB meningkatkan morfologi sperma secara signifikan dibandingkan dengan kelompok yang hanya diberikan cisplatin. Vitamin E 50 mg/kgBB dan 200 mg/kgBB tidak memiliki perbedaan yang signifikan terhadap peningkatan morfologi sperma dibandingkan dengan kelompok kontrol.

Simpulan: α -tocopherol 50 mg/kgBB dan 200 mg/kgBB memberikan efek protektif yang sama terhadap kerusakan spermatozoa terutama dalam aspek motilitas dan morfologi karena paparan cisplatin. Oleh karena itu, dalam penelitian ini lebih disarankan menggunakan α -tocopherol dalam dosis 50 mg/kgBB dibandingkan dengan dosis 200 mg/kgBB.

Kata Kunci: *Vitamin E, spermatozoa, motilitas, morfologi, cisplatin*

EFFECT OF VITAMIN E (α TOCOPHEROL) ADMINISTRATION ON SPERM MOTILITY AND MORPHOLOGY OF SPRAGUE DAWLEY STRAIN RATS AFTER CISPLATIN TREATMENT

Dimas Visa Aditya¹, Tarmono¹, Doddy M. Soebadi¹

¹ Department of Urology, Faculty of Medicine, Airlangga University – Dr Soetomo General Hospital Surabaya

ABSTRACT

Objective: To evaluate the protective effects of vitamin E α -tocopherol isomer against the toxicity of cisplatin on sperm motility and morphology in Sprague Dawley rats.

Material and Methods: Twenty-four rats grouped into four groups (n=6). The control group (CN) is injected with normal saline, second group (CP) is injected with cisplatin, the third group (P1) is injected with cisplatin and vitamin E 50 mg/kgBW for 7 weeks P.O, the fourth group (P2) is injected with cisplatin and vitamin E 200 mg/kgBW for 7 weeks P.O. Vitamin E was given from 3 weeks before cisplatin injection and 4 weeks following cisplatin injection. At week 7th, all the sample were undergoing bilateral orchidectomy. Vitamin E that being used in this study is α -tocopherol isomer.

Results: Cisplatin decreases motility and morphology of spermatozoa significantly against controls. Vitamin E 50 mg/kgBW and 200 mg/kgBW significantly increased motility of spermatozoa ($p < 0.05$) compared to those in the cisplatin group only. Vitamin E 50 mg/kgBW, and 200 mg/kgBW did not have a significant difference in spermatozoa motility compare to control groups. Vitamin E 50 mg/kgBW and 200 mg/kgBW can increase the spermatozoa morphology significantly compare to those cisplatin only group. Vitamin E 50 mg/kgBW, and 200 mg/kgBW did not have a significant difference in spermatozoa morphology compare to control groups.

Conclusions: α -tocopherol 50 mg/kgBW and 200 mg/kgBW provides a same protective effect against spermatozoa damage especially in motility and morphology aspect due to cisplatin exposure. Therefore, in this study it was more recommended to use α -tocopherol in 50 mg/kgBW dose than 200 mg/kgBW.

Keywords: *Vitamin E, spermatozoa, motility, morphology, cisplatin*

DAFTAR ISI

SAMPUL DEPAN	
SAMPUL DALAM.....	i
PRASYARAT GELAR.....	ii
PERNYATAAN ORISINALITAS.....	iii
PERSETUJUAN.....	iv
PENETAPAN PANITIA	v
KATA PENGANTAR.....	vi
PERSETUJUAN PUBLIKASI.....	viii
ABSTRAK	ix
DAFTAR ISI.....	xii
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR.....	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xviii
DAFTAR SINGKATAN.....	xix
BAB 1	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	5
1.3. Tujuan	6
1.3.1 Tujuan Umum.....	6
1.3.2. Tujuan Khusus.....	6
1.4. Manfaat	7
1.4.1 Manfaat Akademis	7
1.4.2. Manfaat Klinis	7

BAB 2	9
2.1 Anatomi Testis	9
2.1.1 Tubulus Seminiferus.....	11
2.1.2 Spermatogonium.....	12
2.1.3 Spermatisit.....	13
2.1.4 Spermatid	13
2.1.5 Spermatozoa.....	14
2.1.6 Sel Leydig	15
2.1.7 Sel Sertoli.....	16
2.1.8 Spermatogenesis.....	17
2.2 Cisplatin	25
2.2.1 Sejarah penemuan	26
2.2.2 Farmakokinetik	27
2.2.3 Farmakodinamik	27
2.2.4 Penggunaan Klinis.....	28
2.2.5 Mekanisme Sitotoksisitas	29
2.3 Radikal Bebas	41
2.3.1. Jenis-jenis radikal bebas	42
2.3.2. Sumber Radikal Bebas.....	43
2.3.2.1. Berasal dari dalam tubuh (Endogen).....	43
2.3.2.2. Berasal dari luar tubuh (eksogen).....	45
2.3.3 Target Kerusakan oleh Radikal Bebas	46
2.3.4. Peroksidasi Lipid	47
2.4. Histopatologi Testis Akibat Paparan Cisplatin.....	48
2.5. Antioksidan.....	53
2.6 Vitamin E	54

BAB 3	59
3.1 Kerangka Konsep.....	59
3.2. Penjelasan Kerangka Konseptual.....	60
3.3 Hipotesis Penelitian	62
BAB 4	64
METODE PENELITIAN	64
4.1. Jenis Penelitian	64
4.2. Rancangan Penelitian	64
4.3. Kerangka Operasional Penelitian.....	66
4.4. Sampel Penelitian	67
4.4.1. Besar Sampel.....	67
4.4.2. Kelompok Kontrol.....	68
4.4.3 Kelompok Perlakuan.....	69
4.5. Tempat dan Waktu Penelitian	70
4.5.1. Tempat Penelitian.....	70
4.5.2. Waktu Penelitian	71
4.6. Variabel Penelitian.....	71
4.6.1 Klasifikasi Variabel Penelitian	71
4.7. Kriteria <i>Drop Out</i> Sampel	71
4.8. Definisi Operasional Variabel Penelitian.....	72
4.9. Unit Analisis.....	74
4.11. Prosedur Penelitian (Lampiran 2).....	74
4.10 Persyaratan Etik	74
4.12 Analisa Data.....	74
4.13 Biaya Penelitian.....	75

4.14 Organisasi Penelitian	76
BAB V.....	77
HASIL PENELITIAN	77
5.1. Analisis Hasil Penelitian	77
5.1.1. Karakteristik Sampel.....	77
5.1.2. Efek pemberian vitamin E terhadap motilitas sperma.....	77
5.1.3. Efek pemberian vitamin E terhadap morfologi sperma	80
BAB VI.....	85
PEMBAHASAN	85
BAB VII	93
KESIMPULAN DAN SARAN	93
7.1 Kesimpulan.....	93
7.2 Saran.....	94
DAFTAR PUSTAKA.....	95

DAFTAR TABEL

Tabel 5.1 Karakteristik sampel	77
Tabel 5.2 Perbandingan motilitas sperma pada tiap kelompok	78
Tabel 5.3 Analisis Post hoc Games-Howell perbandingan motilitas sel sperma pada tiap kelompok.....	79
Tabel 5.4 Perbandingan morfologi sel sperma pada tiap kelompok	81
Tabel 5.5 Analisis Post Hoc LSD perbandingan morfologi sel sperma pada tiap kelompok.....	82

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Anatomi Testis	9
Gambar 2.2 Tubulus Seminiferus	12
Gambar 2.3 Proses Spermatogenesis dan Spermiogenesis	13
Gambar 2.4 Gambaran Sel Spermatozoa	14
Gambar 2.5 Sel Leydig dan Sel Sertoli	15
Gambar 2.6 Pembelahan sel selama proses spermatogenesis	19
Gambar 2.7 Struktur Spermatozoa	20
Gambar 2.8 Struktur Kimia Cisplatin	25
Gambar 2.9 Mekanisme Jalur Sitotoksik Cisplatin.....	30
Gambar 2.10 Fase Apoptosis	34
Gambar 2.11 Mekanisme Sitotoksik Cisplatin	37
Gambar 2.12 Mekanisme dasar radikal bebas berdasarkan reaksi Fenton dan Haber-Weiss	42
Gambar 2.13 Histologi sel-sel spermatogenik mencit pada organ testis dengan pewarnaan HE	49
Gambar 2.14 Kerusakan epitel seminiferus akibat paparan Cisplatin	52
Gambar 2.15 Mekanisme Vitamin E dalam mengikat ROS	54
Gambar 2.16 Mekanisme Vitamin E dalam mentralisir ROS.....	56
Gambar 3.1 Kerangka Konsep	59
Gambar 4.1 Rancangan Penelitian	65
Gambar 4.2 Kerangka Operasional Penelitian	66
Gambar 5.1 Perbandingan motilitas sperma tiap kelompok	80

Gambar 5.2 Perbandingan morfologi sperma tiap kelompok	82
Gambar 5.3 Histopatologi sperma (400x pembesaran).....	83

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Waktu Penelitian	106
Lampiran 2 Prosedur Penelitian	107
Lampiran 3 Rekapitulasi Data Penelitian	113
Lampiran 4 Analisis Data SPSS	114
Lampiran 5 Dokumentasi Penelitian	123
Lampiran 6 Sertifikat Laik Etik	125

DAFTAR SINGKATAN

AIF	: Apoptosis-Inducing Factor
CASA	: Computer Assited Semen Analysis
FAAS	: Flameless Atomic Absorption Spectroscopy
FADD	: Fas Associated Death Domain
FSH	: Follicle Stimulating Hormone
GCT	: Germ Cells Tumor
gDNA	: Genome DNA
GPx	: Gluthathion Peroksidase
GR	: Gluthathion Reduktase
GSH	: Glutathione Stimulating Hormone
ICPMS	: Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry
IMM	: Innet Matrix Membrane
MDA	: Malondialdehyd
MHC	: Monohydrate Complex
MPTP	: Mitochondrial Permeability Transition Pore
OMM	: Outer Matrix Membrane
OS	: Oxidative Stress
RNS	: Reactive Nitrogen Species
ROS	: Reactive Oxygen Species
SOD	: Superoxyde Dismutase
TBARS	: Thiobarbituric Acid Reactive Substances
TGCT	: Testicular Germ Cells Tumor

Pt-NHC : Novel Platinum-N-Heterocyclic Carbene Complex

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Kanker merupakan suatu penyakit yang berkaitan dengan usia, dan risikonya terbukti meningkat seiring dengan bertambahnya usia. Tidak banyak informasi yang dipublikasikan mengenai epidemiologi dari kanker, serta kontribusinya terkait mortalitas pada kelompok usia 85 tahun. Berdasarkan Data GLOBOCAN, *International Agency for Research on Cancer* (IARC), diketahui bahwa pada tahun 2012 terdapat 14.1 juta kasus baru kanker dan 8.2 juta kematian akibat kanker di seluruh dunia (Bott, 2014)(IARC, 2012). Gambaran berdasarkan GLOBOCAN 2012 memperkirakan suatu peningkatan yang sesungguhnya hingga 19.3 juta kasus per tahun pada tahun 2025, yang diakibatkan oleh bertambahnya jumlah dan usia dari populasi global (IARC), 2012). Data dari *National Cancer Registry* Belanda, jumlah survivor penderita kanker telah meningkat dari 366.000 menjadi 692.000 selama 20 tahun terakhir. Di Amerika Serikat, 1 dari sekitar 285 anak akan terdiagnosis kanker pada usia sebelum 20 tahun. Peningkatan jumlah kanker pertahun pada anak-anak adalah 1% dan pada remaja 1,5% (Moon *et al.*, 2014). Beberapa keganasan yang terjadi pada usia remaja telah menunjukkan peningkatan yang signifikan dalam 20 tahun terakhir, terutama tumor testis (*Testicular Germ Cells Tumor* (TGCT)). TGCT adalah kanker yang paling umum di antara laki-laki pada rentang usia 20-39 tahun, mewakili 21% dari keseluruhan diagnosis kanker invasif. Secara keseluruhan, ada sekitar 8.200 kasus baru tumor testis di Amerika Serikat setiap tahunnya. Kemungkinan seumur hidup

berkembangnya tumor testis pada pria kulit putih adalah sekitar 0.2%, bila dibandingkan dengan kanker prostat yang memiliki kemungkinan 3.8% (Nichols, 2010). Anak-anak dan orang dewasa yang didiagnosis menderita kanker saat ini memiliki kesempatan bertahan yang lebih tinggi sebagai hasil dari protokol pengobatan yang baru termasuk operasi, kombinasi kemoterapi dan terapi radiasi (Moon *et al.*, 2014)(Nichols, 2010). Banyak pasien muda dengan kanker, termasuk limfoma, leukemia dan kanker testis (TGCT), dilakukan terapi dengan kemoterapi multi agen. Diantara berbagai jenis kemoterapi multiagen, Cisplatin merupakan agen kemoterapi yang paling sering digunakan terapi berbagai jenis kanker, seperti testis, ovarium, kandung kemih, hati, paru-paru, kepala dan leher, karsinoma uterus, leher rahim dan leukemia.

Cisplatin terbukti sebagai agen kemoterapi yang optimal untuk berbagai kasus keganasan, tetapi di luar itu cisplatin juga memiliki efek samping yang tidak menyenangkan. Sebagian besar pasien yang mendapatkan cisplatin termasuk dalam kelompok usia produktif dan sebagian besar juga dari mereka mengalami infertile permanen oleh karena *azoospermia* yang disebabkan cisplatin tersebut (Moon *et al.*, 2014; Nichols, 2010). Dosis maksimal cisplatin yang aman terhadap infertilitas adalah 400 mg/m². Jika lebih dari itu, maka akan berdampak negatif baik terhadap produksi sperma ataupun kualitas sperma (Kamal-Eldin dan Appelqvist, 1996).

Cisplatin dapat menyebabkan kerusakan sel (apoptosis dan nekrosis sel) melalui beberapa mekanisme, yaitu pengikatan cisplatin ke basis guanin pada DNA, pembentukan rantai silang dan mekanisme terbaru yang diketahui adalah melalui peningkatan produksi *reactive oxygen species* (ROS), yang dapat menyebabkan peroksidasi lemak yang pada akhirnya dapat menyebabkan inflamasi pada sel serta

stress oksidatif (OS) (Bujan et al., 2013). OS ini terjadi oleh karena adanya ketidakseimbangan antara produksi radikal bebas dengan pertahanan antioksidan di dalam tubuh, sehingga dapat menyebabkan berbagai kerusakan pada sel, kerusakan pada asam nukleat, protein, lemak serta dapat menginduksi mutase DNA (Bujan et al., 2013; Guthrie dan Welch, 2012). Radikal bebas adalah sebuah atom, molekul atau ion yang merupakan produk dari berbagai proses kimia yang terjadi di dalam tubuh yang memiliki satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan. Radikal bebas ini memiliki sifat yang sangat reaktif, yaitu dapat mengoksidasi lemak, asam amino, dan karbohidrat, serta dapat menyebabkan kerusakan berupa mutasi DNA (Sanocka dan Kurpisz, 2004). OS menyebabkan kerusakan peroksidatif pada membrane sperma dan fragmentasi DNA pada tingkat inti sel dan mitokondria, sehingga menyebabkan terjadinya kerusakan pada sperma atau infertilitas pada laki-laki (Agarwal *et al.*, 2008). Jaringan testis adalah salah satu jaringan yang sensitif baik terhadap radikal bebas ataupun ROS. Radikal bebas yang berikatan pada membran sel testis (spermatogonium, sel Sertoli dan sel Leydig) akan menyebabkan terjadinya peroksidasi lemak dan berbagai mekanisme lainnya yang dapat memicu terjadinya apoptosis ataupun nekrosis dari sel-sel tersebut (Agarwal *et al.*, 2008). Kerusakan seluler pada testis yang ditimbulkan agen kemoterapi khususnya cisplatin adalah berupa *maturation arrest* yang dapat diketahui dari adanya penurunan parameter sperma dan penurunan diameter tubulus seminiferous setelah adanya paparan agen kemoterapi tersebut (Ishikawa *et al.*, 2004).

Beberapa studi membuktikan bahwa cisplatin dapat menginduksi terjadinya disintegrasi testis, disfungsi sperma, apoptosis *germ cell*, kerusakan pada sel Leydig, toksisitas akibat rigidifikasi membran, peroksidasi lemak, dan kerusakan

oksidatif, serta menurunkan pertahanan oleh antioksidan di dalam organ (Hejazi, 2011). Toksisitas ini terjadi oleh karena terjadinya stress oksidatif yang dipicu dengan peningkatan kadar ROS, serta cisplatin juga meningkatkan peroksidasi lemak melalui peningkatan kadar malondialdehid (MDA) secara bermakna (Soni *et al.*, 2016). Infertilitas pada pria yang mengalami OS disebabkan oleh karena terjadinya efek negative atau kerusakan pada spermatozoa, seperti terjadinya peningkatan jumlah spermatozoa dengan motilitas rendah, peningkatan kerusakan pada membran sel spermatozoa, penurunan jumlah morfologi spermatozoa yang normal, penurunan viabilitas sperma dan kemampuan spermatozoa untuk membuahi ovum (Soni *et al.*, 2016).

ROS akan diproduksi oleh spermatozoa dalam jumlah yang sedikit ketika dalam kondisi normal. ROS ini sejatinya diperlukan untuk regulasi sperma, kapasitasi sperma dan reaksi akrosom sperma. Namun dalam jumlah yang besar, ROS ini akan menyebabkan oksidasi pada sel normal khususnya spermatozoa sehingga dapat merusak sperma melalui mekanisme peningkatan kematian sel sperma (apoptosis) dan kerusakan hingga mutasi DNA. Paparan radikal bebas dalam jumlah yang banyak dapat mengganggu proses spermatogenesis. Radikal bebas ini akan merusak membran sel sperma sehingga pada akhirnya akan menyebabkan gangguan morfologi normal pada sel sperma. Paparan ROS secara terus menerus akan menyebabkan terjadinya disfungsi seluler, apoptosis hingga nekrosis. Salah satu cara yang dipercaya untuk dapat melindungi membran sel sperma dari kerusakan tersebut adalah dengan menggunakan atau mengkonsumsi sumber antioksidan eksogen (Bujan *et al.*, 2013).

Vitamin E adalah salah satu vitamin yang larut dalam lemak dan termasuk ke dalam antioksidan non enzimatis. Vitamin E dapat mencegah atau mengurangi kerusakan sel yang disebabkan oleh OS melalui pencegahan terjadinya reaksi peroksidasi lemak oleh ROS pada sel membrane (Uzunhisarcikli dan Kalender, 2011). Vitamin E juga terbukti dapat memperbaiki kualitas sperma melalui penelitian in vitro pada pasien dengan infertilitas non obstruksi. Cara kerja vitamin E yang dapat menetralkan efek radikal bebas, diharapkan dapat menurunkan terjadinya OS oleh karena pemberian cisplatin. Penurunan OS pada jaringan atau sel diharapkan dapat meminimalisir kerusakan pada jaringan atau sel baik spermatozoa, testis, saraf maupun organ tubuh yang lain. Selain itu, oleh karena efek vitamin E yang dapat menetralkan efek radikal bebas, diharapkan juga akan membantu meningkatkan jumlah spermatogonium, sel Leydig dan sel Sertoli, serta diikuti dengan peningkatan jumlah hormon testosterone dan perbaikan spermatogenesis, sehingga perbaikan motilitas dan morfologi sel spermatozoa dapat dicapai.

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah terdapat perbedaan motilitas dan morfologi sperma pada tikus putih strain Sprague Dawley yang mendapatkan Cisplatin 5 mg/Kg BB dibandingkan dengan tikus putih strain Sprague Dawley kontrol.
2. Apakah terdapat perbedaan motilitas dan morfologi sperma pada tikus putih strain Sprague Dawley yang mendapatkan Cisplatin 5 mg/ Kg BB dan vitamin E 50 mg/kg BB dibandingkan dengan tikus putih strain Sprague Dawley yang hanya mendapatkan Cisplatin 5 mg/Kg BB.

3. Apakah terdapat perbedaan motilitas dan morfologi sperma pada tikus putih strain Sprague Dawley yang mendapatkan Cisplatin 5mg/Kg BB dan vitamin E 200 mg/Kg BB dibandingkan dengan tikus putih strain Sprague Dawley yang hanya mendapatkan Cisplatin 5 mg/Kg BB.
4. Apakah terdapat perbedaan motilitas dan morfologi sperma pada tikus putih strain Sprague Dawley yang mendapatkan Cisplatin 5mg/Kg BB dan vitamin E 200 mg/Kg BB dibandingkan dengan tikus putih strain Sprague Dawley yang hanya mendapatkan Cisplatin 5mg/Kg BB dan vitamin E 50 mg/Kg.

1.3. Tujuan

1.3.1 Tujuan Umum

Untuk menganalisis efek protektif vitamin E terhadap motilitas dan morfologi sperma pada tikus putih strain *Sprague Dawley* yang mendapatkan kombinasi Cisplatin dan vitamin E dibandingkan dengan tikus putih strain *Sprague Dawley* yang hanya mendapatkan Cisplatin.

1.3.2. Tujuan Khusus

1. Untuk menganalisis perbedaan motilitas dan morfologi sperma pada tikus putih strain *Sprague Dawley* yang mendapatkan Cisplatin 5 mg/Kg BB dibandingkan dengan tikus putih strain *Sprague Dawley* kontrol.
2. Untuk menganalisis perbedaan motilitas dan morfologi sperma pada tikus putih strain *Sprague Dawley* yang mendapatkan Cisplatin 5 mg/Kg BB dan vitamin E 50 mg/kg BB dibandingkan dengan tikus putih strain *Sprague Dawley* yang hanya mendapatkan Cisplatin 5 mg/Kg BB.

3. Untuk menganalisis perbedaan motilitas dan morfologi sperma pada tikus putih strain *Sprague Dawley* yang mendapatkan Cisplatin 5mg/Kg BB dan vitamin E 200 mg/Kg BB dibandingkan dengan tikus putih strain *Sprague Dawley* yang hanya mendapatkan Cisplatin 5 mg/Kg BB.
4. Untuk menganalisis perbedaan motilitas dan morfologi sperma pada tikus putih strain *Sprague Dawley* yang mendapatkan Cisplatin 5mg/Kg BB dan vitamin E 200 mg/Kg BB dibandingkan dengan tikus putih strain *Sprague Dawley* yang hanya mendapatkan Cisplatin 5mg/Kg BB dan vitamin E 50 mg/Kg.

1.4. Manfaat

1.4.1 Manfaat Akademis

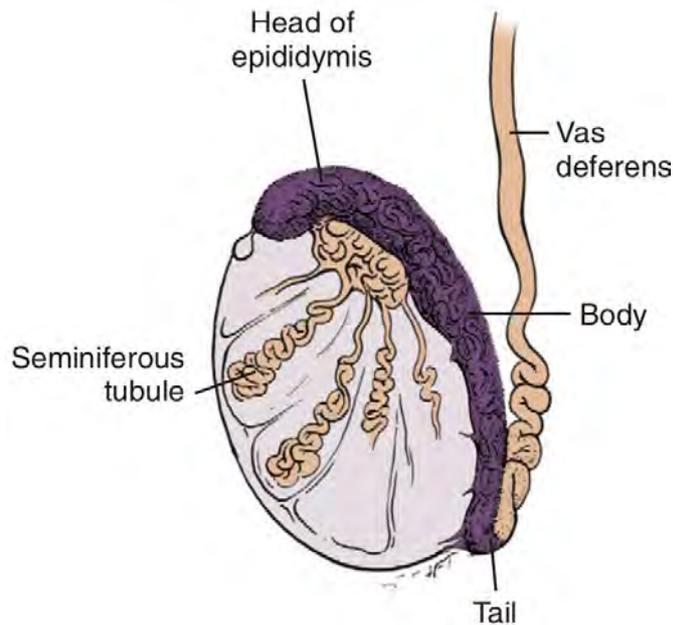
- Mengetahui efek protektif vitamin E terhadap morfologi sperma pada tikus putih strain *Sprague Dawley* dengan paparan Cisplatin.
- Mengetahui efek protektif vitamin E terhadap motilitas sperma pada tikus putih strain *Sprague Dawley* dengan paparan Cisplatin.

1.4.2. Manfaat Klinis

Sebagai dasar pemikiran dalam praktek klinis pemberian vitamin E untuk mendapatkan efek protektif terhadap morfologi dan motilitas sperma pada pasien dengan kemoterapi cisplatin.

BAB 2
TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Anatomi Testis



Gambar 2.1 Anatomi Testis (Emil, 2008)

Testis merupakan sebuah organ genitalia pada laki-laki yang berjumlah dua pada setiap orang normal dan terletak di dalam skrotum kanan dan kiri (satu skrotum berisi satu testis). Testis memiliki panjang sekitar 4-5 cm, lebar 3 cm, dan ketebalan 2,5 cm. Organ ini mempunyai volume \pm 15-25 ml. Testis terbungkus oleh jaringan kuat yaitu tunika albuginea yang melekat pada testis tersebut. Pada bagian luarnya, terdapat tunika vaginalis yang terdiri dari tunika vaginalis viseralis dan parietalis, serta tunika dartos. Tunika vaginalis pada bagian posterior akan bergabung dengan testis itu sendiri membentuk suatu struktur yang disebut

mediastinum testis. Testis juga dikelilingi oleh otot kremaster yang berfungsi untuk pergerakan testis sehingga testis dapat digerakkan mendekati rongga abdomen. Pergerakan testis ini sangat berguna untuk menjaga suhu testis agar tetap stabil (Emil, 2008)(Purnomo, 2014a).

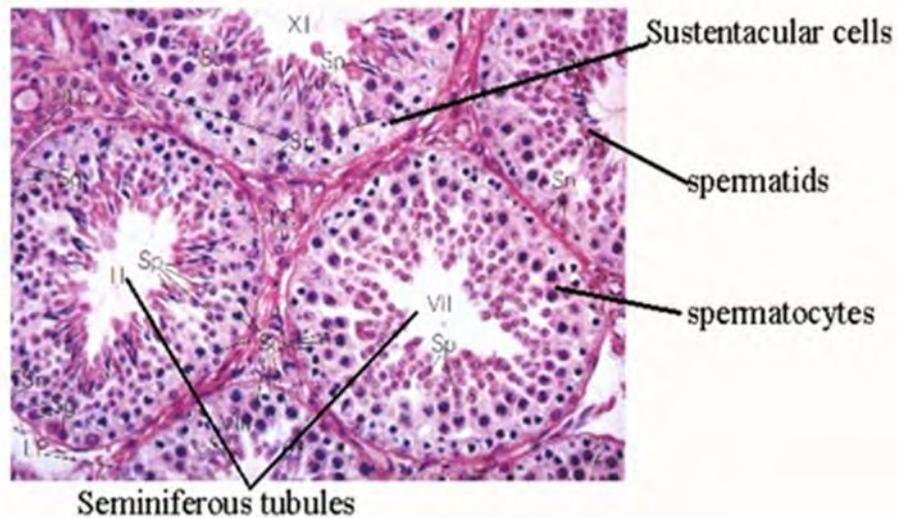
Pada masa janin, testis berada di dalam rongga abdomen dan sesaat sebelum bayi dilahirkan, testis mengalami proses *desensus testikulorum* atau turunnya testis dari rongga abdomen ke dalam skrotum. Testis akan turun ke skrotum bersamaan dengan funikulus spermatikus melalui anulus inguinalis dan akan menempati rongga skrotum. Semua lapisan ini dilapisi oleh muskulus kremaster dan tunika dartos. Beberapa faktor yang mempengaruhi penurunan testis ke skrotum antara lain: (1) adanya tarikan oleh gubernakulum testis dan refleks dari otot kremaster, (2) dorongan dari abdomen (tekanan intraabdominal), dan (3) perbedaan pertumbuhan gubernakulum dengan pertumbuhan badan (Emil, 2008)(Purnomo, 2014b).

Vaskularisasi dari testis berasal dari anastomosis tiga arteri, yaitu arteri testikularis atau arteri spermatika interna yang merupakan cabang dari aorta abdominalis, arteri kremasterika yang merupakan cabang dari arteri epigastrika inferior, dan arteri deferensialis yang merupakan cabang dari arteri vesikalis inferior (Beck *et al.*, 1992). Arteri testikularis berjalan menyilangi ureter dan bagian inferior dari arteri iliaka eksterna menuju ke dalam annulus inguinalis dan menjadi satu kompartemen di dalam funikulus spermatikus. Pembuluh vena yang meninggalkan testis berkumpul menjadi pleksus pampiniformis yang terdiri dari beberapa vena di sekitar testis dan mengelilingi arteri testikularis di funikulus spermatikus (Emil, 2008)(Purnomo, 2014a).

Secara histopatologis, testis terdiri atas \pm 250 lobuli berbentuk kerucut, dimana setiap lobulus terdiri atas tubuli seminiferi. Tiap tubulus berbentuk seperti huruf “U” dengan panjang \pm 100 μ m dan diameter 0,12-0,3 mm. Di dalam tubulus seminiferus terdapat sel spermatogonia dan sel sertoli. Sedangkan di antara tubuli seminiferi terdapat sel leydig (disebut juga sel interstisial). Pada ujung lobulus, tubulus seminiferus akan berubah menjadi lurus (disebut tubuli rekti) dan memasuki mediastinum testis yang akan beranastomosis menjadi jaringan tubulus (Emil, 2008)(Purnomo, 2014a).

2.1.1 Tubulus Seminiferus

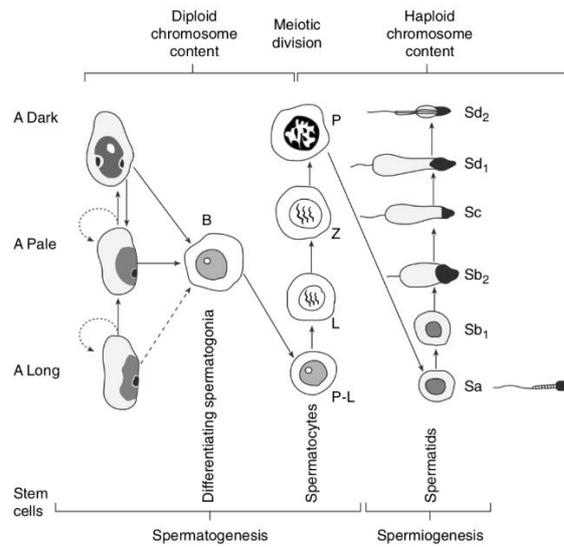
Tubulus seminiferus adalah saluran yang berbentuk seperti pipa berkelok – kelok dengan diameter 150 – 250 μ m dan memiliki fungsi sebagai saluran sekretori dari kelenjar sitogenik. Dinding tubulus seminiferus memiliki epitel yang berlapis yaitu 4 sampai 8 lapis. Di dalam tubulus seminiferous terdapat sel spermatogenik dimana terjadi pembentukan spermatozoa dari spermatogonium dan juga terdapat sel leydig sebagai penyokong dari kehidupan sel-sel spermatogenik tersebut yang berguna memberi nutrisi dalam proses spermatogenesis. Pada lamina propia dari tubulus seminiferous juga terdapat sel – sel mesenkim dari jaringan interstitial dan sel myoid yang terdiri dari epiteloid dan jaringan kontraktile (Anne, 2000).



Gambar 2.2 Tubulus Seminiferus (Mescher dan Junqueira, 2018)

2.1.2 Spermatogonium

Spermatogonium adalah sel punca yang menjadi awal dari semua sel sperma yang akan mengalami proses spermatogenesis. Sel spermatogonium sendiri dibagi menjadi 3 grup utama yaitu: (1) spermatogonia gelap tipe A, (2) spermatogonia pucat tipe A, dan (3) Spermatogonia pucat tipe B. ketiga sel ini dapat dibedakan dengan warna kromatin, ukuran nucleus dan posisinya pada basal membrane seminiferous. (James dan William, 2009)



Gambar 2.3 Proses Spermatogenesis dan spermiogenesis (Pandiyan, 2017)

2.1.3 Spermatisit

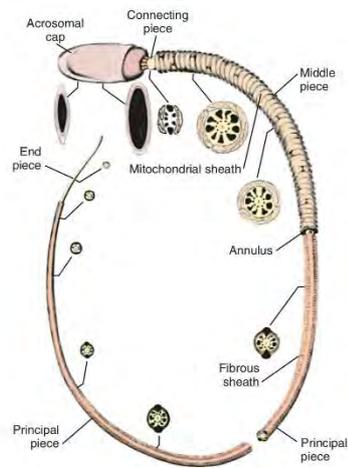
Spermatisit merupakan hasil dari pembelahan spermatogonium tipe B yang terbagi dalam dua jenis, yaitu spermatisit primer dan spermatisit sekunder. Spermatisit primer terjadi pada spermatogonium tipe B yang membelah diri dengan cara mitosis, maka sel-sel tersebut akan menghasilkan sel-sel anak yang seluruhnya berdiferensiasi menjadi spermatisit primer. Spermatisit primer ini dapat dorman dan dapat juga muncul pada berbagai fase mitosis. Spermatisit primer ini kemudian mengalami mitosis dan akan menjadi spermatisit sekunder. Spermatisit sekunder ini akan mengalami mitosis kedua dan akan berlanjut menjadi spermatid (Anne, 2000).

2.1.4 Spermatid

Spermatid adalah sel yang dihasilkan pada pembelahan meiosis kedua. Inti pada spermatid akan menjadi kepala (caput) spermatozoa yang matang. Spermatid

juga mendapatkan asupan nutrisi dari sel sertoli. Spermatid terletak dekat lumen, dan tidak terjadi pembelahan lebih lanjut dimana tiap-tiap spermatid mengalami perubahan atau transformasi melalui diferensiasi yang pesat menjadi spermatozoa(Pandiyan, 2017)

2.1.5 Spermatozoa

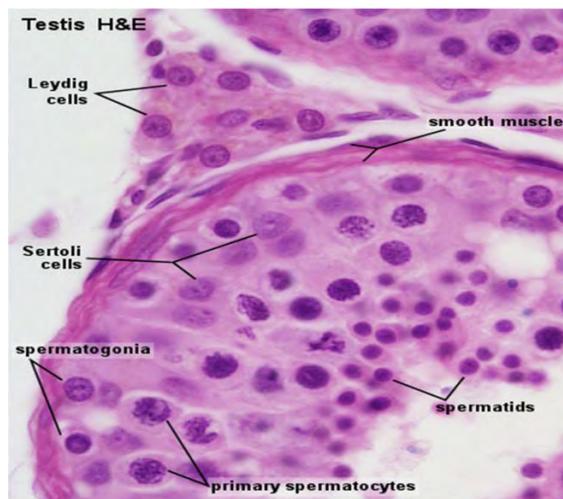


Gambar 2.4. Gambaran Sel Spermatozoa (James dan William, 2009).

Spermatozoa pada manusia berukuran sekitar 60 μm dan secara morfologi dapat dibagi menjadi 3 bagian utama yaitu kepala, leher dan ekor. Bagian kepala dari sperma merupakan bagian terpenting yang terdiri dari nucleus yang sangat padat dengan kromatin, dan juga terdapat acrosome yang digunakan untuk penetrasi pada ovum sebelum fertilisasi. Bagian leher dari sperma berfungsi mengatur hubungan antara kepala dan ekor. Bagian ekor dari spermatozoa sendiri dibagi menjadi 3 bagian yaitu midpiece, principle piece, dan end piece.

2.1.6 Sel Leydig

Sel interstisial Leydig adalah sel – sel yang letaknya berkelompok memadat pada daerah segitiga yang terbentuk oleh susunan-susunan tubulus seminiferus. Sel-sel tersebut besar dengan sitoplasma, sering bervakuol pada gambaran mikroskop cahaya. Inti selnya mengandung butir-butir kromatin kasar dan anak inti yang jelas. Umumnya pula dijumpai sel yang memiliki dua inti. Sitoplasma sel kaya dengan benda-benda inklusi seperti titik lipid, dan pada manusia juga mengandung kristaloid berbentuk batang. Sel Leydig berbentuk polihedral berdiameter kurang lebih 15 mikrometer. Sel Leydig dewasa kaya akan mitokondria dengan krista tubular, retikulum endoplasma halus, dan aparatus golgi yang khas sebagai penghasil steroid sama seperti glandula adrenal (Mescher dan Junqueira, 2018). Sel Leydig sendiri berfungsi menghasilkan testosteorone testis yang berperan dalam pembentukan organ reproduksi pria pada fetus, pertumbuhan karakteristik seksual, pertumbuhan otot, dan spermatogenesis (Cui *et al.*, 2011).



Gambar 2.5. Sel Leydig dan Sel Sertoli (Mescher dan Junqueira, 2018).

2.1.7 Sel Sertoli

Sel sertoli merupakan sel somatic yang penting dalam pembentukan testis dan proses spermatogenesis. Sel sertoli memfasilitasi perkembangan *germ cell* hingga menjadi spermatozoa melalui kontak langsung dan mengontrol lingkungan dalam tubulus seminiferous (Griswold, 1998). Adapun fungsi dari sel sertoli adalah sebagai berikut:

1. Sebagai sawar darah-testis, hal ini diakibatkan oleh struktur dari nucleus yang ireguler, menonjol dan disertai dengan index mitosis yang rendah diantara sel sertoli yang berdekatan, sehingga struktur ini dapat menciptakan *tight junctional complex* yang unik dan menjadi pembatas paling baik di tubuh manusia
2. Sel sertoli juga berperan untuk fagositosis. Pada proses spermatogenesis, akan ada sisa fragmen sitoplasma dari spermatid. Fragmen sitoplasma ini difagosit, dihancurkan, dan selanjutnya direasorpsi oleh lisosom sel sertoli.
3. Sel sertoli berfungsi sebagai sel yang “merawat” untuk spermatogenesis, dan memberikan nutrisi pada *germ cell* yang tersusun antara proyeksi sel sertoli, sel sertoli ini merawat perkembangan dari *germ cell* dengan cara: (1) memberikan microenvironment adluminal yang terspesialisasi, (2) mensupport *germ cell* melalui gap junction antara *germ cell* dan sel sertoli, (3) memberikan akses untuk migrasi dari *germ cell* di dalam tubulus.
4. Sel sertoli adalah tempat kerja testosteron dan *follicle stimulating hormon* (FSH) untuk mengontrol spermatogenesis.

Sel sertoli mensekresikan protein pengikat androgen (androgen binding protein).

Protein tersebut mengikat testostosterone, ABP meregulasi agar level testostosterone

tinggi (50-folds, seperti yang diobservasi pada serum) didalam tubulus seminiferous (Turek, 2011).

2.1.8 Spermatogenesis

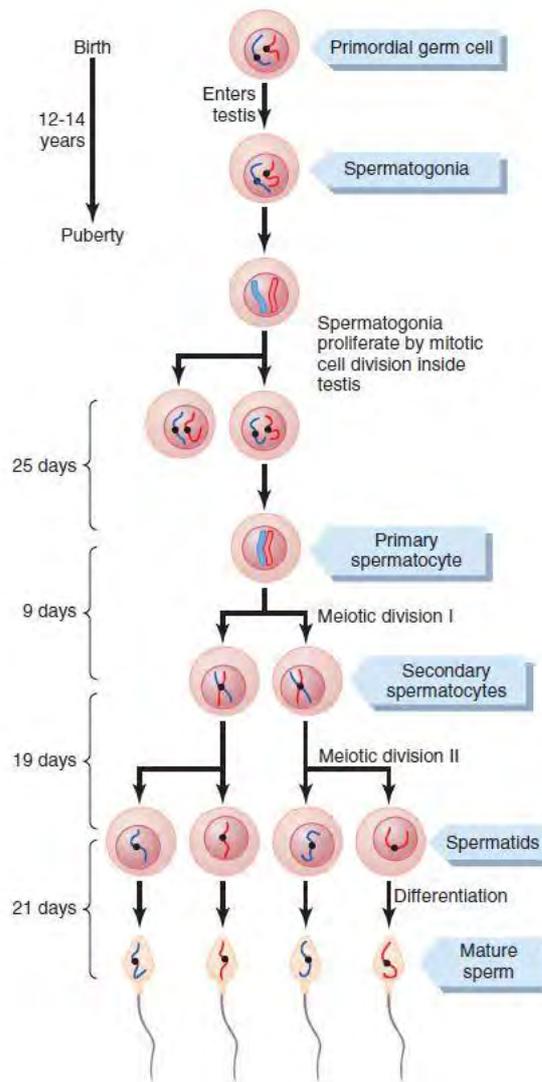
Spermatogenesis merupakan proses pembetukan sel sperma. Proses ini menghasilkan spermatosit primer dan spermatosit sekunder melalui proses pembelahan mitosis sel spermatogenik. Selanjutnya spermatosit akan mengalami pembelahan secara meiosis menghasilkan sel spermatid yang mengandung 23 kromosom tunggal ($22 + x/y$). Selanjutnya melalui proses spermiogenesis, spermatid akan berkembang menjadi sperma (Eroschenko, 2008).

Spermatozoa adalah sel reproduksi pria yang dihasilkan oleh testis. Spermatozoa memiliki tiga bagian penting yaitu bagian kepala, leher dan ekor. Masing-masing bagian pada spermatozoa ini memiliki peranan yang penting dalam proses pembuahan. Spermatozoa merupakan produk akhir dari perkembangan epitel *germ cell* yang disebut spermatogonia. Spermatogonia berkembang menjadi spermatozoa di dalam tubulus seminiferous pada testis. Proses perkembangan atau maturasi ini disebut dengan spermatogenesis (Hall, 2015).

Tahap awal spermatogenesis, dimulai dengan membelahnya spermatogonia primitif (spermatogonia tipe A) sebanyak empat kali untuk membentuk 16 sel yang lebih berdiferensiasi, yang kemudian disebut dengan spermatogonia tipe B. Pada tahap ini, spermatogonia bermigrasi ke bagian sentral sel Sertoli. Sel Sertoli memiliki mekanisme pertahanan sawar darah testis yang kuat (*Sertoli cell junction*) yang mencegah adanya peneterasi dari kapiler-kapiler yang mengelilingi tubulus.

Namun, sel Sertoli memiliki mekanisme khusus untuk spermatogonia yang immunoidentikal untuk dapat menembus lapisan pertahanan tersebut (Hall, 2015).

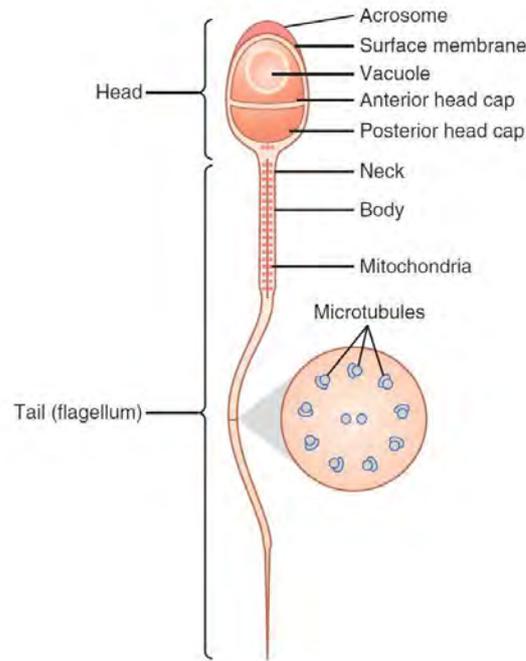
Proses berikutnya ialah pembelahan secara meiosis. Spermatogonia yang melintasi sel Sertoli dimodifikasi dan diperbesar untuk membentuk spermatosit primer. Masing-masing dari sel spermatosit primer ini akan mengalami pembelahan meiosis untuk membentuk dua spermatosit sekunder. Beberapa hari kemudian, spermatosit sekunder juga membelah menjadi spermatid yang akhirnya dimodifikasi dan menjadi spermatozoa. Selama proses perkembangan spermatosit ke tahap spermatid, 46 kromosom (23 pasang kromosom) dari spermatosit dibagi, dan dengan demikian 23 kromosom menuju ke satu spermatid, dan 23 kromosom lainnya menuju ke spermatid kedua. Gen kromosom juga dibagi, sehingga hanya setengah dari karakteristik genetik janin berasal dari Ayah, dan setengah lainnya berasal dari oosit Ibu (Hall, 2015).



Gambar 2.6. Pembelahan sel selama proses spermatogenesis (Hall, 2015).

Setelah terbentuk di tubulus seminiferous, sperma membutuhkan waktu beberapa hari untuk melewati tubulus epididymis yang memiliki panjang kira-kira 6 meter. Sperma yang pertama kali dikeluarkan dari tubulus seminiferous adalah sperma yang nonmotile dan tidak bisa membuahi ovum. Namun setelah sperma telah berada di epididymis selama 18 hingga 24 jam, sel sperma mulai mengembangkan kemampuan motilitas, meskipun beberapa protein penghambat

dalam cairan epididimis masih bisa mencegah motilitas yang berakhir sampai terjadinya ejakulasi (Hall, 2015).



Gambar 2.7. Struktur spermatozoa (Hall, 2015).

Ketika spermatid pertama kali terbentuk, sel spermatid masih memiliki karakteristik sel epiteloid sederhana. Selanjutnya spermatid akan berdiferensiasi menjadi sperma melalui proses yang disebut Spermiogenesis. Setelah berdiferensiasi menjadi spermatozoa, karakteristik yang dimiliki pun juga sudah berubah tidak seperti sebelumnya. Setiap spermatozoa terdiri dari kepala dan ekor.

Spermiogenesis merupakan proses perkembangan spermatid menjadi sperma. Proses ini mengubah ukuran dan bentuk spermatid, dan memadatkan kromatin nucleus. Proses spermiogenesis terdiri dari 3 fase, yaitu fase golgi, fase akrosomal dan fase maturasi. Pada fase golgi terbentuk *granula akrosom* dalam *vesicula akrosom* akibat akumulasi granula halus di *apparatus golgi* spermatid

(Eroschenko, 2008). Pada *fase akrosomal* terbentuk akrosom di ujung anterior spermatid, yang terbentuk akibat pematangan *vesicular akrosom* dan *granulum akrosom*. Akrosom mengandung beberapa enzim hidrolitik, misalnya *hyaluronidase* dan *protease* dengan aktifitas mirip *trypsin*, yang membantu sperma menembus sel (*korona radiata*) dan membran (*zona pelusida*) yang mengelilingi oosit yang berovulasi. Pada fase maturasi terjadi pergerakan membrane plasma kearah posterior dari nukleus, yang selanjutnya menutupi *flagellum* (ekor sperma) yang sedang tumbuh. (Eroschenko, 2008) Selanjutnya sisa sitoplasma spermatid akan lepas dan difagosit oleh sel sertoli dan terjadi pelepasan sel sperma ke dalam lumen tubulus seminiferous. (Eroschenko, 2008)

Sel sperma yang matang terdiri dari kepala (Caput) dan akrosom yang mengelilingi bagian anterior nucleus, leher (collum), pars intermedia yang ditandai oleh adanya selubung mitokondria padat, dan bagian utama atau pars principalis. (Eroschenko, 2008)

Kepala spermatozoa terdiri dari inti sel yang padat, dan dilapisi lapisan membran sel sitoplasma yang tipis di permukaannya. Di bagian luar dari 2 pertiga anterior kepala spermatozoa, terdapat lapisan tebal yang disebut dengan akrosom yang komponen utamanya adalah badan Golgi. Akrosom mengandung beberapa enzim yang mirip dengan yang ditemukan di lisosom pada sel-sel tertentu, termasuk *hyaluronidase* dan enzim proteolitik yang kuat. Enzim ini memiliki peran penting dalam proses pembuahan ovum oleh sperma (Hall, 2015).

Bagian ekor spermatozoa yang disebut dengan *flagellum*, memiliki tiga komponen utama, yaitu kerangka utama yang terdiri dari 11 mikrotubulus atau aksonem, lapisan membran sel tipis yang menutupi aksonem dan sekelompok

mitokondria yang mengelilingi aksonem di bagian proksimal dari ekor spermatozoa. Gerakan bolak-balik dari ekor (gerakan flagella) inilah yang memfasilitasi motilitas dari sperma. Gerakan ini dihasilkan dari gerakan geser longitudinal ritmik antara tubulus anterior dan posterior yang membentuk aksonem. Sperma yang normal bergerak dalam media cair dengan kecepatan 1 hingga 4 mm/menit (Hall, 2015).

Motilitas sperma merupakan salah satu faktor yang dapat mempengaruhi fertilitas seorang pria. Motilitas dari sperma sangat dibutuhkan untuk pembuahan ovum. Maka dari itu, gangguan motilitas pada spermatozoa seringkali menyebabkan infertilitas pada pria dengan jumlah sel spermatozoa yang normal (WHO *et al.*, 1992).

Beberapa faktor dapat menyebabkan terjadinya gangguan motilitas spermatozoa, yaitu yaitu kurangnya ATP yang dihasilkan mitokondria, konsentrasi zat koagulasi yang terlalu banyak dalam semen sehingga mengurangi motilitas spermatozoa, dan kerusakan struktur spermatozoa terutama apabila terjadi kerusakan pada ekor (flagellum) (Rizal *et al.*, 2003).

Analisis motilitas sperma dapat dinilai dengan penghitungan manual atau menggunakan *computer assisted semen analysis* (CASA). Motilitas sperma dalam air mani harus dinilai sesegera mungkin setelah pencairan sampel, sebaiknya pada 30 menit, paling lama dalam 1 jam setelah ejakulasi. Hal ini bertujuan untuk mengurangi terjadinya kerusakan sperma oleh karena dehidrasi sel, perubahan pH ataupun perubahan suhu yang dapat mempengaruhi motilitas spermatozoa (WHO *et al.*, 1992).

Metode penghitungan manual meliputi pemeriksaan motilitas secara kuantitatif dan kualitatif. Motilitas kuantitatif dinilai dengan cara menghitung jumlah sel spermatozoa yang motil dan imotil pada minimal 10 lapangan pandangan yang terpisah dan lokasinya ditentukan secara acak (hindari pemeriksaan di lokasi dekat pojok kaca penutup). Nilai yang diperoleh dibulatkan mendekati nilai yang dapat dibagi 5% (contohnya 73% menjadi 75%; atau 68% menjadi 70%) (WHO *et al.*, 1992).

Motilitas kualitatif dinilai secara subjektif berdasarkan gerakan spermatozoa yang tampak. Motilitas kualitatif spermatozoa dibagi menjadi beberapa kategori atau derajat, yaitu sebagai berikut :

1. Gerakan cepat dan maju lurus (derajat a).
2. Gerakan lambat dan sulit maju lurus (derajat b).
3. Tidak bergerak maju (derajat c).
4. Tidak bergerak (derajat d).

Kandungan cairan semen yang normal memiliki 60% spermatozoa yang motil atau lebih, dengan sebagian besar menunjukkan pergerakan yang baik dalam jangka waktu setengah sampai tiga jam setelah ejakulasi. Jumlah sperma yang motil dalam setiap kategori dibagi kembali dengan alat bantu laboratorium. Pemeriksaan dan pembagian dilakukan sampai mendapatkan 100 sperma secara berurutan, sehingga akhirnya mendapatkan jumlah persentase pada setiap kategori motilitas kualitatif. Nilai-nilai yang diperoleh dinyatakan dalam persentase, jumlah persentase keseluruhan kategori adalah 100 persen. Apabila memungkinkan, dianjurkan untuk melakukan pemeriksaan ulang dengan prosedur yang sama untuk mendapatkan hasil pemeriksaan yang lebih akurat. Selanjutnya hasil persentase

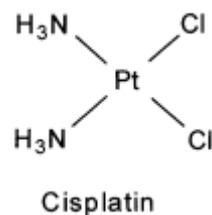
dirata-rata, memberikan perbedaan kurang dari 10%. Hal ini ditentukan secara sederhana dengan membuktikan selisih antara kedua persentase sperma yang bergerak, yaitu jumlah kategori (a), (b), dan (c), adalah kurang dari seperduapuluh dari jumlahnya. Untuk sampel atau siapan air mani kedua dengan motilitas kurang dari 50%, digunakan persentase sperma yang tidak bergerak, yaitu kategori (d). Jika perbedaannya lebih besar dari 10%, siapan ketiga dibuat dan dicacah dan rata-rata persentase dari ketiga siapan dihitung dan dilaporkan (WHO *et al.*, 1992).

Nilai normal motilitas sperma adalah 50% atau lebih yang bergerak maju (kategori a dan b) atau 25% atau lebih bergerak maju dengan cepat (kategori a) dalam waktu maksimal 60 menit setelah ejakulasi (WHO *et al.*, 1992).

Air mani yang hanya memiliki 40% sperma motil atau kurang, dengan pergerakan ke depan yang baik sesudah dua atau tiga jam, dianjurkan untuk dilakukan analisis sperma ulang setelah 48-72 jam dan harus dianalisis dalam waktu 30 menit setelah ejakulasi untuk menentukan apakah gangguan motilitas terjadi dari awal atau memburuk dengan cepat setelah terjadinya ejakulasi. Nilai parameter normal sperma yang ditetapkan oleh WHO pada tahun 1992 telah digunakan secara luas sebagai referensi. Setiap laboratorium khususnya di Indonesia, memiliki nilai parameter Batasan normal sperma tersendiri yang mencerminkan analisa dari populasi spesifik, tetapi hal ini sulit diaplikasikan di lapangan karena terbatasnya sampel air mani dari pria fertil yang terbukti mampu menghasilkan kehamilan (WHO *et al.*, 1992).

2.2 Cisplatin

Cis-diamminedichloridoplatinum (II) atau lebih populer dengan sebutan Cisplatin adalah obat kemoterapi pertama berbasis platinum yang ditemukan sekaligus digunakan secara klinis di seluruh dunia. Sejak saat itu, cisplatin telah banyak diteliti dan mekanisme antitumor dari obat ini sudah mulai diketahui. Cisplatin juga sering dikenal dengan sebutan *cell cycle unspecific* dan dapat digunakan secara kombinasi dengan obat kemoterapi lainnya. Pada sebuah penelitian disebutkan bahwa mekanisme biokimia dari sitotoksitas cisplatin terjadi karena adanya pengikatan obat ke target DNA dan non-DNA serta menginduksi terjadinya apoptosis dan nekrosis atau keduanya dalam populasi sel heterogen yang membentuk suatu massa tumor. Disamping manfaat dari cisplatin yang cukup ampuh untuk terapi tumor maupun kanker, cisplatin yang digunakan dengan dosis tinggi ternyata juga mempunyai efek toksik pada beberapa organ tubuh, antara lain saluran pencernaan, nefrotoksitas, dan neurotoksitas. (Fuertes et al., 2003)(Cepeda et al., 2007)



Gambar 2.8 Struktur kimia cisplatin (Fuertes et al., 2003).

2.2.1 Sejarah penemuan

Regimen platinum yang pertama kali digunakan untuk keperluan kemoterapi adalah cisplatin atau *cis-dichlorodiammineplatinum* (II). Pada tahun 1845, obat ini pertama kali disintesis dan diberi nama klorida Peyrone oleh M. Peyrone. Kemudian pada tahun 1893, Alfred Werner mendeduksi strukturnya sebagai *cis-diamminedichloridoplatinum* (II). Pada tahun 1971, cisplatin akhirnya pertama kali digunakan pada pasien kanker. Setelah itu pada tahun 1978 cisplatin sudah resmi menjadi modalitas terapi dan dipakai secara klinis untuk keperluan kemoterapi pada pasien kanker. Penggunaannya juga telah disetujui oleh *U.S. Food and Drug Administration* dalam bentuk Platinol produksi Bristol-Myers Squibb sebagai terapi kanker testis dan kanker ovarium. (Desoize dan Madoulet, 2002; Fuertes et al., 2003).

Setelah resmi digunakan secara klinis, terdapat \pm 3000 derivat platinum yang disintesis dan diuji coba pada sel-sel kanker. Dari sekian banyak percobaan yang dilakukan, hanya 30 senyawa yang berhasil sampai pada tingkat uji klinis. Hingga saat ini, sudah terdapat 4 obat golongan platinum yang tersedia yang digunakan secara klinis, antara lain cisplatin, carboplatin, oxaliplatin, dan nedaplatin. Khusus untuk nedaplatin, hanya tersedia di Jepang. (Desoize dan Madoulet, 2002) Sedangkan carboplatin dan oxaliplatin sudah digunakan secara klinis di seluruh dunia. Walaupun terdapat 4 obat golongan platinum yang sudah tersedia seperti disebutkan di atas, cisplatin tetaplah yang paling banyak digunakan (Basu dan Krishnamurthy, 2010).

2.2.2 Farmakokinetik

Farmakokinetik dari obat-obatan golongan platinum sebenarnya belum diketahui secara jelas. Untuk menguji farmakokinetiknya dapat dilakukan dengan 2 metode, yaitu *flameless atomic absorption spectroscopy (FAAS)* and *inductively coupled plasma mass spectrometry (ICPMS)*. Cisplatin yang diberikan secara intravena mempunyai waktu paruh eliminasi sekitar 25-50 menit. Hampir 90% dari platinum akan terikat dengan albumin dan protein plasma lainnya dalam darah. Hal ini mengakibatkan terjadinya inaktivasi dari sebagian besar molekul cisplatin tersebut (Cepeda *et al.*, 2007).

Konsentrasi obat yang tinggi akan ditemukan dalam ginjal, hati, usus, dan testis. Total konsentrasi baik yang bebas maupun terikat dengan protein akan menurun dengan sendirinya dalam kurun waktu 24 jam. Ekskresi obat ini melalui ginjal pada 6 jam pertama, dan $\pm 25\%$ akan diekskresikan dalam 24 jam. Sedangkan dalam urin obat ini akan ditemukan hingga 43% dalam urin hingga 5 hari setelah onset pemberian (Desoize dan Madoulet, 2002)(Felici *et al.*, 2002) Cisplatin akan meninggalkan sel setelah melewati pola kinetik dua puncak dengan waktu paruh alfa dan waktu paruh beta (Pisano *et al.*, 2003).

2.2.3 Farmakodinamik

Efektivitas obat golongan platinum terhadap sel kanker disebabkan oleh adanya mekanisme penghambatan sintesis DNA atau saturasi kapasitas seluler (Desoize dan Madoulet, 2002). Pada penelitian sebelumnya didapatkan bahwa efek sitotoksitas cisplatin diyakini disebabkan oleh formasi dari *DNA adduct*, yang termasuk *DNA-cross-links*, *DNA monoadducts*, dan *intrastrand DNA cross-links*.

Beberapa temuan juga telah mengemukakan bahwa sitotoksitas dari cisplatin disebabkan oleh interaksinya dengan asam deoksiribonukleat (DNA). Cisplatin akan berikatan dengan genome DNA (gDNA) sehingga menghambat mekanisme transkripsi dan/atau replikasi DNA menyebabkan perubahan DNA yang berakibat pada kematian sel. Hal inilah yang menjadi dasar sifat antitumor dari cisplatin. Kemudian cisplatin akan masuk ke dalam sitoplasma dan diinaktivasi oleh *Glutathione Stimulating Hormone* (GSH). Setelah itu, cisplatin akan terikat pada protein plasma. Hampir 90% dari cisplatin akan terikat dengan albumin dan protein plasma lainnya yang mengakibatkan terjadinya proses inaktivasi dari molekul cisplatin (Cepeda *et al.*, 2007)(Gilbert Chu, 1994).

2.2.4 Penggunaan Klinis

Pada umumnya, cisplatin digunakan sebagai kemoterapi kombinasi dengan harapan timbulnya efek yang bersifat sinergis tanpa efek samping tambahan. Dosis yang digunakan adalah dimulai dari 40 -50 mg/m² luas permukaan tubuh dengan jeda antar dosis sekurang-kurangnya 3 minggu. Dosis dapat ditingkatkan hingga total mencapai 100-120 mg/m² baik sebagai obat tunggal maupun kombinasi. Apabila terjadi resistensi, maka dosis dapat ditingkatkan hingga 200 mg/m² dengan cara dibagi dalam kurun waktu 5 hari secara berturut-turut (Yusuf A. Hannun, 1997).

Walaupun cisplatin mempunyai efek yang baik sebagai modalitas kemoterapi, cisplatin juga mempunyai efek toksik. Pasien akan mengalami berbagai macam efek samping baik yang umum maupun khusus. Efek samping umum diantaranya mual, muntah, dan penurunan produksi sel darah dan platelet

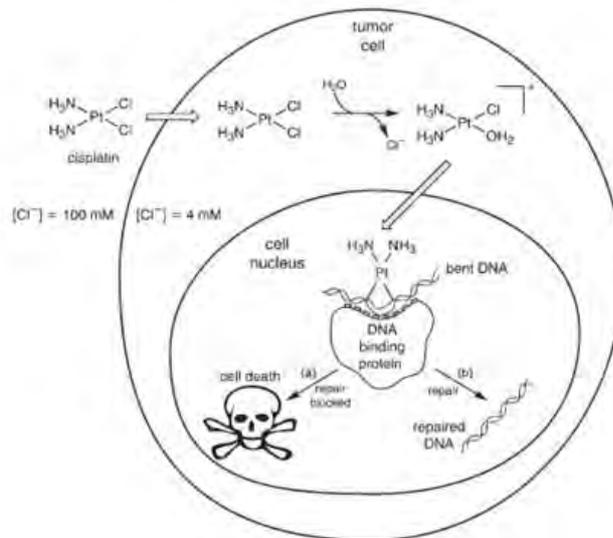
(*myelosuppression*) dan penurunan respon terhadap infeksi (*immunosuppression*). Sedangkan efek samping khusus yaitu toksisitas pada saluran pencernaan, nefrotoksitas, dan neurotoksisitas. Prinsip untuk mencegah efek toksik dari cisplatin, utamanya sebagai renoproteksi, adalah dengan cara meningkatkan eliminasi obat. Eliminasi obat dapat dilakukan dengan cara hidrasi intravena; termasuk di dalamnya penggunaan diuretic osmotik dan mengurangi penggunaan obat-obatan lain yang bersifat nefrotoksik (G Chu, 1994; Yusuf A. Hannun, 1997).

Tingkat keparahan toksisitas cisplatin sangat tergantung pada dosis cisplatin yang diberikan (*dose-dependent*). Sampai saat ini, belum ada pedoman umum tentang bagaimana cara menangani overdosis cisplatin maupun antidotum yang spesifik untuk menangani hal tersebut. Beberapa penelitian hanya memberikan gambaran secara klinis terkait overdosis cisplatin dan lebih menekankan pada cara penanganan serta pertimbangan-pertimbangan yang perlu diperhatikan ketika akan memberikan cisplatin dalam dosis yang cukup tinggi (Del Bello *et al.*, 2007; Florea dan Büsselberg, 2011).

2.2.5 Mekanisme Sitotoksitas

Obat-obatan yang mengandung platinum, termasuk cisplatin, banyak digunakan dalam pengobatan tumor solid seperti kanker ovarium, testis, kandung kemih, dan paru-paru. Secara khusus, cisplatin terbukti memiliki tingkat keberhasilan terapeutik terbesar dalam manajemen tumor *germ cell* non-seminoma pada testis yang dimediasi oleh aktivasi berbagai jalur transduksi sinyal. Cisplatin mengikat ke basa DNA dalam beberapa cara yakni menciptakan DNA adducts, cross-link, dan strand yang menghambat replikasi DNA. Kerusakan DNA yang

tidak dapat diperbaiki akan mengaktifkan jalur apoptosis (Gambar 2.7) (Alderden *et al.*, 2006)(Florea dan Büsselberg, 2011).



Gambar 2.9 Skema di atas menunjukkan mekanisme jalur sitotoksik cisplatin. Setelah memasuki sel, cisplatin terhidrolisis lalu berikatan dengan DNA seluler. Jika lesi DNA tidak diperbaiki oleh sel (jalur a), maka dapat terjadi kematian sel (apoptosis)(Alderden *et al.*, 2006).

Obat kemoterapi dan radioterapi mengeliminasi sel kanker dengan cara menginduksi apoptosis, semakin banyak sel kanker yang mengalami apoptosis maka prognosnya akan semakin baik. Obat anti kanker, salah satunya cisplatin akan membentuk senyawa ikatan platinum dengan DNA serta menghasilkan *Reactive Oxygen Species* (ROS), yang selanjutnya akan mengakibatkan timbulnya respon seluler. (Gonzalez *et al.*, 2001)

Setelah 15 menit atau 1 jam setelah bolus injeksi cisplatin, selanjutnya cisplatin akan dihidrolisis dan terbentuk *monohydrate complex* (MHC) yang merupakan suatu *toxic biotransformation product*. MHC bersifat lebih reaktif dibandingkan cisplatin. *Cisplatin* dan atau MHC akan mengaktifkan enzim *NADPH*

oksidase (NOX-3) sehingga terjadi produksi ROS ($O_2^{\bullet-}$) yang berlebihan. Secara fisiologis NOX-3 memproduksi $O_2^{\bullet-}$ dalam jumlah tertentu untuk metabolismenya. $O_2^{\bullet-}$ kemudian dikatalisis oleh *superoksida dismutase* (SOD) menjadi *hidrogen peroksida* (H_2O_2), H_2O_2 akan dipecah menjadi H_2O dan O_2 oleh enzim *katalase* dan enzim *gluthation peroksidase*. H_2O_2 akan mengalami reaksi lanjutan dengan adanya ion Fe^{2-} sehingga terjadi reaksi *Fenton* atau *Haber-Weiss* yang menghasilkan ion hidroksil (OH^{\bullet}). Ion OH^{\bullet} bersifat sangat reaktif dengan waktu paruh pendek, dan dapat bereaksi dengan semua molekul yang pertama kali ditemui.

ROS dalam jumlah tertentu dibutuhkan dalam metabolisme sel, namun jika jumlah ROS berlebihan dan peningkatannya tidak dapat dihentikan oleh antioksidan endogen maka akan terjadi kerusakan sel-sel sehat di sekitar tumor. ROS meliputi senyawa *NO*, $O_2^{\bullet-}$, *ONOO-*, *RSNOs*, dan *H_2O_2*. Produksi ROS akan menyebabkan terbentuknya *lipid peroksida*, *protein teroksidasi*, dan *DNA teroksidasi* (Barabas *et al.*, 2008).

Cisplatin akan menyebabkan terjadinya produksi *reactive nitrogen species* (RNS) selain menghasilkan ROS, dimana *Nitrit oxide* (*NO*) merupakan senyawa terbesar RNS, yang terbentuk melalui reaksi *oksidasi L-arginin* menjadi *L-citrulline* oleh enzim *NO sintase* (NOS). *NO* akan bereaksi dengan $O_2^{\bullet-}$ membentuk *peroksinitrit* (*ONOO-*) yang bersifat sangat reaktif. ROS pada keadaan patologis akan diproduksi oleh organela intraseluler, membran sel atau pada reaksi ekstraseluler.

Akumulasi ROS menyebabkan terjadinya apoptosis melalui jalur intrinsik dengan mengaktivasi *caspase-8*, *-9*, dan *-3*. Akumulasi ROS akan melepaskan

sitokrom-c dari mitokondria melalui aktivasi *c-Jun-N-terminal kinase (JNK)* dan *p38MAPK*, yang selanjutnya *ssitokrom-c* akan mengaktivasi caspase 8,9, dan 3 (Barabas *et al.*, 2008).

Banyak penelitian mengungkapkan bahwa cisplatin menginduksi apoptosis sel kanker namun belum ada penjelasan tentang bagaimana cisplatin menginduksi apoptosis sel. Cisplatin juga mengakibatkan terjadinya nekrosis yang merupakan bentuk sitotoksitas pada kematian sel yang dapat terjadi simultan pada jaringan atau kultur sel dengan paparan cisplatin (Gonzalez *et al.*, 2001).

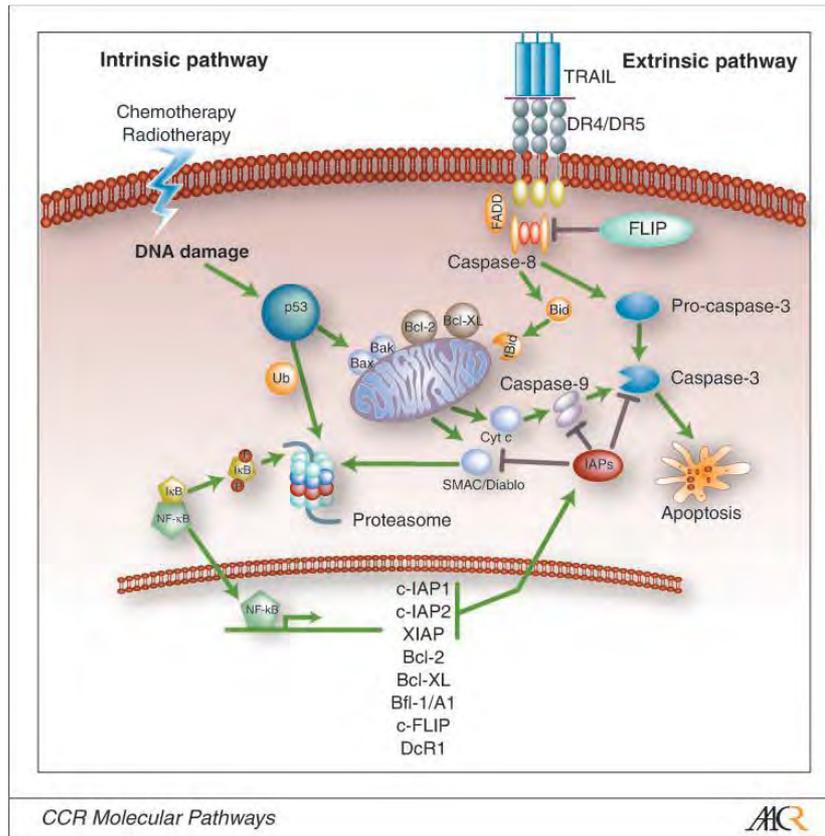
1) Apoptosis

Kematian sel terprogram atau apoptosis, merupakan mekanisme *turnover* sel yang diregulasi secara genetik selama perkembangan embrionik, homeostasis seluler normal dan kematian sel tumor akibat obat. Proses apoptosis adalah suatu proses yang terintegrasi antara faktor eksternal maupun internal sel yang melibatkan sejumlah protein reseptor-ligan (FasL/C95L dengan Fas/CD95), protein regulator sitosolik (Bcl2, Bclxl, Bax, Apaf-1, PUMA, Noxa, Smac-Diablo, dll) dan sejumlah enzim-enzim caspase (ensim hidrolase atau proteolitik) yang berperan penting dalam proses apoptosis. Dalam apoptosis ada tiga fase penting yaitu fase inisiasi, fase efektor dan fase eksekusi (Gonzalez *et al.*, 2001).

Pada fase inisiasi terbentuk ikatan antara ligan dan reseptor seperti halnya ikatan yang terjadi antara FasL dan Fas, Ikatan ini diikuti dengan terbentuknya kompleks protein death domain, recruitment protein adaptor seperti *Fas Associated Death Domain (FADD)* dan procaspase-8 (inactive). Komplek protein ini merupakan *cell death signals*. Pada fase efektor procaspase-8 akan diaktifasi

menjadi caspase 8. Caspase-8 (aktif) akan mengaktifkan protein Bid (Death promoting protein). Protein Bid ini akan memacu pelepasan sitokrom-c dari mitokondria. Jalur intrinsik diperankan mitokondria yang akan melepaskan sitokrom-c, setelah menerima sinyal dari luar sel. Lepasnya sitokrom-c akan ditangkap oleh procaspase-9 (inactive) dan membentuk protein kompleks bersama dengan protein Apaf-1. Ikatan protein ini akan mengaktifkan caspase-9. Aktifnya caspase-9 akan mengaktifkan procaspase-3 menjadi bentuk aktifnya yaitu caspase-3. Eksekusi sel dilaksanakan oleh caspase-3 dengan ditandai adanya *cleavage* atau pemotongan PARP (poly-ADP Ribosa Polimerase) yang merupakan substrat spesifik caspase-3 dan beberapa protein mengalami autodigesti, atau secara mikroskopis tampak terbentuknya *apoptotic bodies*, yaitu fragmen-fragmen DNA (inti sel) dan komponen sitosol yang terbentuk dengan selubung membrane sel dengan ukuran lebih kecil dari sel atau inti sel dimana pada fase inilah terjadinya apoptosis sel (Gonzalez *et al.*, 2001).

Gambaran ketiga fase tersebut secara skematik diperlihatkan pada gambar 2.8 berikut. (De Vries *et al.*, 2006)



Gambar 2.10 Fase Apoptosis

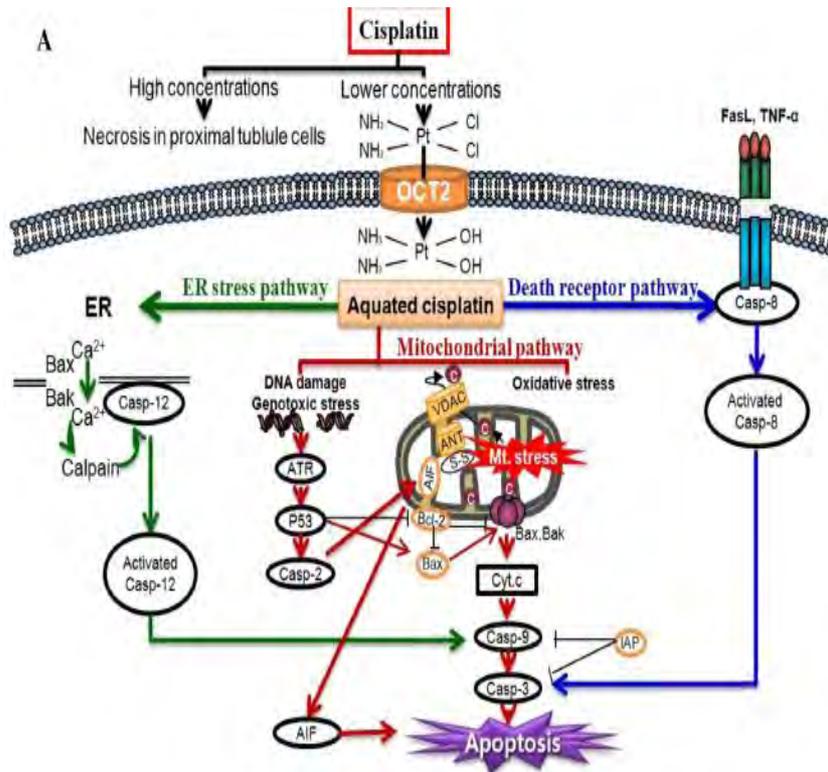
Terdapat 2 jalur yang berperan dalam proses apoptosis yaitu jalur ekstrinsik (jalur kematian sel) dan jalur intrinsik (jalur mitokondria). Jalur reseptor kematian sel disebut sebagai jalur ekstrinsik dan dipicu oleh sinyal di luar sel dan mengaktifkan cascade apoptosis via caspase 8. Jalur mitokondria yang sering disebut sebagai jalur intrinsik melibatkan pelepasan faktor apoptogenik seperti *apoptosis-inducing factor* (AIF) dari mitokondria dan *cytochrome c*. Protein AIF merupakan flavoprotein penjaga intermembran yang ditranslokasi ke nukleus setelah dilepas dari mitokondria yang akan berperan dalam induksi kondensasi kromatin dan fragmentasi DNA. (G Chu, 1994)

Di dalam sel yang normal, membran luar mitokondria mensekresikan protein Bcl-2. Bcl-2 bergabung dengan protein Apaf-1. Bila terjadi kerusakan di dalam sel, Bcl-2 akan membebaskan Apaf-1 dan sitokrom c akan keluar dari mitokondria. Protein pro apoptotik dari golongan famili Bcl-2 yaitu Bax dan Bak meningkatkan permeabilitas membran mitokondria dan menginduksi pelepasan *cytochrome c* melalui oligomerisasi dan insersi di luar membran mitokondria. Apaf-1 dan sitokrom c akan bergabung dengan caspase 9 dan membentuk kompleks apoptosom yang akan terkumpul dalam sitosol. Caspase 9 yang merupakan protease akan mengaktifkan caspase efektor (caspase 7 dan caspase 3). Caspase efektor bertanggung jawab terhadap banyak karakteristik biokimia apoptosis termasuk pembelahan poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) dan fragmentasi DNA. Banyak penelitian tentang sel kanker memperlihatkan bahwa terapi cisplatin akan memicu aktivasi caspase, PARP *cleavage*, dan kemudian apoptosis (Del Bello *et al.*, 2007).

Dikenal beberapa model mekanisme cisplatin dalam memicu apoptosis yang diajukan, yaitu *hijacking model* yang mengemukakan bahwa terikatnya protein HMG pada ikatan cisplatin-DNA kemudian memodulasi kejadian siklus sel yang kemudian menimbulkan apoptosis. Model lain nya adalah *repair shielding model*, protein HMG memproteksi ikatan cisplatin-DNA dari enzim perbaikan DNA. Kedua mekanisme ini tidak selalu terjadi eksklusif masing-masing tetapi bisa terjadi bersamaan (Gonzalez *et al.*, 2001). Namun Mekanisme spesifik yang memicu apoptosis setelah pemberian cisplatin belum jelas tetapi pada prinsipnya harus melibatkan deteksi kerusakan DNA yang cukup besar.

Selain kerusakan DNA yang ekstensif, beberapa jalur sinyal termasuk Akt, PKC dan MAPK juga dapat meregulasi apoptosis yang diinduksi cisplatin. Protein

supresor tumor p53 berperan penting dalam regulasi penghentian siklus sel (*cell cycle arrest*), perbaikan DNA dan apoptosis. Cisplatin menginduksi akumulasi p53 sebelum dan selama apoptosis untuk selanjutnya menginduksi ekspresi protein p21. Jalur p53 (dengan atau tanpa p21) diperkirakan mentargetkan sel yang rusak untuk apoptosis meskipun protein ini tidak dibutuhkan untuk terjadinya apoptosis. Tyrosine kinase non r esepor c-Abl berpartisipasi pada respon kerusakan DNA dengan mengaktifkan MAPK dan interaksi dengan p53 dan p73. Sensitivitas sel terhadap cisplatin tidak hanya diregulasi oleh *uptake*-nya, efluks, atau interaksi cisplatin dengan target DNA tetapi respon seluler tersebut juga berperan dalam menentukan nasib akhir sel, dimana inhibisi progresi sel dan perbaikan kerusakan DNA akibat cisplatin dapat dilakukan oleh sel dengan mengaktifkan respon protektif. Dua jalur utama diinisiasi sebagai respon terhadap kerusakan DNA. Salah satunya dimediasi oleh aksis ATM-Chk2 dan lainnya lewat ATR (*ataxia-telangiectasia and Rad3-related*)-Chk1. Jalur ATM-Chk2 terutama merespon pemisahan *double strand* DNA sedangkan respon terhadap replikasi yang terkait lesi DNA yang terjadi melewati jalur ATR-Chk1 (Liang *et al.*, 2011). Ringkasan mekanisme sitotoksik cisplatin hingga menimbulkan apoptosis dijelaskan pada gambar 2.9 (Hong *et al.*, 2012).



Gambar 2.11. Mekanisme sitotoksik cisplatin (Hong *et al.*, 2012)

Apoptosis melalui jalur mitokondria paling banyak terjadi (46%), jalur reseptor kematian sel memberikan kontribusi 29%, sedangkan jalur retikulum endoplasma terjadi sebanyak 0,08%, sisanya diperankan oleh kombinasi komunikasi (*crosstalk*) antar jalur-jalur tersebut (Hong *et al.*, 2012).

Aktivitas faktor transkripsi dipengaruhi oleh beberapa regulasi fosforilasi dan defosforilasi positif dan negatif yang selanjutnya juga mempengaruhi siklus sel. Salah satu mekanisme regulasi siklus sel dan pengendalian proliferasi sel dipengaruhi oleh protein supresor tumor p53 yang merupakan faktor transkripsi penting bahkan inaktivasinya disebutkan berperan kunci dalam karsinogenesis. Protein regulator siklus sel seperti p21(WAF1/Cip1) terikat pada kompleks cyclin/CDK dan menghambat aktivitas kinasenya lalu menghentikan progresi

siklus sel. Keterikatan pada antigen proliferasi nukleus adalah untuk blokade replikasi DNA tetapi tidak proses perbaikan DNA (Hong *et al.*, 2012).

2) Nekrosis

Nekrosis merupakan kondisi kematian sel yang berbeda dengan apoptosis, baik secara morfologi dan mekanik. Kematian sel karena nekrosis tidak mengikuti jalur transduksi sinyal apoptosis, tetapi berbagai reseptor diaktifkan, dan mengakibatkan hilangnya integritas membran sel dan pelepasan produk yang tidak terkendali dari kematian sel ke dalam ruang ekstraseluler. Obat anti tumor seperti cisplatin atau bahan kimia atau fisik lain dapat menginduksi kematian sel secara nekrosis atau apoptosis, tergantung dari level ATP intrasel, hal tersebut dinyatakan dalam pemelitan mekanisme biokimia kematian sel pada tahun 1990 (Fanning *et al.*, 1990).

3) Perbaikan DNA, *cell cycle arrest* dan *senescence*

Pemahaman terhadap siklus proliferasi sel sangat penting untuk memahami kerusakan DNA yang terjadi karena cisplatin.

Ada empat fase siklus proliferasi sel yaitu,

1. Fase G1 atau pertumbuhan 1 yaitu fase antara mitosis (M) sampai sintesis (S), dalam fase ini terjadi persiapan sintesis hingga sintesis DNA.
2. Fase S yaitu fase akhir G1 dalam fase ini terjadi sintesis DNA
3. Fase G2 atau fase pertumbuhan 2, yaitu fase antara S dan M, merupakan fase pasca sintesis DNA sampai fase mitosis.

4. Fase M atau fase mitosis pada fase ini terjadi penggandaan sel. Terdapat fase sel yang tidak dalam keadaan mitosis, disebut fase G₀.

Cisplatin mengaktivasi sejumlah jalur yang mengakibatkan kerusakan DNA. Untuk mencegah akuisisi dan akumulasi mutasi dapat dilakukan skrining evolusi pada dua titik pengecekan utama/*main checkpoints* selama siklus sel yaitu G₁/S dan G₂/M. *Checkpoint* G₁/S memungkinkan restorasi DNA sebelum replikasi sedangkan G₂/M memfasilitasi perbaikan kerusakan DNA selama fase S atau G₂ untuk mencegah segregasinya pada sel anak.

Cisplatin biasanya tidak menginduksi penghentian G₁, bahkan cisplatin bisa menstimulasi p53 dan menyebabkan penghentian fase S, serta kegagalan menginduksi fase G₁ pada sinkronisasi sel MEF tipe *wild (synchronized wild-type MEF cells)*. Sebaliknya *arrest* pada G₂ nampaknya memicu kematian sel pada pemberian cisplatin (Hammond *et al.*, 2002).

Induksi apoptosis akibat cisplatin melibatkan *Cell cycle arrest* dan titik pengecekan siklus sel spesifik di antara fase G₂ dan M. Jika kerusakan seluler oleh cisplatin tidak dapat diperbaiki pada fase G₂, eliminasi sel yang terplatinasi via apoptosis akan mencegah pasase sel tersebut dalam fase mitosis. Sehingga mencegah berlanjutnya replikasi terhadap *template* yang rusak atau berlanjutnya transmisi material genetik yang rusak pada sel anak (Gonzalez *et al.*, 2001).

Senescence atau penuaan biologis adalah penurunan fungsi secara bertahap dari bentuk kehidupan yang paling kompleks terjadi di level organisme (*organismal senescence*) dan level seluler (*cellular senescence*), dimana terjadi akumulasi proses perubahan struktur molekuler dan seluler yang mengganggu metabolisme dan mengakibatkan kematian.

Setelah paparan cisplatin seluruh *cell line* mengalami henti tumbuh dan *marker senescence* yaitu beta-galaktosidase menunjukkan terjadinya *senescence* tanpa gambaran apoptosis (Wang *et al.*, 1999). *Senescence* merupakan sebuah fenomena di mana sel diploid berhenti membelah, yang normalnya berlangsung setelah pembelahan ke 50 secara *in vitro*. Fenomena ini juga dikenal sebagai *replicative senescence* atau Hayflick *phenomenon*. *Replicative senescence* merupakan akibat dari pemendekan telomer yang pada akhirnya memicu respon kerusakan DNA. Sel dapat diinduksi kedalam keadaan *senescence* melalui kerusakan DNA sebagai respon terhadap meningkatnya ROS, aktivasi onkogen, fusi sel-sel, dan panjang *telomere independent*.

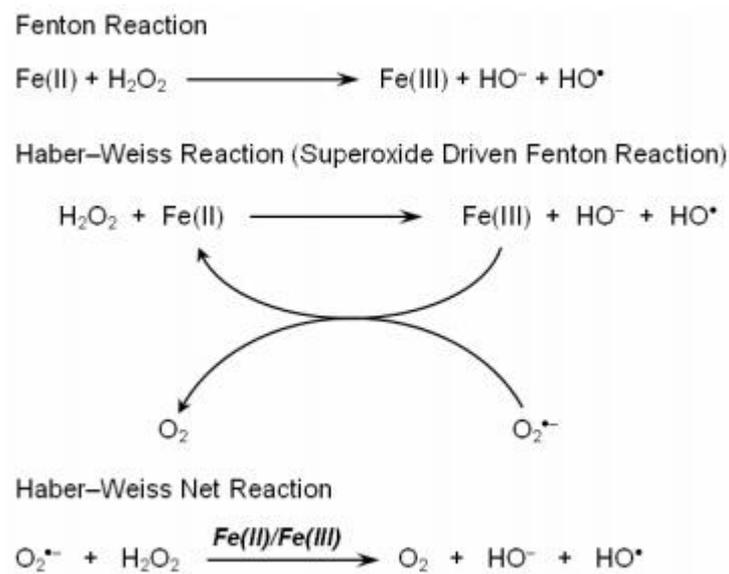
Meskipun sel senescent tidak dapat lagi bereplikasi, sel-sel ini tetap aktif secara metabolik dan umumnya mengadopsi fenotipe imunogenik yang terdiri dari sekretor pro-inflamasi, pengaturan ligan imun, respon pro-survival, ekspresi gen *promiscuous* (pGE) dan pewarnaan positif untuk aktivitas *senescence-associated* β -galactosidase. Inti sel senescent ditandai oleh *senescence-associated heterochromatin foci* (SAHF) dan *DNA segments with chromatin alterations reinforcing senescence* (DNA-SCARS). Sel senescent mempengaruhi penekanan tumor, penyembuhan luka dan kemungkinan juga mempengaruhi perkembangan embrio/plasenta dan berperan pada penyakit yang berkaitan dengan usia. Induksi *senescence* oleh obat diduga dipengaruhi oleh dosis dan berkorelasi dengan terhentinya pertumbuhan sel (Wang *et al.*, 1999).

2.3 Radikal Bebas

Radikal bebas dapat didefinisikan sebagai suatu molekul, atom, atau beberapa atom yang mempunyai satu atau lebih elektron tidak berpasangan pada orbit luarnya sehingga bersifat sangat reaktif (Evans, C.A.R., Diplock, A.T., 1991). Suatu molekul bersifat stabil bila elektronnya berpasangan, tetapi bila tidak berpasangan (*single*) molekul tersebut menjadi tidak stabil dan memiliki potensi untuk merusak (Frei, 1994). Bila molekul tidak stabil ini mengambil satu elektron dari senyawa lain maka molekul tersebut menjadi stabil sedangkan molekul yang diambil elektronnya menjadi tidak stabil berubah menjadi radikal dan memicu reaksi pembentukan radikal bebas berikutnya (reaksi berantai) (Frei, 1994).

Radikal bebas yang banyak terdapat di dalam tubuh adalah anion superoksida dan radikal hidroksil. Radikal hidroksil dapat terbentuk dari anion superoksida melalui reaksi *Haber-Weiss*, baik dengan bantuan ion *Ferri* ataupun tidak. Radikal bebas diproduksi oleh proses yang berbeda dan terjadi di dalam tubuh, seperti : reduksi molekul oksigen yang terjadi selama pernapasan aerob, menghasilkan radikal superoksida dan hidroksil, produk kimia seperti oksidasi katekolamin dan aktivasi rantai asam arakidonat yang menghasilkan elektron, yang dapat mereduksi molekul oksigen menjadi radikal superoksida dan asam hipoklorus (HOHCL). Pada kondisi normal, terbentuknya hidrogen peroksida tidak begitu berbahaya. Namun, adanya logam transisi seperti Cu dan Fe akan membentuk radikal hidroksil yang sangat berbahaya, melalui reaksi Haber-Weiss dan Fenton. Di dalam tubuh, tembaga dan besi merupakan logam transisi yang terbanyak dan ditemukan dalam konsentrasi yang tinggi. Sebagai contoh pada enzim monoamin oksidase, terdapatnya bentuk isoenzim yang berbeda akan membentuk hidrogen

peroksida dalam jaringan perifer. Logam Fe atau Cu akan bereaksi dengan radikal hidroksil, kemudian akan menghancurkan struktur sel. Dalam reaksi Fenton, Ion Ferro (Fe²⁺) bereaksi dengan hidrogen peroksida (H₂O₂) membentuk ion ferri (Fe³⁺) dan radikal hidroksil (OH•). Reaksi Haber-Weiss merupakan reaksi antara radikal superoksid (O₂^{•-}) dengan hidrogen peroksida (H₂O₂) yang kemudian menghasilkan oksigen (O₂) dan radikal hidroksil (OH•).



Gambar 2.12 Mekanisme dasar radikal bebas berdasarkan reaksi Fenton dan Haber-Weiss

2.3.1. Jenis-jenis radikal bebas

Radikal bebas dapat terbentuk dari oksigen dan nitrogen sebagai produk metabolisme sel normal, atau disebut dengan *reactive oxygen species* (ROS) dan *reactive nitrogen species* (RNS). RNS dan ROS yang sangat reaktif terdiri atas radikal superoksida (O₂^{•-}), hidroksil (OH•), peroksil (RO₂•), alkoksil (RO•) dan hidroperoksil (HO₂•), nitrit oksida (NO•), nitrogen dioksida (NO₂•), lipid peroksil (LOO•) dan kelompok non-radikal yang kurang reaktif namun masih tergolong

radikal bebas seperti hidrogen peroksida (H_2O_2), asam hipoklorit ($HOCl$), ozon (O_3), oksigen singlet (1O_2), peroksinitrat ($ONOO^-$), asam nitrit (HNO_2), dinitrogen trioksida (N_2O_3) dan lipid peroksida ($LOOH$). Radikal bebas yang berasal dari oksigen merupakan spesies radikal yang lebih banyak dihasilkan dalam sistem kehidupan. ROS (*reactive oxygen species*) dan RNS (*reactive nitrogen species*) diproduksi pada hewan dan manusia dalam kondisi fisiologis dan patologis. Oleh karena itu, ROS dan RNS meliputi spesies yang radikal dan non-radikal (Punchard dan Kelly., 1996)(Perkins, 1994).

2.3.2. Sumber Radikal Bebas

Radikal bebas dapat berasal dari(Evans, C.A.R., Diplock, A.T., 1991)(Frei, 1994):

1. Endogen
2. Eksogen

2.3.2.1. Berasal dari dalam tubuh (Endogen)

a. Mitokondria

Di antara berbagai organel dalam sel, mitokondria adalah tempat utama pembentukan ROS selama proses metabolisme normal. Beberapa studi meyakini bahwa 90% pembentukan ROS dihasilkan di mitokondria. Fosforilasi oksidatif selular mengakibatkan pengurangan univalen oksigen dan pembentukan ROS. Beberapa reaksi enzimatik lain di mitokondria juga berperan dalam reduksi univalen atau divalen O_2 sehingga membentuk O_2^- atau H_2O_2 . Contohnya, Xantine oksidase dapat menghasilkan O_2^- atau H_2O_2 saat mengkonversi

hypoxantine menjadi xantine sebelum dikonversi menjadi asam urat (Evans, C.A.R., Diplock, A.T., 1991)(Punchard dan Kelly., 1996).

b. Mikrosom

Mikrosom merupakan tempat kedua terbanyak dalam memproduksi radikal bebas. Pada saat berlangsungnya proses transpor elektron, terbentuk O_2^- dan H_2O_2 . Autooksidasi dari sitokrom P-450 dan oksidasi dari NADPH oleh NADPH dehidrogenase akan memicu terbentuknya O_2^- . Aktivasi nukleofil melalui proses reduksi oleh flavin monooxygenase system merupakan proses lain terbentuknya ROS di mikrosom (Evans, C.A.R., Diplock, A.T., 1991)(Punchard dan Kelly., 1996).

c. Enzim

Beberapa enzim dapat memproduksi O_2^- dalam sel. Dalam keadaan hipoksia, oksidasi xantine dan hipoxantine oleh xantine oksidase menghasilkan O_2^- yang akan memicu kerusakan sel. *Indole amine dioxygenase*, enzim yang umumnya terdapat di jaringan kecuali di hati, terlibat dalam pembentukan O_2^- . *Tryptophan dehydrogenase* yang terdapat di sel hati juga memproduksi O_2^- ketika bereaksi dengan triptofan (Evans, C.A.R., Diplock, A.T., 1991)(Punchard dan Kelly., 1996).

d. Fagosit

Fagosit dapat memproduksi ROS dalam perannya melawan mikroorganisme, partikel asing, dan stimulus-stimulus lain. Aktivasi fagosit memicu suatu

respiratory burst, yang ditandai dengan peningkatan uptake O₂, metabolisme glukosa, dan penggunaan NADPH. NADPH-oksidade mengkatalisis reaksi tersebut, dan memicu pembentukan ROS (Evans, C.A.R., Diplock, A.T., 1991)(Punchard dan Kelly., 1996).

2.3.2.2. Berasal dari luar tubuh (eksogen)

a. Obat-obatan:

Beberapa macam obat dapat meningkatkan produksi radikal bebas dalam bentuk peningkatan tekanan oksigen. Bahan-bahan tersebut bereaksi bersama hiperoksia dapat mempercepat tingkat kerusakan. Termasuk didalamnya antibiotika kelompok quinoid atau berikatan logam untuk aktifitasnya (nitrofurantoin), obat kanker seperti bleomycin, anthracyclines (adriamycin), dan methotrexate, yang memiliki aktifitas pro-oksidan. Selain itu, radikal juga berasal dari fenilbutason, beberapa asam fenamat dan komponen aminosalisilat dari sulfasalasin dapat menginaktivasi protease, dan penggunaan asam askorbat dalam jumlah banyak mempercepat peroksidasi lemak (Evans, C.A.R., Diplock, A.T., 1991)(Punchard dan Kelly., 1996).

b. Radiasi:

Radioterapi memungkinkan terjadinya kerusakan jaringan yang disebabkan oleh radikal bebas. Radiasi elektromagnetik (sinar X, sinar gamma) dan radiasi partikel (partikel elektron, photon, neutron, alfa, dan beta) menghasilkan radikal primer dengan cara memindahkan energinya pada komponen seluler seperti air. Radikal primer tersebut dapat mengalami reaksi sekunder bersama oksigen yang

terurai atau bersama cairan seluler (Evans, C.A.R., Diplock, A.T., 1991)(Punchard dan Kelly., 1996).

c. Asap rokok:

Oksidan dalam rokok mempunyai jumlah yang cukup untuk memainkan peranan yang besar terjadinya kerusakan saluran napas. Telah diketahui bahwa oksidan asap tembakau menghabiskan antioksidan intraseluler dalam sel paru (in vivo) melalui mekanisme yang dikaitkan terhadap tekanan oksidan. Diperkirakan bahwa tiap hisapan rokok mempunyai bahan oksidan dalam jumlah yang sangat besar, meliputi aldehida, epoxida, peroxida, dan radikal bebas lain yang mungkin cukup berumur panjang dan bertahan hingga menyebabkan kerusakan alveoli. Bahan lain seperti nitrit oksida, radikal peroksil, dan radikal yang mengandung karbon ada dalam fase gas. Juga mengandung radikal lain yang relatif stabil dalam fase tar. Contoh radikal dalam fase tar meliputi *semiquinone moieties* dihasilkan dari bermacam-macam quinone dan hydroquinone. Perdarahan kecil berulang merupakan penyebab yang sangat mungkin dari desposisi besi dalam jaringan paru perokok. Besi dalam bentuk tersebut menyebabkan pembentukan radikal hidroksil yang mematikan dari hidrogen peroksida. Juga ditemukan bahwa perokok mengalami peningkatan netrofil dalam saluran napas bawah yang mempunyai kontribusi pada peningkatan lebih lanjut konsentrasi radikal bebas (Evans, C.A.R., Diplock, A.T., 1991)(Punchard dan Kelly., 1996).

2.3.3 Target Kerusakan oleh Radikal Bebas

Target utama radikal bebas adalah Protein, Lipid, DNA dan RNA. Dari

ketiga molekul target tersebut, yang paling rentan terhadap serangan radikal bebas adalah asam lemak tak jenuh karena mengandung banyak ikatan rangkap. Radikal bebas dapat mengakibatkan lipid kehilangan ketidakejenuhan, membentuk metabolit reaktif yang mengubah fluiditas, permeabilitas membran, dan mempengaruhi enzim yang terikat membran. Sedangkan protein yang terserang radikal bebas dapat terjadi agregasi dan *crosslinking*, fragmentasi, modifikasi gugus thiol, menyebabkan perubahan transpor ion, peningkatan influks kalsium, dan perubahan aktivitas enzim. Kerusakan yang terjadi pada protein didahului kerusakan pada DNA dan RNA. Radikal bebas dapat memutus cincin deoksiribosa, menyebabkan kerusakan basa, terjadi mutasi, kesalahan translasi, dan menghambat sintesis protein (Evans, C.A.R., Diplock, A.T., 1991)(Punchard dan Kelly., 1996).

2.3.4. Peroksidasi Lipid

Mekanisme kerusakan sel atau jaringan akibat serangan radikal bebas yang paling awal diketahui dan terbanyak diteliti adalah peroksidasi lipid. Peroksidasi lipid paling banyak terjadi di membran sel, terutama asam lemak tidak jenuh yang merupakan komponen penting penyusun membran sel. Radikal bebas akan menyebabkan terjadinya peroksidasi lipid membran sel dengan cara menginisiasi peroksidasi lipid secara langsung terhadap asam lemak *polyunsaturated* dinding sel. Peroksida lipid akan terbentuk dalam rantai yang makin panjang dan dapat merusak organisasi membran sel. Peroksidasi ini akan mempengaruhi fluiditas membran, *cross-linking* membran, serta struktur dan fungsi membran sel. Pengukuran tingkat peroksidasi lipid diukur dengan mengukur produk akhirnya, yaitu *malondialdehyde* (MDA), yang merupakan produk oksidasi asam lemak tidak jenuh dan yang bersifat

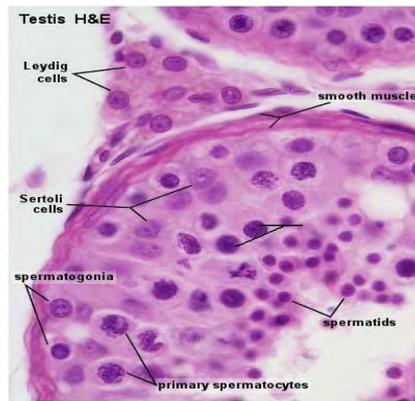
toksik terhadap sel. Pengukuran kadar MDA merupakan pengukuran aktivitas radikal bebas secara tidak langsung sebagai indikator stres oksidatif. Pengukuran ini dilakukan dengan tes *Thiobarbituric Acid Reactive Substances* (TBARS test) (Makker *et al.*, 2009).

2.4. Histopatologi Testis Akibat Paparan Cisplatin

Testis terdiri dari kelenjar-kelenjar yang berbentuk tubulus, dibungkus oleh selaput tebal yang disebut tunika albugenia. Pada sudut posterior organ ini terbungkus oleh selaput atau kapsula yang disebut mediastinum testis. Septula testis merupakan selaput tipis yang meluas mengelilingi mediastinum sampai ke tunika albugenia dan membagi testis menjadi 250-270 bagian berbentuk piramid yang disebut lobuli testis. Isi dari lobulus adalah tubulus seminiferus, yang merupakan tabung kecil panjang dan berkelok-kelok memenuhi seluruh kerucut lobulus. Muara tubulus seminiferus terdapat pada ujung medial dari kerucut. Pada ujung apikal dari tiap-tiap lobulus akan terjadi penyempitan lumen dan akan membentuk segmen pendek pertama dari sistem saluran kelamin yang selanjutnya akan masuk ke rete testis. (Thomas, 1997)

Dinding tubulus seminiferus terdiri dari tiga lapisan dari luar ke dalam yaitu tunika propria, lamina basalis dan lapisan epitelium. Tunika propria terdiri atas beberapa lapisan fibroblas, yang berfungsi sebagai alat transportasi sel spermatozoa dari tubulus seminiferus ke epididimis dengan jalan kontraksi. Lapisan epitel pada tubulus seminiferus terdiri dari dua jenis sel yaitu sel-sel penyokong yang disebut sebagai sel sertoli dan sel-sel spermatogonium. Sel-sel spermatogonium merupakan sel benih sejati, karena sel-sel inilah dihasilkan

spermatozoa melalui pembelahan sel. Sel-sel spermatogonium tersusun dalam 4-8 lapisan yang menempati ruang antara membrana basalis dan lumen tubulus. (Thomas, 1997)(Hill, 2018)

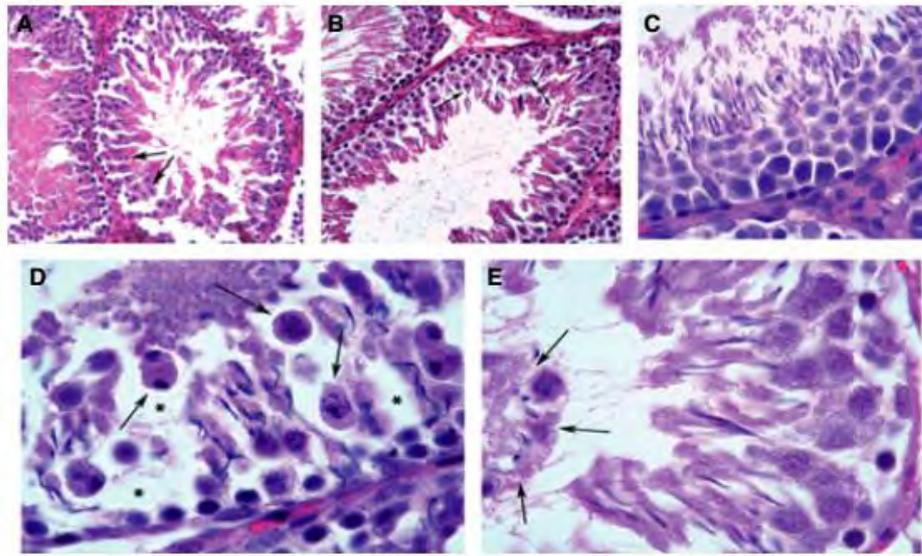


Gambar 2.13. Histologi sel-sel spermatogenik menci pada organ testis dengan pewarnaan HE (Hill, 2018)

Cisplatin adalah obat antitumor yang paling banyak digunakan, terutama untuk pengobatan untuk tumor testis. Juga, efektif terhadap beberapa penyakit lain seperti kanker ovarium, leher rahim dan kandung kemih. Penelitian eksperimental telah menunjukkan bahwa toksisitas testis terkait dengan pemberian cisplatin adalah masalah penting pada laki-laki karena aktivitas mitosis tinggi sel spermatogenik. Ditentukan bahwa paparan cisplatin dapat menyebabkan azoospermia, kelainan pada sperma, penurunan motilitas sperma, gangguan spermatogenesis dan penurunan kadar testosteron pada tikus percobaan. Selain itu, menyebabkan stress oksidatif yang ditandai dengan peningkatan peroksidasi lipid dan penurunan sistem anti-oksidan serta perubahan histologis dalam jaringan testis (Ciftci, Osman, 2011).

Menurut Agarwal dan Saleh, stress oksidatif pada sel sperma dapat bervariasi tergantung pada faktor-faktor seperti jumlah ROS yang diproduksi, tekanan oksigen, interaksi situs dengan ROS dan durasi paparan ROS, serta faktor lingkungan sekitar seperti aktivasi leukosit, konsentrasi komponen molekul dan sistem antioksidan yang tersedia di plasma seminal. Aitken *et al* melaporkan bahwa konsentrasi hidrogen peroksida yang rendah belum menunjukkan efek buruk pada motilitas sperma tetapi menghambat interaksi sperma-oosit. Hal ini mungkin menjelaskan mengapa beberapa pasien dengan parameter sperma normal masih bisa mengalami gangguan kesuburan. Pada pasien tersebut, tingkat ROS tidak cukup tinggi untuk merusak parameter analisis semen dasar tetapi dapat menyebabkan cacat pada fungsi lain yang diperlukan untuk pembuahan. Pada konsentrasi yang lebih tinggi dari ROS, terjadi kerusakan oksidatif asam lemak tak jenuh ganda dalam membran plasma sperma dan ini kemudian memulai peroksidasi lipid cascade. Ketika peroksidasi lipid terjadi, peroksida lipid menumpuk di permukaan sperma dan ini mengurangi fluiditas membran fosfolipid sperma membuat pekerjaan flagella sperma kurang efektif, sehingga mengurangi motilitas. Pengeluaran ROS yang berlebih dari mitokondria di *midpiece* juga dapat merusak sumber daya mitokondria untuk motilitas sperma sehingga menyebabkan penurunan motilitas. Oleh karena itu stres oksidatif memiliki kemampuan untuk menghasilkan infertilitas dengan mengganggu transit sperma yang melalui saluran reproduksi wanita. Selanjutnya, kerusakan membran akrosom akan mengurangi aktivitas acrosin dan menghambat kapasitas sperma menyatu dengan oosit, akibatnya menyebabkan kapasitas fertilisasi yang jelek (Tunc, 2010).

Cisplatin memiliki efek yang dapat merusak tubulus seminiferus. Beberapa area tubulus menunjukkan penipisan *germ cell*. Sedangkan daerah lainnya menunjukkan spermatogonia atau spermatosit primer. Sel Sertoli memperlihatkan derajat perubahan degeneratif dalam bentuk kerusakan proses seluler dan *junction* sel. Gangguan pada membran nukleus spermatid dan hilangnya jembatan interseluler juga terbukti. Dalam suatu studi, diperlihatkan perbedaan antara kontrol dengan pemberian cisplatin pada hewan coba. Pada tikus kontrol, *germ cell* terlihat beraturan dalam lapisan konsentris dan tubulus seminiferus mengandung semua tahapan spermatogenesis. Namun, pada kelompok yang diberikan cisplatin dan Pt-NHC (*Novel Platinum-N-Heterocyclic Carbene Complex*) sebesar 5 mg/kg, kerusakan yang lebih jelas terjadi, seperti penangkapan spermatogenik dan disorganisasi *germ cell*. Tubulus seminiferus yang mengandung sel spermatogenik ditangkap di berbagai tahap pembelahan dan mengalami perubahan degeneratif pada *germ cell*. Tubulus dengan spermatid bulat memperlihatkan sitoplasma vacuola lebih mencolok pada kelompok yang diberikan cisplatin dan Pt-NHC dosis tinggi. (*Gambar 2.12*) (Ciftci, Osman, 2011)(Abdel-Mohsen *et al.*, 2013)



Gambar 2.14. (A) Kerusakan moderat/sedang pada epitel seminiferus: pada kelompok cisplatin 5 mg / kg. (B) Kerusakan sedang epitel seminiferus dalam kelompok Pt-NHC 5 mg / kg. (C) Testis menunjukkan morfologi testis normal dengan pengaturan teratur *germ cell* dalam kelompok kontrol (D) tertangkapnya spermatosit di berbagai tahap divisi (panah), dan ruang intraepitelial (*) karena kurangnya spermatosit dan spermatid dalam kelompok cisplatin 10 mg / kg (E) Degenerasi *germ cell* dengan sitoplasma vacuolated terlihat pada kelompok Pt-NHC 10 mg-kg(Ciftci, Osman, 2011)

Pada kelompok cisplatin, ada penurunan yang signifikan ($P \leq 0.001$) dalam berat badan dan berat testis bila dibandingkan dengan kelompok kontrol. Hasil ini dikonfirmasi oleh penelitian lain, yang menemukan penurunan yang signifikan dalam berat testis yang dinyatakan dalam kaitannya dengan berat badan pada pemberian cisplatin. Bagian testis dari hewan coba yang menerima cisplatin menunjukkan beberapa tubulus seminiferus terdistorsi dengan diikuti peningkatan secara signifikan jumlah tubulus yang berdiameter kecil dan begitu juga dengan sejumlah tubulus abnormal dan berdegenerasi. Beberapa tubulus seminiferus menunjukkan hilangnya selularitas bersamaan dengan vakuolisasi intersel. Tubulus lainnya sangat terpengaruh dengan penurunan total *germ cell*. Selain itu, ada gangguan pada membran nukleus di beberapa spermatid. Peneliti lain menyatakan

bahwa cisplatin mampu mengikat beberapa komponen seluler, termasuk fosfolipid membran dan mikrofilamen sitoskeletal. Keterlibatan sel Sertoli yang tercatat diperlihatkan dengan tidak adanya proses sitoplasma dan tampakan ektoplasmik. Mekanisme dimana cisplatin mengubah fungsi sel Sertoli ditunjukkan pada efek destruktif cisplatin yang terjadi pada pemberian obat dosis tinggi, yang nantinya akan menyebabkan pelepasan enzim hidrolitik, penghancuran blood-testis barrier, dan kerusakan akibat sel yang berdekatan (Abdel-Mohsen *et al.*, 2013)(Sawhney, Pragati, 2013).

2.5. Antioksidan

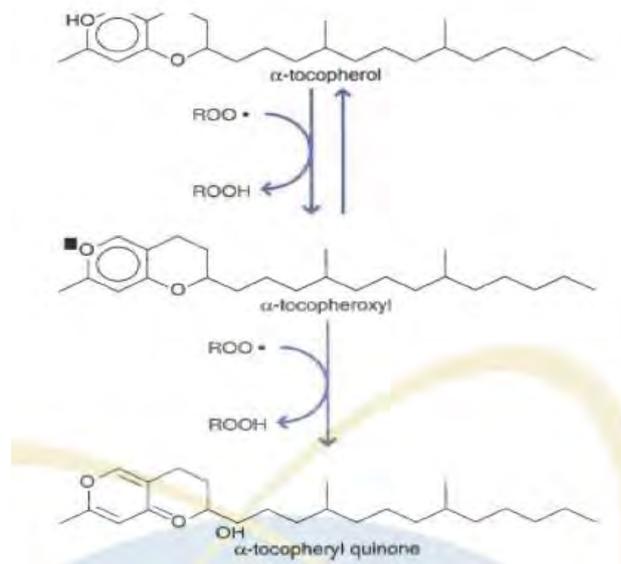
Antioksidan adalah senyawa yang mempunyai struktur molekul yang dapat memberikan elektronnya dengan cuma-cuma kepada molekul radikal bebas tanpa terganggu sama sekali fungsinya dan dapat memutus reaksi berantai dari radikal bebas yang dapat menimbulkan stress oksidatif. Stress oksidatif (OS) adalah situasi ketika ada ketidakseimbangan antara produksi spesies oksigen reaktif dan sistem pertahanan antioksidan. Antioksidan dalam kadar rendah mampu menghambat oksidasi molekul target sehingga dapat melawan atau menetralkan radikal bebas (Murray K, Bender DA, Botham KM, 2009).

Antioksidan Dibagi menjadi tiga kelompok, yaitu antioksidan enzimatik, antioksidan pemutus rantai dan antioksidan logam transisi terikat protein. Yang termasuk antioksidan enzimatik adalah *superoksida dismutase* (SOD), *katalase* (CAT), *gluthathion peroksidase* (GPx), *gluthathion reduktase* (GR) *seruloplasmin*. Mekanisme kerja antioksidan enzimatik adalah mengkatalisir pemusnahan radikal bebas dalam sel. Antioksidan pemutus rantai adalah molekul kecil yang dapat

menerima dan memberi elektron dari atau ke radikal bebas, sehingga membentuk senyawa baru yang stabil, contoh antioksidannya adalah vitamin E dan vitamin C. Sedangkan antioksidan logam transisi terikat protein bekerja mengikat ion logam seperti Fe^{2+} dan Cu^{2+} contohnya Flavonoid dapat mencegah radikal bebas. Antioksidan jenis ini memperbaiki kerusakan sel-sel dan jaringan yang disebabkan radikal bebas (Makker *et al.*, 2009).

2.6 Vitamin E

Vitamin E merupakan antioksidan yang berperan melindungi fosfolipid yang tak tersaturasi pada membran dari degradasi oksidatif akibat reactive oxygen species (ROS) dan radikal bebas lainnya, sebagai antioksidan terpenting pada membran sel, vitamin E memiliki sifat larut dalam lipid pada membran sel. Vitamin E memiliki dua substansi biologis yang aktif, yaitu tocopherol dan tocotrienols. Pada gambar 2.13 menunjukkan bagaimana vitamin E mengikat ROS (Galagher, 2008).

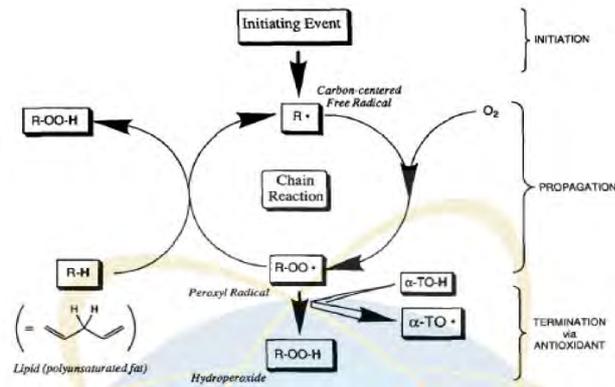


Gambar 2.15. Mekanisme Vitamin E dalam mengikat ROS. (Fanning *et al.*, 1990)

Bentuk vitamin E yang paling aktif secara biologis adalah α -tokoferol, dan merupakan bentuk vitamin E kedua yang paling umum dalam makanan. Varian ini dapat ditemukan paling banyak dalam minyak gandum, bunga matahari, dan minyak safflower (Reboul *et al.*, 2006). Sebagai antioksidan yang larut dalam lemak, ia mengganggu penyebaran ROS melalui membran biologis atau melalui lemak ketika kandungan lipidnya mengalami oksidasi dengan bereaksi dengan radikal lipid yang lebih reaktif untuk membentuk produk yang lebih stabil. Tokoferol berperan sebagai antioksidan dengan menyumbangkan atom hydrogen pada gugus hidroksil (OH) dari struktur cincin ke radikal bebas yang mengakibatkan radikal bebas menjadi tidak reaktif.

Vitamin E berperan dalam mengikat radikal bebas, Hariyatmi (2004) dalam penelitiannya menyatakan bahwa vitamin E memiliki kemampuan untuk menghentikan lipid peroksida dengan cara menyumbangkan satu atom hidrogennya dari gugus OH kepada lipid peroksida yang bersifat radikal sehingga menjadi radikal *tocopheryl* yang kurang reaktif dan tidak merusak, ikatan O-H dalam tokoferol 10% lebih lemah dibandingkan dengan kebanyakan fenol lainnya. Ikatan yang lemah memungkinkan vitamin E untuk menyumbangkan atom hidrogen ke radikal peroksil dan radikal bebas lainnya, Radikal *tocopheryl* yang dihasilkan akan kembali kedalam bentuk tokoferol oleh reaksi redoks dengan donor hidrogen seperti vitamin C (Traber dan Stevens, 2011). Pada sebuah penelitian terbukti bahwa pentana, sebuah produksi minor dari peroksidasi lipid polyunsaturated, berkurang pada nafas manusia yang diberi vitamin E. Hal ini menunjukkan bahwa peroksidasi lipid polyunsaturated dapat diturunkan oleh vitamin E secara *in vivo* (Jungwirth *et al.*, 2016).

Radikal bebas bermula dari bentuk *carbon-centered free radical*, kemudian berikatan dengan oksigen bebas sehingga membentuk ROS. ROS dapat dinetralisir oleh lipid (*polyunsaturated fat*) menjadi hydroperoxide. Dalam menetralsir ROS lipid dibantu oleh vitamin E terutama tocopherol, Pada gambar 2.14 dibawah dapat dilihat bagaimana vitamin E menetralsir ROS, dimana kemampuan tocopherol dalam menetralsir ROS lebih cepat bila dibandingkan dengan lipid. Terjadinya peroksidasi lipid pada membran sel dapat dicegah dan dikurangi oleh vitamin E (Jungwirth *et al.*, 2016).



Gambar 2.16. Mekanisme vitamin E dalam menetralsir ROS (Fanning *et al.*, 1990).

Reduksi molekul oksigen dan aktivitas oksidatif enzim menghasilkan radikal bebas, radikal bebas tersebut selanjutnya dapat diikat oleh vitamin E yang merupakan antioksidan larut lemak dalam membran sel. Vitamin E berperan dalam menghambat peroksidasi lipid, menurunkan kadar malondialdehide pada spermatozoa, meningkatkan motilitas spermatozoa, mengurangi fragmentasi DNA spermatozoa dan meningkatkan aktivitas berbagai antioksidan lain yang juga berfungsi untuk mengikat radikal bebas (Agarwal dan Sekhon, 2010)(Wen, 2006). Selain itu vitamin E dapat menetralsir gugus hidroksil, superoksida, dan radikal

hidrogen peroksida, serta mencegah aglutinasi sperma (Agarwal dan Sekhon, 2010).

Sebagian kerusakan yang disebabkan oleh radikal bebas terjadi pada membran sel dan lipoprotein dengan kepadatan rendah yang tersusun oleh molekul lemak, hal ini menjadikan vitamin E antioksidan yang paling efektif dikarenakan vitamin E larut dalam lemak. Vitamin C juga merupakan antioksidan kuat, namun vitamin C tidak larut dalam lemak, namun larut dalam air (Sitohang *et al.*, 2015). Hal ini menjelaskan bagaimana pemberian vitamin E dapat memperbaiki kualitas spermatozoa setelah diberikan paparan asap rokok dengan lebih baik dibandingkan dengan pemberian vitamin C, oleh karena sebagian besar kerusakan yang disebabkan oleh radikal bebas terjadi pada molekul lemak (Hariyatmi, 2004).

Kelebihan vitamin E dalam tubuh akan disimpan dalam beberapa organ, antara lain hati, jaringan adiposa, otak dan lipoprotein. Vitamin E diekskresikan dari tubuh bersama empedu melalui feses, sebagian lagi melalui urin setelah diubah menjadi asam tokoferonat dan tokoferonalakton yang berkonjugasi dengan glukoronat.

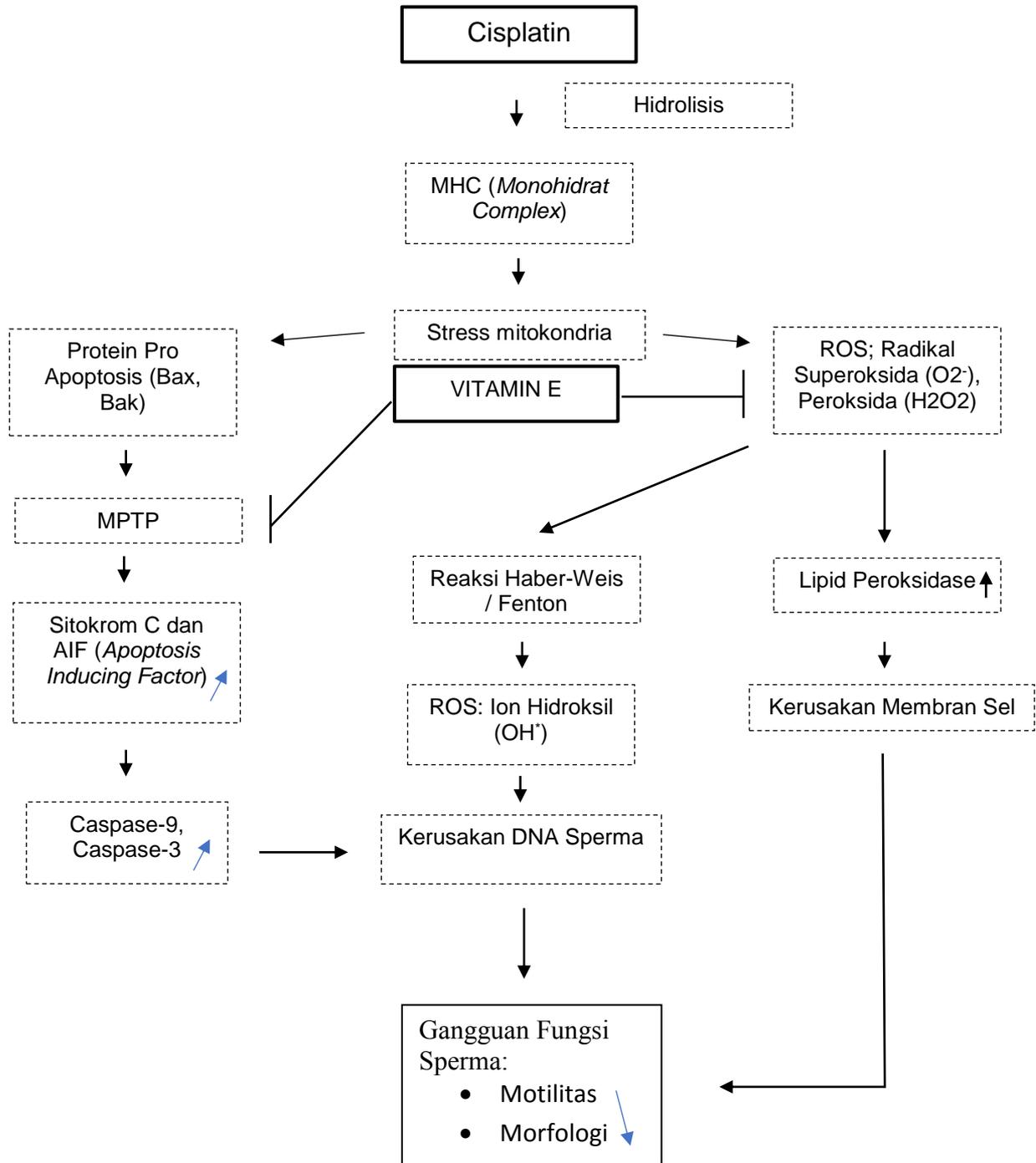
Median konsentrasi Vitamin E (*alfa tocopherol*) tertinggi dalam darah dan plasma semen dicapai pada pemberian 800 mg/Kg BB, yang dicapai masing masing setelah 1 minggu dan 3 minggu setelah pemberian Vitamin E per oral (Momeni, Hamid R, Mehranjan, Malek S, Abnosi MH, Mahmoodi, 2009). Pemberian vitamin E dosis 4,4 IU/kg tidak menimbulkan efek pada sel sertoli dan jumlah sperma, tetapi jika dosis vitamin E ditingkatkan menjadi 220 IU/kg dapat menurunkan konsentrasi prostaglandin pada prostat dan kematangan vesikel glandula seminal pada babi hutan (Guzman MJ, 2000). Pemberian vitamin E pada dosis 100 mg/kg/hari tidak

hanya berefek pada peningkatan berat testis, motilitas sperma, jumlah sperma, dan jumlah sperma, tetapi juga meningkatkan kelangsungan hidup dan perkembangan sperma tikus yang dipapar timbal (Moilanen dan Hovatta, 1995).

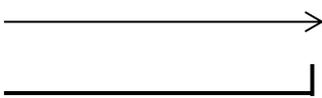
BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

3.1 Kerangka Konsep



Gambar 3.1. Kerangka Konsep

Keterangan:  : menginduksi
 : menghambat

Motilitas dan Morfologi Sperma: variabel terikat yang diamati

Vitamin E : variabel bebas



: variabel diteliti



: variabel tidak diteliti

3.2. Penjelasan Kerangka Konseptual

Cisplatin akan dihidrolisis menjadi *monohidrat complex* (MHC). MHC akan mengaktifkan suatu enzim bernama NADPH oksidase (NOX-3) yang menjadi penyebab terbentuknya *reactive oxygen species* (ROS) yang berlebihan. Hal ini akan merusak keseimbangan antara *scavenger* (Superoxide dismutase (SOD) dan katalase) dan ROS karena jumlah ROS yang lebih banyak daripada *scavenger*. Akibatnya, terjadilah kerusakan pada membran sel-sel yang sensitive terhadap ROS, seperti sel saraf dan jaringan testis, terutama pada sel spermatogonium dan sel sertoli. ROS yang menyebabkan kerusakan sel tersebut antara lain radikal superoksida (O_2^-) dan peroksida (H_2O_2). Apabila radikal bebas berinteraksi dengan membran sel dan mitokondria spermatogonium dan sel Sertoli, maka akan menyebabkan terjadinya lipid peroksidase dan kerusakan pada membrane kedua sel tersebut yang dapat berujung kematian. ROS yang berlebih akan menginduksi terbentuknya lipid peroksidase di dalam sel dalam jumlah yang cukup banyak. Lipid peroksidase akan ditambahkan ke dalam suspensi sperma sehingga terjadilah agregasi sperma dan motilitas sperma pun terpengaruh. Sedangkan H_2O_2 akan bereaksi dengan Fe^{2+} menghasilkan ion hidroksil (OH^*) yang sering disebut

dengan reaksi Fenton atau Haber-Weiss. Reaksi Fenton atau Haber-Weiss ini akan menyebabkan pemutusan rantai DNA dan perubahan basa DNA oleh OH⁻ yang memang mempunyai sifat sangat reaktif sehingga terjadilah apoptosis patologis pada sel. Secara tidak langsung, hal ini akan menyebabkan penurunan kualitas spermatogenesis karena terjadinya penurunan jumlah spermatogonium dan sel Sertoli.

MHC dan ROS yang ada di dalam mitokondria akan menyebabkan terjadinya suatu reaksi yang disebut stress mitochondria. Stress mitochondria ini akan mengaktifkan Bax dan Bak (protein pro apoptotik dari golongan Bcl-2 family). Adanya Bax dan Bak menyebabkan mitokondria mengaktifkan *mitochondrial permeability transition pore* (MPTP) diantara *outer matrix membrane* (OMM) dan *inner matrix membrane* (IMM), tepatnya pada matriks mitokondria. Bax, Bak, dan t-bid, yang mendapatkan stimulasi apoptotik, akan mengalami translokasi ke mitokondria. Kemudian mitokondria akan melepaskan sitokrom-c ke dalam sitosol. Hal ini terjadi bersamaan dengan pelepasan *apoptotic inducing factor* (AIF) dan dATP. Pelepasan ini mengakibatkan terjadinya pemecahan procaspase-9 menjadi bentuk aktifnya yakni caspase-9. Caspase-9 akan menginisiasi caspase-7 dan caspase-3 (caspase efektor) yang mempunyai peran pada apoptosis sel, yaitu pada pembelahan poly (ADP-ribose) polierase (PARP) dan fragemntasi DNA.

Vitamin E merupakan suatu vitamin larut lemak yang sudah dikenali sebagai antioksidan yang cukup kuat. Vitamin E bermanfaat dalam menghambat bahkan mencegah terjadinya kerusakan yang diakibatkan oleh ROS. Hal ini terjadi terutama karena sifat vitamin E yang larut lemak. Sifat ini akan mengakibatkan

Vitamin E mencegah reaksi peroksidase lipid pada membran sel. Oleh karena sifat inilah maka vitamin E juga disebut sebagai antioksidan non-enzimatik. Vitamin E juga dapat mencegah pelepasan sitokrom-C yang pro apoptotik sehingga dapat menghindari kerusakan membran mitokondria. Dengan pemberian vitamin E, diharapkan produksi ROS akan menurun. Produksi ROS yang menurun akan menyeimbangkan rasio *scavenger* dan ROS atau bahkan membuat rasio scavenger lebih banyak dari ROS sehingga dapat menetralkan ROS yang secara tidak langsung akan menurunkan stress oksidatif. Hal ini secara simultan akan menyebabkan reaksi antara radikal bebas dengan membran sel dan mitokondria spermatogonium dan sel Sertoli menurun, kematian sel menurun, jumlah spermatogonium dan sel Sertoli meningkat, morfologi sperma membaik, dan motilitas sperma pun diharapkan juga akan membaik.

3.3 Hipotesis Penelitian

1. Motilitas dan morfologi sperma pada testis tikus putih strain *Sprague Dawley* yang mendapatkan cisplatin 5 mg/kg BB menunjukkan nilai yang lebih buruk dibandingkan dengan tikus putih strain *Sprague Dawley* kontrol.
2. Motilitas dan morfologi sperma pada testis tikus putih strain *Sprague Dawley* yang mendapatkan cisplatin 5 mg/ kg BB dan vitamin E 50 mg/kg BB menunjukkan nilai yang lebih baik dibandingkan dengan tikus putih strain *Sprague Dawley* yang hanya mendapatkan cisplatin 5 mg/kg BB.

3. Motilitas dan morfologi sperma pada testis tikus putih strain *Sprague Dawley* yang mendapatkan cisplatin 5mg/kg BB dan vitamin E 200 mg/kg BB menunjukkan nilai yang lebih baik dibandingkan dengan tikus putih strain *Sprague Dawley* yang hanya mendapatkan cisplatin 5 mg/kg BB.
4. Motilitas dan morfologi sperma pada testis tikus putih strain *Sprague Dawley* yang mendapatkan cisplatin 5mg/kg BB dan vitamin E 200 mg/kg BB menunjukkan nilai yang lebih baik dibandingkan dengan tikus putih strain *Sprague Dawley* yang hanya mendapatkan cisplatin 5mg/kg BB dan vitamin E 50 mg/kg BB

BAB 4

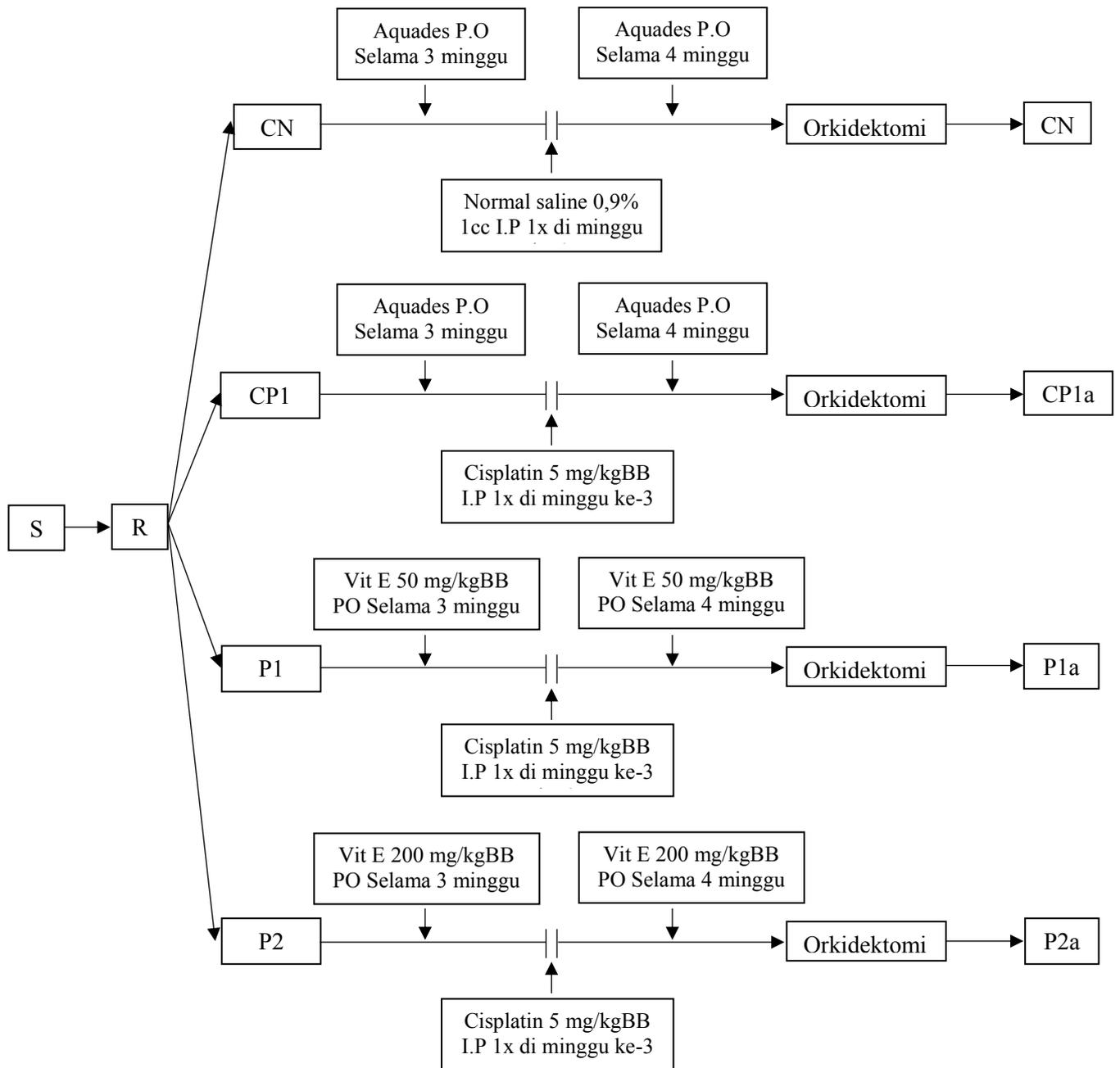
METODE PENELITIAN

4.1. Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah eksperimental dengan menggunakan binatang coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan strain *Sprague Dawley*. Perlakuan yang diberikan kepada subjek berupa pemberian cisplatin dan kombinasi cisplatin dengan vitamin E untuk melihat pengaruhnya terhadap motilitas dan morfologi sperma testis.

4.2. Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian ini adalah eksperimental laboratorium dengan *post test only control group design*, dengan evaluasi gambaran motilitas dan morfologi sperma testis yang dilakukan setelah hewan coba diberikan perlakuan. Pengelompokan hewan coba dilakukan dengan cara randomisasi, dengan pengulangan sebanyak 6 hewan coba pada masing-masing kelompok dan terdapat kelompok kontrol sebagai pembanding (kontrol positif dan kontrol negatif) (Zainuddin, 1995).



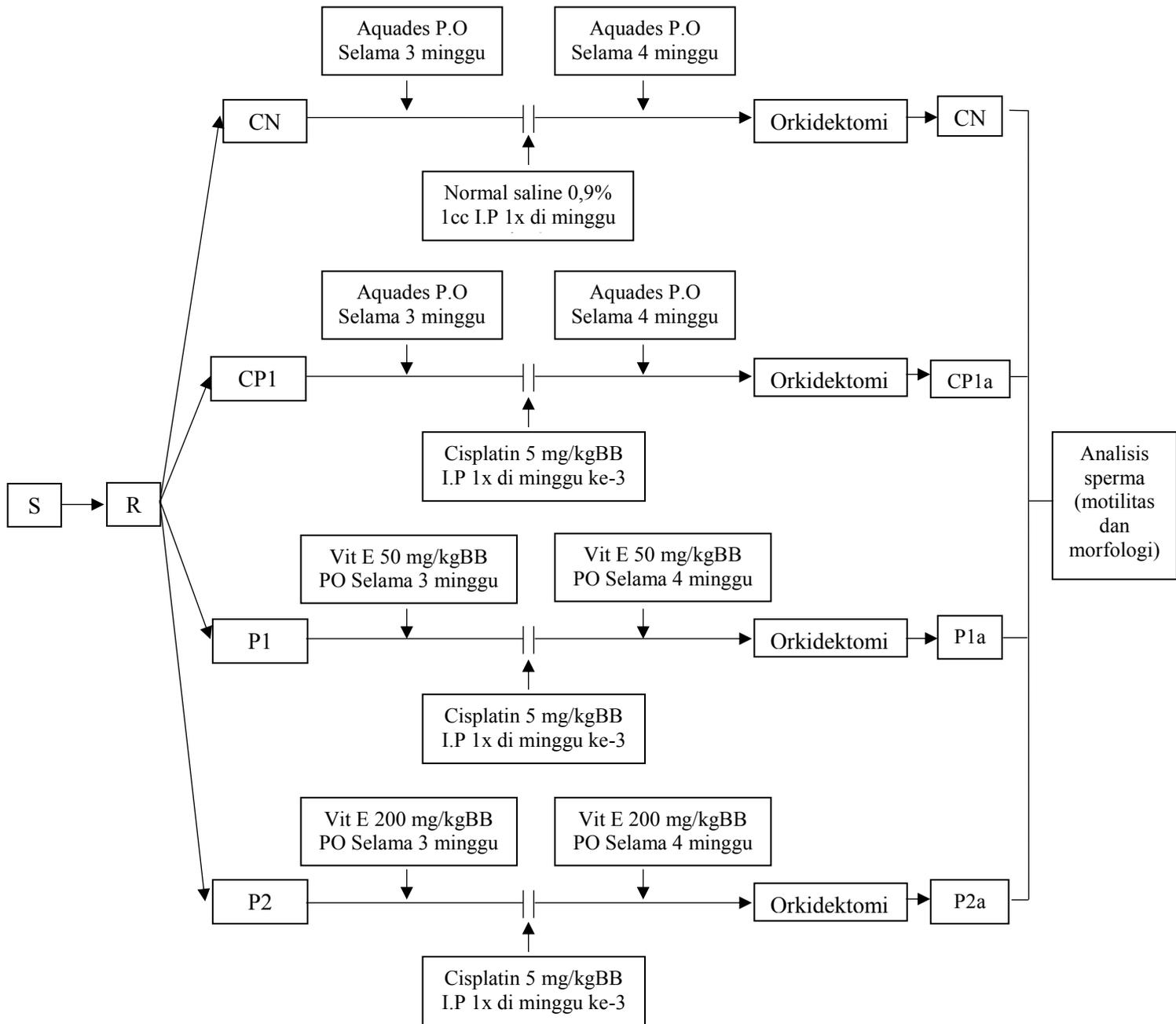
Gambar 4.1. Rancangan Penelitian

Keterangan:

- S : Besar sampel
- R : Random alokasi
- CN : Kontrol negatif
- CP : Kontrol positif cisplatin 5 mg/kgBB
- P1 : Kelompok perlakuan cisplatin 5 mg/ kgBB + Vit E 50 mg/kgBB
- P2 : Kelompok perlakuan cisplatin 5 mg/kgBB + Vit E 200 mg/kgBB

- CPa : Post test kontrol positif cisplatin 5 mg/kgBB
- P1a : Post test kelompok perlakuan cisplatin 5 mg/ kgBB + Vit E 50 mg/kgBB
- P2a : Post test kelompok perlakuan cisplatin 5 mg/kgBB + Vit E 200 mg/kgBB

4.3. Kerangka Operasional Penelitian



Gambar 4.2. Kerangka Operasional Penelitian

Keterangan:

S : Sampel
R : Random alokasi
CN : Kontrol negatif
CP : Kontrol positif cisplatin 5 mg/kg BB
P1 : Kelompok perlakuan cisplatin 5 mg/ kg BB + Vit E 50 mg/kg BB
P2 : Kelompok perlakuan cisplatin 5 mg/kg BB + Vit E 200 mg/kg BB
CP1a : Post test kontrol positif cisplatin 5 mg/kg BB
P1a : Post test kelompok perlakuan cisplatin 5 mg/ kg BB + Vit E 50 mg/kg BB
P2a : Post test kelompok perlakuan cisplatin 5 mg/kg BB + Vit E 200 mg/kg BB
BB

4.4. Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan strain *Sprague Dawley* yang mempunyai kriteria sebagai berikut (Balai Pengujian Hewan, 1989).

1. Umur 10-12 minggu
2. Berat badan 200-250 gram
3. Sehat dan tidak cacat

Sampel ini diperoleh dari Lembaga Penelitian Terpadu (LPT) Universitas Gajah Mada Jogjakarta.

4.4.1. Besar Sampel

Sampel dikelompokkan dalam 4 kelompok secara random dengan menggunakan bilangan random untuk meningkatkan validitas internal karena penelitian ini merupakan penelitian kasualitas (sebab-akibat) (Snedecor dan Cochran, 1974). Setiap sampel mempunyai kesempatan yang sama untuk mendapatkan perlakuan yang sama sehingga probabilitas untuk terpilih menjadi anggota kelompok perlakuan dan kontrol adalah sama (Zainuddin, 1995). Besar

sampel pada tiap kelompok dihitung berdasarkan rumus *Federer* (Daniel dan Cross, 1987).

$$(N-1) - (P-1) \geq 15$$

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

$$(3N - 3) \geq 15$$

$$3N \geq 18$$

$$N \geq 6$$

Keterangan :

P : jumlah perlakuan

N : jumlah pengulangan.

Dengan perhitungan menggunakan rumus di atas didapatkan besar sampel pada tiap kelompok (*r*) yang diperlukan adalah 6 ekor. Pada penelitian ini terdapat kemungkinan sampel mengalami *drop out*, oleh karena itu diputuskan untuk mengambil sampel 7 ekor per kelompok, sehingga keseluruhan sampel dalam penelitian ini adalah 28 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan strain *Sprague Dawley*.

4.4.2. Kelompok Kontrol

Sampel tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan strain *Sprague Dawley* yang baru didapatkan dari Laboratorium Hewan *Tropical Disease Center* (TDC) Universitas Airlangga Surabaya, diawali dengan proses adaptasi dalam kandang/lingkungan penelitian selama 2 minggu dengan siklus 12 jam terang, 12 jam gelap. Kelompok kontrol dalam penelitian ini meliputi kelompok kontrol negatif (CN), yang diberikan perlakuan injeksi *normal saline* 0,9% 1cc 1x intra

peritoneal pada minggu ke 3 sebagai placebo, kemudian pada minggu ke 7 kelompok ini akan langsung dilakukan orkidektomi. Kelompok kontrol positif (CP), yang diberikan perlakuan cisplatin (Cisplatin, Kalbe Farma, Indonesia) dengan dosis 5 mg/kgBB intra peritoneal 1x pada minggu ke 3, kemudian dilakukan orkidektomi pada minggu ke 7.

Orkidektomi pada kelompok kontrol positif maupun negatif dilakukan dengan cara tikus diposisikan terlentang dalam anestesi ketamine 75 mg/kgBB intra peritoneal, insisi kulit skrotum hingga testis dan funikulusnya tampak jelas, kemudian funikulus di klem pada 2 tempat yang berdekatan dan dipotong diantaranya, potongan proksimal diikat dengan benang sutera 3-0 (Ethicon Inc., Johnson & Johnson Co., Somerville), kemudian klem dilepas dan sampel testis kemudian diambil dan segera difiksasi dengan menggunakan formalin buffer-ph 7,4, insisi pada kulit skrotum dijahit kembali satu lapis dengan menggunakan benang plain catgut 3-0 (Ethicon Inc., Johnson & Johnson Co., Somerville). Selanjutnya dilakukan analisis sperma dari sediaan testis yang telah diambil.

4.4.3 Kelompok Perlakuan

Sampel tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain *Sprague Dawley* yang baru didapatkan dari Laboratorium Hewan *Tropical Disease Center* (TDC) Universitas Airlangga Surabaya, diawali dengan proses adaptasi dalam kandang/lingkungan penelitian selama 2 minggu dengan siklus 12 jam terang, 12 jam gelap. Terdapat dua kelompok perlakuan, kelompok P1, yaitu kelompok yang diberikan perlakuan vitamin E (Blackmores, *Catalent* Australia) 50 mg/kgBB selama 7 minggu, dikombinasikan dengan cisplatin (Cisplatin, Kalbe Farma,

Indonesia) 5 mg/kgBB intra peritoneal 1x pada minggu ke 3, kemudian dilakukan orkidektomi. Kelompok perlakuan kedua P2, yaitu kelompok yang diberikan perlakuan vitamin E (Blackmores, *Catalent* Australia) 200 mg/kgBB selama 7 minggu dikombinasikan dengan cisplatin (Cisplatin, Kalbe Farma, Indonesia) 5 mg/kgBB intra peritoneal 1x pada minggu ke 3, kemudian dilakukan orkidektomi pada minggu ke 7.

Orkidektomi dilakukan dengan cara tikus diposisikan terlentang dalam anestesi ketamine 75 mg/kgBB intra peritoneal, insisi kulit skrotum hingga testis dan funikulusnya tampak jelas, kemudian funikulus di klem pada 2 tempat yang berdekatan dan dipotong diantaranya, potongan proksimal diikat dengan benang sutera 3-0 (Ethicon Inc., Johnson & Johnson Co., Somerville), kemudian klem dilepas dan sampel testis kemudian diambil dan segera difiksasi dengan menggunakan formalin buffer-ph 7,4, insisi pada kulit skrotum dijahit kembali satu lapis dengan menggunakan benang plain catgut 3-0 (Ethicon Inc., Johnson & Johnson Co., Somerville). Selanjutnya dilakukan analisis sperma dari sediaan testis yang telah diambil.

4.5. Tempat dan Waktu Penelitian

4.5.1. Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di:

1. Bagian Embriologi Reproduksi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga: untuk tempat pemeliharaan hewan coba, memberikan perlakuan pada hewan coba dan pengambilan sampel hewan coba setelah hewan coba dikorbankan

2. Seksi Patobiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga:
untuk pemeriksaan patologi anatomi sperma yang diperiksa.

4.5.2. Waktu Penelitian

Waktu penelitian sekitar 3 bulan (Lampiran 1).

4.6. Variabel Penelitian

4.6.1 Klasifikasi Variabel Penelitian

Variabel dalam penelitian ini diklasifikasikan menjadi variabel bebas, variabel tergantung dan variabel kendali

- a. Variabel bebas: variabel bebas dalam penelitian ini adalah pemberian Cisplatin serta Cisplatin dikombinasikan dengan vitamin E pada tikus putih strain *Sprague Dawley*.
- b. Variabel tergantung: Motilitas dan Morfologi sperma
- c. Variabel kendali: jenis hewan coba, umur hewan coba, berat badan, jenis kandang, pakan dan minuman dengan cara pemberiannya, suhu, tekanan udara, kelembapan kandang, pemeliharaan oleh orang yang sama, cara pemberian perlakuan oleh orang yang sama, dosis perlakuan, teknik orkidektomi dengan orang yang sama, temperatur penyimpanan sampel jaringan sama.

4.7. Kriteria *Drop Out* Sampel

Sampel dinyatakan *drop out* dari penelitian apabila hewan coba mati selama diteliti

4.8. Definisi Operasional Variabel Penelitian

Definisi operasional variabel penelitian ini didefinisikan sebagai berikut:

1. Cisplatin atau cisplatinum, atau *cis*-diamminedichloroplatinum (II) adalah obat kemoterapi kanker yang mengandung senyawa platinum *soluble* dengan dosis 5 mg/kg BB diberikan intra peritoneal 1x pada minggu ke 3 dengan Merk Cisplatin, kalbe farma.
2. Vitamin E (alfa tocopherol) adalah vitamin larut dalam lemak yang merupakan anti oksidan kuat. dalam penelitian ini didapat dari *Catalent*, Australia. Vitamin E diberikan dengan dosis 50 mg/kg BB dan 200 mg/kgBB yang diencerkan dengan vehiculum minyak Jagung dengan volume akhir 0,5 ml tiap kali pemberian secara sonde untuk kelompok perlakuan P1 dan P2, sehari sekali selama 7 minggu.

Dosis ini didasarkan pada penelitian sebelumnya yang menunjukkan efek perlindungan vitamin E terhadap stres oksidatif pada testis dan sperma, dimana tidak ada efek samping yang dilaporkan (Gevrek dan Erdemir, 2018)(Krishnamoorthy *et al.*, 2007). Dosisnya setara dengan 480 mg dan 1980 mg per hari untuk orang dewasa 60 kg. Dalam penelitian sebelumnya, vitamin E tidak menunjukkan efek buruk pada dosis sampai 2362 mg per hari (Anderson dan Reid, 1974). Studi yang sama menyimpulkan bahwa hingga 1073 mg per hari vitamin E aman untuk kebanyakan orang dewasa (Hathcock *et al.*, 2005).

3. Koleksi Sperma Epididimis Tikus

Kauda epididimis kiri dan kanan disayat untuk mengeluarkan spermatozoa. Kemudian kauda epididimis diletakkan di dalam cawan petri yang telah

berisi NaCl fisiologis 1 ml dan dipotong kecil-kecil dan dibiarkan 1-2 menit untuk memberikan kesempatan bagi spermatozoa keluar dari epididimis dan menyebar.

4. Untuk Pemeriksaan motilitas dilakukan dengan meletakkan satu tetes semen di atas gelas objek dan ditambahkan satu tetes larutan NaCl fisiologis, selanjutnya dicampur sampai homogen. Pemeriksaan di bawah mikroskop dengan pembesaran 400x.

5. Untuk pemeriksaan Morfologi/viabilitas dilakukan dengan membuat preparat pewarnaan Eosin negrosin dengan komposisi:

Larutan A: terdiri atas negrosin sol. (20g negrosin ad.100 ml Aqua), diaduk dan dipanaskan.

Larutan B: Stock buffer atau campuran 20 ml larutan a dan 80 ml larutan b

a: 21.628 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ad.500 ml Aqua

b:22.254 g KH_2PO_4 ad.500 ml Aqua.

Larutan C: Stock glucose sol 43.3 g glucose ad.500 ml Aqua

Kemudian campurkan bahan berikut dengan pemanasan.

Larutan A 150 ml

Eosin Yellow 5 gram

Larutan B 30 ml

Larutan C 20 ml

Aqua ad. 300 ml

6. Pemeriksaan dan penghitungan jumlah sel yang diteliti pada tiap kelompok dilakukan oleh peneliti dengan dibawah pengawasan ahli patologi anatomi.

4.9. Unit Analisis

Unit analisis dalam penelitian ini adalah berupa jaringan testis untuk pemeriksaan mikroskopis sperma.

4.11. Prosedur Penelitian (Lampiran 2)

4.10 Persyaratan Etik

Pengelolaan hewan coba saat perlakuan sampai pengorbanan pada penelitian ini mengikuti kaidah *International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals* (1985) dari *Council for International Organizations of Medical Sciences*. Hal yang perlu dilaksanakan sesuai dengan persyaratan etik antara lain dalam perawatan kandang, pemberian makan dan minum, aliran udara dalam kandang, perlakuan saat penelitian, menghilangkan rasa sakit, pengambilan unit analisis penelitian dan pemusnahan hewan coba.

4.12 Analisa Data

Data motilitas dan morfologi sperma selanjutnya akan diuji normalitas dengan tujuan untuk mengetahui sebaran data normal atau tidak dan juga akan dilakukan uji varians dengan tujuan untuk mengetahui varian data sama atau tidak. Uji hipotesis yang digunakan pada penelitian ini untuk mengetahui adanya perbedaan motilitas dan morfologi sperma pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan ditentukan berdasarkan hasil uji normalitas dan varians data. Jika sebaran data normal dan varian homogen, maka digunakan uji hipotesis *One Way Anova*, jika varian tidak homogen digunakan *One-Way Anova Brown-Forsythe*.

Hipotesis ditentukan berdasarkan nilai signifikansi yang diperoleh. Jika nilai signifikansi $<0,05$, maka langkah selanjutnya adalah dengan melakukan uji perbandingan berganda atau *Post Hoc Test* dengan cara LSD, yaitu untuk mengetahui secara lebih rinci pasangan kelompok perlakuan yang berbeda secara signifikan dan yang tidak berbeda secara signifikan.

Jika tidak memenuhi syarat uji *Anova*, maka dilakukan langkah-langkah uji statistik berikut (Dahlan, 2006)

1. Diupayakan untuk melakukan transformasi data supaya sebaran menjadi normal dan varian menjadi sama.
2. Jika variabel hasil transformasi data tidak berdistribusi secara normal atau varian tetap tidak sama, maka alternatif dipilih uji *Kruskal-Wallis*.
3. Jika pada uji *Kruskal-Wallis* menghasilkan nilai $p < 0,05$, maka dilanjutkan uji *Mann-Whitney*.

Jika terdapat perbedaan, maka dilanjutkan dengan uji statistik berikutnya untuk mengetahui pasangan data yang berbeda (untuk melihat perbedaan dari tiap kelompok). Uji ini menggunakan *Mann-Whitney* sebagai uji lanjut *Kruskal-Wallis*.

Penelitian ini bermakna bila nilai $p < 0,05$ (Dahlan, 2006). Seluruh teknis pengolahan data dianalisis secara komputerisasi dengan menggunakan *software statistical product and service solution 25 for windows* (SPSS 25).

4.13 Biaya Penelitian

- | | |
|-----------------------------------|--------------------|
| 1. Biaya alat tulis | : Rp. 500.000,00 |
| 2. Operasional penelitian | : Rp. 1.000.000,00 |
| 3. Biaya pembelian bahan dan obat | : Rp. 1.000.000,00 |

4. Biaya pembelian dan perawatan tikus	: Rp. 7.000.000,00
5. Biaya pembuatan sampel preparat	: Rp. 2.700.000,00
Total Biaya	: Rp. 12.200.000,00

4.14 Organisasi Penelitian

Peneliti	: Dimas Visa Aditya
Pembimbing	: Tarmono Doddy M. Soebadi
Pendukung	: PPDS Urologi FK Unair dan karyawan

BAB V

HASIL PENELITIAN

5.1. Analisis Hasil Penelitian

5.1.1. Karakteristik Sampel

Telah dilakukan penelitian untuk melihat pengaruh pemberian vitamin E terhadap motilitas sel sperma pada hewan coba yang mendapatkan paparan cisplatin. Pada penelitian dapat diketahui karakteristik subyek penelitian ini sebagaimana terlihat pada tabel 5.1. Berdasarkan hasil uji statistik diketahui bahwa pada penelitian ini distribusi berat badan pada tiap kelompok tidak berdistribusi normal dengan nilai $p < 0,05$. Oleh karena itu pada penelitian ini data berat badan dianalisis dengan menggunakan uji Kruskal-Wallis. Berdasarkan hasil uji ini tidak terdapat perbedaan yang signifikan rerata berat badan antar kelompok dengan nilai $p > 0,05$.

Tabel 5.1. Karakteristik sampel

Berat Badan	Median (Min- Max)	Nilai p
Pre-perlakuan(gram)		
- CN	250 (220-270)	0.57 ^a
- CP	250 (220-280)	
- P1	245 (220-290)	
- P2	275 (210-280)	

CN: Kelompok kontrol

CP: Kelompok cisplatin

P1: Kelompok cisplatin + vitamin E 50 mg/kgBB

P2: Kelompok cisplatin + vitamin E 200 mg/kgBB

5.1.2. Efek pemberian vitamin E terhadap motilitas sperma

Pada penelitian ini berdasarkan uji statistik menggunakan uji Shapiro-Wilk dapat diketahui bahwa distribusi motilitas sel sperma pada setiap kelompok

berdistribusi normal dengan nilai $p > 0,05$. Pada uji homogenitas juga didapatkan data setiap kelompok memiliki varian yang tidak homogen dengan nilai $p < 0,05$. Berdasarkan hal tersebut, pada penelitian ini data dianalisis dengan menggunakan uji One-Way ANOVA Brown-Forsythe sebagaimana terlihat pada tabel 5.2. Pada penelitian ini berdasarkan hasil analisis didapatkan perbedaan yang signifikan antar kelompok dengan nilai $p < 0,05$, oleh karena itu selanjutnya data dianalisis dengan menggunakan uji post hoc Games-Howell untuk mengetahui perbedaan dan perbandingan masing-masing kelompok.

Tabel 5.2. Perbandingan motilitas sperma pada tiap kelompok

Kelompok	n	Mean \pm SD (%)	Nilai p
CN	6	66,67 \pm 6,83	0,00*
CP	6	14,17 \pm 3,76	
P1	6	52,50 \pm 20,43	
P2	6	59,17 \pm 21,30	

* $p < 0,05$: berbeda signifikan secara statistik

Pada penelitian ini berdasarkan hasil uji post hoc Games-Howell dapat terlihat bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok yang terpapar cisplatin dibandingkan dengan kelompok kontrol dengan nilai $p < 0,05$ (Tabel 5.3). Oleh karena itu, pada penelitian ini terbukti bahwa cisplatin dapat menurunkan motilitas sel sperma. Pada penelitian ini pemberian vitamin E dilakukan untuk memberikan proteksi terhadap motilitas sel sperma. Pada penelitian ini dapat terlihat bahwa terdapat perbedaan yang signifikan motilitas sel sperma pada kelompok yang mendapat vitamin E 50 mg/kgBB dibandingkan dengan kelompok yang terpapar cisplatin dengan nilai $p < 0,05$ (Tabel 5.3) dimana motilitas sel sperma pada kelompok yang mendapat vitamin E 50 mg/kgBB lebih tinggi

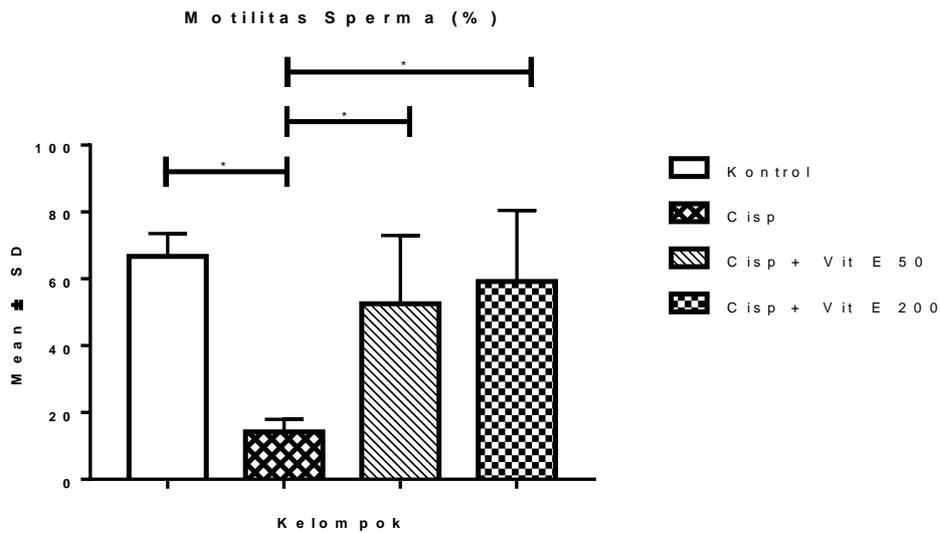
dibandingkan dengan kelompok yang terpapar cisplatin. Demikian pula jika dibandingkan antara kelompok yang mendapat vitamin E 50 mg/kgBB dengan kelompok kontrol didapatkan tidak terdapat perbedaan yang signifikan dengan nilai $p < 0,05$ (Tabel 5.3). Hal ini menunjukkan bahwa vitamin E 50 mg/kgBB mampu mempertahankan motilitas sel sperma secara optimal.

Pada penelitian ini juga menunjukkan kelompok yang mendapat vitamin E 200 mg/kgBB dibandingkan dengan kelompok yang terpapar cisplatin dengan nilai $p < 0,05$ (Tabel 5.3). Pada penelitian ini dapat terlihat bahwa terdapat perbedaan yang signifikan motilitas sel sperma pada kelompok yang mendapat vitamin E 200 mg/kgBB dibandingkan dengan kelompok yang terpapar cisplatin dengan nilai $p < 0,05$ (Tabel 5.3) dimana motilitas sel sperma pada kelompok yang mendapat vitamin E 200 mg/kgBB lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok yang terpapar cisplatin. Pada penelitian ini juga jika dibandingkan antara kelompok yang mendapat 200 mg/kgBB dibandingkan dengan kelompok kontrol didapatkan tidak terdapat perbedaan yang signifikan dengan nilai $p > 0,05$. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian vitamin E pada dosis 200 mg/kgBB pada kelompok yang terpapar cisplatin dapat mempertahankan motilitas sel sperma secara optimal.

Tabel 5.3. Analisis Post hoc Games-Howell perbandingan motilitas sel sperma pada tiap kelompok

Perbandingan antar kelompok	Perbedaan Rerata	IK 95%		Nilai p
		Batas Bawah	Batas Atas	
CN vs CP	54,50	42,24	62,76	0,000*
CN vs P1	14,17	-16,12	44,45	0,438
CN vs P2	7,50	-24,10	39,10	0,843
CP vs P1	-38,33	-68,87	-42,24	0,020*
CP vs P2	-45,00	-76,87	-7,79	0,012*
P1 vs P2	-6,67	-43,55	30,22	0,944

* $p < 0,05$: bermakna secara statistik



Gambar 5.1. Perbandingan motilitas sperma tiap kelompok

5.1.3. Efek pemberian vitamin E terhadap morfologi sperma

Pada penelitian ini berdasarkan berdasarkan uji statistik dengan menggunakan uji Shapiro-Wilk dapat diketahui bahwa distribusi morfologi sel sperma pada setiap kelompok berdistribusi normal dengan nilai $p > 0,05$. Pada uji homogenitas juga didapatkan data setiap kelompok memiliki varian yang homogen dengan nilai $p > 0,05$. Berdasarkan hal tersebut, pada penelitian ini data dianalisis dengan menggunakan uji One Way ANOVA. Pada penelitian ini berdasarkan hasil analisis didapatkan terdapat perbedaan yang bermakna antar kelompok dengan nilai $p < 0,05$ (Tabel 5.4), oleh karena itu selanjutnya data dianalisis dengan menggunakan Uji Post Hoc *Least Significant Difference* (LSD) untuk mengetahui perbedaan dan perbandingan masing-masing kelompok.

Tabel 5.4. Perbandingan morfologi sel sperma pada tiap kelompok

Kelompok	n	Mean \pm SD (%)	Nilai p
CN	6	72,00 \pm 7,95	0,01*
CP	6	48,00 \pm 19,99	
P1	6	69,00 \pm 12,00	
P2	6	75,00 \pm 13,57	

* p < 0,05: bermakna secara statistik

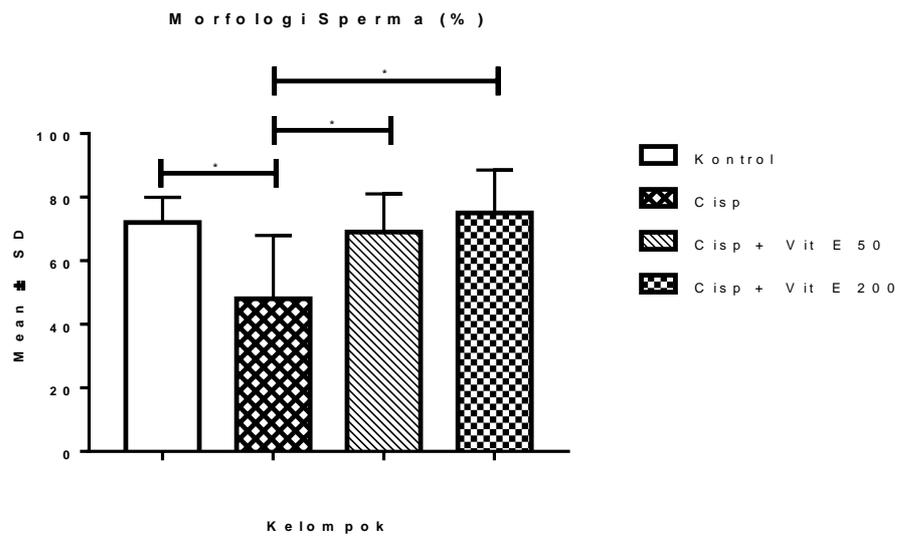
Pada penelitian ini berdasarkan hasil uji Post Hoc LSD dapat terlihat bahwa terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok yang terpapar cisplatin dibandingkan dengan kelompok yang normal dengan nilai p < 0,05. Oleh karena itu, pada penelitian ini terbukti bahwa cisplatin dapat menurunkan morfologi sel sperma. Pemberian vitamin E diharapkan dapat memberikan efek proteksi terhadap morfologi sel sperma. Pemberian dosis vitamin E 50 mg/kgBB dan 200 mg/kgBB memberikan pengaruh yang signifikan terhadap morfologi sel sperma. Hal ini sebagaimana terlihat pada tabel 5.5, bahwa terdapat perbedaan yang signifikan morfologi sel sperma pada kelompok yang terpapar cisplatin yang mendapat vitamin E 50 mg/kgBB, maupun vitamin E 200 mg/kgBB dibandingkan dengan yang mendapatkan cisplatin dimana morfologi sel sperma pada kelompok yang terpapar cisplatin dan mendapat vitamin E50 mg/kgBB, dan vitamin E 200 mg/kgBB lebih tinggi morfologi sel spermanya dengan nilai p < 0,05. Demikian pula jika dibandingkan dengan kelompok kontrol dapat terlihat bahwa tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok kontrol dengan kelompok yang mendapat vitamin E50 mg/kgBB maupun vitamin E 200 mg/kgBB dengan nilai p > 0,05. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian vitamin E pada dosis 50

mg/kg BB dan 200 mg/kgBB pada kelompok yang terpapar cisplatin dapat memberikan proteksi terhadap morfologi sel sperma.

Tabel 5.5. Analisis Post Hoc LSD perbandingan morfologi sel sperma pada tiap kelompok

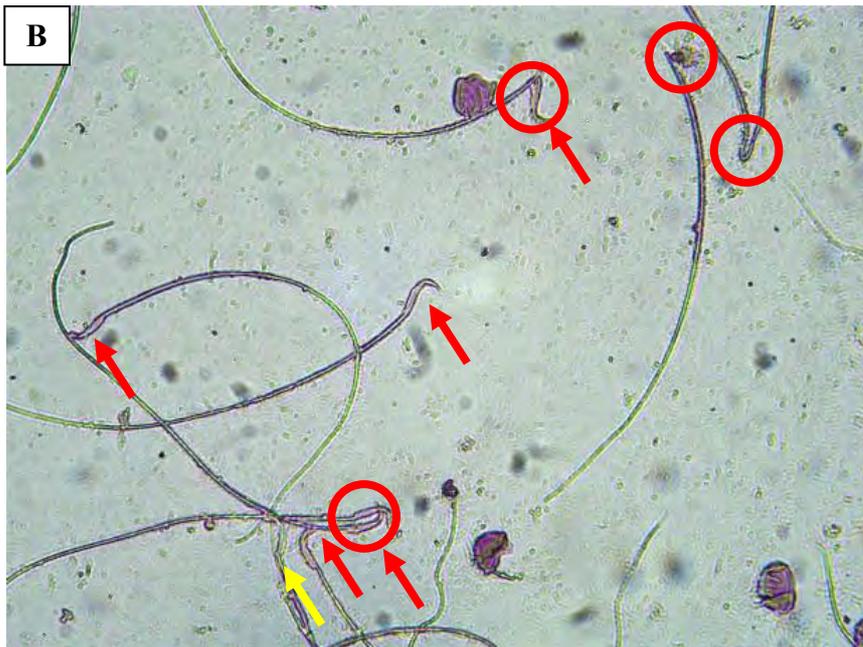
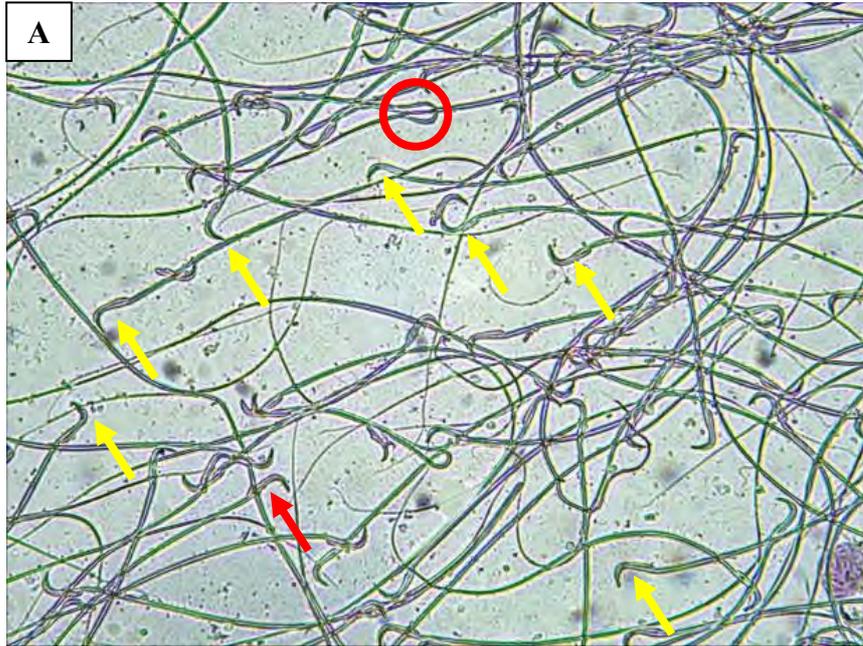
Perbandingan antar kelompok	Perbedaan Rerata	IK 95%		Nilai p
		Batas Bawah	Batas Atas	
CN vs CP	24,00	7,07	40,93	0,00*
CN vs P1	3,00	-13,93	19,93	0,72
CN vs P2	-3,00	-19,93	13,93	0,72
CP vs P1	-21,00	-37,93	-4,07	0,02*
CP vs P2	-27,00	-43,93	-10,07	0,00*
P1 vs P2	-6,00	-22,93	10,93	0,47

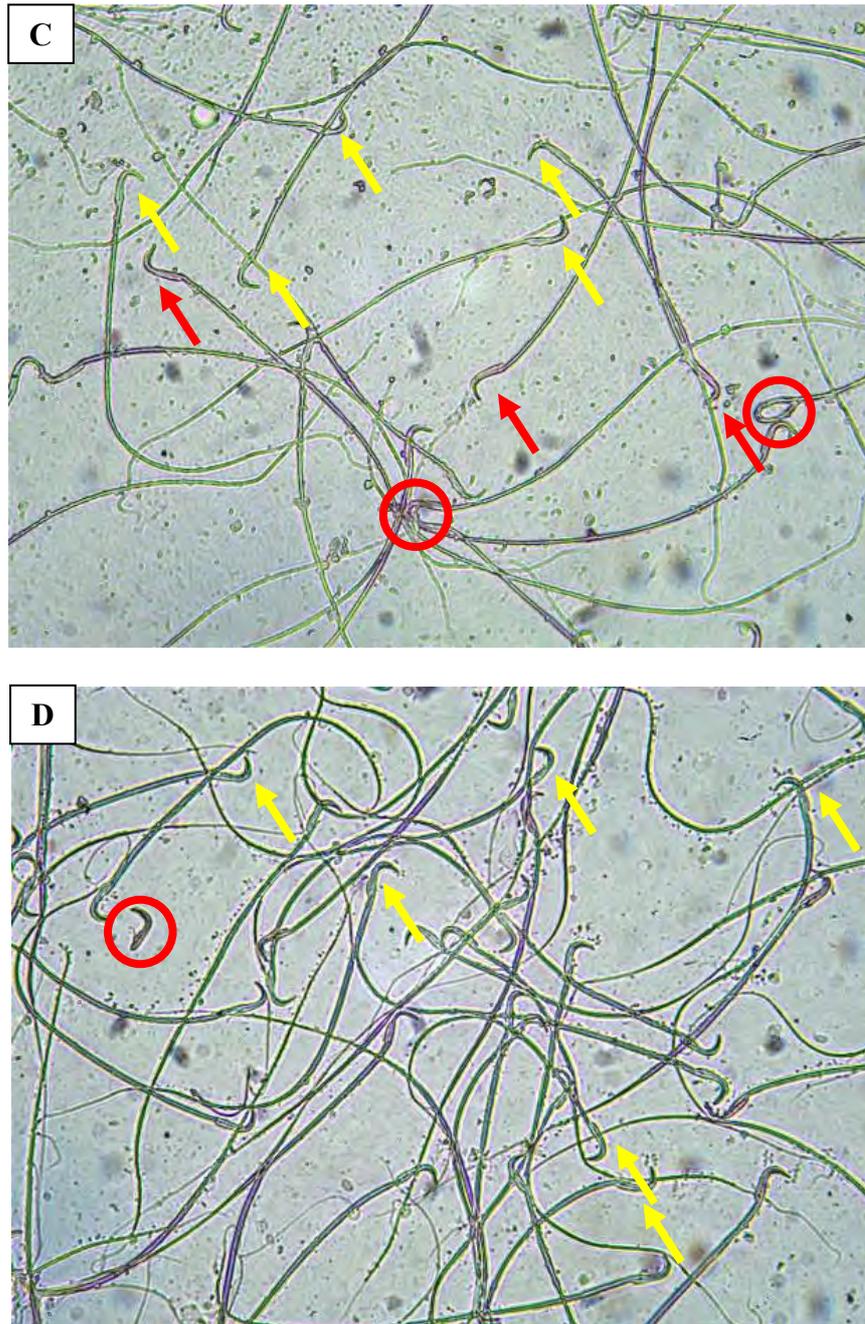
* p < 0,05 : bermakna secara statistik



Gambar 5.2. Perbandingan morfologi sperma tiap kelompok

Histopatologi Hasil Penelitian





Gambar 5.3. Histopatologi sperma (400x pembesaran) pada: **A.** Kelompok kontrol negatif; **B.** Kelompok kontrol positif; **C.** Kelompok cisplatin dan Vitamin E 50 mg/kgBB; **D.** Kelompok cisplatin dan Vitamin E 200 mg/kgBB. Panah warna kuning: sel sperma hidup; Panah warna merah: sel sperma mati; Lingkaran warna merah: sel sperma dengan morfologi abnormal

BAB VI

PEMBAHASAN

Cis-diamminedichloridoplatinum (II) atau lebih populer dengan sebutan Cisplatin adalah obat kemoterapi pertama berbasis platinum yang ditemukan sekaligus digunakan secara klinis di seluruh dunia. Cisplatin juga sering dikenal dengan sebutan *cell cycle unspecific* dan dapat digunakan secara kombinasi dengan obat kemoterapi lainnya. Disamping manfaat dari cisplatin yang cukup ampuh untuk terapi tumor maupun kanker, cisplatin yang digunakan dengan dosis tinggi ternyata juga mempunyai efek toksik pada beberapa organ tubuh, antara lain saluran pencernaan, nefrotoksisitas, dan neurotoksisitas (Salem et al., 2012). Selain itu, efek samping dari cisplatin yang cukup dikeluhkan berupa disfungsi testis dalam jangka waktu lama (Colpi et al., 2004).

Pada penelitian ini, pemberian cisplatin 5 mg/ kgBB intraperitoneal secara signifikan menurunkan morfologi dari spermatozoa dibandingkan dengan kelompok control ($p < 0,05$) dan cisplatin juga menurunkan motilitas spermatozoa dibandingkan dengan kelompok kontrol. Hal ini sesuai dengan penelitian Ciftci et al (2011), yang menyatakan bahwa cisplatin menyebabkan toksisitas pada sistem reproduksi melalui peningkatan kerusakan oksidatif dan histologis, penurunan kadar testosteron serum dan perubahan karakteristik sperma (Ciftci et al., 2011). Dosis maksimal cisplatin yang aman terhadap infertilitas adalah 400 mg/m². Jika lebih dari itu, maka akan berdampak negatif baik terhadap produksi sperma ataupun kualitas sperma (Kamal-Eldin dan Appelqvist, 1996).

Mekanisme sitotoksitas Cisplatin yang berakibat pada kerusakan sel (apoptosis dan nekrosis sel) terjadi melalui beberapa cara, yaitu pengikatan cisplatin ke basis guanin pada DNA, pembentukan rantai silang dan melalui peningkatan produksi *reactive oxygen species* (ROS), yang dapat menyebabkan peroksidasi lemak yang pada akhirnya dapat menyebabkan inflamasi pada sel serta stress oksidatif (OS). (Bujan et al., 2013; Salem et al., 2012). OS ini terjadi oleh karena adanya ketidakseimbangan antara produksi radikal bebas dengan pertahanan antioksidan di dalam tubuh, sehingga dapat menyebabkan berbagai kerusakan pada sel, kerusakan pada asam nukleat, protein, lemak serta dapat menginduksi mutase DNA (Bujan et al., 2013; Guthrie dan Welch, 2012).

Radikal bebas adalah sebuah atom, molekul atau ion yang merupakan produk dari berbagai proses kimia yang terjadi di dalam tubuh yang memiliki satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan. Radikal bebas ini memiliki sifat yang sangat reaktif, yaitu dapat mengoksidasi lemak, asam amino, dan karbohidrat, serta dapat menyebabkan kerusakan berupa mutasi DNA (Sanocka dan Kurpisz, 2004). OS menyebabkan kerusakan peroksidatif pada membrane sperma dan fragmentasi DNA pada tingkat inti sel dan mitokondria, sehingga menyebabkan terjadinya kerusakan pada sperma atau infertilitas pada laki-laki (Wagner et al., 2018).

Jaringan testis adalah salah satu jaringan yang sensitif baik terhadap radikal bebas ataupun ROS. Radikal bebas yang berikatan pada membran sel testis (spermatogonium, sel Sertoli dan sel Leydig) akan menyebabkan terjadinya peroksidasi lemak dan berbagai mekanisme lainnya yang dapat memicu terjadinya apoptosis ataupun nekrosis dari sel-sel tersebut (Wagner et al., 2018). Kerusakan seluler pada testis yang ditimbulkan agen kemoterapi khususnya cisplatin adalah

berupa *maturation arrest* yang dapat diketahui dari adanya penurunan parameter sperma dan penurunan diameter tubulus seminiferous setelah adanya paparan agen kemoterapi tersebut.

Beberapa studi membuktikan bahwa cisplatin dapat menginduksi terjadinya disintegrasi testis, disfungsi sperma, apoptosis *germ cell*, kerusakan pada sel Leydig, toksisitas akibat rigidifikasi membran, peroksidasi lemak, dan kerusakan oksidatif, serta menurunkan pertahanan oleh antioksidan di dalam organ (Hejazi, 2011). Toksisitas ini terjadi oleh karena terjadinya stress oksidatif yang dipicu dengan peningkatan kadar ROS, serta cisplatin juga meningkatkan peroksidasi lemak melalui peningkatan kadar malondialdehid (MDA) secara bermakna (Soni *et al.*, 2016). ROS akan diproduksi oleh spermatozoa dalam jumlah yang sedikit ketika dalam kondisi normal. ROS ini sejatinya diperlukan untuk regulasi sperma, kapasitasi sperma dan reaksi akrosom sperma. Namun dalam jumlah yang besar, ROS ini akan menyebabkan oksidasi pada sel normal khususnya spermatozoa sehingga dapat merusak sperma melalui mekanisme peningkatan kematian sel sperma (apoptosis) dan kerusakan hingga mutasi DNA. Kerusakan juga terlihat pada tubulus seminiferous. Beberapa area tubulus menunjukkan penipisan *germ cell*. Sedangkan daerah lainnya menunjukkan spermatogonia atau spermatosit primer. Sel Sertoli memperlihatkan derajat perubahan degeneratif dalam bentuk kerusakan proses seluler dan *junction* sel. Gangguan pada membran nukleus spermatid dan hilangnya jembatan interseluler juga terbukti dapat menyebabkan morfologi sperma terganggu (Abdel-Mohsen *et al.*, 2013; Ciftci, Osman, 2011).

ROS dengan konsentrasi yang tinggi dapat memicu kerusakan oksidatif asam lemak tak jenuh ganda dalam membran plasma sperma dan ini kemudian

memulai peroksidasi lipid cascade. Ketika peroksidasi lipid terjadi, peroksida lipid menumpuk di permukaan sperma dan ini mengurangi fluiditas membran fosfolipid sperma yang menyebabkan kerja flagella sperma kurang efektif, sehingga mengurangi motilitas. Pengeluaran ROS yang berlebih dari mitokondria di *midpiece* juga dapat merusak sumber daya mitokondria untuk motilitas sperma sehingga menyebabkan penurunan motilitas. Oleh karena itu stres oksidatif memiliki kemampuan untuk menghasilkan infertilitas dengan mengganggu transit sperma yang melalui saluran reproduksi wanita. Selanjutnya, kerusakan membran akrosom akan mengurangi aktivitas acrosin dan menghambat kapasitas sperma menyatu dengan oosit, akibatnya menyebabkan kapasitas fertilisasi yang jelek (Tunc, 2010). Salah satu cara yang diketahui untuk melindungi membran sel sperma dari kerusakan akibat peningkatan kadar ROS adalah dengan menggunakan atau mengkonsumsi sumber antioksidan eksogen (Bujan et al., 2013).

Pada penelitian ini dapat terlihat bahwa pada kelompok tikus dengan pemberian Vitamin E 50 mg/kgBB P.O maupun Vitamin E 200 mg/kgBB P.O yang diberikan 3 minggu sebelum sampai 4 minggu sesudah injeksi cisplatin 5 mg/kgBB intraperitoneal, secara statistik terdapat perbedaan yang bermakna pada morfologi spermatozoa dengan kelompok tikus yang dilakukan injeksi cisplatin saja ($p < 0,05$). Demikian pula jika dibandingkan dengan kelompok kontrol dapat terlihat bahwa tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok kontrol dengan kelompok yang mendapat vitamin E 50 mg/kgBB maupun vitamin E 200 mg/kgBB dengan nilai $p > 0,05$. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian vitamin E pada dosis 50 mg/kg BB dan 200 mg/kgBB pada kelompok yang terpapar cisplatin dapat memberikan proteksi terhadap morfologi sel spermatozoa.

Terlihat pula bahwa motilitas spermatozoa kelompok tikus terpapar cisplatin dan Vitamin E 50 mg/kgBB dan 200 mg/kgBB lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok tikus terpapar cisplatin saja dan berbeda secara signifikan dengan nilai $p < 0,05$. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian vitamin E pada dosis 50 mg/kg BB dan 200 mg/kgBB pada kelompok yang terpapar cisplatin dapat memberikan proteksi optimal terhadap motilitas sel sperma. Secara deskriptif, motilitas pada kelompok vitamin E 200 mg/kgBB lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok vitamin E 50 mg/kgBB, tetapi tidak berbeda secara signifikan ($p > 0,05$). Peningkatan dosis vitamin E mungkin bisa memberikan efek protektif yang lebih baik, maka dari itu diperlukan penelitian lebih lanjut yang menggunakan berbagai dosis vitamin E yang lebih tinggi.

Antioksidan diketahui sebagai mekanisme ketahanan intraseluler terhadap kerusakan testis yang diinduksi cisplatin. Beberapa penelitian yang dilakukan telah menunjukkan efek protektif dari zat antioksidan pada *cisplatin-induced toxicity* (Anand *et al.*, 2015; Kaya *et al.*, 2015). Vitamin E merupakan antioksidan yang berperan melindungi fosfolipid yang tak tersaturasi pada membran dari degradasi oksidatif akibat reactive oxygen species (ROS) dan radikal bebas lainnya. Sebagai antioksidan terpenting pada membran sel, vitamin E memiliki sifat larut dalam lipid pada membran sel. Vitamin E memiliki dua substansi biologis yang aktif, yaitu tocopherol dan tocotrienols (Galagher, 2008).

Bentuk vitamin E yang paling aktif secara biologis adalah α -tokoferol, dan merupakan bentuk vitamin E kedua yang paling umum dalam makanan. Sebagai antioksidan yang larut dalam lemak, vitamin E berperan dalam mengikat radikal bebas, Hariyatmi (2004) dalam penelitiannya menyatakan bahwa vitamin E memiliki

kemampuan untuk menghentikan lipid peroksida dengan cara menyumbangkan satu atom hidrogennya dari gugus OH kepada lipid peroksida yang bersifat radikal sehingga menjadi radikal *tocopheryl* yang kurang reaktif dan tidak merusak. Radikal bebas bermula dari bentuk *carbon-centered free radical*, kemudian berikatan dengan oksigen bebas sehingga membentuk ROS. ROS dapat dinetralsisir oleh lipid (*polyunsaturated fat*) menjadi hydroperoxide. Dalam menetralsisir ROS, lipid dibantu oleh vitamin E terutama tocopherol, dimana kemampuan tocopherol dalam menetralsisir ROS lebih cepat bila dibandingkan dengan lipid. Terjadinya peroksidasi lipid pada membran sel dapat dicegah dan dikurangi oleh vitamin E (Jungwirth *et al.*, 2016).

Pada penelitian ini secara deskriptif terlihat bahwa kelompok yang mendapatkan injeksi Cisplatin dan Vitamin E 200 mg/kgBB memiliki morfologi spermatozoa yang lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok yang mendapatkan injeksi Cisplatin dan Vitamin E 50 mg/kgBB walaupun secara statistik tidak bermakna ($p > 0,05$). Tetapi jika kelompok yang mendapat Vitamin E 200 mg/kgBB dibandingkan dengan kelompok yang hanya mendapatkan Cisplatin saja, berdasarkan data statistik dengan uji *Post Hoc* hal ini terdapat perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$). Hal ini mengindikasikan bahwa pemberian Vitamin E 200 mg/kgBB memberikan pengaruh yang signifikan dalam mencegah menurunnya morfologi spermatozoa akibat pemberian injeksi Cisplatin dan efektifitasnya secara deskriptif lebih superior dibandingkan dengan pemberian Vitamin E 50 mg/kgBB.

Dapat diamati bahwa ada perbedaan yang signifikan dalam morfologi dan motilitas spermatozoa terutama pada dosis vitamin E yang lebih tinggi (200 mg/kgBB). Data ini menunjukkan bahwa ada penekanan efek spermatoksisitas

cisplatin gradual yang tergantung pada dosis dari suplementasi vitamin E. Efektifitas perlindungan vitamin E terhadap stress oksidatif yang ditimbulkan oleh pemberian cisplatin di tunjukkan dengan adanya tren linear jumlah morfologi dan motilitas spermatozoa yang normal. Respon linear tergantung dosis vitamin E yang diberikan yaitu dengan dosis tertinggi memberikan perlindungan yang maksimum.

Vitamin E berperan dalam menghambat peroksidasi lipid, menurunkan kadar malondialdehyde pada spermatozoa, meningkatkan motilitas spermatozoa, mengurangi fragmentasi DNA spermatozoa dan meningkatkan aktivitas berbagai antioksidan lain yang juga berfungsi untuk mengikat radikal bebas (Gadallah, 2018; Muhammad, 2017). Selain itu vitamin E dapat menetralkan gugus hidroksil, superoksida, dan radikal hidrogen peroksida, serta mencegah aglutinasi sperma. Sebagian kerusakan yang disebabkan oleh radikal bebas terjadi pada membran sel dan lipoprotein dengan kepadatan rendah yang tersusun oleh molekul lemak, hal ini menjadikan vitamin E antioksidan yang paling efektif dikarenakan vitamin E larut dalam lemak (Gadallah, 2018).

Pada tahap intraseluler, MHC dan ROS yang ada di dalam mitokondria akan menyebabkan terjadinya suatu reaksi yang disebut stress mitokondria. Stress mitokondria ini akan mengaktifkan Bax dan Bak (protein pro apoptotik dari golongan Bcl-2 family). Adanya Bax dan Bak menyebabkan mitokondria mengaktifkan *mitochondrial permeability transition pore* (MPTP) diantara *outer matrix membrane* (OMM) dan *inner matrix membrane* (IMM), tepatnya pada matriks mitokondria. Bax, Bak, dan t-bid, yang mendapatkan stimulasi apoptotik, akan mengalami translokasi ke mitokondria. Kemudian mitokondria akan melepaskan sitokrom-c ke dalam sitosol. Hal ini terjadi bersamaan dengan

pelepasan *apoptotic inducing factor* (AIF) dan dATP. Pelepasan ini mengakibatkan terjadinya pemecahan procaspase-9 menjadi bentuk aktifnya yakni caspase-9. Caspase-9 akan menginisiasi caspase-7 dan caspase-3 (caspase efektor) yang mempunyai peran pada apoptosis sel, yaitu pada pembelahan poly (ADP-ribose) polimerase (PARP) dan fragmentasi DNA (Ganga *et al.*, 2013).

Hal ini sesuai dengan penelitian oleh Fikret *et al* menunjukkan bahwa cisplatin juga menyebabkan apoptosis testis melalui jalur protein apoptosis Cas-3 dan Bax. Cisplatin meningkatkan ekspresi dari protein jalur apoptosis yaitu Caspase-3 dan Bax, sementara menurunkan ekspresi dari protein anti apoptotic yaitu Bcl-2 yang mengarah ke apoptosis testis. Pemberian Vitamin E menunjukkan efek perlindungan dengan menurunkan ekspresi protein apoptosis (Cas-3, Bax) dan menurunkan rasio Bax dan Bcl-2 (Gevrek dan Erdemir, 2018).

Dengan berkurangnya ekspresi Bax dan rasio Bax/bcl-2 maka apoptosis sel baik spermatogonium, sertoli dan leydig berkurang. Vitamin E juga dapat mencegah pelepasan sitokrom-C yang pro apoptotik sehingga dapat menghindari kerusakan membran mitokondria. Dengan pemberian vitamin E, produksi ROS akan menurun. Produksi ROS yang menurun akan menyeimbangkan rasio *scavenger* dan ROS atau bahkan membuat rasio scavenger lebih banyak dari ROS sehingga dapat menetralkan ROS yang secara tidak langsung akan menurunkan stress oksidatif. Hal ini secara simultan akan menyebabkan reaksi antara radikal bebas dengan membran sel dan mitokondria spermatogonium dan sel Sertoli menurun, kematian sel menurun, jumlah spermatogonium dan sel Sertoli meningkat, morfologi sperma membaik, dan motilitas sperma pun juga akan membaik.

BAB VII

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

1. Motilitas dan morfologi sperma pada tikus putih strain Sprague Dawley yang hanya mendapatkan cisplatin lebih kecil dibandingkan dengan tikus putih strain Sprague Dawley kontrol.
2. Terdapat perbedaan bermakna pada motilitas sperma pada kelompok tikus putih strain Sprague Dawley yang mendapatkan cisplatin dan vitamin E 50 mg/kgBB, dan pada kelompok cisplatin dan vitamin E 200 mg/kgBB dibandingkan dengan kelompok yang hanya mendapatkan cisplatin.
3. Tidak ada perbedaan bermakna pada motilitas sperma pada kelompok yang mendapatkan cisplatin dan vitamin E 50 mg/kgBB dibandingkan dengan kelompok yang mendapatkan cisplatin 5 dan vitamin E 200 mg/kgBB.
4. Terdapat perbedaan bermakna pada morfologi sperma pada kelompok tikus putih strain Sprague Dawley yang mendapatkan cisplatin dan vitamin E 50 mg/kgBB, dan pada kelompok cisplatin dan vitamin E 200 mg/kgBB dibandingkan dengan kelompok yang hanya mendapatkan cisplatin.
5. Tidak ada perbedaan bermakna pada morfologi sperma pada kelompok yang mendapatkan cisplatin dan vitamin E 50 mg/kgBB dibandingkan

dengan kelompok yang mendapatkan cisplatin dan vitamin E 200 mg/kgBB

6. Hasil dari penelitian ini sesuai dan mendukung hipotesis awal dari penelitian ini yaitu vitamin E dapat memberikan efek protektif terhadap kerusakan sperma yang disebabkan oleh pemberian cisplatin.

7.2 Saran

1. Perlu penelitian lebih lanjut untuk penentuan dosis optimal vitamin E sehingga bisa mendapatkan efek protektif yang maksimal terhadap kerusakan sperma yang disebabkan oleh cisplatin.
2. Perlu penelitian lebih lanjut untuk mengetahui efek samping pemberian vitamin E dengan dosis 50 mg/kgBB dan 200mg/kgBB dalam jangka waktu yang panjang.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdel-Mohsen, A., Elmarakby, D., Elgendy, M., Eldsouky, D., 2013. Histological study on the role of ginger against cisplatin-induced testicular toxicity in albino rats. *Egypt. J. Histol.* 36, 312–320.
- Agarwal, A., Makker, K., Sharma, R., 2008. Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: An update. *Am. J. Reprod. Immunol.* 59, 2–11.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2007.00559.x>
- Agarwal, A., Sekhon, L.H., 2010. The role of antioxidant therapy in the treatment of male infertility. *Hum. Fertil.* 13, 217–225.
<https://doi.org/10.3109/14647273.2010.532279>
- Alderden, R.A., Hall, M.D., Hambley, T.W., 2006. The Discovery and Development of Cisplatin. *J. Chem. Educ.* 83, 728.
<https://doi.org/10.1021/ed083p728>
- Anand, H., Misro, M.M., Sharma, S.B., Prakash, S., 2015. Protective effects of *Eugenia jambolana* extract versus N-acetyl cysteine against cisplatin-induced damage in rat testis. *Andrologia* 47, 194–208.
<https://doi.org/10.1111/and.12247>
- Anderson, T.W., Reid, D.B.W., 1974. A Double-blind Trial of Vitamin E in Angina Pectoris. *Am. J. Clin. Nutr.* 27, 1174–1178.
<https://doi.org/10.1093/ajcn/27.8.1174>
- Anne, J.M., 2000. *Male Infertility: A Guide for Clinicians*. Blackwell Science.
- Balai Pengujian Hewan, 1989. *Teknis Pemeliharaan Hewan Percobaan Untuk Pengujian Mutu Obat Hewan*. Departemen Pertanian, Jakarta.

- Barabas, K., Milner, R., Lurie, D., Adin, C., 2008. Cisplatin: A review of toxicities and therapeutic applications. *Vet. Comp. Oncol.* 6, 1–18.
<https://doi.org/10.1111/j.1476-5829.2007.00142.x>
- Basu, A., Krishnamurthy, S., 2010. Cellular Responses to Cisplatin-Induced DNA Damage 10, 1–16. <https://doi.org/10.4061/2010/201367>
- Beck, E.M., Schlegel, P.N., Goldstein, M., 1992. Intraoperative Varicocele Anatomy: A Macroscopic and Microscopic Study. *J. Urol.* 148, 1190–1194.
[https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(17\)36857-X](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(17)36857-X)
- Bott, R., 2014. Data and Health Information of Cancer Situation. *Igarss 2014* 1–5.
<https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>
- Bujan, L., Walschaerts, M., Moinard, N., Hennebicq, S., Saias, J., Brugnon, F., Auger, J., Berthaut, I., Szerman, E., Daudin, M., Rives, N., 2013. Impact of chemotherapy and radiotherapy for testicular germ cell tumors on spermatogenesis and sperm DNA: A multicenter prospective study from the CECOS network. *Fertil. Steril.* 100, 673–680.
<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.05.018>
- Cepeda, V., Fuertes, M., Castilla, J., Alonso, C., Quevedo, C., Perez, J., 2007. Biochemical Mechanisms of Cisplatin Cytotoxicity. *Anticancer. Agents Med. Chem.* 7, 3–18.
- Chu, G., 1994. Cellular responses to cisplatin. The roles of DNA-binding proteins and DNA repair. *J. Biol. Chem.* 269, 787–790.
- Ciftci, O., Beytur, A., Cakir, O., Gurbuz, N., Vardi, N., 2011. Comparison of Reproductive Toxicity Caused by Cisplatin and Novel Platinum-N-Heterocyclic Carbene Complex in Male Rats. *Basic Clin. Pharmacol.*

- Toxicol. 109, 328–333. <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2011.00737.x>
- Colpi, G.M., Contalbi, G.F., Nerva, F., Sagone, P., Piediferro, G., 2004. Testicular function following chemo-radiotherapy. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 113, 2–6. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2003.11.002>
- Cui, D., Naftel, J.P., Lynch, J.C., Yang, G., Daley, W.P., Haines, D.E., Fratkin, J.D., 2011. *Atlas of Histology with Functional and Clinical Correlations*, Lippincott Williams and Wilkins. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.
- Dahlan, M.S., 2006. *Statistik untuk kedokteran dan kesehatan: uji hipotesis*. Bina Mitra Press, Jakarta.
- Daniel, W.W., Cross, C.L., 1987. *Biostatistics : A Foundation for Analysis in the Health Sciences*, 4th ed.
- De Vries, E.G.E., Gietema, J.A., De Jong, S., 2006. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand pathway and its therapeutic implications. *Clin. Cancer Res.* 12, 2390–2393. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-0352>
- Del Bello, B., Moretti, D., Gamberucci, A., Maellaro, E., 2007. Cross-talk between calpain and caspase-3/-7 in cisplatin-induced apoptosis of melanoma cells: a major role of calpain inhibition in cell death protection and p53 status. *Oncogene* 26, 2717–2726. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210079>
- Desoize, B., Madoulet, C., 2002. Particular aspects of platinum compounds used at present in cancer treatment. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 42, 317–325. [https://doi.org/10.1016/S1040-8428\(01\)00219-0](https://doi.org/10.1016/S1040-8428(01)00219-0)

- Emil, T.E., 2008. Anatomy of the Genitourinary Tract, in: Smith's General Urology 17th ed. hal. 1. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-10233-2.50047-X>
- Eroschenko, V., 2008. Difiore's Atlas of Histology with functional correlations 11th edition Alih bahasa: Tambayong J. Penerbit Buku Kedokt. EGC. Jakarta. 423–427.
- Evans, C.A.R., Diplock, A.T., and M.C.. S., 1991. Techniques in Free Radical Research Amsterdam, 1991; 1-50, 125-149. Elsevier Sci. Publ. BV 1, 125–149.
- Fanning, J., Biddle, W.C., Goldrosen, M., Crickard, K., Crickard, U., Piver, M.S., Foon, K. a, 1990. Comparison of cisplatin and carboplatin cytotoxicity in human ovarian cancer cell lines using the MTT assay. *Gynecol. Oncol.* 39, 119–22.
- Felici, A., Verweij, J., Sparreboom, A., 2002. Dosing strategies for anticancer drugs: The good, the bad and body-surface area. *Eur. J. Cancer* 38, 1677–1684. [https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(02\)00151-X](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(02)00151-X)
- Florea, A.-M., Büsselberg, D., 2011. Cisplatin as an Anti-Tumor Drug: Cellular Mechanisms of Activity, Drug Resistance and Induced Side Effects. *Cancers (Basel)*. 3, 1351–1371. <https://doi.org/10.3390/cancers3011351>
- Frei, B., 1994. Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanisms of action. *Acad. Press. San Diego* 1–14.
- Fuertes, M.A., Alonso, C., Pérez, J.M., 2003. Biochemical Modulation of Cisplatin Mechanisms of Action: Enhancement of Antitumor Activity and Circumvention of Drug Resistance. *Chem. Rev.* 103, 645–662.

<https://doi.org/10.1021/cr020010d>

- Gadallah, K., 2018. Role of Antioxidants in the Treatment of Male Infertility. *Surg Med Open Acc J* 1, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.sbspro.2010.12.131>
- Galagher, M., 2008. Krause's food and nutrients therapy. Elsevier Saunders 12th, 113–118.
- Ganga, U.K., Kishori, B., Reddy, P.S., 2013. Cisplatin and/or etoposide induces oxidative stress in testicular, hepatic and kidney tissues in male albino mice. *J. Biol. Earth Sci.* 3, B249–B254.
- Gevrek, F., Erdemir, F., 2018. Investigation of the effects of curcumin, vitamin E and their combination in cisplatin-induced testicular apoptosis using immunohistochemical technique. *Türk Üroloji Dergisi/Turkish J. Urol.* 44, 16–23. <https://doi.org/10.5152/tud.2017.95752>
- Gonzalez, V.M., Fuertes, M. a, Alonso, C., Perez, J.M., 2001. Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis? *Mol. Pharmacol.* 59, 657–663. <https://doi.org/10.1124/mol.59.4.657>
- Griswold, M.D., 1998. The Central Role of Sertoli Cells in Spermatogenesis. *Semin. Cell Dev. Biol.* 9, 411–416. <https://doi.org/10.1006/scdb.1998.0203>
- Guthrie, H., Welch, G., 2012. Effects of reactive oxygen species on sperm function. *Theriogenology* 78, 1700–1708. [https://doi.org/10.1016/0098-2997\(91\)90006-8](https://doi.org/10.1016/0098-2997(91)90006-8)
- Guzman MJ, M.D.& P.J., 2000. Effect of dietary selenium and vitamin E on spermatogenic development in boars. *J. Anim. Sci.* 78, 1537–1543.
- Hall, J., 2015. Reproductive and Hormonal Functions of the Male (and Function of the Pineal Gland), in: Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology.

- Saunders, hal. 1021–1026.
- Hammond, E.M., Denko, N.C., Dorie, M.J., Abraham, R.T., Giaccia, A.J., 2002. Hypoxia Links ATR and p53 through Replication Arrest. *Mol. Cell. Biol.* 22, 1834–1843. <https://doi.org/10.1128/MCB.22.6.1834-1843.2002>
- Hariyatmi, 2004. Kemampuan vitamin E sebagai antioksidan terhadap radikal bebas pada usia lanjut. *J. MIPA UMS* 14, 52–60.
- Hathcock, J.N., Azzi, A., Blumberg, J., Bray, T., Dickinson, A., Frei, B., Jialal, I., Johnston, C.S., Kelly, F.J., Kraemer, K., Packer, L., Parthasarathy, S., Sies, H., Traber, M.G., 2005. Vitamins E and C are safe across a broad range of intakes. *Am. J. Clin. Nutr.* 81, 736–745. <https://doi.org/10.1093/ajcn/81.4.736>
- Hejazi, S., 2011. Toxicity Effect of Cisplatin-Treatment on Rat Testis Tissue. *J. Mens. health* 8, 208–235. <https://doi.org/10.1016/j.jomh.2011.08.081>
- Hill, M., 2018. Embryology Spermatozoa Development. [WWW Document]. URL https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/Spermatozoa_Development
- Hong, J.Y., Kim, G.H., Kim, J.W., Kwon, S.S., Sato, E.F., Cho, K.H., Shim, E.B., 2012. Computational modeling of apoptotic signaling pathways induced by cisplatin. *BMC Syst. Biol.* 6. <https://doi.org/10.1186/1752-0509-6-122>
- IARC, 2012. Estimated cancer incidence, mortality, and prevalence worldwide in 2012. *Estim. cancer Incid. mortality, Preval. Worldw. 2012 GLOBOCAN 2.*
- Ishikawa, T., Fujioka, H., Fujisawa, M., 2004. Clinical and hormonal findings in testicular maturation arrest. *BJU Int.* 94, 1314–1316.

<https://doi.org/10.1111/j.1464-410X.2004.05163.x>

James, L.M., William, K.E., 2009. *Infertility In the Male*. Cambridge University Press.

Jungwirth, A., Diemer, T., Dohle, G., Kopa, Z., Krausz, C., Tournaye, H., 2016. Guidelines on Male Infertility. *Eur. Assoc. Urol.* 46, 1–24.

<https://doi.org/10.1007/978-1-60761-193-6>

Kamal-Eldin, A., Appelqvist, L.Å., 1996. The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids* 31, 671–701.

<https://doi.org/10.1007/BF02522884>

Kaya, K., Ciftci, O., Cetin, A., Doğan, H., Başak, N., 2015. Hesperidin protects testicular and spermatological damages induced by cisplatin in rats.

Andrologia 47, 793–800. <https://doi.org/10.1111/and.12332>

Krishnamoorthy, G., Venkataraman, P., Arunkumar, A., Vignesh, R.C., Aruldhas, M.M., Arunakaran, J., 2007. Ameliorative effect of vitamins (α -tocopherol and ascorbic acid) on PCB (Aroclor 1254) induced oxidative stress in rat epididymal sperm. *Reprod. Toxicol.* 23, 239–245.

<https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2006.12.004>

Liang, X., Guo, Y., Figg, W.D., Fojo, A.T., Mueller, M.D., Yu, J.J., 2011. The Role of Wild-Type p53 in Cisplatin-Induced Chk2 Phosphorylation and the Inhibition of Platinum Resistance with a Chk2 Inhibitor. *Chemother. Res. Pract.* 2011, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2011/715469>

<https://doi.org/10.1155/2011/715469>

Makker, K., Agarwal, A., Sharma, R., 2009. Oxidative stress and male infertility.

Indian J Med Res. 129, 357–67. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2017.69>

Mescher, A.L., Junqueira, L.C.U., 2018. *Junqueira's basic histology : text and*

atlas, 15 ed. McGraw-Hill Education.

- Moilanen, J., Hovatta, O., 1995. Excretion of alpha-tocopherol into human seminal plasma after oral administration. *Andrologia* 27, 133–136.
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.1995.tb01083.x>
- Momeni, Hamid R, Mehranjan, Malek S, Abnosi MH, Mahmoodi, & M., 2009. Effects of vitamin E on sperm parameters and reproductive hormones in developing rats treated with para-nonylphenol. *Iran. J. Reprod. Med.* 7, 111–116.
- Moon, E.-K., Park, H.J., Oh, C.-M., Jung, K.-W., Shin, H.Y., Park, B.K., Won, Y.-J., 2014. Cancer Incidence and Survival among Adolescents and Young Adults in Korea. *PLoS One* 9, e96088.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096088>
- Muhammad, Z., 2017. Effects of dietary vitamin E on male reproductive system. *Asian Pacific J. Reprod.* 6, 145–150.
<https://doi.org/10.12980/apjr.6.20170401>
- Murray K, Bender DA, Botham KM, 2009. Free Radicals an Antioxidant Nutrients. *Harper's Illustrated Biochem.* 482–86.
- Nichols, C.R., 2010. Testicular Cancer: A Prototypic Tumor of Young Adults. *J. Clin. Oncol.* 36, 432–438.
<https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2009.07.006>
- Pandiyan, N., 2017. Male Infertility. Springer India, New Delhi.
<https://doi.org/10.1007/978-81-322-3604-7>
- Perkins, J.M., 1994. Radical Chemistry. Ellis Horwood, New York 132–139.
- Pisano, C., Pratesi, G., Laccabue, D., Zunino, F., Giudice, P. Lo, Bellucci, A.,

- Pacifici, L., Camerini, B., Vesce, L., Castorina, M., Cicuzza, S., Tredici, G., Marmioli, P., Nicolini, G., Galbiati, S., Calvani, M., Carminati, P., Cavaletti, G., 2003. Paclitaxel and Cisplatin-Induced Neurotoxicity: A Protective Role of Acetyl-L-Carnitine. *Clin. Cancer Res.* 9, 5756–5767.
- Punchard, N.A., Kelly, F.J., 1996. *Free Radical: A Practical Approach*. Oxford Univ. Press. New York 1–6, 119–120, 125–126.
- Purnomo, B.B., 2014a. Anatomi Sistem Urogenitalia, in: *Dasar-Dasar Urologi*. Sagung Seto, Jakarta, hal. 5–20.
- Purnomo, B.B., 2014b. Anomali Traktus Urinarius, in: *Dasar-Dasar Urologi*. Sagung Seto, Jakarta, hal. 197–243.
- Reboul, E., Richelle, M., Perrot, E., Desmoulins-Malezet, C., Pirisi, V., Borel, P., 2006. Bioaccessibility of carotenoids and vitamin E from their main dietary sources. *J. Agric. Food Chem.* 54, 8749–8755.
<https://doi.org/10.1021/jf061818s>
- Rizal, D., Mirzanie, H., Suryadi, E., 2003. Motilitas Spermatozoa pada Prostatitis Bakterial Kronis. *Berkala Ilmu Kedokteran* 35.
- Salem, E.A., Salem, N.A., Maarouf, A.M., Serefoglu, E.C., Hellstrom, W.J.G., 2012. Selenium and lycopene attenuate cisplatin-induced testicular toxicity associated with oxidative stress in Wistar rats. *Urology* 79, 1184.e1-1184.e6.
<https://doi.org/10.1016/j.urology.2011.12.006>
- Sanocka, D., Kurpisz, M., 2004. Reactive oxygen species and sperm cells. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2, 12. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-2-12>
- Sawhney, Pragati, 2013. Cisplatin-Induced Long-term Failure of Spermatogenesis in Adult C57/Bl/6J Mice. *J. Androl. – Am. Soc. Androl.*

136–145.

- Sitohang, A.G., Wantouw, B., Queljoe, E., 2015. Perbedaan antara efek pemberian vitamin C dan Vitamin E terhadap kualitas spermatozoa tikus wistar (*Rattus norvegicus*) jantan setelah diberi paparan asap rokok. *J. e-Biomedik* 3, 65–71.
- Snedecor, G., Cochran, W., 1974. Ten Thousand Randomly Assorted Digits, in: *Statistical Methods*.
- Soni, K.K., Kim, H.K., Choi, B.R., Karna, K.K., You, J.H., Cha, J.S., Shin, Y.S., Lee, S.W., Kim, C.Y., Park, J.K., 2016. Dose-dependent effects of cisplatin on the severity of testicular injury in sprague dawley rats: Reactive oxygen species and endoplasmic reticulum stress. *Drug Des. Devel. Ther.* 10, 3959–3968. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S120014>
- Thomas, T.D., 1997. Histology of The Normal Testis. *Am. J. Surg. Pathol.* 11, 1–12.
- Traber, M.G., Stevens, J.F., 2011. Vitamins C and E: Beneficial effects from a mechanistic perspective. *Free Radic. Biol. Med.* 51, 1000–1013. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.05.017>
- Tunc, O., 2010. “ Investigation of the Role of Oxidative Stress in Male Infertility .”
- Turek, P.J., 2011. Male Reproductive Physiology, in: *Campbell-Walsh Urology*. Saunders, hal. 598.
- Uzunhisarcikli, M., Kalender, Y., 2011. Protective effects of vitamins C and E against hepatotoxicity induced by methyl parathion in rats. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, 2112–2118. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.07.001>

- Wagner, H., Cheng, J.W., Ko, E.Y., 2018. Role of reactive oxygen species in male infertility: An updated review of literature. *Arab J. Urol.* 16, 35–43.
<https://doi.org/10.1016/j.aju.2017.11.001>
- Wang, X., Liu, Y., Chow, L.S., Wong, S.C., Tsao, S.W., Kwong, D.L., Wang, J., Sham, J.S., Nicholls, J.M., 1999. Cisplatin-induced p53-independent growth arrest and cell death in cancer cells. *Int. J. Oncol.* 15, 1097–1102.
- Wen, C.J., 2006. The role of vitamin E in the treatment of male infertility. *Nutr. Bytes* 11, 1–6.
- WHO, Arsyad, K., Hayati, L., 1992. *Penuntun Laboratorium WHO untuk Pemeriksaan Semen Manusia dan Interaksi Sperma-Getah Servik.*, 3 ed. Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya, Palembang.
- Yusuf A. Hannun, 1997. Apoptosis and the Dilemma of Cancer Chemotherapy 93, 2143–2148.
- Zainuddin, M., 1995. *Metodologi Penelitian.* Sagung Seto, Jakarta.

LAMPIRAN 1

Waktu Penelitian

Waktu penelitian sekitar 3 bulan, sesuai table di bawah ini:

No	Kegiatan	Bulan 1				Bulan 2				Bulan 3			
		Mg 1	Mg 2	Mg 3	Mg 4	Mg 1	Mg 2	Mg 3	Mg 4	Mg 1	Mg 2	Mg 3	Mg 4
1	Persiapan reagen	x	X										
2	Persiapan hewan coba	x	X										

3	Perlakuan hewan coba			x	x	X	X	X	x	x			
4	Pembuatan sediaan histoPA									x	x	x	
5	Pembacaan sediaan histoPA									x	x	x	
6	Analisa data											x	
7	Diskusi hasil penelitian											x	x
8	Penulisan naskah											x	x
9	Editing											x	x

LAMPIRAN 2

Prosedur Penelitian

2.1 Pemerolehan Hewan Coba dan Cara Kerja

Hewan coba yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus Norvegicus*) strain *Sprague Dawley*, yang mempunyai sertifikasi persyaratan hewan coba yang di peroleh dari dari Fakultas Kedokteran Hewan Univeristas Airlangga Surabaya

2.2 Pemeliharaan Hewan Coba dan Tahapan Penelitian

Prosedur perlakuan dalam penelitian ini melalui beberapa tahapan antara lain:

1. Mendapatkan sampel: Pengambilan sampel tikus putih (*Rattus Norvegicus strain Sprague Dawley*) jantan, dilakukan secara acak sebanyak 28 ekor dewasa, usia 10-12 minggu, dengan berat badan 200-250 gram, di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.
2. Adaptasi tikus putih: sampel tikus (*Rattus Norvegicus strain Sprague Dawley*) putih yang baru didapatkan terlebih dahulu dilakukan proses adaptasi dalam kandang/ lingkungan penelitian (di bagian kandang FKH Unair) selama 2 minggu.
3. Kriteria kandang tikus terbuat dari plastik, lantai dan dinding bak dengan wire mesh pada puncaknya. Luas lantai kandang untuk sekelompok tikus dengan jumlah hingga lima ekor dan berat badan tikus 200-250-gram sekitar 1500 cm². Ketinggian bagian atas kandang 22 cm. Suhu ruangan kandang berkisar 20-26°C dengan kelembaban udara berkisar 40-70% dan ada pertukaran gelap dan terang setiap 12 jam. Masing-masing kelompok diletakkan dalam kandang tersendiri, disekat antar masing masing tikus dan dijaga sedemikian rupa sehingga tidak saling berinteraksi.
4. Pemberian pakan dan minum disediakan secara ad libitum. Jenis makanan yang disediakan menggunakan pelet komersial “hi pro vite 593, 20-25 gram/hari dan minum air bersih secukupnya.
5. Pengelompokan sampel: sampel dalam penelitian ini dikelompokkan secara random menjadi 4 kelompok yaitu CN, CP, P1 dan P2, masing-masing 7 ekor tikus putih.

6. Kelompok kontrol negatif (CN) diberikan injeksi *normal saline* 0,9% 1cc, 1x intra peritoneal sebagai placebo, pada minggu ke 7 kelompok ini akan langsung dilakukan orkidektomi bilateral.
7. Terhadap kelompok CP diberikan cisplatin 5 mg/kg BB intraperitoneal 1x pada minggu ke 3, kemudian dilakukan orkidektomi bilateral pada minggu ke 7.
8. Terhadap kelompok P1 diberikan vitamin E 50 mg/kg BB melalui sonde sehari sekali selama 7 minggu dan cisplatin 5mg/kgBB intraperitoneal 1x pada minggu ke 3, kemudian dilakukan orkidektomi bilateral pada minggu ke 7.
9. Terhadap kelompok P2 diberikan vitamin E 200 mg/kg BB melalui sonde sehari sekali selama 7 minggu dan cisplatin 5mg/kgBB intraperitoneal 1x pada minggu ke 3, kemudian dilakukan orkidektomi bilateral pada minggu ke 7.
10. Spesimen orkidektomi bilateral diperiksa ke patologi anatomi.
11. Setelah semua proses penelitian berakhir, hewan coba akan dikorbankan dengan cara dilakukan dislokasi cervical, setelah itu dilakukan insenerasi.
12. Semua tindakan dilaksanakan dengan menggunakan metode aseptik.

2.3 Pengenceran Vitamin E

Penghitungan kebutuhan vitamin E berdasarkan berat badan tikus adalah sebagai berikut:

Dosis 1: (50 mg/kg/hari)

Kebutuhan vitamin E = 50 mg/kg/hari

Berat badan tikus = 0.200 kg Kebutuhan vit E tikus = $50 \times 0,20 = 10 \text{ mg/hari}$
= 14,9 IU \approx 15 IU

Keterangan: 1 IU = 0,67 mg alpha-tokoferol

Vitamin E untuk 7 ekor tikus selama 7 hari (sediaan dibuat 7 hari sekali) adalah $15 \text{ IU} \times 7 \times 7 = 735 \text{ IU}$, jumlah ini setara dengan 2,94 kapsul dan dibulatkan menjadi 3 kapsul vitamin E (2,1 ml) dimana tiap kapsul vit E mengandung 250 IU alpha-tokoferol. Untuk mempermudah proses sonde, vitamin E diencerkan menggunakan minyak jagung sampai volume 0,5 ml. Oleh karena itu 3 kapsul vitamin E diencerkan dengan minyak jagung sampai volume akhir yang didapatkan adalah 24,5 ml.

Dosis 2: (200 mg/kg/hari) dibuat dengan mengencerkan 12 kapsul vitamin E dengan minyak zaitun sampai volume 24,5 ml.

2.4 Teknik melakukan orkidektomi

Langkah-langkah untuk melakukan orkidektomi bilateral adalah sebagai berikut:

1. Dilakukan anastesi umum dengan ketamine injeksi intraperitoneal 75 mg/kgBB
2. Tikus ditidurkan terlentang (posisi supine).
3. Insisi kulit skrotum pada median raphe, diperdalam lapis demi lapis sampai testis kanan dan kiri dan funikulusnya tampak jelas

4. Funikulusnya di klem pada 2 tempat yang berdekatan dan dipotong diantaranya
5. Potongan proksimal diikat dengan benang sutera 3-0 (Ethicon Inc., Johnson & Johnson Co, Somerville).
6. Klem dilepas
7. Sampel testis kemudian diambil
8. Insisi pada kulit skrotum dijahit kembali satu lapis dengan menggunakan benang plain catgut 3-0 (Ethicon Inc., Johnson & Johnson Co, Somerville)

2.5 Prosedur Euthanasia

Pada akhir penelitian hewan coba dilakukan prosedur euthanasia. Metodenya menggunakan metode standar yang disetujui secara internasional yaitu cara dilakukan dislokasi cervical dalam kondisi tikus masih tersedasi, setelah itu dilakukan insenerasi.

2.6 Prosedur Pemeriksaan Analisa sperma

Kauda epididimis kiri dan kanan disayat untuk mengeluarkan spermatozoa. Kemudian kauda epididimis diletakkan di dalam cawan petri yang telah berisi NaCl fisiologis 1 ml dan dipotong kecil-kecil dan dibiarkan 1-2 menit untuk memberikan kesempatan bagi spermatozoa keluar dari epididimis dan menyebar.

Untuk Pemeriksaan motilitas dilakukan dengan meletakkan satu tetes semen di atas gelas objek dan ditambahkan satu tetes larutan NaCl fisiologis,

selanjutnya dicampur sampai homogen. Pemeriksaan di bawah mikroskop dengan pembesaran 400x.

Untuk gerak Individu dinilai sebagai berikut:

0= bila tidak ada spermatozoa yang bergerak/sedikit

1=gerakan spermatozoa pelan/lambat

2=gerakan spermatozoa sedang

3=gerakan spermatozoa cepat

4=gerakan spermatozoa sangat cepat

Untuk pemeriksaan Morfologi/viabilitas dilakukan dengan membuat preparat pewarnaan Eosin negrosin dengan komposisi:

- Larutan A: terdiri atas negrosin sol. (20g negrosin ad.100 ml Aqua), diaduk dan dipanaskan.
- Larutan B: Stock buffer atau campuran 20 ml larutan a dan 80 ml larutan b
 - a: 21.628 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ad.500 ml Aqua
 - b:22.254 g KH_2PO_4 ad.500 ml Aqua.
- Larutan C: Stock glucose sol 43.3 g glucose ad.500 ml Aqua

Kemudian campurkan bahan berikut dengan pemanasan.

- Larutan A 150 ml
- Eosin Yellow 5 gram
- Larutan B 30 ml
- Larutan C 20 ml
- Aqua ad. 300 ml

Untuk penentuan persentase morfologi /viabilitas spermatozoa digunakan rumus:

Persentase spermatozoa (%) = Jumlah Spermatozoa yang hidup (Hidup dan bentuk normal) / Jumlah Spermatozoa total x 100 %

Spermatozoa yang hidup tidak akan terwarnai oleh zat warna eosin. Spermatozoa yang telah mati akan berwarna merah-keunguan karena rusaknya membran plasma sel spermatozoa. Pembacaan preparat dilakukan oleh seorang ahli patologi anatomi di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

LAMPIRAN 3

Rekapitulasi Data Penelitian

No	Kode	Berat Badan (gram)	Motilitas	Morfologi
1	CN-1	270	70	74
2	CN-2	240	55	63
3	CN-3	260	65	75
4	CN-4	240	75	85
5	CN-5	260	70	65
6	CN-6	220	65	70
7	CP-1	240	10	20
8	CP-2	280	15	78
9	CP-3	240	15	50
10	CP-4	275	20	57

11	CP-5	220	10	33
12	CP-6	260	15	50
13	P1-1	220	20	76
14	P1-2	230	70	54
15	P1-3	290	60	73
16	P1-4	220	50	64
17	P1-5	260	75	60
18	P1-6	275	40	87
19	P2-1	270	50	67
20	P2-2	260	75	82
21	P2-3	280	75	84
22	P2-4	280	20	52
23	P2-5	210	70	89
24	P2-6	280	65	76

LAMPIRAN 4

Analisis Data SPSS

1. Analisis Data Berat Badan Tikus

1.1 Data Deskriptif

Descriptives

	Kelompok			Statistic	Std. Error
Berat Badan Pre	Kontrol	Mean		248.33	7.491
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	229.08	

		Upper Bound	267.59	
		5% Trimmed Mean	248.70	
		Median	250.00	
		Variance	336.667	
		Std. Deviation	18.348	
		Minimum	220	
		Maximum	270	
		Range	50	
		Interquartile Range	28	
		Skewness	-.513	.845
		Kurtosis	-.621	1.741
Cisplatin		Mean	252.50	9.465
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	228.17
			Upper Bound	276.83
		5% Trimmed Mean	252.78	
		Median	250.00	
		Variance	537.500	
		Std. Deviation	23.184	
		Minimum	220	
		Maximum	280	
		Range	60	
		Interquartile Range	41	
		Skewness	-.135	.845
		Kurtosis	-1.414	1.741
Cisplatin + Vit E 50 mg/kgBB		Mean	249.17	12.276
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	217.61
			Upper Bound	280.72
		5% Trimmed Mean	248.52	
		Median	245.00	
		Variance	904.167	
		Std. Deviation	30.069	
		Minimum	220	
		Maximum	290	
		Range	70	
		Interquartile Range	59	
		Skewness	.330	.845
		Kurtosis	-2.122	1.741
Cisplatin + Vit E 200 mg/kgBB		Mean	263.33	11.155
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	234.66

Upper Bound	292.01	
5% Trimmed Mean	265.37	
Median	275.00	
Variance	746.667	
Std. Deviation	27.325	
Minimum	210	
Maximum	280	
Range	70	
Interquartile Range	33	
Skewness	-2.023	.845
Kurtosis	4.202	1.741

1.2 Uji Normalitas

Tests of Normality

	Kelompok	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Berat	Kontrol	.238	6	.200*	.928	6	.566
Badan Pre	Cisplatin	.205	6	.200*	.937	6	.631
	Cisplatin + Vit E 50 mg/kgBB	.238	6	.200*	.881	6	.272
	Cisplatin + Vit E 200 mg/kgBB	.285	6	.140	.711	6	.008

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

a. Lilliefors Significance Correction

1.3 Uji Kruskal-Wallis

Test Statistics^{a,b}

Berat Badan Pre	
Kruskal-Wallis	2.007
H	
df	3
Asymp. Sig.	.571

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable:
Kelompok

2. Analisis Data Motilitas Sperma

2.1 Data Deskriptif

		Descriptives					
Kelompok				Statistic	Std. Error		
Motilitas	Kontrol	Mean		66.67	2.789		
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	59.50			
			Upper Bound	73.84			
		5% Trimmed Mean		66.85			
		Median		67.50			
		Variance		46.667			
		Std. Deviation		6.831			
		Minimum		55			
		Maximum		75			
		Range		20			
		Interquartile Range		9			
		Skewness		-.889	.845		
		Kurtosis		1.339	1.741		
		Cisplatin		Mean		14.17	1.537
				95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	10.22	
Upper Bound	18.12						
5% Trimmed Mean				14.07			
Median				15.00			
Variance				14.167			
Std. Deviation				3.764			
Minimum				10			
Maximum				20			
Range				10			
Interquartile Range				6			
Skewness				.313	.845		
Kurtosis				-.104	1.741		
Cisplatin + Vit E 50 mg/kgBB				Mean		52.50	8.342
				95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	31.06	
		Upper Bound	73.94				
		5% Trimmed Mean		53.06			
		Median		55.00			
		Variance		417.500			
		Std. Deviation		20.433			

	Minimum		20	
	Maximum		75	
	Range		55	
	Interquartile Range		36	
	Skewness		-.673	.845
	Kurtosis		-.253	1.741
Cisplatin + Vit E 200 mg/kgBB	Mean		59.17	8.700
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	36.80	
		Upper Bound	81.53	
	5% Trimmed Mean		60.46	
	Median		67.50	
	Variance		454.167	
	Std. Deviation		21.311	
	Minimum		20	
	Maximum		75	
	Range		55	
	Interquartile Range		33	
	Skewness		-1.595	.845
	Kurtosis		2.237	1.741

2.2 Uji Normalitas

		Tests of Normality					
		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Kelompok	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Motilitas	Kontrol	.237	6	.200*	.927	6	.554
	Cisplatin	.254	6	.200*	.866	6	.212
	Cisplatin + Vit E 50 mg/kgBB	.143	6	.200*	.956	6	.787
	Cisplatin + Vit E 200 mg/kgBB	.275	6	.177	.808	6	.069

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

a. Lilliefors Significance Correction

2.3 Uji Homogenitas

		Test of Homogeneity of Variances			
		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Motilitas	Based on Mean	4.229	3	20	.018
	Based on Median	2.352	3	20	.103

Based on Median and with adjusted df	2.352	3	9.575	.136
Based on trimmed mean	3.815	3	20	.026

2.4 Uji One-Way ANOVA Brown-Forsythe

ANOVA

Motilitas

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	9828.125	3	3276.042	14.053	.000
Within Groups	4662.500	20	233.125		
Total	14490.625	23			

Robust Tests of Equality of Means

Motilitas

	Statistic ^a	df1	df2	Sig.
Brown-Forsythe	14.053	3	11.353	.000

a. Asymptotically F distributed.

2.5 Uji post-hoc Games-Howell

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Motilitas

Games-Howell

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol	Cisplatin	52.500 [*]	3.184	.000	42.24	62.76
	Cisplatin + Vit E 50 mg/kgBB	14.167	8.796	.438	-16.12	44.45
	Cisplatin + Vit E 200 mg/kgBB	7.500	9.136	.843	-24.10	39.10
Cisplatin	Kontrol	-52.500 [*]	3.184	.000	-62.76	-42.24
	Cisplatin + Vit E 50 mg/kgBB	-38.333 [*]	8.482	.020	-68.87	-7.79

	Cisplatin + Vit E 200 mg/kgBB	-45.000*	8.835	.012	-76.87	-13.13
Cisplatin + Vit E 50 mg/kgBB	Kontrol	-14.167	8.796	.438	-44.45	16.12
	Cisplatin	38.333*	8.482	.020	7.79	68.87
	Cisplatin + Vit E 200 mg/kgBB	-6.667	12.053	.944	-43.55	30.22
Cisplatin + Vit E 200 mg/kgBB	Kontrol	-7.500	9.136	.843	-39.10	24.10
	Cisplatin	45.000*	8.835	.012	13.13	76.87
	Cisplatin + Vit E 50 mg/kgBB	6.667	12.053	.944	-30.22	43.55

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

3. Analisis Data Morfologi Sperma

3.1 Data Deskriptif

		Descriptives		Statistic	Std. Error
	Kelompok				
Morfologi (%)	Kontrol	Mean		72.00	3.246
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	63.66	
			Upper Bound	80.34	
		5% Trimmed Mean		71.78	
		Median		72.00	
		Variance		63.200	
		Std. Deviation		7.950	
		Minimum		63	
		Maximum		85	
		Range		22	
		Interquartile Range		13	
		Skewness		.688	.845
		Kurtosis		.346	1.741
		Cisplatin	Mean		48.00
95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound		27.02		
	Upper Bound		68.98		
5% Trimmed Mean			47.89		
Median			50.00		
Variance			399.600		

	Std. Deviation		19.990	
	Minimum		20	
	Maximum		78	
	Range		58	
	Interquartile Range		33	
	Skewness		.091	.845
	Kurtosis		.246	1.741
Cisplatin + Vit E 50 mg/kgBB	Mean		69.00	4.899
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	56.41	
		Upper Bound	81.59	
	5% Trimmed Mean		68.83	
	Median		68.50	
	Variance		144.000	
	Std. Deviation		12.000	
	Minimum		54	
	Maximum		87	
	Range		33	
	Interquartile Range		20	
	Skewness		.349	.845
	Kurtosis		-.665	1.741
	Cisplatin + Vit E 200 mg/kgBB	Mean		75.00
95% Confidence Interval for Mean		Lower Bound	60.76	
		Upper Bound	89.24	
5% Trimmed Mean			75.50	
Median			79.00	
Variance			184.000	
Std. Deviation			13.565	
Minimum			52	
Maximum			89	
Range			37	
Interquartile Range			22	
Skewness			-1.065	.845
Kurtosis			.600	1.741

3.2 Uji Normalitas

Tests of Normality

Kelompok	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk			
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.	
Morfologi (%)	Kontrol	.186	6	.200*	.948	6	.722
	Cisplatin	.207	6	.200*	.970	6	.894

Cisplatin + Vit E 50 mg/kgBB	.162	6	.200*	.976	6	.928
Cisplatin + Vit E 200 mg/kgBB	.197	6	.200*	.920	6	.505

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

a. Lilliefors Significance Correction

3.3 Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Morfologi (%)	Based on Mean	1.073	3	20	.383
	Based on Median	.746	3	20	.537
	Based on Median and with adjusted df	.746	3	12.193	.545
	Based on trimmed mean	1.067	3	20	.385

3.4 Uji One-Way ANOVA

ANOVA

Morfologi (%)

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2700.000	3	900.000	4.552	.014
Within Groups	3954.000	20	197.700		
Total	6654.000	23			

3.5 Uji post hoc LSD

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Morfologi (%)

LSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol	Cisplatin	24.000*	8.118	.008	7.07	40.93
	Cisplatin + Vit E 50 mg/kgBB	3.000	8.118	.716	-13.93	19.93

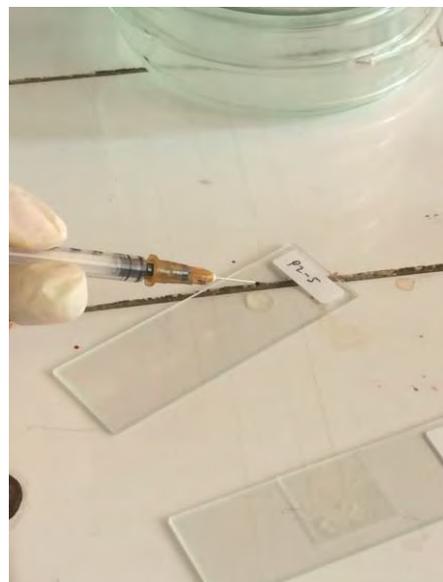
	Cisplatin + Vit E 200 mg/kgBB	-3.000	8.118	.716	-19.93	13.93
Cisplatin	Kontrol	-24.000*	8.118	.008	-40.93	-7.07
	Cisplatin + Vit E 50 mg/kgBB	-21.000*	8.118	.018	-37.93	-4.07
	Cisplatin + Vit E 200 mg/kgBB	-27.000*	8.118	.003	-43.93	-10.07
Cisplatin + Vit E 50 mg/kgBB	Kontrol	-3.000	8.118	.716	-19.93	13.93
	Cisplatin	21.000*	8.118	.018	4.07	37.93
	Cisplatin + Vit E 200 mg/kgBB	-6.000	8.118	.468	-22.93	10.93
Cisplatin + Vit E 200 mg/kgBB	Kontrol	3.000	8.118	.716	-13.93	19.93
	Cisplatin	27.000*	8.118	.003	10.07	43.93
	Cisplatin + Vit E 50 mg/kgBB	6.000	8.118	.468	-10.93	22.93

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

LAMPIRAN 5

Dokumentasi Penelitian





TESIS

EFEK PEMBERIAN VITAMIN.....

DIMAS VISA ADITYA

LAMPIRAN 6

Sertifikat Laik Etik

