

## BAB 1

### PENDAHULUAN

#### 1.1 Latar Belakang

Pasangan infertil adalah ketidakmampuan untuk hamil setelah 12 bulan berhubungan seksual secara teratur tanpa menggunakan alat kontrasepsi (Abdollahzadeh, 2018). Hal ini menimbulkan permasalahan tidak hanya kepada pasangan suami-istri tetapi secara luas akan berdampak emosional, fisik, keuangan dan sosial budaya (Slade *et al.*, 2007). Prevalensi global infertilitas semakin hari semakin meningkat mencapai 15% pria infertil di seluruh dunia (Kumalic *et al.*, 2014; Agarwal *et al.*, 2015). Indonesia pada tahun 2012 memiliki jumlah penduduk sekitar 238 juta dan prevalensi infertilitas pria sebanyak 2.647.695 atau sebesar 1,11 % (HIFERI, 2013).

Penyebab infertilitas bisa dari pihak suami (40%), istri (40%), suami dan istri (10%), serta tidak diketahui penyebabnya atau idiopatik sebesar 10% (Hinting, 1996; Razak, 2002; Alahmar, 2017). Menurut *European Association of Urology* infertilitas idiopatik laki-laki mencapai 31,7% (Dohle, 2005). Infertilitas idiopatik ini sering dikategorikan berdasarkan kelainan pada morfologi (*teratozoospermia*), motilitas rendah (*asthenozoospermia*), dan jumlah sperma (*oligozoospermia*) (Wael *et al.*, 2014; Kumalic *et al.*, 2014).

Motilitas merupakan parameter penting dalam fungsi spermatozoa atau infertilitas pria (Cooper, 2010; Alahmar, 2019). Spermatozoa memerlukan energi tinggi agar motilitasnya bisa berfungsi dengan baik. Energi diperoleh dari dua jalur metabolisme utama: glikolisis yang terjadi pada bagian utama flagel dan oksidasi

fosforilasi (OXPHOS) di mitokondria yang terletak di *midpiece* flagel (Du Plessis, 2015).

Pada jalur glikolisis, per molekul glukosa menghasilkan dua molekul ATP sedangkan jalur Oxphos menghasilkan 34 molekul ATP sehingga Oxphos merupakan jalur yang paling efisien. Oxphos melibatkan enzim kompleks I, II, III, IV dan V (Kao *et al.*, 1998; Koppers *et al.*, 2008). Rangkaian proses Oxphos ini menghasilkan Reaktif Oksigen Spesies (ROS) sebagai hasil samping yang tidak dapat dihindari (Kumar dan Sangeetha, 2009)

Dalam kondisi fisiologis, spermatozoa memproduksi ROS dalam jumlah kecil untuk regulasi fungsi sel sperma, kapasitas spermatozoa dan reaksi akrosom sedangkan dalam jumlah besar mengakibatkan stress oksidatif (SO) yaitu produksi ROS berlebihan sehingga tidak mampu dinetralisir oleh sistem pertahanan antioksidan yang ada pada spermatozoa. ROS bersifat sebagai oksidator yang dapat menyebabkan kerusakan oksidatif pada lipid membran, protein, dan DNA (Zelen *et al.*, 2010) akibatnya motilitas spermatozoa menurun (Sudjarwo, 2001; Nallella *et al.*, 2005; Shukla *et al.*, 2016).

Oksidasi lipid menjadi peroksida pada membran spermatozoa akan menghasilkan senyawa MDA (*Malondialdehyda*) yang menyebabkan integritas membran sel turun dan motilitas spermatozoa turun (Suleiman *et al.*, 1996; Sudjarwo, 2011). Kadar MDA dapat diukur secara tidak langsung yaitu dari produk reaksi radikal bebas (Edyson, 2002) menggunakan Spektrofotometer, luminometer, spektrofluorometer (Sudjarwo, 2001) dan secara langsung dengan TBA Test (*Thiobarbituric Acid Reactive Substances*) (Clarkson dan Thompson, 2000; Alahmar, 2019).

Radikal bebas mampu secara langsung merusak DNA spermatozoa dengan mengoksidasi basa purin dan pirimidin, menginisiasi terjadinya apoptosis dalam spermatozoa, menyebabkan aktifnya enzim-enzim caspase untuk mendegradasi DNA sperma (Tremellen, 2008). Oksidasi DNA menghasilkan senyawa 8-*hidroksideoksiguanosin* (8-OH-dG) sebagai marker kerusakan DNA (Sabeti *et al.*, 2016) yang dapat ditentukan kadarnya dengan ELISA kit (López, *et al.*, 2013)

Adanya kelainan rantai respirasi mtDNA seperti mutasi mtDNA dapat menghambat transfer elektron akibatnya ROS meningkat, ATP menurun, motilitas menurun (Kao *et al.*, 1995; St. John *et al.*, 1997). Oksidasi guanin oleh ROS apabila terletak di rantai respirasi sel dapat menyebabkan SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisme*) atau mutasi titik (*point mutation*). SNPs mt A3243G merupakan mutasi kausal pada diabetes turunan maternal (*Maternally Inherited Diabetes, MID*), diabetes turunan dengan ketulian dan pada optalmoplegia eksternal (*Maternally Inherited Diabetes and Deafness, MIDD*) serta *mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis, dan stroke-like episodes syndrome* (MELAS) (Alcolado *et al.*, 1995; Majamaa *et al.*, 1998; Jin Zhang *et al.*, 2015). “*Strong SNPs*” banyak terjadi pada spermatozoa manusia di India, terletak di A3243G yang berada di rantai respirasi sel di mitokondria berkorelasi dengan penurunan motilitas spermatozoa (Spiropoulos *et al.*, 2002; Venkatesh, 2009).

Pemeriksaan Laju Endap Darah (LED) merupakan salah satu elemen pemeriksaan laboratorium penunjang yang efisien, cepat dan tepat (Wirawan, 2011; Bregani *et al.*, 2013). LED mencerminkan perubahan protein plasma yang terjadi pada infeksi akut maupun kronik. Infeksi dapat memengaruhi motilitas spermatozoa, pada penyakit menular seperti klamidia dan gonore sering menyebabkan infertilitas karena

menyebabkan skar yang memblokir jalannya spermatozoa (Brajadenta dan Sumaerah, 2019).

Pengobatan pilihan untuk infertilitas idiopatik pada pria menggunakan suplementasi antioksidan telah terbukti meningkatkan parameter spermatozoa (Majzoub dan Agarwal, 2017). Antioksidan dibedakan menjadi antioksidan endogen atau enzimatis (katalase, *glutathione*, dan superoksida dismutase) dan eksogen atau non-enzimatis (Vitamin C, vitamin E, beta karoten, likopen, zeaxanthin, flavonoid, astaxanthin) (Winarsi, 2007; Capelli, 2018). Suplementasi senyawa non-enzimatis dapat meningkatkan aktivitas dan efektivitas enzimatis. Antioksidan eksogen dapat menjadi pro-oksidan sehingga mempunyai efek negatif dengan menyebabkan oksidasi di dalam tubuh, sedangkan astaxanthin tidak pernah menjadi pro-oksidan (Naguib, 2000) dan sangat resisten terhadap auto-oksidasi (Mc. Nulty *et al.*, 2007). Hal inilah yang membedakan astaxanthin dari antioksidan lainnya. Astaxanthin mampu melindungi komponen sel lain (lemak, protein, DNA) dari kerusakan oleh radikal bebas (Nishida *et al.*, 2007; Capelli, 2018) sehingga merupakan salah satu antioksidan yang sangat potensial, karena secara *in vivo* astaxanthin dapat meningkatkan viabilitas spermatozoa, morfologi normal, dan integritas DNA (Bahmanzadeh *et al.*, 2016).

Sumber astaxanthin tertinggi ada di ganggang hijau (*Haematococcus pluvialis*) yang dapat mensintesis dan mengakumulasi 1000-3000 kali dibanding pada ikan salmon (Suseela *et al.*, 2006; Wayama *et al.*, 2013). Di antara karotenoid yang ditemukan dalam mikroalga dan makanan laut (misalnya: salmon, trout, dan udang), astaxanthin telah dilaporkan memiliki aktivitas antioksidan tertinggi (Yan *et al.*, 2016). Aktivitas astaxanthin 40 kali lebih kuat dari kelompok karoten, efektivitas 500 - 1000 kali lebih baik dibandingkan vitamin E dalam hal pencegahan peroksidasi lemak secara *in vivo*,

6000 kali Vitamin C, 800 kali Coenzym Q10, 560 kali ekstrak *green tea*, 75 kali *lipoic acid* (Nishida *et al.*, 2007; Wood dan Yamasitha, 2009 ; Capelli, 2018).

Astaxanthin (3,3'-dihydroxy-4,4'-diketo- $\beta$ ,  $\beta'$ -karoten) atau  $C_{40}H_{52}O_4$  terbentuk dari rantai panjang 40-karbon alifatik hidrokarbon (poliena), sembilan  $-C=C-$  dengan dua tambahan  $-C=C-$  di dalam cincin siklik yang dilengkapi dengan kelompok oksigen fungsional. Secara umum molekul astaxanthin mirip dengan molekul beta-karoten. Ada tiga stereoisomer dari astaxanthin: 3S, 3'S; 3R,3'S dan 3R,3'R. Yang berasal dari alam hanya berisi 3S, 3'S sedangkan yang sintetis mengandung tiga stereoisomer. Penelitian menunjukkan astaxanthin alami secara substansial lebih efektif daripada sintetis. Struktur molekul yang unik ini memberikan keunggulan dalam kapasitas antioksidan, yaitu menerima radikal bebas dengan memasukkannya ke rantai poliena panjang daripada menyumbangkan satu elektron atau satu atom hidrogen. Ini adalah mekanisme yang lebih efektif dibanding antioksidan lain (Cappeli *et al.*, 2018).

Astaxanthin berupa serbuk berwarna merah tua yang tidak larut dalam air tetapi larut dalam lemak dan beberapa pelarut organik. Sifat larut lemak memungkinkan untuk menembus ke dalam membran sel. Gugus keto dan hidroksil melekat pada cincin sehingga bersifat hidrofilik, jadi dalam membran sel bersifat hidrofilik dan lipofilik. Hal ini memungkinkan astaxanthin untuk melepas spesies oksigen reaktif lebih efektif terhadap peroksidasi lipid. Selain itu, strukturnya yang panjang meningkatkan kekakuan dan kekuatan mekanik. Hal ini yang membedakannya juga dengan antioksidan lain (Kidd, 2011; Cappeli *et al.*, 20018).

Astaxanthin, seperti golongan karotenoid lainnya, memiliki sifat lipofilik yang diabsorpsi di usus halus. Bioavailabilitas karotenoid umumnya rendah hanya Astaxanthin yang paling baik dan bioavailabilitasnya meningkat jika diemulsikan dengan *olive oil* (Odeberg, 2003; Fiedor *et al.*, 2014). Metabolisme utama di hati,

pada tikus di *cytochrome P-450 1A1/2*, AUC (*Area Under The Concentration*) di hati lebih besar daripada di plasma, tercapai setelah 8 jam dan diekskresikan lewat urin (Rao, 2013).

Penelitian *in vitro* genotoksisitas astaxanthin sintetik menunjukkan bahwa astaxanthin tidak bersifat genotoksik dan tidak menginduksi mutagenik, klastogenik dan perubahan aneugenik. Pada pemakaian selama dua tahun dengan dosis 200 dan 1000 mg/kg BB/hari pada tikus perempuan akan bersifat toksis karena meningkatkan insiden *hepatoselular hipertrofi* (adenoma jinak) (Edwads *et al.*, 2016).

Dari uraian di atas tentang infertilitas pada pria yang 30-80% penyebabnya adalah stress oksidatif (Shukla *et al.*, 2016) yang memerlukan Astaxanthin sebagai antioksidan sangat kuat dan bermanfaat untuk infertilitas dengan meningkatkan motilitas spermatozoa (Yuan *et al.*, 2010; Sariozkan *et al.*, 2014, Capelli *et al.*, 2017), menurunkan kadar (MDA (Fang *et al.*, 2015). Maka perlu dilakukan penelitian tentang pengaruh pemberian astaxanthin per oral terhadap MDA, 8-OHdG, LED, aktivitas enzim kompleks III, aktivitas enzim kompleks IV dan SNPS mt DNA A3243G untuk mengetahui peran astaxanthin dalam upaya memperbaiki fungsi spermatozoa manusia.

## 1.2 Rumusan Masalah

Dari uraian di atas, maka timbul suatu permasalahan:

- a. Apakah pemberian Astaxanthin dapat menurunkan kadar MDA, 8-OH-dG pada spermatozoa manusia dan menurunkan LED?
- b. Apakah pemberian Astaxanthin dapat meningkatkan aktivitas enzim kompleks III dan aktivitas enzim kompleks IV pada spermatozoa manusia?
- c. Apakah terdapat SNPs mtDNA A3243G pada spermatozoa manusia di RSUD. Dr. Soetomo Surabaya?

- d. Apakah pemberian Astaxanthin dapat meningkatkan fungsi spermatozoa manusia?

### **1.3 Tujuan Penelitian**

Tujuan umum dari penelitian ini adalah untuk :

1. Menganalisis kadar MDA , 8-OHdG pada spermatozoa manusia dan LED setelah pemberian Astaxanthin
2. Menganalisis aktivitas enzim kompleks III dan aktivitas enzim kompleks IV pada spermatozoa manusia setelah pemberian Astaxanthin.
3. Menganalisis ada tidaknya SNPs mtDNA A3243G pada spermatozoa manusia di RSUD. Dr. Soetomo Surabaya?
4. Menganalisis mekanisme Astaxanthin sebagai antioksidan dalam upaya meningkatkan fungsi spermatozoa manusia.

### **1.4 Manfaat Penelitian**

#### **1.4.1 Manfaat Ilmiah**

Manfaat dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan sumbangan ilmu pengetahuan khususnya di bidang reproduksi molekuler, yaitu pemberian antioksidan Astaxanthin per oral dalam memperbaiki fungsi spermatozoa.

#### **1.4.2 Manfaat Praktis**

Memberikan informasi kepada masyarakat mengenai dampak pemberian Astaxanthin per oral sebagai antioksidan terhadap fungsi spermatozoa yang akan mempengaruhi fertilitas pria.

### **1.4.3 Manfaat Sosial**

Masyarakat yang karena faktor pekerjaan, lingkungan, gaya hidup serta gangguan metabolisme biologis yang mengakibatkan stres oksidatif dapat mempertimbangkan penggunaan Astaxanthin per oral sebagai salah satu cara untuk menangkal ROS.