

Hubungan Kadar Malondialdehide (MDA) Testis dengan Kualitas Spermatozoa pada Tikus Putih Strain Wistar (*Rattus novergicus*) Diabetes Tipe I

Jauhari Deslo¹, Jufriady Ismy², Dasrul Dasrul³

¹Program Pendidikan Dokter Spesialis Ilmu Bedah, Fakultas Kedokteran Universitas Syiah Kuala/ Rumah Sakit Umum dr. Zainoel Abidin Banda Aceh.

²Divisi Urologi, Departemen Bedah Fakultas Kedokteran Universitas Syiah Kuala/ Rumah Sakit Umum dr. Zainoel Abidin Banda Aceh.

³Staf Dosen Kedokteran Hewan, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala/ Rumah Sakit Umum dr. Zainoel Abidin Banda Aceh.

Abstrak

Latar Belakang. Hyperglikemia pada diabetes melitus tipe 1 diduga berperan dalam peningkatan radikal bebas (oksidan) dan penurunan antioksidan darah. Peningkatan senyawa radikal bebas memicu peroksidasi lipid pada darah dan testis yang ditandai dengan peningkatan kadar malondialdehid (MDA) testis dan penurunan kualitas spermatozoa.

Tujuan Penelitian. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui hubungan kadar MDA testis dengan kualitas spermatozoa tikus putih diabetes mellitus tipe 1.

Metode Penelitian. Desain penelitian ini adalah *static comparison group* dan menggunakan uji analitik observasional. Subjek penelitian dibagi menjadi 2 kelompok yaitu 16 ekor tikus putih normal dan 16 ekor tikus putih dengan diabetes mellitus tipe 1 yang diinduksi aloksan. Kadar MDA spermatozoa diukur dengan menggunakan uji TBA dan spektrofotometer. Penilaian kualitas spermatozoa (jumlah, persentase motilitas dan morfologi normal spermatozoa) dilakukan dengan menggunakan standar WHO. Data kadar MDA testis dan kualitas spermatozoa (jumlah, motilitas dan morfologi spermatozoa) dianalisis dengan uji-t independent, sedangkan hubungan antara kadar MDA dengan kualitas spermatozoa dianalisis dengan korelasi pearson menggunakan spss 21.0.

Hasil Penelitian. Hasil analisis menunjukkan bahwa kadar MDA testis tikus normal berbeda secara nyata ($p < 0,05$) dibandingkan dengan tikus putih DM. Jumlah, motilitas dan morfologi normal spermatozoa tikus putih normal berbeda secara nyata ($p < 0,05$) dibandingkan dengan pada tikus putih DM. Terdapat hubungan yang kuat antara kadar MDA testis dengan jumlah, motilitas dan morfologi normal spermatozoa dengan arah negatif ($R = - 0,877$; $- 0,804$ dan $- 0,795$).

Kesimpulan. Kadar MDA testis berhubungan secara kuat dengan kualitas (jumlah, motilitas dan morfologi normal) spermatozoa dengan arah negatif.

Kata kunci: *Diabetes mellitus, malondialdehida testis, kualitas spermatozoa*

The Relationship of Testicular Malondialdehyde (MDA) Levels with Spermatozoa Quality in Wistar Strain White Mice (*Rattus norvegicus*) with Type I Diabetes

Jauhari Deslo¹, Jufriady Ismy², Dasrul Dasrul³

Abstract

Background. Hyperglycemia in type 1 diabetes mellitus is thought to play a role in increasing free radicals (oxidants) and decreasing blood antioxidants. The increase in free radical compounds triggers lipid peroxidation in the blood and testicle which is characterized by an increase in the amount of testicle malondialdehyde (MDA) and a decrease in the quality of spermatozoa.

Objective. This study aims to determine the relationship of the amount of MDA and the quality of spermatozoa of type 1 diabetes mellitus white mice.

Materials and Methods. The design of this study was *static comparison group* and used observational analytic tests. The research subjects were divided into 2 groups, namely 16 normal white mice and 16 type 1 diabetes mellitus white mice induced by alloxan. The amount of MDA of spermatozoa was measured using the TBA test and spectrophotometer. The observation of the quality of spermatozoa was based on the number, percentage of motility and morphology of normal spermatozoa carried out using eosin-negrosin staining. The data in the form of spermatozoa MDA amount and the percentage of viability were analyzed by paired t-test and Pearson correlation using SPSS 21.0.

Result. The results of the analysis showed that the amount of MDA in normal mice's testicle were significantly different ($p < 0.05$) compared to DM white mice. The number, motility and normal morphology of spermatozoa of normal white mice differed significantly ($p < 0.05$) compared to DM white mice. There was a strong relationship between testicle amount of MDA with the number, motility and normal morphology of spermatozoa with the negative direction ($R = -0.877$; -0.804 and -0.795).

Conclusions. The amount of testicle MDA were strongly associated with the number, motility and normal morphology of spermatozoa with negative direction.

Keywords: *Diabetes mellitus, testicle of malondialdehyde, quality of spermatozoa*

Pendahuluan

Diabetes mellitus (DM) merupakan gangguan metabolisme kronik yang kompleks tidak menular, dengan karakteristik tingginya kadar glukosa dalam darah (hiperglikemia) yang terjadi karena kelainan sekresi insulin, kerja insulin atau keduanya.¹ Penyakit DM menjadi sangat penting karena jumlah penderitanya makin meningkat tiap tahun, dan juga dapat menyebabkan berbagai masalah medis, psikologis dan seksual.² Lebih lanjut Amaral *dkk.*, tahun 2008, menyatakan bahwa prevalensi terjadinya disfungsi seksual pada pria diabetes hampir mencapai 50%, sedangkan pada wanita diabetes memiliki prevalensi yang lebih rendah dibandingkan dengan pria diabetes.³ Sekitar 90% pria diabetes mengalami disfungsi seksual yang meliputi disfungsi testis, menurunnya libido (impotensi), dan penurunan tingkat fertilitas. Disfungsi ereksi dilaporkan sekitar 50 % terjadi pada pria diabetes dan frekuensi disfungsi ereksi pada penderita diabetes meningkat 25 % di atas usia 35 tahun dan 70 % sesudah usia 60 tahun, serta 30 % penderita diabetes mengalami penurunan libido.⁴

Selain itu, Kanter *et al.*, tahun 2012 juga menyatakan bahwa dampak yang ditimbulkan akibat penyakit diabetes melitus, terutama pada organ testis diantaranya ialah mengecilnya ukuran serta berat testis, peningkatan abnormalitas pada spermatogenesis yang ditandai dengan menurunnya jumlah sperma yang dihasilkan.⁵ Peningkatan jumlah sel yang mengalami apoptosis pada sel germinal (terutama spermatogonium dan spermatisit) dalam tubulus seminiferus telah dilaporkan juga terjadi pada hewan uji tikus diabetes.⁶

Beberapa peneliti membuktikan faktor utama pemicu terjadinya disfungsi ereksi dan penurunan kualitas spermatozoa pada penderita diabetes mellitus adalah akibat peningkatan produksi senyawa oksigen reaktif (*reactive oxygen spesies*/ROS) dalam tubuh seperti superoksida ($O_2^{\bullet-}$), radikal hidroksil (OH^{\bullet}), serta hidrogen peroksida (H_2O_2)^{1,7}

Correspondents:
Jauhari Deslo
PPDS Ilmu Bedah
email : kearyumm@gmail.com

Peningkatan ROS yang melebihi kapasitas enzim antioksidan dalam tubuh untuk menetralsirkannya dikenal dengan istilah stress oksidatif yang selanjutnya menyebabkan terjadinya reaksi peroksidasi pada lipid, protein, dan DNA membrane sel-sel tubuh termasuk didalamnya sel-sel interstitial testis dan spermatozoa^{7,8}

Stress oksidatif akibat diabetes militus juga menjadi pencetus produksi malondialdehide (MDA). Malondialdehide merupakan hasil dari oksidasi *polyunsaturated fatty acid* (PUFA). Akibat proses pembentukan malondialdehide, biomarker ini menjadi penanda biologis yang paling sering digunakan sebagai indikator peroksidasi lemak. Senyawa ini merupakan produk peroksidasi lemak yang relatif konstan terhadap proporsi peroksidasi lemak, oleh karena itu MDA merupakan indikator yang tepat untuk mengetahui kecepatan (*rate*) proses peroksidasi lemak *in vivo*.^{9,10} MDA juga menjadi indikator tingginya kadar radikal bebas dalam tubuh dengan ditunjukkan oleh rendahnya aktifitas dari enzim antioksidan. Semakin tinggi kadar radikal bebas maka makin tinggi kadar MDA dalam tubuh. Berkaitan dengan infertilitas dan kualitas spermatozoa, MDA telah dilaporkan menjadi biomarker yang

baik untuk memahami patologi dari pengurangan motilitas sperma pada kondisi infeksi urogenital atau status inflamasi.¹⁰ Selain itu adanya peningkatan MDA dalam membran plasma spermatozoa telah dilaporkan menambah rigiditas struktur, mengubah kemampuan spermatozoa untuk berfusi dengan oosit yang ditandai dengan penurunan motilitas spermatozoa dan buruknya kualitas semen.¹¹ Tavilani dkk menyatakan bahwa konsentrasi MDA signifikan lebih tinggi pada kondisi asthenozoospermic dibandingkan pada laki-laki normozoospermik. Nilai MDA pada plasma sperma asthenozoospermic dan normozoospermic masing-masing adalah $1,35 \pm 0,42$ dan $1,2 \pm 0,3$ nmol/ml plasma seminal.

Pada studi lain didapatkan hubungan MDA dengan status infertilitas, penurunan jumlah sperma, motilitas dan morfologi.^{12,13} Namun sampai sejauh ini belum ditemukan laporan yang membahas bagaimana hubungan kadar MDA jaringan testis dengan kualitas (jumlah, motilitas dan morfologi normal) spermatozoa pada penderita diabetes mellitus. Berdasarkan uraian diatas maka, peneliti tertarik untuk melakukan suatu penelitian yang bertujuan untuk mengkaji hubungan antara kadar malondialdehide (MDA) jaringan testis dengan

kualitas spermatozoa tikus strain wistar (*rattusnovergicus*) diabetes militus.

Hasil penelitian ini diharapkan dapat meningkatkan pemahaman mengenai mekanisme infertilitas melalui pendekatan biomolekuler, dan mengetahui peran dari MDA jaringan testis terhadap kualitas spermatozoa sehingga dapat digunakan sebagai biomarker infertilitas pria.

Metode

Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian experimental laboratory dengan rancangan static comparison group. Terdapat dua kelompok yaitu perlakuan kondisi tikus diabetes militus dan tanpa diabetes militus.

Lokasi dan Waktu Penelitian

Lokasi penelitian dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala Banda Aceh, selama 3 bulan mulai dari September hingga Nopember 2018.

Persiapan hewan percobaan

Tikus putih (*rattus novergicus*) strain Wistar, berjenis kelamin jantan, dewasa, berusia

3-4 bulan, diperoleh dari Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala sebanyak 32 ekor. Dilakukan homogenisasi sampel penelitian dimana sebelum perlakuan tikus ditimbang, diukur suhu rektal yang telah dilakukan adaptasi selama dua minggu dengan dipelihara di dalam kandang. Suhu dalam kandang diatur pada suhu kamar, setiap harinya tikus diberi makan berupa pelet sebanyak 20 gram dan air minum diberikan secara *ad libitum*.

Pembuatan hewan perlakuan Diabetes Melitus

Pembuatan tikus diabetes dilakukan menurut Kim *et al.* (2006), tikus *putih strain Wistar* jantan dipuasakan selama 24 jam kemudian diinjeksi dengan aloksan monohidrat yang dilarutkan dalam larutan NaCl fisiologis steril dengan dosis 120 mg/kg bobot badan secara intraperitoneal. Setelah 7 hari penyuntikan dilakukan pemeriksaan glukosa darah dengan menggunakan Glukometer (*EZ Smart*). Tikus putih mengalami diabetes militus dengan bukti kadar glukosa puasa >126mg/dl.

Pemeriksaan Glukosa Darah

Pengukuran glukosa darah menggunakan Glukometer (*EZ Smart*), glukotest ini secara otomatis akan berfungsi ketika strip dimasukan

dan akan tidak berfungsi ketika strip dicabut. Darah diambil dengan menusuk ekor tikus dengan jarum kecil sampai keluar darah, dengan menyentuhkan setetes darah ke strip, reaksi dari wadah strip akan otomatis menyerap darah ke dalam strip melalui aksi kapiler. Ketika wadah terisi penuh oleh darah, alat akan mulai mengukur kadar glukosa darah, hasil pengukuran dibaca selama 9 detik setelah darah masuk strip.

Pengambilan sekresi cauda epididimis

Setelah pemberian perlakuan selama 60 hari, semua tikus dibunuh dengan cara pemberian anestesi inhalasi menggunakan kloroform. Lalu tikus diletakkan pada nampan dengan posisi ventral dan dilakukan pembedahan untuk mendapatkan organ reproduksi. Kemudian organ testis beserta epididimis sebelah kanan diambil dan diletakkan ke dalam cawan petri yang berisi NaCl 0,9%. Dengan menggunakan mikroskop pembesaran 40 kali cauda epididimis dipisahkan dengan cara memotong bagian proksimal corpus epididimis dan bagian distal vas deferens. Selanjutnya cauda epididimis dimasukkan ke dalam gelas arloji yang berisi 1 ml NaCl 0,9% hangat (37°C), kemudian bagian proksimal cauda dipotong sedikit dengan gunting lalu cauda ditekan

dengan perlahan hingga cairan epididimis keluar dan tersuspensi dengan NaCl 0,9%. Suspensi spermatozoa yang telah diperoleh dilakukan pengamatan kualitas spermatozoa yang meliputi: konsentrasi, motilitas dan morfologi normal spermatozoa.

Penilaian kadar MDA jaringan Testis

Penilaian kadar MDA dilakukan secara in vivo menggunakan endogen yang bereaksi terhadap TBA, berikut cara pembuatan lisat dan preparat MDA⁴⁴

- Siapkan 1 × solusi reagen TBA / TCA / HCl dengan mengencerkan larutan stok 4 kali lipat dalam air. Sambil diaduk solusi dengan pengaduk magnet, tambahkan BHT ke konsentrasi akhir 0,03%
- Lisat testis disentrifugasi selama 20 menit dengan kecepatan 8000 rpm
- Supernatan yang terbentuk dari hasil sentrifugasi diambil 100 µl ditambah 550 µl akuades, 100 µl TCA 100 µl TCA kemudian divortex, ditambahkan 250 µl HCL 1N kemudian divortex.
- Ditambahkan 100 µl NaThio 1% lalu divortex kembali. Setelah itu disentrifugasi dengan kecepatan 500 rpm selama 15 menit.

- Supernatan yang terbentuk dipisahkan dan dipindahkan pada mikrotube baru. Setelah itu, dipanaskan dalam water bath 100°C selama 30 menit.
- Sampel kemudian diukur absorbansinya dengan persentase spektrofotometer (%) untuk menilai kadar MDA dari cairan lisat testis.

Analisa Data

Data kadar MDA testis dan kualitas spermatozoa (motilitas, morfologi normal dan jumlah sel sperma) yang diperoleh terlebih dahulu dilakukan uji normalitas dan homogenitas. Uji normalitas menggunakan uji Saphiro-Wilk dan homogenitas menggunakan uji Levene. Jika didapatkan distribusi data yang normal dan homogen, maka dilakukan analisa data dengan uji t-independent. Sedangkan untuk melihat hubungan antara kadar MDA dengan kualitas spermatozoa (jumlah, motilitas dan morfologi normal) dilakukan dengan uji korelasi pearson.

Hasil

Kadar MDA Testis tikus putih

Malondialdehida (MDA) merupakan senyawa hasil peroksidasi lipid yang umumnya digunakan sebagai indikator terjadinya stres

oksidatif. Hasil pemeriksaan kadar MDA testis menggunakan metode *Thiobarbituric Acid Reactive Substances* (TBARs), didapatkan kadar MDA testis pada kelompok tikus putih DM yang diinduksi aloksan (KP), lebih tinggi dibandingkan dengan kadar MDA testis pada kelompok tikus putih normal (KN) sebagaimana terlihat pada Tabel 1.

Selanjutnya untuk menentukan apakah data kadar MDA testis berdistribusi normal, data dianalisis dengan uji normalitas menggunakan uji *Saphiro-Wilk*. Hasil uji normalitas terhadap kadar MDA testis disajikan dalam tabel 2.

Hasil dari uji *Shapiro-Wilk* pada Tabel 2 didapatkan bahwa data terdistribusi secara normal dimana nilai p untuk kelompok kontrol (KN) dan kelompok perlakuan KP, adalah >0.05 . Untuk melihat homogenitas data, maka data kemudian dilanjutkan dengan uji *Levence*. Hasil uji *Levence* untuk terhadap kadar MDA testis pada penelitian disajikan dalam tabel 3.

Nilai signifikan untuk uji keseragaman varians menggunakan uji *Levence* menunjukkan 0,56 ($p > 0.05$). Hal ini menandakan bahwa data yang diperoleh homogen, maka kemudian dilanjutkan dengan analisa data menggunakan

uji *t-independent* yang dilakukan untuk membandingkan kadar MDA testis dari kelompok KN dan KP. Hasil uji *t-independent* disajikan pada Tabel 4.

Berdasarkan Tabel 4 di, menunjukkan bahwa kadar MDA testis pada kedua kelompok tikus normal dan tikus DM berbeda secara bermakna ($p = 0,000$). Hasil ini membuktikan bahwa diabetes mellitus mampu meningkatkan kadar MDA testis tikus putih.

Kualitas Spermatozoa

Pemeriksaan kualitas spermatozoa tikus putih pada penelitian ini berdasarkan pada jumlah spermatozoa, persentase motilitas spermatozoa dan morfologi abnormalitas spermatozoa. Hasil pengamatan rerata kualitas spermatozoa tikus putih normal dan tikus DM dapat dilihat pada Tabel 5.

Untuk menentukan apakah data kualitas (jumlah, motilitas dan morfologi normal) spermatozoa berdistribusi normal, maka data dianalisis dengan uji normalitas menggunakan uji *Saphiro-Wilk*. Hasil uji normalitas terhadap kualitas spermatozoa disajikan dalam tabel 6.

Hasil dari uji *Shapiro-Wilk* didapatkan bahwa data terdistribusi secara normal dimana nilai p

untuk kelompok tikus normal (KN) dan kelompok tikus putih DM (KP), adalah >0.05 , dan untuk melihat homogenitas data, maka data kemudian dilanjutkan dengan uji *Levence*. Hasil uji *Levence* untuk terhadap data kualitas spermatozoa pada penelitian disajikan dalam tabel 7.

Nilai signifikan untuk uji keseragaman varians menggunakan uji *Levence* menunjukkan $p > 0.05$. Hal ini menandakan bahwa data yang diperoleh homogen, maka kemudian dilanjutkan uji *t-independent*. Hasil analisa data evaluasi kualitas spermatozoa dapat dilihat pada tabel 8.

Berdasarkan hasil uji T pada Tabel 8, menunjukkan bahwa kualitas berdasarkan jumlah, persentase motilitas dan persentase morfologi normal spermatozoa pada kelompok tikus putih normal dan tikus putih DM berbeda secara bermakna dengan nilai p masing-masing adalah 0,000; 0,000 dan 0,000. Hasil ini dapat disimpulkan bahwa perlakuan diabetes mellitus tipe 1 pada tikus putih dapat menurunkan kualitas spermatozoa (jumlah, persentase motilitas dan morfologi normal spermatozoa) secara nyata.

Hubungan kadar MDA testis dengan Pembahasan kualitas spermatozoa tikus putih

Hasil analisis korelasi dan regresi linier diperoleh koefisien korelasi (r), koefisien determinasi (r^2) dan persamaan regresi antara kadar MDA testis dengan jumlah spermatozoa, persentase motilitas dan morfologi normal spermatozoa tikus putih DM dapat dilihat pada Tabel 9.

Berdasarkan Tabel 9 hasil analisis korelasi pearson di atas menunjukkan bahwa terdapat hubungan yang nyata ($p = 0,000$) antara kadar MDA testis dengan jumlah spermatozoa, persentase motilitas dan morfologi normal spermatozoa dengan nilai koefisien korelasi (r) berturut-turut adalah $-0,877$; $-0,804$ dan $-0,795$. Nilai koefisien korelasi ($r = -0,877$; $-0,804$ dan $-0,795$) adalah kuat yang artinya keeratan hubungan kadar MDA testis dengan jumlah spermatozoa sebesar $87,70\%$, persentase motilitas ($80,40\%$) dan morfologi normal spermatozoa ($79,50\%$). Nilai negatif pada (r) menunjukkan arah korelasi negatif yang menunjukkan semakin rendah kadar MDA testis, maka jumlah spermatozoa, persentase motilitas dan morfologi normal spermatozoa semakin meningkat.

Malondialdehida (MDA) merupakan senyawa hasil peroksidasi lipid yang umumnya digunakan sebagai indikator terjadinya stres oksidatif. Pada penelitian ini dilakukan pengukuran konsentrasi MDA testis tikus jantan pada setiap kelompok perlakuan untuk mengetahui perbandingan kadar MDA testis tikus putih normal dengan tikus putih DM yang diinduksi aloksan. Malondialdehid terbentuk dari peroksidasi lemak (*lipid peroxidation*) pada membran sel yaitu reaksi radikal hidroksi (OH^\cdot) dengan *Poly Unsaturated Fatty Acid* (PUFA). Reaksi tersebut terjadi secara berantai, akibat akhir dari reaksi rantai tersebut akan terbentuk hidrogen peroksida. Hidrogen peroksida tersebut dapat menyebabkan dekomposisi beberapa produk aldehyd yang bersifat toksik terhadap sel dan berpengaruh terhadap gangguan kesuburan testis.²³

Hasil ini membuktikan bahwa tikus putih DM dapat meningkatkan kadar MDA serum. Meningkatnya kadar MDA serum darah tikus putih pada kelompok perlakuan DM (KP) pada penelitian ini kemungkinan disebabkan terjadinya peningkatan ROS dalam sirkulasi. Hasil ini sejalan dengan hasil penelitian yang

dilaporkan oleh beberapa peneliti sebelumnya bahwa induksi aloksan dapat menyebabkan hiperglikemia dan berperan penting dalam peningkatan produksi ROS dan peroksidasi lipid yang berlebihan pada tingkat jaringan.²⁹ Lebih lanjut Suarsana dkk. menyatakan tingginya kadar glukosa darah meningkatkan pembentukan ROS, melalui reaksi oksidasi reduksi sehingga mendorong lebih banyak donor elektron NADH dan FADH₂ masuk ke dalam rantai transport elektron. Peningkatan laju transport elektron turut berkontribusi dalam peningkatan pembentukan anion superoksida (O₂⁻) salah satu unsur ROS sehingga terjadi stress oksidatif.^{30,38} Stres oksidatif yang terjadi pada kondisi hiperglikemik berasal dari peningkatan produksi ROS di mitokondria melalui mekanisme autooksidasi glukosa, glikasi non-enzimatik, aktivasi protein kinase C (PKC), aktivasi *hexosamine pathway* enzimatik, rendahnya konsentrasi antioksidan di jaringan, serta gangguan aktivitas pertahanan antioksidan enzimatik seperti *superoksida dismutase* (SOD), *gluthation peroksidase* (GPx) dan *catalase* (CAT).^{39,40}

Pada kondisi hiperglikemia, peningkatan produksi ROS yang melebihi kapasitas antioksidan sel menyebabkan peningkatan stres

oksidatif yang diiringi dengan terjadinya peroksidasi lipid pada membran sel sehingga akan meningkatkan malondialdehid (MDA) sebagai hasil peroksidasi lipid.^{29,34,35} Telah dilaporkan bahwa MDA secara sistemik memiliki hubungan parameter metabolik pada subjek diabetes tipe I dan II. Pasien dengan kontrol metabolik yang buruk, akan menunjukkan konsentrasi MDA plasma tertinggi, berbeda secara signifikan dengan kelompok pasien kontrol metabolik yang lebih baik. Lebih lanjut beliau juga menjelaskan bahwa peningkatan kadar MDA secara sangat signifikan berkorelasi dengan lamanya pasien menderita DM.¹⁹

Hasil uji T *independent*, diketahui bahwa pada tikus putih normal (KN) memiliki nilai rata-rata konsentrasi MDA (3,55 ± 0,62nmol/mg) yang lebih rendah secara signifikan (p=0,000) dari pada kelompok tikus putih diabetes (5,35± 0,53 nmol/mg). Kadar MDA pada kelompok tikus putih DM (KP) yang lebih tinggi dibandingkan kelompok tikus putih normal (KN) mengindikasikan bahwa tikus putih DM mengalami stres oksidatif. Hal ini dapat terjadi karena pada kelompok tikus putih DM diinduksi dengan aloksan. Aloksan dapat menyebabkan gangguan sekresi insulin pada sel

beta pancreas,^{37,38,39} serta gangguan histopatologi pankreas.⁴⁰ Hal ini didukung juga oleh pernyataan Radenkovic *et al*, yang menyatakan bahwa aloksan bersifat hidrofilik sehingga tidak dapat masuk melalui membran sel. Namun aloksan dapat masuk ke dalam sel beta pankreas melalui protein saluran glukosa (GLUT 2) karena aloksan memiliki struktur seperti glukosa. Masuknya aloksan ke dalam sel beta pankreas menyebabkan inaktivasi enzim glukokinase untuk menstimulus sekresi insulin. Kondisi hiperglikemik memicu peningkatan produksi ROS melalui mekanisme antara lain glikasi non-enzimatik, aktivasi *hexosamine pathway*, dan *polyol pathway*.^{3,33,37,42} ROS dapat berikatan dengan *polyunsaturated fatty acid* (PUFA) pada membran plasma dan menghasilkan MDA yang berlanjut dengan kerusakan sel.^{34,43} Sel-sel pada organ testis, terutama sel spermatozoa, merupakan target utama dari kerusakan yang disebabkan oleh ROS karena sebagian besar sel tersusun atas PUFA.³ Berdasarkan referensi tersebut, dapat dijelaskan mengapa konsentrasi MDA pada organ testis tikus putih DM menunjukkan nilai kadar MDA tertinggi. Hal ini juga dikuatkan hasil penelitian Abdulgani dkk yang menemukan bahwa tikus hiperglikemik menunjukkan gejala histopatologi testis

tertinggi dan jumlah sel-sel spermatogenesis terendah. Menurut Halliwell dan Gutteridge semakin tinggi kadar MDA semakin tinggi pula tingkat kerusakan sel yang disebabkan oleh stres oksidatif. Sedangkan pada kelompok tikus putih normal memiliki kadar MDA yang lebih rendah dari pada kelompok tikus putih DM. Hal ini dikarenakan tikus putih normal tidak mengalami kondisi hiperglikemik yang menyebabkan produksi ROS berlebih. Walaupun dalam keadaan normal atau sehat MDA pada tikus normal (KN) tetap terbentuk, akan tetapi dalam kadar yang lebih rendah dibandingkan dengan kadar MDA pada keadaan hiperglikemik.^{40,44} Hal ini sesuai dengan pernyataan Pasupathi, bahwa kadar MDA yang merupakan hasil dari lipid peroksida ditemukan juga pada keadaan tubuh normal atau sehat, yang mengindikasikan bahwa ROS juga diproduksi dalam metabolisme di mitokondria pada sel tubuh yang normal. Produksi ROS di organ testis, terutama di tubulus seminiferus merupakan proses fisiologis normal yang berperan dalam proses fisiologi. Akan tetapi, produksi ROS yang berlebihan menyebabkan terganggunya fungsi sel hingga menyebabkan kerusakan sel.^{45,46,47}

Kualitas spermatozoa

Penilaian kualitas spermatozoa tikus putih pada penelitian ini diamati berdasarkan pada jumlah spermatozoa, persentase motilitas spermatozoa dan persentase morfologi abnormal spermatozoa. Rata-rata jumlah spermatozoa tikus putih normal (KN) adalah $252,56 \pm 22,32 \times 10^6/\text{ml}$ lebih tinggi dibandingkan dengan jumlah spermatozoa pada kelompok tikus putih DM yang diinduksi aloksan (KP) yaitu $168,25 \pm 17,52 \times 10^6/\text{ml}$. Hasil uji *t-independent* terhadap jumlah spermatozoa menunjukkan ada perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$) diantara kelompok tikus putih normal dengan tikus putih DM. Hasil ini membuktikan bahwa perlakuan DM dengan penyuntikan aloksan berpengaruh terhadap penurunan jumlah spermatozoa tikus putih strain Wistar. Hasil ini sejalan dengan beberapa hasil penelitian sebelumnya yang menemukan penurunan yang signifikan jumlah spermatozoa tikus yang menderita DM.

Menurunnya jumlah spermatozoa pada kelompok tikus putih DM yang diinduksi aloksan pada penelitian ini diduga disebabkan oleh peningkatan produksi ROS yang berlebihan pada tingkat sel. Peningkatan produksi ROS yang berlebihan tanpa diikuti

kesimbangan aktivitas antioksidan endogen, menyebabkan terjadinya stress oksidatif pada sel termasuk sel testis. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Aitken dkk. membuktikan bahwa kondisi hiperglikemia pada pasien diabetes melitus menyebabkan peningkatan produksi ROS sekaligus penurunan aktivitas dari enzim antioksidan seperti SOD, GSH-Px dan CAT. Pembentukan ROS sebenarnya adalah proses fisiologi tubuh akan tetapi jika peningkatan ROS secara berlebihan tanpa diimbangi dengan antioksidan maka akan menyebabkan stres oksidatif pada sel yang selanjutnya akan menyebabkan peroksidasi lipid dan kerusakan dari sel dalam tubulus seminiferus, termasuk sel Leydig dan sel Sertoli.^{16,31,35,48} Lebih lanjut Argawal, menyatakan bahwa stress oksidatif juga dapat merusak integritas DNA pada nukleus spermatozoa sehingga menginduksi apoptosis sel yang mengakibatkan turunnya jumlah spermatozoa. Hal ini juga didukung oleh Faranita bahwa apoptosis sel menurunkan jumlah spermatozoa. Pada penelitian lain juga dilaporkan, stress oksidatif akibat DM dapat menyebabkan ketidakseimbangan poros hipotalamus-hipofisa-gonad yang selanjutnya mempengaruhi sekresi dan kerja *Follikel*

Stimulating Hormone (FSH) dan *Luteinizing Hormone* (LH).^{16,49} FSH merupakan hormon gonadotropin berperan pada tahap perkembangan sel spermatogonia dan spermatosit primer. FSH mempengaruhi aktifitas mitosis dan proliferasi sel spermatogonia dan menunjang tahap pematangan termasuk reduksi meiosis sel spermatosis dan perkembangan spermatid hingga terbentuk spermatozoa. Sedangkan LH merupakan hormon testosteron yang akan mempengaruhi proses spermatogenesis. Bila terjadi penurunan jumlah sel leydig maka akan terjadi penurunan hormon testosteron yang akan menghambat proses spermatogenesis dan penurunan jumlah spermatozoa.^{22,48,50,51}

Rata-rata persentase motilitas spermatozoa tikus putih DM yang diinduksi aloksan (KP) adalah $58,56 \pm 4,37\%$ lebih rendah dibandingkan dengan persentase motilitas spermatozoa pada tikus putih normal (KN) yaitu $87,13 \pm 3,81\%$. Hasil uji t terhadap persentase motilitas spermatozoa menunjukkan ada perbedaan yang nyata diantara kelompok tikus putih normal dengan tikus putih DM. Hasil ini membuktikan bahwa perlakuan DM dengan penyuntikan aloksan dapat menurunkan persentase motilitas spermatozoa tikus putih.

Hasil ini sejalan dengan laporan beberapa penelitian sebelumnya yang menemukan adanya penurunan persentase motilitas spermatozoa yang bermakna pada penderita DM dibandingkan dengan kondisi normal.

Menurunnya persentase motilitas spermatozoa tikus putih pada kelompok perlakuan DM dengan penyuntikan aloksan disebabkan terjadinya peningkatan ROS dalam sirkulasi. Hasil ini sejalan dengan hasil penelitian yang dilaporkan oleh beberapa peneliti sebelumnya bahwa pemberian diet tinggi lemak dapat menyebabkan hiperlipidemia berperan penting dalam peningkatan produksi radikal bebas dan peroksidasi lipid yang berlebihan pada tingkat jaringan. Tingginya kadar radikal bebas dalam sirkulasi akan merusak membran sel spermatozoa (akrosom) dan menyebabkan gangguan gerak spermatozoa dan penurunan motilitas spermatozoa.⁵² Hiperglikemia punya pengaruh terhadap sel epitel germinal dalam tubuli seminiferi testis, sehingga sel epitel germinal yang dihasilkan terganggu pertumbuhan dan perkembangannya. Terganggunya pertumbuhan dan perkembangan sel epitel germinal tersebut akhirnya akan menyebabkan spermatozoa yang dihasilkan belum masak, hal ini akan berpengaruh

terhadap energi yang dihasilkan yang kemudian menghasilkan motilitas yang kurang baik. Spermatozoa yang belum masak mempunyai mitokondria yang belum sempurna susunannya (tidak melingkar), sehingga tenaga yang dihasilkan bukan merupakan energi yang terotasi. Akibatnya energi yang dihasilkan tidak efisien untuk menggerakkan ekor. Di lain pihak pada keadaan hiperkolesterolemia terjadi penurunan aktivitas enzim 17-beta *hydroxysteroid dehydrogenase* serta menurunnya enzim antioksidan (SOD, *Catalase*, GSH, *glutathione peroxidase*), hal ini semakin mendukung terjadinya penurunan kualitas maupun motilitas spermatozoa. Pada penelitian lain juga dilaporkan, pada keadaan hiperkolesterolemia terjadi kelainan morfologi spermatozoa dikarenakan terjadinya gangguan pematangan dan gangguan pada proses sintesis hormon sehingga menyebabkan gangguan pada proses pembentukan spermatozoa. Adanya kelainan morfologi spermatozoa akan berpengaruh terhadap motilitas spermatozoa.^{16,22}

Rata-rata persentase morfologi normal spermatozoa tikus putih strain Wistar normal (KN) adalah $91,85 \pm 1,19\%$ mengalami penurunan pada perlakuan tikus DM (KP)

menjadi $82,94 \pm 2,56\%$. Hasil uji t terhadap persentase morfologi abnormal spermatozoa menunjukkan ada perbedaan yang nyata ($p=0,000$) antara kelompok tikus putih normal dibandingkan dengan tikus putih DM. Hasil ini membuktikan bahwa DM dapat menurunkan persentase morfologi normal spermatozoa tikus putih. Menurunnya persentase morfologi normal spermatozoa tikus putih pada kelompok perlakuan tikus putih DM (KP) disebabkan terjadinya peningkatan ROS dalam sirkulasi. Hasil ini sejalan dengan hasil penelitian yang dilaporkan oleh beberapa peneliti sebelumnya bahwa induksi aloksan dapat menyebabkan hiperglikemia yang secara klinis mirip seperti DM tipe 1, peningkatan produksi ROS dan peroksidasi lipid yang berlebihan pada tingkat jaringan. Tingginya kadar ROS dalam sirkulasi akan merusak membran sel spermatozoa dan menyebabkan gangguan penyempurnaan bentuk spermatozoa pada tahap spermiogenesis.^{22,31} Selain itu juga diakibatkan terjadi penurunan sekresi testosteron dari sel Leydig sehingga kadar testosteron dalam darah menjadi rendah yang selanjutnya akan menyebabkan proses spermiogenesis tidak berjalan optimal, yang pada akhirnya morfologi spermatozoa menjadi tidak sempurna.^{53,53,55,56}

Hubungan Kadar MDA dengan Kualitas Spermatozoa

Hasil analisis korelasi pearson menunjukkan adanya hubungan yang antara kadar MDA testis dengan jumlah spermatozoa, persentase motilitas dan morfologi normal spermatozoa tikus putih dengan nilai korelasi (r) secara berturut-turut adalah - 0,877; - 0,804 dan - 0,795. Hasil ini membuktikan bahwa terdapat hubungan antara kadar MDA testis dengan jumlah spermatozoa, persentase motilitas dan morfologi normal spermatozoa adalah kuat secara berturut-turut sebesar 87,70%; 80,40% dan 79,50%. Nilai negatif pada nilai korelasi (r) menunjukkan arah korelasi negatif yang berarti bahwa semakin rendah kadar MDA testis akan menyebabkan semakin meningkat jumlah spermatozoa, persentase motilitas dan morfologi normal spermatozoa. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa diabetes mellitus tipe 1 meningkatkan terjadinya peroksidasi lipid pada testis yang ditunjukkan dengan meningkatnya kadar MDA testis. Peningkatan kadar MDA testis menyebabkan gangguan proses spermatogenesis di tubulus seminiferus testis yang selanjutnya akan menurunkan jumlah spermatozoa, penurunan motilitas dan morfologi normal spermatozoa. Sebagaimana

dilaporkan oleh beberapa peneliti terdahulu bahwa MDA sebagai produk akhir dapat digunakan untuk mengetahui derajatkerusakan oksidatif yang disebabkan oleh peroksidasi lipid. Peroksidasi lipid hasil dari radikal bebas ini akan selalu membentuk reaksi berantai yang terus berlanjut sampai radikal bebas ini dihilangkan oleh radikal bebas lain dan oleh sistem antioksidan dari tubuh.⁵⁷ Malondialdehida umum digunakan sebagai biomarker biologis peroksidasi lipid dan menggambarkan derajat stres oksidatif pada jaringan termasuk testis⁵⁸. Diabetes melitus juga mempengaruhi fungsi reproduksi pria seperti terganggunya proses spermatogenesis.⁵⁹ Stres oksidatif yang terjadi pada diabetes melitus berkaitan erat dengan infertilitas karena memiliki pengaruh yang cukup besar terhadap disfungsi sperma. Sebanyak 40,88% pasien pria diabetes yang mengalami infertilitas, memiliki sperma dengan kadar ROS yang tinggi.⁶⁰ Kadar ROS berlebih mampu mempengaruhi kualitas dan fungsi sperma. Spermatozoa mudah terserang oleh induksi stres oksidatif karena dalam membran plasmanya banyak terkandung asam lemak tak jenuh rantai ganda. Stres oksidatif merusakintegritas DNA di inti spermatozoa, akan menginduksi terjadinya apoptosis sel spermatozoa. Apoptosis adalah

kematian sel spermatozoa terprogram dimana proses ini merupakan proses fisiologis yang ditentukan oleh perubahan morfologi dan biokimia sel spermatozoa. Proses ini diregulasi oleh faktor intrinsik dan ekstrinsik, dan dapat dirangsang oleh berbagai stimulus. Pada pria infertil ditemukan adanya peningkatan apoptosis sel spermatozoa, yang pada akhirnya menyebabkan menurunnya jumlah spermatozoa, motilitas spermatozoa serta menyebabkan perubahan morfologi spermatozoa.^{58,59,60,61} Maxwell dan Watson menyatakan bahwa plasma membran spermatozoa kaya asam lemak tak jenuh sehingga rentan terhadap kerusakan peroksidasi lipid. MDA merupakan hasil dari peroksidasi lipid oleh ROS.⁶² Pengukuran kadar MDA merupakan cara pengukuran aktivitas ROS secara tidak langsung, karena yang diukur adalah produk dari ROS. Peningkatan ROS menyebabkan terjadinya peroksidasi lipid, adanya peroksidasi lipid pada membran spermatozoa menghasilkan senyawa MDA. Dengan demikian kadar MDA yang tinggi menunjukkan terjadinya kerusakan membran spermatozoa. Keadaan ini diindikasikan dengan menurunnya jumlah spermatozoa yang dihasilkan. Hal ini sesuai dengan Helliwell dan Gutteridge, yang menyatakan bahwa semakin

tinggi kadar MDA semakin tinggi pula tingkat kerusakan sel yang disebabkan oleh stres oksidatif.^{44,57,58,59} Sejumlah penelitian telah menunjukkan bahwa lipidperoksidasi mempengaruhi jumlah, motilitas, morfologi spermatozoa.^{63,64} Colagar dkk. tahun 2009 menunjukkan bahwa kadar MDA dalam spermatozoa adalah secara signifikan terkait dengan jumlah spermatozoa immotil²⁰. Telah terbukti bahwa konsentrasi MDA dalam plasma seminal berkorelasi negatif dengan konsentrasi sperma, motilitas dan morfologi normal antara subur dan pria infertil.^{65,66,67} Beberapa penelitian lain juga menyatakan bahwa ROS menyerang integritas DNA dalam inti sperma dengan menyebabkan modifikasi dasar, untai DNA rusak dan chromatin cross-linking.^{68,69} Di sisi lain, kerusakan DNA akibat peningkatan kadar ROS yang berlebihan mempercepat proses apoptosis sel germinal, menyebabkan penurunan jumlah spermatozoa dan motilitas spermatozoa pria infertilitas^{70,71,72} Motilitas adalah sangat diperlukan untuk spermatozoa, seperti yang seharusnya perjalanan saluran reproduksi wanita untuk mencapai tempat pembuahan. Studi telah menemukan bahwa tingkat ROS berkorelasi dengan motilitas spermatozoa. Kerusakan peroxidative pada protein membran spermatozoa dan aksonemal

menyebabkan kerusakan permanen pada motilitas spermatozoa.⁷⁰ ROS yang berlebihan menyebabkan ATP berkurang dengan cepat mengakibatkan penurunan fosforilasi protein aksonemal dan menyebabkan kerusakan sementara motilitas.⁷¹ Peroksidasi lipid juga memiliki efek merusak status ultramorphological dari sel spermatozoa.^{71,72} Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa terdapat hubungan negatif antara peningkatan kadar MDA testis dengan kualitas spermatozoa tikus putih yang mengalami diabetes mellitus. Temuan ini sejalan dengan hasil beberapa penelitian lain, bahwa peningkatan kadar MDA testis berhubungan dengan tingginya persentase spermatozoa abnormal dan produksi ROS.^{20,68,73} Temuan ini menunjukkan bahwa stres oksidatif pada tikus putih diabetes terlibat dalam peningkatan kadar MDA testis dan penurunan kualitas spermatozoa. Ukuran kadar MDA testis bisa sebagai alat diagnostik yang berguna untuk estimasi penurunan kualitas spermatozoa pada penderita diabetes mellitus.

Kesimpulan

Berdasarkan hasil analisis dan pembahasan yang telah diuraikan oleh peneliti, dapat diambil kesimpulan bahwa terdapat hubungan yang kuat

antara kadar MDA testis dengan kualitas (jumlah, motilitas dan morfologi normal) spermatozoa tikus putih diabetes mellitus ($R = -0,877$; $-0,804$ dan $-0,795$). Semakin tinggi kadar MDA testis semakin rendah jumlah, persentase motilitas dan morfologi normal spermatozoa tikus putih diabetes.

Saran

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disampaikan bahwa perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui faktor-faktor lain yang dapat menentukan jumlah spermatozoa akibat DM, seperti aktivitas antioksidan endogen (SOD, Gpx, dan CAT) dalam serum.

Daftar Referensi

1. Soviana, E., Banundari, R., dan Nyoman, S. W. Pengaruh Suplementasi β -carotene Terhadap Kadar Glukosa Darah dan Kadar Malondialdehida pada Tikus *Sprague dawley* yang Diinduksi *Streptozotocin*. Jurnal Gizi Indonesia 2014;2(2): 41-46.
2. Enzlin P, Mathieu C, Van den Bruel A, Vanderschueren D, Demyttenaere K. Prevalence and Predictors of Sexual

- Dysfunction in Patients with Type 1 Diabettes . Belgium. Available from : URL :<http://www.care.diabetesjournals.org/cgi/content/full/26/2/409>; 2003.
3. Amaral, S., Oliveira, P. J., and Ramalho, J. Diabetes and the Impairment of Reproductive Function: Possible Role of Mitochondria and Reactive Oxygen Species. *Current Diabetes Reviews* 2008; 4(1): 46-54.
 4. PERKEMI. Konsensus Pengelolaan Diabetes Melitus Tipe 2 di Indonesia 2002. Semarang. 2002; p 6-7.
 5. Amaral, S., Moreno, A. J., Santos, M. S., Seica, R., and Santos, J. R. Effects of Hyperglycemia on Sperm and Testicular Cells of Goto-Kakizaki and Streptozotocin-Treated Rat Models for Diabetes. *Theriogenology* 2006; 66: 2056-2067.
 6. Kanter, M., Aktas, C., and Erboga, M. 2012. Protective Affects of Quercetin Against Apoptosis and Oxidative Stress in Streptozotocin-Induced Diabetic Rat Testis. *Food Chem Toxicol* 50: 719-725.
 7. Agarwal A, Cocuzza M, Abdelrazik H, Sharma RK. Oxidative stress measurement in patients with male or female factor infertility. *Handbook of Chemiluminescent Methods in Oxidative Stress Assessment*. 2008. p. 195-218.
 8. Maslachah, L., Sugihartuti, R., dan Kurniasanti, R. Hambatan Produksi Reactive Oxygen Species Radikal Superoksida (O₂⁻) oleh Antioksidan Vitamin E (α -Tocopherol) pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang Menerima Stressor Renjatan Listrik. *Media Kedokteran Hewan*. 2008; 24(1): 21-26.
 9. Darmawan H. 2007. Production of ROS and Its Effects on Mitochondrial and Nuclear DNA, Human Spermatozoa, and Sperm Function. *Medical Journal Indonesia.*; 16: 2.
 10. Noberasco G, Odetti P, Boeri D, Maiello M, Adezati L. Malondialdehyde (MDA) level in diabetic subjects. Relationship with blood glucose and glycosylated hemoglobin. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 1991;45(4):193-6.
 11. Siswonoto S. Hubungan Kadar Malondialdehid Plasma dengan Keluaran Klinis Stroke Iskemik Akut: Program Pasca Sarjana Universitas Diponegoro; 2008.

12. Ni K, Steger K, Yang H, Wang H, Hu K, Zhang T, et al. A comprehensive investigation of sperm DNA damage and oxidative stress injury in infertile patients with subclinical, normozoospermic, and astheno/oligozoospermic clinical varicocele. *Andrology*. 2016;4(5):816-24
13. Tavilani H, Doosti M, Saeidi H. Malondialdehyde levels in sperm and seminal plasma of asthenozoospermic and its relationship with semen parameters. *Clinica Chimica Acta*. 2005;356(1):199-203.
14. Jungwirth A, Giwercman A, Tournaye H, Diemer T, Kopa Z, Dohle G, et al. European Association of Urology guidelines on Male Infertility: the 2012 update. *European urology*. 2012;62(2):324-32.
15. Medicine PCotASfR. Diagnostic evaluation of the infertile male: a committee opinion. *Fertility and sterility*. 2012;98(2):294-301.
16. Agarwal A, Durairajanayagam D, Halabi J, Peng J, Vazquez-Levin M. Proteomics, oxidative stress and male infertility. *Reproductive biomedicine online*. 2014;29(1):32-58.
17. Benedetti S, Tagliamonte MC, Catalani S, Primiterra M, Canestrari F, De Stefani S, et al. Differences in blood and semen oxidative status in fertile and infertile men, and their relationship with sperm quality. *Reproductive biomedicine online*. 2012;25(3):300-6.
18. Bhutia Y, Ghosh A, Sherpa ML, Pal R, Mohanta PK. Serum malondialdehyde level: Surrogate stress marker in the Sikkimese diabetics. *Journal of Natural Science, Biology, and Medicine*. 2011;2(1):107-12.
19. Nakhjavani M, Esteghamati A, Nowroozi S, Asgarani F, Rashidi A, Khalilzadeh O. Type 2 diabetes mellitus duration: an independent predictor of serum malondialdehyde levels. *Singapore medical journal*. 2010;51(7):582-5.
20. Colagar AH, Pouramir M, Marzony ET, Jorsaraei SGA. Relationship between seminal malondialdehyde levels and sperm quality in fertile and infertile men. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2009;52(6):1387-92.
21. Akbar B. Tumbuhan dengan kandungan senyawa aktif yang berpotensi sebagai bahan antifertilitas. Adabia Press; 2013.

22. Guyton Arthur C, Hall JE. Buku Ajar Fisiologi Kedokteran, edisi 11. Jakarta: EGC; 2007.
23. Austin CR, Short RV. Reproduction in mammals: Cambridge University Press; 2005.
24. Group IRTD. Rat Sperm Morphological Assessment. 1st ed.2000. p. 1-15.
25. HIFERI, PERFITRI, IAUI, POGI. Konsensus penanganan infertilitas. Jakarta2013.
26. Cavallini G. Male Idiopathic (Oligo) ± (Asthen) ±(Terato)-Spermia. In: Cavallini G, Beretta G, editors. Clinical Management of Male Infertility. London: Springer; 2015. p. 79-85.
27. Coskun O, Ocakci Ayse, Bayraktaroglu T, and Kanter M. Exercise Training Prevents and Protects Streptozotocin-Induced Oxidative Stress and β-Cell Damage in Rat Pancreas. Departement of Medical Histology and Embryology. Turkey: Zonguldak Karaelmas University. 2004.
28. Coskun Z.M, Sacanc O, Karatugd A, Turka N, Refiye Yanardagc R, Bolkentd S and Bolkenta S. Regulation of oxidative stress and somatostatin, cholecystokinin, apelin gene expressions by ghrelin in stomach of newborn diabetic rats. ACTHIS,2013; 50697-50704.
29. Suparman, E. Kadar Lipid Peroksida pada Kehamilan Normotensi dan Preeklampasia. Majalah Obstetri & Ginekologi2012; 20: 65-71.
30. Suarsana IN, I.H. Utama, I.G. Agung dan A. Suartini. 2011. Pengaruh hiperglikemia dan vitamin E pada kadar malonaldehida dan enzim antioksidan intra sel jaringan pankreatikus. Majalah Kedokteran Bandung 43(2):72-6.
31. Aitken, R. J. and Roman, S. D. Antioxidant System andOxidative Stress in The Testes. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2008;1(1): 15-24.
32. Evans J.L, Goldfine I.D, Maddux B.A and Grodsky G.M. (2002): Oxidative stress and stress activated signaling pathways: A unifying hypothesis of type 2 diabetes. Endo. Rev., 23: 599-622.
33. Tang, W. H., Martin, K. A., and Hwa, J. Aldose Reductase,Oxidative Stress, and Diabetic Mellitus. Frontiers in Pharmacology: Experimental Pharmacology and Drug Discovery, 2012;Vol 3 Article 87.
34. Palmeira, C. M., Santos, D. L., Seica, R., Moreno, A. J., andSantos, M. S.

- Enhanced Mitochondrial Testicular Antioxidant Capacity in Goto-Kakizaki Diabetic Rats: Role of Coenzyme Q. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2001; 281: 1023–1028.
35. Kumar, V., Abdul, K. A., and Nelson, F. *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease* 7th Edition. Philadelphia:Elsevier Saunders. 2005.
36. Jyoti, A. and Anand, K. Chronic Treatment of Diabecon in The Regulation of Alloxan Induced Hyperglycemia and Oxidative Stress in Different Tissues of Adolescent Diabetic Rats. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 2014; 6(4): 83-87.
37. Radenkovic, M., Stojanovic, M., and Prostran, M. Experimental Diabetes Induced by Alloxan and Streptozotocin: The Current State of The Art. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 2016; 78: 13-31.
38. Rohilla, A. and Ali, S. Alloxan Induced Diabetes: Mechanisms and Effects. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences* 2012 ; 3(2): 819-823.
39. Szkudelski, T. The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pancreas. *Physiol Res* 2001; 50: 536-543.
40. Abdulgani, N dan Maharani, L. Potensi Regenerasi Sel Leydig dan Sel Spermatogenik pada Testis Mencit Mencit (*Mus musculus*) Hiperglikemik yang Diinduksi dengan Ekstrak Ikan Gabus (*Channa striata*). Tugas Akhir. Surabaya: ITS.2014.
41. Abdulgani, N., Trisnawati, I., Aunurohim, Hidayati, D., Aisyatusoffi, N., & Arifiyanto, A. Snakehead (*Channa striata*) Extracts Treatment towards Hyperglycemic Mice (*Mus musculus*) Blood Glucose Levels and Pancreatic Histology Structure. *Journal of Applied Environmental and Biological Sciences.* 2014;4(5): 1-6.
42. Setiawan, B dan Suhartono, E. Stress Oksidatif dan Peran Antioksidan pada Diabetes Melitus. *Majalah Kedokteran Indonesia.* 2005; Vol 55 No 2.
43. Grotto, D., Maria, L. S., Valentini, J., Paniz, C., and Garcia. Importance of The Lipid Peroxidation Biomarkers and Methodological Aspects For

- Malondialdehyde Quantification. *Quin Nova* 2009; 32(1): 169-174.
44. Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. *Free Radical in Biology and Medicine* 3rd ed. New York: Oxford University Press.1999.
45. Pasupathi, P. Glutathione, Glutathione-Dependent Enzymes and Antioxidant Status in Gastric Carcinoma Patients. *Journal of Applied Biomedicine*, 2009;7(2): 101-109.
46. Koksall, I. T., Usta, M., Orhan, I., Abbasoglu, S., Kadioglu, A. Potential Role of Reactive Oxygen Species on Testicular Pathology Associated With Infertility. *Asian J Androl* 2003; 5: 95-99.
47. Shayakhmetova, G. M., Bondarenko, L. B., and Kovalenko, V.M. Damage of Testicular Cell Macromolecules and Reproductive Capacity of Male Rats Following Co-Administration of Ethambutol, Rifampicin, Isoniazid Acid and Pyrazinamide. *Interdiscip Toxicol*, 2012;5(1): 9-14.
48. Idris M.H, Budin S.B, Osman M and Mohamed J. (2012): protective role of hibiscus sabdariffa calyx extract against streptozotocin induced sperm damage in diabetic rats. *EXCLI Journal*, 11:659-669.
49. Faranita, O.V. Kualitas Spermatozoa Pada Tikus Wistar Jantan Diabetes Melitus. *Skripsi*. Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro, Semarang. 2009.
50. Sherwood L. *Fisiologi Manusia dari Sel ke Sistem Edisi 2*. Jakarta: EGC;2001
51. Remzi Cevik, Ali Gur, Suat Acar, Kemal Nas and Ayegül Jale Sarac. (2004). Hypothalamic pituitary-gonadal axis hormones and cortisol in both menstrual phases of women with chronic fatigue syndrome and effect of depressive mood on these hormones. *BMC Musculoskelet. Disord*.5, 47-51.
52. Shofia, V., Aulanni'am, dan C. Mahdi. 2013, Studi Pemberian Ekstrak Rumput Laut *Co klat (Sargassum Prismaticum)* terhadap Kadar Malondialdehid dan Gambaran Histologi Jaringan Ginjal pada Tikus (*Rattus Norvegicus*) Diabetes Melitus Tipe 1. *Kimia Student Journal*. 1(1): 119-125
53. Glenn D, Braunstein MD. Testis. Dalam: Greenspan F.S, Strewler G.J. *Endokri*

- nologi dasar & klinik, ed. 4. Jakarta: EGC, 1995: 508-14
54. Matsumoto AM. The testis. In: Felig P, Frohman LA, editors. *Endocrinology & metabolism*, 4th ed. USA: The McGraw-Hill Companies Inc., 2001: 635-58.
55. Silva PFN, Gadella BM. Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology* 2006. 65: 958-978.
56. Salisbury, N. L. dan Van Demark. *Fisiologi dan Reproduksi Pada Sapi*. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta (Diterjemahkan oleh R. Djanuar). 1985.
57. Saxena, R. and Lal, A.M. Effect of Aging on Antioxidant Enzyme Status and Lipid Peroxidation. *Journal of The Indian Academy of Geriatrics*. 2006; Vol 2 No 2
58. Hendromartono, S. Peran radikal bebas terhadap komplikasi vaskuler. *Majalah Penyakit Dalam Udayana* 2000; 1: 89-92.
59. Ilyas, S., Ardinata, D., dan Meldawati. Pengaruh Ekstrak Buah *Morinda Citrifolia* Linn Terhadap Kualitas, Kuantitas Sperma Dan Kadar Malondialdehyde Testis Tikus Wistar Diabetes Mellitus. Tesis. Program Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran. Medan: Universitas Sumatera Utara. 2011
60. Sudoyo, A.W., Setiyohadi, B., Alwi, I., Simadibrata, M., dan Setiyati, K. S. *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam Jilid 3 Edisi 4*. Jakarta: Pusat Penerbitan Departemen Penyakit Dalam Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. 2007
61. Tremellen, K. Oxidative Stress and Male Infertility-A Clinical Perspective. *Human Reproduction Update*, 2008; 14(3): 243-258.
62. Maxwell, W.M. and Watson, P.F. Recent Progress in Preservation of Ram Semen. *Animal Reproduction Science*. 42. Elsevier. 1996
63. Hsieh, Y.Y.; Chang, C.C.; and Lin CS. Seminal malondialdehyde concentration but not glutathione Peroxidase activity is negatively correlated with seminal concentration and motility. *Int J Biol Sci.*, 2006, 2, 23-9.
64. Huang, Y.L.; Tseng, W.H.; Cheng, S.Y. and Lin, T.S. Trace elements and

- lipid peroxidation in human seminal plasma. *Biol Trace Elem Res.*,2000, 76, 207-15.
65. Zalata, A.A.; Ahmed, A.H.; Allamaneni, S.S.R.;Comhaire, F.H. and Agarwal, A. Relationship between acrosin activity of human spermatozoa andoxidative stress. *Asian J Androl.*, 2004; 6, 313-18.
66. Duru, N.K.; Morshedi, M. and Oehninger, S. Effects of hydrogen peroxide on DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa. *Fert andSteril.*, 2000; 74, 1200-207.
67. Aitken, R.J. and Baker, M.A. Oxidative stress,sperm survival and fertility control. *Mol and CellEndocrin.*, 2006; 250, 66-69.
68. Agarwal, A. and Prabakaran, S.A. Oxidative stress and antioxidants in male infertility: a difficult balance. *Iran J Rep Med.*, 2005; 3: 1-8.
69. Agarwal, A.; Saleh, R.A. and Bedaiwy, M.A. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fert and Steril.*, 2003; 79, 829-43.
70. Aitken, R.J. and Krausz, C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reprod.*, 2001; 22,497-606.
71. Aleksandra, K.; Slawomir, K. and Ewa, B.Values of malondialdehyde in human seminal plasma. *Progress in Med Res.*, 2004; 2, 1-10.
72. Zabludovsky, N.; Eltes, F.; Geva, E.; Berkovitz, E.;Amit, A.; Barak, Y.; Har-even, D. and Bartoov,B. Relationship between human sperm lipid peroxidation, comprehensive quality parameters and IV outcome. *Androl.*, 1999; 31, 91-8

Tabel 1. Rerata kadar MDA testis (nmol/mg) tikus putih (*Rattus norvegicus*) setelah perlakuan selama 60 hari

Perlakuan	Ulangan	Kadar MDA testis (nmol/mg)
Tikus Normal	16	3,55± 0,62
Tikus DM	16	5,35 ± 0,53

Tabel 2. Hasil uji *Shapiro-Wilk* kadar MDA testis

Kelompok	Ulangan	Mean	SD	P value
KN	16	3,55	0,62	0,626
KP	16	5,35	0,53	0,212

Ket : Nilai *p* dihitung menggunakan uji *Shapiro-Wilk* **p* > 0.05 (data terdistribusi normal)

Tabel 3. Hasil uji *Levene* MDA testis

<i>Levene Statistic</i>	df1	df2	<i>P value/Sig.</i>
0,351	1	30	0,558

Keterangan : Nilai *p* dihitung menggunakan uji *Levene* **p* > 0.05 (data tetap homogen)

Tabel 4. Hasil uji *t-independent* kadar MDA testistikus putih normal dan tikus putih Diabetes

Kelompok Perlakuan	n	Rata-rata Kadar MDA	SD	T	<i>p</i>
Tikus Normal	16	3,55	0,62	8,795	0,000
Tikus DM	16	5,35	0,53		

Tabel 5. Rata-rata (\pm SD) kualitas spermatozoa tikus putih strain Wistar normal (KN) dan tikus Diabetes Mellitus (KP)

Kelompok Perlakuan	Ulangan	Kualitas Spermatozoa		
		Jumlah spermatozoa (x 10^6 /ml)	Motilitas spermatozoa (%)	Morfologi Normal spermatozoa (%)
Tikus Normal	16	252,56 \pm 22,32	87,13 \pm 3,81	91,85 \pm 1,19
Tikus DM	16	168,25 \pm 17,52	58,56 \pm 4,37	82,94 \pm 2,56

Tabel 6. Hasil uji *Shapiro-Wilk* kualitas spermatozoa (jumlah, motilitas dan morfologi normal) tikus putih

Parameter	Kelompok	Ulangan	Mean	SD	P value
Jumlah Spermatozoa	KN	16	252,56	22,32	0,248
	KP	16	168,25	17,52	0,947
Motilitas Spermatozoa	KN	16	87,13	3,81	0,218
	KP	16	58,56	4,37	0,905
Morfologi normal spermatozoa	KN	16	91,85	1,19	0,470
	KP	16	82,94	2,56	0,095

Ket : Nilai *p* dihitung menggunakan uji *Shapiro-Wilk* **p* > 0.05 (data terdistribusi normal)

Tabel 7. Hasil uji *Levene* kualitas spermatozoa (jumlah, motilitas dan morfologi abanormal spermatozoa)

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Jumlah Spermatozoa	0,878	1	30	0,356
Motilitas Spermatozoa	0,174	1	30	0,679
Morfologi normal Spermatozoa	5,388	1	30	0,327

Keterangan : Nilai *p* dihitung menggunakan uji *Levene* **p* > 0.05 (data tetap homogen)

Tabel 8. Hasil uji *t-independent* kualitas (jumlah, persentase motilitas dan morfologi abnormal) spermatozoa tikus putih normal dan tikus putih Diabetes Mellitus tipe 1

Jumlah Spermatozoa					
Kelompok Perlakuan	N	Rata-rata	SD	T	<i>p</i>
Tikus Normal	16	252,56	22,32	11,886	0,000
Tikus DM	16	168,25	17,52		

Persentase Motilitas Spermatozoa					
Kelompok Perlakuan	N	Rata-rata	SD	T	<i>P</i>
Tikus Normal	16	87,13	3,81	19,716	0,000
Tikus DM	16	58,56	4,37		

Persentase Morfologi normal Spermatozoa

Kelompok Perlakuan	N	Rata-rata	SD	T	P
Tikus Normal	16	91,85	1,19	15,314	0,000
Tikus DM	16	82,94	2,56		

Tabel 9. Analisis Korelasi Pearson antara kadar MDA testis dengan jumlah, persentase motilitas dan morfologi normal spermatozoa tikus putih strain Wistar

		Jumlah	Motilitas	Morfologi	MDA
Jumlah Sperma	Pearson Correlation	1	-0,829**	-0,834**	-0,877**
	Sig. (2-tailed)		0,000	0,000	0,000
	N	32	32	32	32
Motilitas sperma	Pearson Correlation	-0,829**	1	-0,927**	-0,804**
	Sig. (2-tailed)	,000		0,000	0,000
	N	32	32	32	32
Morfologi normal sperma	Pearson Correlation	-0,834**	-0,927**	1	-0,795**
	Sig. (2-tailed)	0,000	0,000		0,000
	N	32	32	32	32
Kadar MDA testis	Pearson Correlation	-0,877**	-0,804**	-0,795**	1
	Sig. (2-tailed)	0,000	0,000	0,000	
	N	32	32	32	32