

PENGARUH PEMBERIAN *DARK CHOCOLATE* TERHADAP MOTILITAS SPERMATOZOA MENCIT *BALB/C* JANTAN YANG DIPAPAR ASAP ROKOK

Rahmawan Bagus Maheyasa¹, Eka Chandra Herlina²

¹Mahasiswa Program Studi S-1 Ilmu Kedokteran Umum, Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro

² Staf Pengajar Ilmu Biologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro
Jl. Prof. H. Soedarto, SH., Tembalang-Semarang 50275, Telp. 02476928010

ABSTRAK

Latar Belakang Asap rokok merupakan senyawa radikal bebas yang dapat menyebabkan keadaan patologis pada tubuh, salah satunya dapat memberikan gangguan pada motilitas spermatozoa. *Dark chocolate* adalah salah satu makanan yang sangat bermanfaat bagi kesehatan, kandungan flavonoidnya yang berfungsi sebagai antioksidan mampu menurunkan jumlah rantai radikal bebas pada oksidasi lipid.

Tujuan Membuktikan pemberian *dark chocolate* dengan dosis bertingkat dapat mempengaruhi motilitas spermatozoa pada mencit *balb/c* jantan yang dipapar asap rokok.

Metode Penelitian ini menggunakan *post test only control group design*. Jumlah sampel sebanyak 40 mencit *Balb/c* jantan yang dibagi menjadi 5 kelompok. Kelompok K(-) adalah kelompok tanpa perlakuan. Kelompok K(+) hanya diberi paparan asap rokok. Kelompok P1 dipapar asap rokok dan diberi *dark chocolate* dosis 0,05 gram/hari. Kelompok P2 dipapar asap rokok dan diberi *dark chocolate* dosis 0,1 gram/hari. Kelompok P3 dipapar asap rokok dan diberi *dark chocolate* dosis 0,2 gram/hari. Perlakuan selama 28 hari, pada hari ke-29 semua mencit diterminasi dan diperiksa motilitas spermatozoanya.

Hasil Rerata motilitas spermatozoa adalah: Kelompok K(-)=46; Kelompok K(+)=8; Kelompok P1=46; Kelompok P2=48; Kelompok P3=50. Uji *Kruskal Wallis* didapatkan perbedaan yang bermakna antara kelima kelompok tersebut ($p=0,012$). Uji *Mann Whitney* didapatkan perbedaan bermakna antara K(-) dengan K(+), K(+) dengan P1, K(+) dengan P2, dan K(+) dengan P3.

Kesimpulan Pemberian *dark chocolate* menimbulkan pengaruh perbaikan motilitas spermatozoa pada mencit *balb/c* jantan yang dipapar asap rokok secara signifikan. Penggunaan dosis 0,05 gram/hari memberi hasil terbaik dalam meningkatkan dan memperbaiki motilitas spermatozoa.

Kata Kunci : asap rokok, *dark chocolate*, motilitas spermatozoa

ABSTRACT

THE EFFECT OF DARK CHOCOLATE ON SPERM MOTILITY OF MALE BALB/C MICE EXPOSED BY CIGARETTE SMOKE

Background Cigarette smoke contains free radicals which can cause pathologic changes in the body, including altering the motility of spermatozoa. Dark chocolate contains flavonoid which acts as an antioxidant, it can decrease free radical chains in lipid oxidation.

Aim To prove the effect of dark chocolate consumption in different dosages towards the sperm motility in *balb/c* male mice exposed by cigarette smoke.

Method This study used post test only control group design. The samples were 40 male *balb/c* mice which were divided into 5 groups. K(-) was the control group, while mice in group K(+) were exposed to cigarette smoke. Group P1 exposed by cigarette smoke and dark chocolate 0,05 grams/day. Group P2 exposed by cigarette smoke and dark chocolate 0,1

grams/day. Group P3 exposed by cigarette smoke and dark chocolate 0,2 grams/day. This experimental lasted for 28 days. On the 29th day, all mice were terminated and the sperm motility was examined.

Result The mean of sperm motility in each group were as follows: K(-)=46, K(-)=48, P1=46, P2=48, P3=50. Kruskal Wallis test showed significant difference sperm motility in all group ($p=0,012$). Mann Whitney test showed a significant difference between K(+) with K(-), K(+) with P1, K(+) with P2 also between K(+) with P3.

Conclusions Dark chocolate giving effect to the sperm motility balb/c mice with cigarette smoke exposure significantly. Dose 0,05 grams/day give the best effect in repair and increasing sperm motility.

Keywords : cigarette smoke, dark chocolate, sperm motility

PENDAHULUAN

Infertilitas adalah keadaan dimana tidak terjadi kehamilan minimal 12 bulan setelah senggama secara teratur tanpa kontrasepsi.¹ Menurut penelitian sebelumnya, terdapat 48,5 juta pasangan suami istri di dunia yang mempunyai masalah infertilitas.² Infertilitas dapat disebabkan oleh faktor perempuan, laki-laki maupun keduanya. Setidaknya, sebesar 30-40% dari infertilitas disebabkan oleh faktor laki-laki, sehingga pemeriksaan sperma pada laki-laki penting dilakukan.³

Menurut WHO tahun 2012, 21% jumlah penduduk dunia di atas umur 15 tahun adalah perokok.⁴ Indonesia merupakan negara ketiga dengan jumlah perokok terbesar di dunia setelah Cina dan India. Jumlah perokok di Indonesia kurang lebih adalah 48 juta jiwa, dengan masing-masing perokok menghisap 12,3 batang rokok setiap harinya.⁵ Telah diketahui dan dibuktikan dari penelitian-penelitian sebelumnya bahwa asap rokok dapat menyebabkan infertilitas, karena asap rokok merupakan senyawa radikal bebas, dimana radikal bebas dapat menyebabkan keadaan patologis pada tubuh seperti terganggunya proses spermatogenesis, motilitas spermatozoa, dan kualitas spermatozoa. Asap rokok merupakan stres oksidatif yang dapat menimbulkan kerusakan oksidatif jaringan dengan mekanisme kerja mengurangi konsentrasi antioksidan dan meningkatkan radikal bebas.⁶

Dark chocolate adalah salah satu makanan yang sangat bermanfaat bagi kesehatan. Telah diketahui bahwa *dark chocolate* juga merupakan salah satu antioksidan yang terkuat. *Dark chocolate* mengandung kaka dengan presentasi tinggi ($\pm 70\%$), dengan sedikit atau tanpa tambahan gula. Beberapa contoh manfaat dari *dark chocolate* antara lain menurunkan tekanan darah, menaikkan aliran darah, menaikkan HDL, menurunkan oksidasi LDL, menurunkan risiko penyakit jantung, melindungi kulit dari sinar ultraviolet, dan menaikkan fungsi otak. Selain mengandung banyak *cocoa*, di dalam *dark chocolate* juga terkandung

kalori yang lebih sedikit ketimbang *milk chocolate* karena kadar gulanya juga sedikit. Selain itu, juga terkandung senyawa tumbuhan yaitu flavonoid yang dapat memberikan efek sebagai antioksidan karena dapat menurunkan rantai radikal bebas pada oksidasi lipid.^{7,8}

Berdasarkan hal tersebut, peneliti tertarik untuk meneliti pengaruh pemberian *dark chocolate* terhadap motilitas spermatozoa mencit *balb/c* jantan yang dipapar asap rokok.

METODE

Penelitian eksperimental dengan desain penelitian “*post test only control group design*” yang dilakukan pada kelompok mencit *balb/c* jantan. Kriteria inklusi penelitian ini antara lain, mencit strain *balb/c* jantan, berat badan 25-30 gram, umur 6-8 minggu, tampak aktif selama masa adaptasi dan tidak terdapat kelainan anatomi. Kriteria eksklusi penelitian ini adalah mencit tidak aktif dan terdapat abnormalitas anatomi yang tampak.

Sampel dikelompokkan dengan *simple random sampling* ke dalam lima kelompok yaitu, kelompok K(-) yang tidak mendapat perlakuan apapun, kelompok K(+) yang hanya diberi paparan asap rokok, kelompok P1 dipapar asap rokok dan diberi *dark chocolate* dosis 0,05 gram/hari, kelompok P2 dipapar asap rokok dan diberi *dark chocolate* dosis 0,1 gram/hari, kelompok P3 dipapar asap rokok dan diberi *dark chocolate* dosis 0,2 gram/hari. Besar sampel ditentukan berdasarkan ketentuan WHO, yaitu minimal 5 ekor. Pada penelitian ini jumlah mencit *balb/c* jantan untuk setiap kelompok sebanyak 8 ekor, sehingga jumlah mencit *balb/c* jantan yang dibutuhkan adalah 40 ekor.

Variabel bebas penelitian ini adalah pemberian *dark chocolate* dosis bertingkat dan paparan asap rokok. Variabel terikat penelitian ini adalah motilitas spermatozoa mencit *balb/c* jantan.

Sebelum mendapat perlakuan, 40 ekor mencit *balb/c* diadaptasi dengan dikandangkan dan diberi ransum pakan standar dan minuman selama satu minggu. Setelah itu, 40 ekor mencit dibagi 5 kelompok yang masing-masing kelompok terdiri dari 8 ekor mencit yang ditentukan secara acak. Kemudian mencit diberi perlakuan berupa pemaparan asap rokok dengan menggunakan spuit tanpa jarum dengan frekuensi 1 batang per hari per kelompok dan pemberian *dark chocolate* dengan menggunakan sonde lambung selama 4 minggu sesuai dengan pembagian kelompok di atas. Pada hari ke-29 dilakukan pengambilan sperma mencit masing-masing 5 ekor di setiap kelompok. Kemudian dilakukan pembuatan preparat dilanjutkan dengan penilaian motilitas spermatozoa.

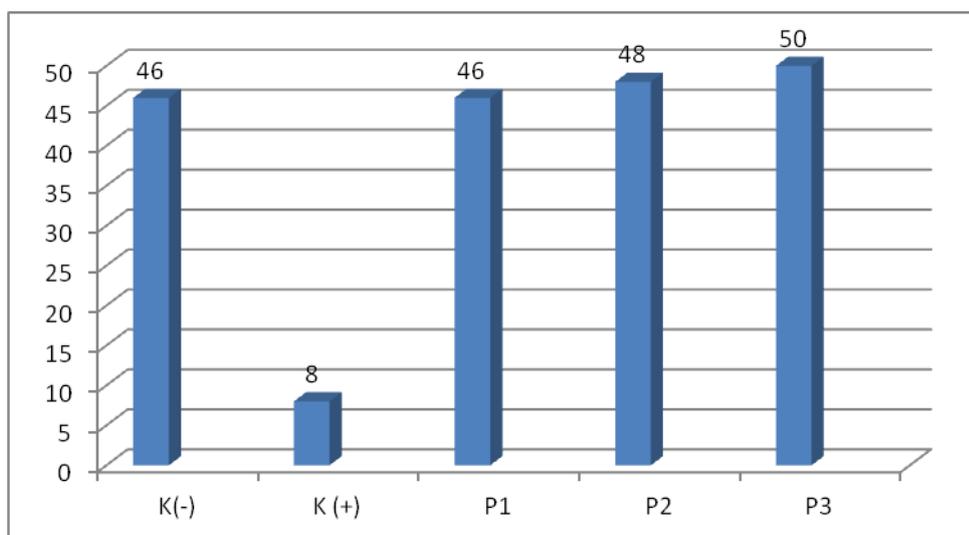
Data yang dikumpulkan adalah data primer hasil penelitian eksperimental laboratorik yaitu berupa persentase motilitas spermatozoa mencit *balb/c* jantan. Kemudian data tersebut diuji normalitasnya dengan uji *Saphiro-Wilk*. Jika distribusi data normal, uji hipotesa dilakukan dengan menggunakan statistic parametric *One Way ANOVA* dan dilanjutkan Uji *Post Hoc*. Jika distribusi data tidak normal, uji hipotesa dilakukan dengan menggunakan statistic non parametric, yaitu uji *Kruskal Wallis* dan dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney* untuk melihat perbedaan antar kelompok.

HASIL

Tabel 1. Persentase Motilitas Spermatozoa Mencit *Balb/c* Jantan Kriteria PR

Kelompok	N	Rerata	SD	Minimal	Maksimal
K(-)	5	46,00	5,48	40	50
K(+)	5	8,00	8,37	0	20
P1	5	46,00	8,94	40	60
P2	5	48,00	13,04	30	60
P3	5	50,00	7,07	40	60

Dari tabel di atas dan histogram di bawah menunjukkan bahwa pemberian *dark chocolate* dapat mempertahankan motilitas spermatozoa kelompok P1, P2, dan P3 dibandingkan dengan kelompok K(+). Paparan asap rokok sangat berpengaruh terhadap motilitas spermatozoa, dimana terlihat penurunan motilitas spermatozoa pada kelompok K(+) dibandingkan dengan kelompok K(-).



Gambar 1. Diagram Rerata Motilitas Spermatozoa Mencit Kriteria PR tiap Kelompok

Keterangan :

K (-) : Kontrol negatif

K (+) : Kontrol positif, mencit dengan paparan asap rokok

P1 : Mencit dengan paparan asap rokok + 0,05 gram dark chocolate

P2 : Mencit dengan paparan asap rokok + 0,1 gram dark chocolate

P3 : Mencit dengan paparan asap rokok + 0,2 gram dark chocolate

Tabel 2. Perbedaan antar Kelompok dengan Uji *Mann Whitney*

P	K(-)	K(+)	P1	P2	P3
K(-)	-	0,008*	0,817	0,661	0,339
K(+)	0,008*	-	0,008*	0,008*	0,008*
P1	0,817	0,008*	-	0,742	0,371
P2	0,661	0,008*	0,742	-	0,913
P3	0,339	0,008*	0,371	0,913	-

*Bermakna $p < 0,05$

Data motilitas spermatozoa diuji normalitasnya dengan uji *Shapiro-Wilk*. Hasilnya menunjukkan distribusi data yang tidak normal sehingga uji selanjutnya adalah uji *Kruskal Wallis*. Dari uji tersebut didapatkan perbedaan bermakna dalam hal motilitas spermatozoa pada semua kelompok ($p=0,012$). Pada tabel dapat diketahui bahwa terdapat perbedaan yang bermakna antara K(-) dengan K(+) ($p=0,008$), K(+) dengan P1 ($p=0,008$), K(+) dengan P2 ($p=0,008$), dan K(+) dengan P3 ($p=0,008$).

PEMBAHASAN

Asap rokok merupakan stres oksidatif pada tubuh manusia dengan mekanisme kerja mengurangi konsentrasi antioksidan dan meningkatkan radikal bebas. Radikal bebas akan bereaksi dengan protein, DNA, dan lemak sehingga mengakibatkan kerusakan lokal dan disfungsi organ tertentu.^{6,9} Paparan asap rokok pada penelitian ini mengandung lebih dari 1014 molekul radikal bebas yang menyebabkan adanya gangguan pada proses spermatogenesis sehingga dapat menurunkan motilitas spermatozoa. Hal ini terlihat pada penurunan motilitas spermatozoa pada kelompok kontrol positif [K(+)] atau kelompok yang hanya diberi perlakuan paparan asap rokok saja dibandingkan dengan kelompok kontrol negative [K(-)] yang tanpa perlakuan apapun. Hasil ini memperkuat penelitian-penelitian sebelumnya yang menunjukkan betapa buruknya efek asap rokok terhadap kualitas spermatozoa terutama motilitas spermatozoa. Radikal bebas yang berasal dari partikel gas

rokok juga dapat menyebabkan terjadinya aglutinasi sperma sehingga berakibat terhadap menurunnya motilitas sperma.¹⁰ Penelitian lain menyebutkan bahwa paparan asap rokok menyebabkan gangguan spermatogenesis pada mencit, yang sebagian disebabkan karena adanya induksi kerusakan DNA dan stres oksidatif. Dalam penelitian lain, telah dilaporkan bahwa asap rokok menginduksi peroksidasi lipid dan mengubah kadar enzim oksidatif pada testis tikus.¹¹

Perbaikan dan peningkatan motilitas spermatozoa dengan pemberian *dark chocolate* cukup beralasan. Dimana hasil tersebut menunjukkan bahwa kandungan flavonoid dalam *dark chocolate* yang dapat memberikan efek sebagai antioksidan dapat menurunkan rantai radikal bebas pada oksidasi lipid. Flavonoid bertindak sebagai antioksidan dengan langsung menetralkan radikal bebas, sebagai pengkelat logam (Fe^{2+} dan Cu^+), menghambat enzim yang bertanggung jawab untuk produksi ROS, melakukan proses *up-regulating* atau melindungi antioksidan pertahanan.¹² Senyawa polifenol pada kakao, terkandung dalam sel pigmen kotiledon. Penelitian ini menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan tertinggi terdapat pada *dark chocolate* murni dalam bentuk bubuk seperti yang digunakan dalam penelitian ini.¹³ Dari hasil penelitian ini menunjukkan kecocokan dan memperkuat penelitian-penelitian sebelumnya dimana antioksidan mampu mempertahankan motilitas spermatozoa dari paparan asap rokok karena kandungan flavonoidnya. Penelitian sebelumnya yang pernah dilakukan yaitu tentang pengaruh berbagai antioksidan lain seperti ekstrak daun cincau, vitamin C, ekstrak temu putih terhadap motilitas spermatozoa mencit yang dipapar asap rokok.^{6,14,15} Namun, hingga saat ini belum ada publikasi ilmiah ataupun literatur yang menunjukkan tentang pengaruh pemberian *dark chocolate* terhadap motilitas spermatozoa.

Secara statistik, kelompok P1 menunjukkan peningkatan motilitas spermatozoa yang signifikan dengan kelompok K(+) dengan $p = 0,008$. Hal ini menunjukkan bahwa dosis 0,05 gram merupakan dosis efektif, karena dalam dosis tersebut sudah bisa memperbaiki motilitas spermatozoa yang terpapar asap rokok. Sedangkan pada kelompok P2 menunjukkan peningkatan motilitas dibandingkan dengan P1, begitupun kelompok P3 menunjukkan peningkatan motilitas dibandingkan dengan P2. Namun secara statistik, hal tersebut tidak menunjukkan peningkatan yang signifikan. Hal ini menunjukkan bahwa dosis-dosis tersebut bukan merupakan dosis efektif, namun secara klinis masih bisa diberikan karena terjadi peningkatan motilitas spermatozoa yang sangat sedikit pada dosis tersebut. Jika dosis 0,05 gram *dark chocolate* merupakan dosis efektif dalam memperbaiki dan meningkatkan motilitas

spermatozoa mencit *balb/c* jantan dikonversikan pada manusia, maka dosis yang baik dikonsumsi pada manusia adalah 19,23 gram/hari.

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Pemberian *dark chocolate* menimbulkan pengaruh perbaikan motilitas spermatozoa pada mencit *balb/c* jantan yang dipapar asap rokok secara signifikan. Selain itu, penggunaan dosis *dark chocolate* 0,05 gram per hari memberi hasil efektif dalam memperbaiki dan meningkatkan motilitas spermatozoa. Dan terdapat penurunan motilitas spermatozoa secara signifikan pada mencit *balb/c* jantan yang hanya dipapar asap rokok.

Saran

Penelitian selanjutnya perlu dilakukan dengan interval dosis *dark chocolate* yang lebih panjang, bentuk sediaan *dark chocolate* yang lebih bervariasi misalnya dalam bentuk padat, dengan durasi perlakuan yang lebih lama, serta frekuensi paparan asap rokok yang lebih banyak sehingga bisa dilihat lebih lanjut seberapa besar efek *dark chocolate* terhadap motilitas spermatozoa.

DAFTAR PUSTAKA

1. World Health Organization. Infertility definitions and terminology [Internet]. [cited 2015 Dec 24]. Available from: <http://www.who.int/reproductivehealth/topics/infertility/definitions/en/>
2. World Health Organization. Global prevalence of infertility, infecundity and childlessness [Internet]. [cited 2015 Dec 14]. Available from: <http://www.who.int/reproductivehealth/topics/infertility/burden/en/>
3. Hestiantoro A, Wiweko B, Pratama G, Yusuf D. Konsensus Penanganan Infertilitas. 2013.
4. World Health Organization. Prevalence of Tobacco Use [Internet]. [cited 2016 Jan 29]. Available from: <http://www.who.int/gho/tobacco/use/en/>
5. Kemenkes RI. Perilaku Merokok Masyarakat Indonesia (Berdasarkan Riskesdas 2007 dan 2013). HTTS 31 Me. Jakarta: InfoDATIN (Pusat Data dan Informasi Kementerian Kesehatan RI); 2015.

6. Iswara RAF. Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Cyclea Barbata L.Miers terhadap Motilitas Spermatozoa Mencit Balb/c Jantan yang dipapar Asap Rokok. Universitas Diponegoro; 2010.
7. Sørensen LB, Astrup A. Eating dark and milk chocolate: a randomized crossover study of effects on appetite and energy intake. *Nutr Diabetes*. 2011;1(12):e21.
8. Gunnars K. 7 Proven Health Benefits of Dark Chocolate (No. 5 is Best) [Internet]. Authority Nutrition. 2015 [cited 2015 Dec 30]. Available from: <http://authoritynutrition.com/7-health-benefits-dark-chocolate/>
9. Arief S. Radikal Bebas. *Ilmu Kesehat Anak FK UNAIR/RSU Dr Soetomo*. 2007;1–9.
10. Agarwal A, Saleh R, Bedaiwy M. Role of Reactive Oxygen Species in the Pathophysiology of Human Reproduction. *Fertil Steril*. 2003;79:829–43.
11. Aprioku JS, Ugwu TC. Comparative Evaluation of the Impact of Subacute Exposure of Smokeless Tobacco and Tobacco Smoke on Rat Testis. *Int J Reprod Med*. Hindawi Publishing Corporation; 2015;
12. Ramiro-puig E, Castell M. Review Article Cocoa : antioxidant and immunomodulator *British Journal of Nutrition*. *Br J Nutr*. 2009;931–40.
13. Ibric A, Cavar S. Phenolic Cmpounds and Antioxidant Activity of Cocoa and Chocolate Products. *Bull Chem Technol Bosnia Herzegovina*. 2014;42:37–40.
14. Claudia V, Queljoe E De, Tendean L. PERBEDAAN KUALITAS SPERMATOZOA MENCIT JANTAN (MUS MUSCULUS L) YANG DIBERIKAN VITAMIN C. *J e-Biomedik*. 2013;1:629–34.
15. Ashfahani ED, Wiratmini NI, Sukmaningsih AASA. Motilitas Dan Viabilitas Spermatozoa Mencit (Mus musculus L.) Setelah Pemberian Ekstrak Temu Putih (Curcuma zedoaria (Berg.) Roscoe.). *J Biol*. 2007;(1):20–3.