



**PENGARUH PEMBERIAN VITAMIN C TERHADAP MOTILITAS SPERMATOZOA MENCIT
JANTAN STRAIN BALB/C YANG DIBERI PAPARAN ASAP ROKOK**

ARTIKEL KARYA TULIS ILMIAH

**Diajukan untuk memenuhi tugas dan melengkapi syarat dalam menempuh
Program Pendidikan Sarjana Fakultas Kedokteran**

Disusun oleh:

NAMA : ALINI HAFIZ

NIM : G2A002009

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS DIPONEGORO
SEMARANG
2006**

HALAMAN PENGESAHAN

Artikel Ilmiah

"PENGARUH PEMBERIAN VITAMIN C TERHADAP MOTILITAS SPERMATOZOA MENCIT

JANTAN STRAIN BALB/C YANG DIBERI PAPARAN ASAP ROKOK”

disusun oleh :

ALINI HAFIZ

G2A002009

Semarang, 7 Juli 2006

Pembimbing,

dr. Ahmad Zulfa Juniarto, M.Si, Med
NIP. 132 163 896

The effect of Vitamin C to Sperm Motility of Male Balb/C exposed by Cigarette Smoke
Alini Hafiz, Ahmad Zulfa Juniarto***

ABSTRACT

Background :

Free Radical in cigarette smoke can cause oxidative stress.¹ Latest research reported that oxidative stress is the main factor in resulting man infertility.^{1,2} Oxidative stress caused by excess production of ROS (Reactive Oxygen Species) which causes the increase of sperm agglutination and resulting the reduction of sperm motility. The production of ROS is greatly enhanced under the influence of various environmental and life style factors such as pollution and smoking.²

Vitamin C as antioxidant hold a important role as sperm protector from ROS. Hopefully, an adequate vitamin C treatment will overcome the oxidative stress which can caused man infertility. In this research, we used smoke as oxidants which resulting oxidative stress. The purpose of this research is to prove the effect of Vitamin C to sperm motility of male Balb/C exposed by Cigarette Smoke

Method :

The subjects of this research are 30 male Balb/C, which divided into 6 groups: Group K- (negative control) has no any treatment, neither vitamin C nor expose of cigarette smoke. Group K+ (positive control) is only exposed by cigarette smoke, without treatment of vitamin C. Group P1 exposed by cigarette smoke and treatment of vitamin C 0,01 mg/g bw, group P2 exposed by cigarette smoke and treatment of vitamin C 0,15 mg/g bw, group P3 exposed by cigarette smoke and treatment of vitamin C 0,2 mg/g bw, group P4 exposed by cigarette smoke and treatment of vitamin C 0,4 mg/g bw. Treatment is given in 14 days.

Result :

Kruskal wallis test shows that there is no any significant difference in sperm motility between groups. but in mann whitney test we found there is significant differences between group K- and K+ ($p=0.028$), between

group K+ and P1 ($p=0.016$) and between group K+ and P4 ($p=0.028$)

Conclusions:

Treatment of vitamin C with variant level in 14 days to male Balb/C –which exposed by cigarette smoke- doesn't shows any significant improvement in sperm count. But we found that is a significant reduction in amount of spermatozoa between K- group (which has no any treatment) and K+ group (which treated by expose of cigarette smoke).

keywords : vitamin C, spermatozoa motility, Cigarette smoke

* Student of Medical Faculty Diponegoro University, Semarang, Indonesia

** Lecturer of Biology's Departement Faculty of Medicine Diponegoro University, Semarang, Indonesia

Pengaruh Pemberian Vitamin C Terhadap Motilitas Spermatozoa Mencit Strain Balb/C Jantan Yang Diberi paparan asap rokok

Alini Hafiz*, Ahmad Zulfa Juniarto**

ABSTRAK :

Latar Belakang :

Radikal bebas yang terdapat pada asap rokok bisa menyebabkan timbulnya Stress oksidatif.¹ Riset melaporkan bahwa stress oksidatif (*Oxidative stress*) merupakan faktor utama penyebab infertilitas pada pria.^{1,2} Stress Oksidatif ini diakibatkan oleh adanya peningkatan ROS (*Reactive Oxygen Spesies*) yang akan mengakibatkan peningkatan kemungkinan terjadinya aglutinasi sperma yang akan menyebabkan turunnya motilitas dari sperma. Produksi ROS dapat meningkat pada pria dengan kebiasaan merokok dan pada lingkungan dengan polusi tinggi.²

Vitamin C sebagai antioksidan memegang peranan yang sangat penting sebagai protektor spermatozoa terhadap ROS. Pemberian vitamin C yang adekuat diharapkan dapat mengatasi stress oksidatif yang dapat menimbulkan infertilitas pria. Dalam hal ini peneliti menggunakan asap rokok sebagai oksidan yang dapat memicu terjadinya stress oksidatif. Tujuan dari penelitian ini adalah membuktikan apakah pemberian vitamin C dapat mempengaruhi motilitas spermatozoa mencit Balb/c jantan yang diberi paparan asap rokok.

Metodologi :

Subyek penelitian ini (hewan coba) adalah 30 mencit strain Balb/C jantan, yang dibagi secara acak menjadi enam kelompok: Kelompok K- (kontrol negatif) tidak mendapat perlakuan paparan asap rokok dan pemberian vitamin C, kelompok K+ hanya diberi paparan asap rokok tanpa pemberian vitamin C, kelompok P1 diberi paparan asap rokok dan vitamin C dosis 0,01 mg/g BB, kelompok P2 diberi paparan asap rokok dan vitamin C dosis 0,15 mg/g BB, kelompok P3 diberi paparan asap rokok dan vitamin C dosis 0,2 mg/g BB, kelompok P4 diberi paparan asap rokok dan vitamin C dosis 0,4 mg/g BB. Perlakuan diberikan selama 14 hari.

Hasil :

Uji *kruskal wallis* menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan signifikan pada jumlah sperma antara kelompok. Namun dalam test mann whitney ditemukan perbedaan yang signifikan antara kelompok kontrol negatif dan kontrol positif ($p=0.028$), antara kontrol negatif dan kelompok P1 ($p=0.016$), dan antara K+ dan P4 ($p=0.032$)

Kesimpulan :

Pemberian vitamin C dengan dosis bertingkat selama 14 hari pada mencit Balb/C yang diberi paparan asap rokok tidak menunjukkan peningkatan jumlah spermatozoa yang signifikan. Penurunan motilitas spermatozoa terlihat pada kelompok yang tidak diberi perlakuan dan kelompok yang diberi perlakuan pemaparan asap rokok.

Kata kunci : vitamin C, motilitas sperma, Asap rokok

* Mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, Semarang

** Dosen Pengajar bagian Biologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, Semarang

PENDAHULUAN

Infertilitas adalah momok paling menakutkan dalam kehidupan pasangan suami istri. Insiden infertilitas ini terjadi pada sekitar 15 persen pasangan. Faktor infertilitas pria diduga menyebabkan lebih dari 50% dari keseluruhan kasus. Masalah ini menunjukkan peningkatan dalam dekade terakhir ini. Observasi di beberapa negara menunjukkan gejala penurunan jumlah dan kualitas sperma yang cukup mencolok di antara pria dewasa.¹

Riwayat penyakit yang mungkin menyebabkan hal ini adalah infeksi saluran kemih, penyakit hubungan seksual dan penyakit sistemik. Faktor lain yang mungkin mempengaruhi fertilitas pria yang menonjol adalah merokok.²

Rokok berpengaruh kepada kualitas dan kuantitas sperma. Pada kasus kasus infertilitas, hasil analisis semen menunjukkan bahwa infertilitas banyak disebabkan oleh kelainan konsentrasi, disusul dengan kelainan morfologi dan motilitas dari sperma.³ Asap rokok yang dihirup seorang perokok aktif mengandung komponen gas dan partikel. Komponen gas yang sangat rentan menimbulkan radikal bebas terdiri dari karbon monoksida, karbon dioksida, oksida dari nitrogen dan senyawa hidrokarbon. Sedang komponen partikel terdiri dari tar, nikotin, benzopiren, fenol, dan cadmium. Komponen ini dibebaskan sebanyak 5×10^9 pp selama merokok.⁴

Penelitian yang terbaru lebih menyoroiti tentang peran radikal bebas dalam mengurangi fungsi sperma yang menyebabkan infertilitas. Walaupun radikal bebas terdapat secara fisiologis pada sperma manusia, namun jumlah yang berlebihan menyebabkan stress oksidatif pada sperma.⁵

Faktor gaya hidup yang buruk seperti merokok semakin membuat radikal bebas semakin berlebihan dalam tubuh. Sehingga perokok lebih rentan mengalami infertilitas disebabkan karena partikel partikel gas yang terdapat didalam rokok menyebabkan berlebuhnya produksi radikal bebas dalam sperma.¹

Mitokondria dan plasma adalah tempat produksi radikal bebas dalam tubuh. Proses produksi ini melibatkan kompleks enzim kreatinin kinase dan diaphorase. Radikal bebas menyebabkan kerusakan DNA dan akhirnya apoptosis sel sperma.⁶

Asupan antioksidan sangat dibutuhkan untuk menghindari dampak buruk dari radikal bebas. Vitamin C adalah antioksidan kuat yang larut dalam air. Vitamin C mampu mencapai cairan semen delapan kali lebih

efektif jika dibanding dengan aliran darah.⁷ Dibandingkan dengan bukan perokok, perokok membutuhkan asupan vitamin C dua kali lebih banyak. Sebab pria yang merokok lebih dari 20 batang perhari memiliki kadar vitamin C 40 persen lebih rendah di dalam tubuh. Mereka juga memiliki jumlah sperma 17 persen lebih sedikit dibanding bukan perokok, motilitas yang berkurang dan meningkatnya jumlah sperma yang bentuknya abnormal.⁸

Motilitas sperma yang berkurang ini diduga karena terjadinya aglutinasi sperma yang disebabkan oleh radikal bebas terutama berasal dari partikel gas rokok.¹

METODOLOGI PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik, dengan pendekatan *Post Test – Only Control Group Design* yang menggunakan binatang percobaan mencit sebagai subyek penelitian.

Vitamin C yang digunakan adalah Asam asorbat tablet yang dilarutkan. Dosis vitamin C yang diberikan pada mencit jantan strain *Balb/c* adalah 0,10 mg/gBB/hari; 0,15 mg/gBB/hari; 0,20 mg/gBB/hari; 0,40 mg/gBB/hari.

Rokok yang digunakan adalah rokok kretek SUKUN. Paparan asap rokok dilakukan sebanyak ½ batang setiap harinya selama 14 hari dengan menggunakan spuit 10 cc sebagai pompa. Kandang pemaparan asap rokok adalah kotak berukuran 30 x 22 x 19 cm yang telah diberi ventilasi secukupnya, setiap kandang diisi 4 ekor mencit pada saat pemaparan asap rokok.

Hewan coba dalam penelitian ini adalah mencit strain BALB/c sebanyak 30 ekor, dan 20 ekor cadangan yang diperoleh dari Pusat Antar Universitas (PAU) Universitas Airlangga, Surabaya. Sampel penelitian diambil secara acak dengan kriteria inklusi: mencit strain BALB/c, jantan, sehat, umur 8 – 12 minggu, berat badan 20 – 25 gram. Mencit terlebih dulu diadaptasikan selama satu minggu serta diberikan makan dan minum secara *ad libitum*. Semua mencit tersebut kemudian dibagi menjadi enam kelompok secara acak, masing – masing terdiri dari lima ekor mencit dengan perlakuan berbeda pada tiap kelompoknya. Kelompok K- (kontrol negatif) tidak mendapat perlakuan paparan asap rokok dan pemberian vitamin C, kelompok K+ hanya diberi paparan asap rokok tanpa pemberian vitamin C, kelompok P1 diberi paparan asap rokok dan vitamin C dosis 0,01 mg/g BB, kelompok P2 diberi paparan asap rokok dan vitamin C dosis 0,15 mg/g BB, kelompok P3 diberi paparan asap

rokok dan vitamin C dosis 0,2 mg/g BB, kelompok P4 diberi paparan asap rokok dan vitamin C dosis 0,4 mg/g BB. Perlakuan dilakukan selama 14 hari

Pada hari ke-15 mencit tersebut diterminasi, kemudian diambil sampel spermatozoa pada tiap-tiap kelompok untuk diperiksa motilitas spermatozoa. Sampel diambil dari epididimis yaitu tepatnya 1 cm dibawah caput epididimis. Ditempat tersebut di-klem, kemudian dipotong. Bagian yang dipotong tadi, dikeluarkan spermanya dengan cara dipencet, kemudian ditetesi NaCl 0,9% sebanyak 2 tetes, diaduk agar menjadi homogen sehingga memudahkan pemeriksaan. Sperma diletakkan diatas *objekglass*, ditutup dengan *deckglass* diperiksa dibawah mikroskop dengan lensa obyektif perbesaran 10x. Pengamatan dilakukan pada lima lapangan pandang dengan kriteria motilitas sebagai berikut:

A : Berjalan cepat dan lurus

B : Berjalan lambat

C : Bergerak ditempat

D : Tidak bergerak sama sekali

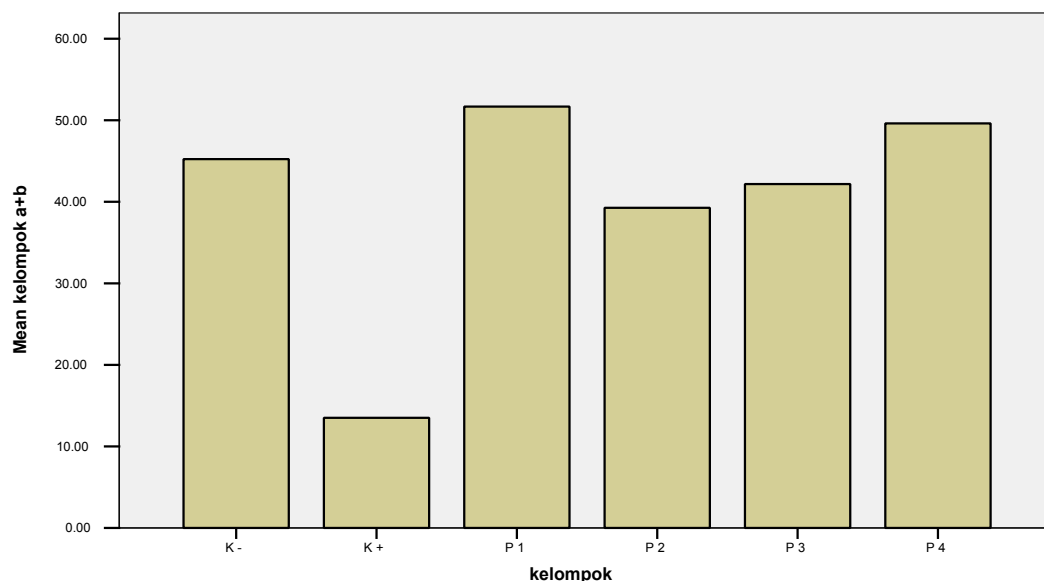
Data yang diambil adalah kriteria spermatozoa yang berjalan cepat lurus dan bergerak lambat (A+B). Analisis data menggunakan *SPSS 13.00 for Windows*, hasil penelitian dianggap signifikan bila $p < 0,05$. Analisis data dimulai dengan uji normalitas *Shapiro-Wilk*. Bila data terdistribusi normal dilanjutkan dengan uji parametrik *Oneway ANOVA*. Bila data terdistribusi tidak normal uji yang digunakan adalah uji non parametrik *Kruskall-Wallis*. Bila dari uji *Oneway ANOVA* data tersebut didapatkan hasil signifikan ($p < 0,05$), dilanjutkan dengan uji *Post Hoc*. Bila dari uji *Kruskall Wallis* data tersebut didapatkan hasil signifikan ($p < 0,05$), maka dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney*.

HASIL

Dari keseluruhan sampel penelitian didapatkan data jumlah dan motilitas sperma dengan deskripsi sebagai berikut :

Kelompok	Mean	Median	SD	p
K-	45.2340	54.9200	18.18239	0.036
K+	13.5040	9.5100	16.8933	0.166
P1	51.6760	45.000	12.31825	0.295
P2	39.2600	34.5600	30.55493	0.977

P3	42.1740	45.5500	23.45383	0.252
P4	49.6200	52.4200	14.10065	0.589



Dengan uji normalitas *Shapiro-Wilk* didapatkan data jumlah sperma terdistribusi normal, sehingga uji selanjutnya adalah uji *Oneway ANOVA*. Dari uji tersebut didapatkan bahwa tidak terdapat perbedaan bermakna dalam hal jumlah spermatozoa antara kelompok perlakuan. Untuk mengetahui beda antar kelompok dilanjutkan dengan uji *Posthoc*, dengan hasil sebagai berikut:

p	K-	K+	P1	P2	P3	P4
K-	-	0.028*	0.602	0.917	0.917	0.754
K+	0.028*	-	0.016*	0.209	0.076	0.028*
P1	0.032*	0.965	-	0.536	0.551	
P2	0.110	0.565	0.536	-	0.983	
P3	0.105	0.580	0.551	0.983	-	

* bermakna $p < 0,05$

Dari tabel di atas dapat diketahui bahwa perbedaan yang bermakna hanya terdapat antara kontrol negative (K-) dan kontrol positif ($p=0.035$), dan antara kontrol negative dan kelompok P1 ($p=0.032$). Sedangkan antar kelompok perlakuan tidak terdapat perbedaan yang bermakna.

PEMBAHASAN

Stress oksidatif adalah suatu kondisi dimana terjadi peningkatan kerusakan seluler yang disebabkan oleh *oxygen-derived oxidants* yang lebih dikenal sebagai ROS (*Reactive Oxygen Spesies*). Proses ini adalah hasil dari

ketidakseimbangan antara produksi dan eliminasi ROS, dimana terjadi peningkatan pembentukan ROS tanpa diimbangi oleh eliminasinya oleh antioksidan dalam tubuh. ²

Kerusakan oksidatif atau stress oksidatif dapat menyebabkan kerusakan DNA dan *cross-linking* protein.² Sebuah studi oleh Sun, *et al* (1997) menemukan adanya korelasi negatif diantara persentase kerusakan DNA spermatozoa dengan kemampuan fertilisasi. ⁷

Mitokondria memegang peranan penting dalam apoptosis. Peningkatan ROS dapat merusak membran mitokondria sehingga terjadi pelepasan protein sitokrom C yang akan menginduksi terjadinya apoptosis. Hal ini akan menyebabkan hilangnya fungsi potensial membran mitokondria sehingga akan terjadi kematian sel (apoptosis). ⁸ (gambar.1). Dalam sebuah studi ditunjukkan bahwa ada peningkatan sitokrom C pada semen laki-laki infertil, hal ini mengindikasikan terjadinya kerusakan oleh ROS. ⁹ (gambar.2)

Rokok (tembakau) mengandung sekitar 4000 zat yang sebagian besar diantaranya adalah oksigen reaktif atau nitrogen spesies. ¹⁰ Sebuah studi telah membuktikan adanya korelasi positif antara merokok dan kerusakan DNA. ¹⁰ Dalam studi lain juga ditemukan bahwa merokok dapat meningkatkan kadar ROS dan menurunkan antioksidan pada semen. ³ Hal tersebut dapat menimbulkan kerusakan DNA sperma yaitu terjadi fragmentasi DNA pada sperma. ⁴ Studi ini dibuktikan dengan peningkatan Kadar 8-OHdG (marker fragmentasi DNA) sebesar 50% pada pria perokok. ⁵ Selain itu pada pria perokok juga ditemukan mengalami penurunan jumlah sperma. ⁶ Dalam sebuah penelitian ditemukan bahwa tikus yang diberi paparan asap rokok kronik mengalami peningkatan kadar MDA serum sebesar (0,332±0,92) ug/dl walaupun tidak signifikan ($p>0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa adanya radikal bebas dalam jumlah banyak dalam tubuh akan mengalami reaksi yang menghasilkan senyawa toksik, diantaranya MDA. ¹¹

Vitamin C (ascorbic acid) telah banyak didokumentasikan sebagai antioksidan yang mempunyai kemampuan dalam memproteksi sel dari radikal bebas. Dalam sebuah penelitian, kemampuan proteksi ini telah dibuktikan secara *in vitro*. Variable yang dimonitoring adalah MDA (*malonaldehyde*). Pemberian vitamin C terbukti dapat menurunkan kadar MDA pada mencit yang diberi paparan asap rokok secara kronik. ¹² (Gambar.3)

Dalam penelitian ini, peneliti ingin membuktikan secara langsung pengaruh pemberian vitamin C terhadap mencit yang diberi paparan asap rokok.

KESIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan (hanya peningkatan kecil) antara kelompok mencit yang diberi paparan asap rokok dengan kelompok mencit yang diberi paparan asap rokok dan vitamin C (dosis bertingkat). Namun, perbedaan yang signifikan ditemukan dalam perbandingan motilitas spermatozoa mencit yang tidak diberi perlakuan dengan kelompok mencit yang diberi paparan asap rokok.

Dalam penelitian sebelumnya memang telah ditunjukkan bahwa pemberian vitamin C dapat meningkatkan MDA serum pada mencit yang diberi paparan asap rokok. Namun belum ada sumber yang secara jelas menjelaskan mengenai peranan vitamin C terhadap peningkatan motilitas spermatozoa mencit yang diberi paparan asap rokok. Hasil penelitian menunjukkan bahwa peranan vitamin C sebagai antioksidan belum cukup adekuat dalam meningkatkan motilitas spermatozoa mencit yang diberi paparan asap rokok, dalam penelitian ini peneliti mengambil kesimpulan:

1. Paparan asap rokok memberi pengaruh yang signifikan terhadap penurunan motilitas spermatozoa.
2. Pemberian vitamin C tidak berpengaruh signifikan terhadap peningkatan motilitas spermatozoa mencit jantan strain BALB/C yang diberi paparan asap rokok
3. Tidak terdapat perbedaan motilitas spermatozoa yang signifikan antar kelompok yang diberi paparan asap rokok dan vitamin C dosis bertingkat.

SARAN

1. Diharapkan dapat dilakukan penelitian lebih lanjut tentang pengaruh pemberian antioksidan lainnya terhadap kualitas spermatozoa.
2. Diharapkan dapat dilakukan penelitian lebih lanjut tentang pengaruh paparan asap rokok terhadap organ-organ lain selain organ reproduksi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Dalam kesempatan ini penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada dr. Ahmad Zulfa Juniarto, M.Si, Med selaku dosen pembimbing atas waktu, bimbingan dan bantuannya dalam keseluruhan pelaksanaan penelitian ini. Dan kepada seluruh pihak yang telah membantu penyusunan Karya Tulis Ilmiah ini dan

pelaksanaan penelitiannya.

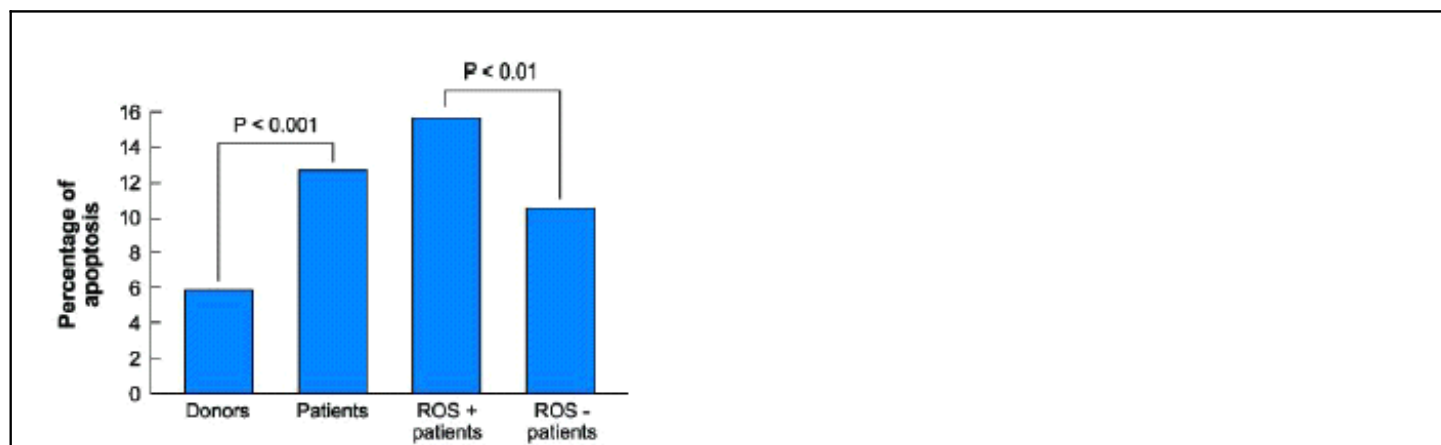
DAFTAR PUSTAKA

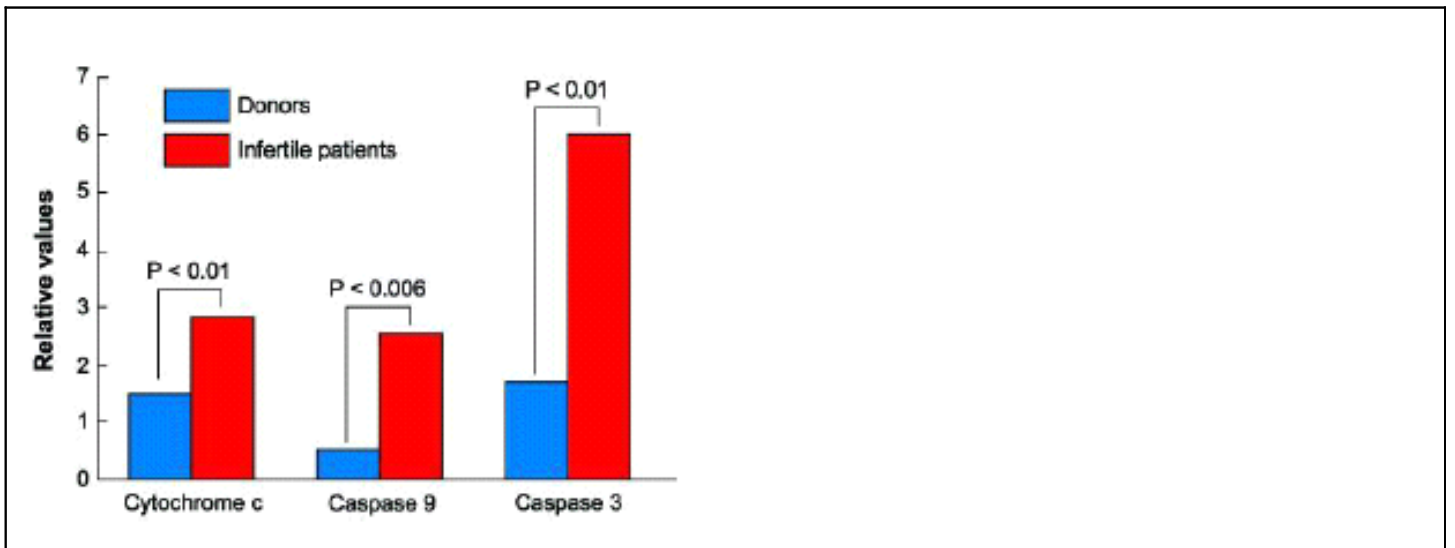
1. Ashok Agarwal, et al. Oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male infertility :a clinical approach. *BJU International*. 2005
2. Ashok Agarwal, et al. Oxidative stress and antioxidants in male infertility: a difficult balance. *Iranian Journal of Reproductive Medicine* Vol. 3, No.1 pp: 1-8. 2005
3. Saleh RA, Agarwal A, Nada EA, El-Tonsy MH, Sharma RK, Meyer A, et al. Negative effects of increased sperm DNA damage in relation to seminal oxidative stress in men with idiopathic and male factor infertility. *Fertil Steril* 2003; 79(3): 1597-1605
4. Zavos PM, Correa JR, Karagounis CS, Ahparaki A, Phoroglou C, Hicks CL, et al. An electron microscope study of the axonemal ultrastructure in human spermatozoa from male smokers and nonsmokers. *Fertil Steril* 1998; 69: 430-434
5. Fraga CG, Motchnik PA, Wyrobek AJ, Rempel DM, Ames BN. Smoking and low antioxidant levels increase oxidative damage to sperm DNA. *Mutat Res* 1996; 351:199-203
6. Vine MF, Tse CK, Hu P, Truong KY. Cigarette smoking and semen quality. *Fertil Steril* 1996; 65: 835-842
7. Sun JG, Jurisicova A, Casper RF. Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. *Biol Reprod* 1997;56: 602-607
8. Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, et al. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 1997;275: 1129-1132

9. Wang X, Sharma RK, Sikka SC, Thomas AJ Jr, Falcone T, Agarwal A. Oxidative stress is associated with increased apoptosis leading to spermatozoa DNA damage in patients with male factor infertility. *Fertil Steril* 2003b; 80: 531-535
10. Centola GM, Ginsburg KA, editor. Evaluation and treatment of the infertile male. Cambridge, Great Britain: Cambridge University Press;1996. p.22-6
11. Nanik S, et al. Pengaruh radikal bebas terhadap jumlah circulating endhotel pada darah tikus yang dipapar asap rokok kretek secara kronik. *Majalah Kedokteran Unibraw* Vol.XIV, No. 3 Desember 1998.
12. Aitken, R.J., and Clarkson, J.S. Significance of Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Defining the Efficacy of Sperm Preparation Techniques. *Journal of Andrology*, Nov/Dec 1988; 9(6): 367-376.

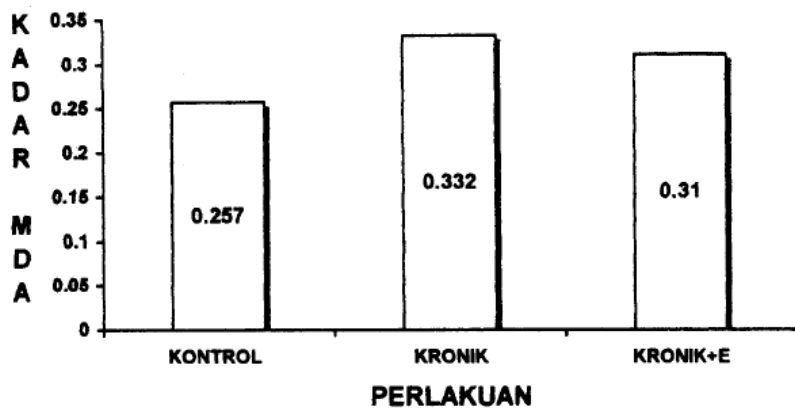
LAMPIRAN

Gambar. 1 Perbandingan persentase terjadinya apoptosis antara pasien infertil dengan donor sehat. Pada pasien pria infertil didapatkan ROS yang meningkat





Gambar 2. Jumlah sitokrom C, caspase 9, dan caspase 3 pada pasien pria infertil dan donor sehat.



Gambar 1. Kadar MDA Serum Dengan Dan Tanpa Vitamin E