



ARTIKEL KARYA TULIS ILMIAH

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

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

Disusun oleh:

**NAMA : DIANA ANGGRAINI
NIM : G2A002057**

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS DIPONEGORO
SEMARANG
2006**

HALAMAN PENGESAHAN

Telah disetujui oleh dosen pembimbing, artikel karya tulis ilmiah dari :

Nama : Diana Anggraini
NIM : G2A002057
Fakultas : Kedokteran
Universitas : Universitas Diponegoro
Tingkat : Program Pendidikan Sarjana
Bagian : Biologi
Judul : PENGARUH PEMBERIAN VITAMIN E TERHADAP MOTILITAS SPERMATOZOA
MENCIT JANTAN STRAIN BALB/C YANG DIBERI PAPARAN ASAP ROKOK
Pembimbing : dr. Ahmad Zulfa Juniarto, M.Si, Med

Diajukan untuk memenuhi tugas dan melengkapi syarat dalam menempuh program pendidikan sarjana.

Semarang, 7 Juli 2006

Pembimbing,

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

The effect of Vitamin E to Sperm Motility of Male Balb/C mice exposed by Cigarette Smoke
Diana Anggraini*, Ahmad Zulfa Juniarto**

ABSTRACT

Background: Cigarette smoke contains ± 4000 component such as alkaloid, nitrosamine, anorganic molecul, and ROS substance, that influence man infertility. Vitamin E as antioxidant estimated could protect sperm from ROS. The aim of this research is to prove the effect of vitamin E on sperm motility of male Balb/C exposed by cigarette smoke.

Method: This was an experimental study with a post test only control group design with 30 male Balb/C mice as a subject, which was divided into 6 groups: K- was not treated; K+ was exposed by cigarette smoke; P1; P2; P3; P4 were exposed by cigarette smoke and 0,02 mg/g bw; 0,04 mg/g bw; 0,06 mg/g bw; 0,12 mg/g bw vitamin E. Treatment is given in 14 days, at 15th day the mice was terminated, then the sperm motility was examined with straight quick move and slow move criteria and then analyzed with SPSS 13.00 Windows programm.

Result: The mean motility of sperm in the K- group was $45,23 \pm 18,18$; K+ was $13,50 \pm 16,89$; P1 was $48,19 \pm 23,61$; P2 was $31,40 \pm 31,00$ and $65,57 \pm 12,77$ at the P3 group, while the P4 was died. Kruskal-Wallis test between all groups, Mann-Whitney test among K- with K+, K+ with P1 and P3 were significantly different.

Conclusions : Vitamin E supplementation maintains sperm motility of male Balb/c mice exposed by cigarette smoke.

Keywords : vitamin E, sperm motility, cigarette smoke, male Balb/C mice

* Student of Faculty of Medicine Diponegoro University

** Lecturer of Biology Departement Faculty of Medicine Diponegoro University

Pengaruh Pemberian Vitamin E Terhadap Motilitas Spermatozoa Mencit Jantan Strain Balb/C Yang Diberi Paparan Asap Rokok

Diana Anggraini*, Ahmad Zulfa Juniarto**

ABSTRAK :

Latar Belakang: Asap rokok mengandung ± 4000 komponen seperti alkaloid, nitrosamine, molekul anorganik, dan substansi berupa SOR yang dapat mempengaruhi fertilitas pria. Vitamin E sebagai antioksidan diperkirakan dapat melindungi spermatozoa dari SOR. Tujuan penelitian ini adalah membuktikan pengaruh vitamin E terhadap motilitas spermatozoa mencit Balb/c jantan yang diberi paparan asap rokok.

Metodologi: Penelitian eksperimental laboratoris dengan pendekatan *post test only control group design*. Subyeknya adalah 30 ekor mencit jantan strain Balb/c yang dibagi secara acak menjadi enam kelompok. Kelompok: K- tidak mendapat perlakuan; K+ diberi paparan asap rokok; P1; P2; P3; P4 diberi paparan asap rokok dan vitamin E dosis 0,02 mg/g BB; 0,04 mg/g BB; 0,06 mg/g BB; 0,12 mg/g BB. Perlakuan berlangsung selama 14 hari, pada hari ke15 mencit diterminasi, kemudian dilakukan pemeriksaan motilitas spermatozoa dengan kriteria bergerak cepat lurus dan bergerak lambat yang diolah dengan program *SPSS 13.00 for Windows*.

Hasil: Rerata motilitas spermatozoa pada K- adalah $45,23 \pm 18,18$; K+: $13,50 \pm 16,89$; P1: $48,19 \pm 23,61$; P2: $31,40 \pm 31,00$ dan $65,57 \pm 12,7$ pada P3, sedangkan P4 sampel mati semua. Perbandingan pada semua kelompok dan antara dua kelompok (K- dengan K+, K+ dengan P1 dan P3) terdapat perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$).

Kesimpulan: Pemberian vitamin E dapat mempertahankan motilitas spermatozoa mencit jantan strain Balb/c yang diberi paparan asap rokok.

Kata kunci: vitamin E, motilitas spermatozoa, asap rokok, mencit jantan strain Balb/C

* Mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro

** Dosen Pengajar bagian Biologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro

PENDAHULUAN

Infertilitas adalah salah satu masalah utama pada pasangan yang sudah menikah. Diperkirakan sekitar 15% persen dari pasangan, mempunyai masalah infertilitas. Lima puluh persen berasal dari faktor pria, dan baru diketahui penyebabnya sekitar 25% nya.¹

Ada dugaan bahwa stress oksidatif, ketidakseimbangan antara radikal bebas dan antioksidan, adalah salah satu penyebab dari infertilitas.² Radikal bebas adalah beberapa komponen (derivat yang tidak penting dari oksigen) dimana oksigen berisi satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan. Yang sering dikenal spesies oksigen reaktif (SOR) yang mempunyai implikasi potensial terhadap reproduksi termasuk didalamnya anion superoksida (O_2^-), hidrogen peroksida (H_2O_2), radikal peroksil (ROO^\cdot), dan radikal hidroksil (OH^\cdot) Derivat nitrogen radikal bebas nitrit oksida (NO) dan anion peroksinitrit (ONOO) juga memberikan peranan penting dalam reproduksi dan fertilisasi.³ Stress oksidatif menyebabkan infertilitas melalui efek negatifnya ke spermatozoa seperti: peningkatan hilangnya motilitas, peningkatan kerusakan membran, penurunan morfologi, viabilitas, dan kemampuan spermatozoa.⁴

Rokok merupakan salah satu sumber utama radikal bebas yang berasal dari lingkungan, selain polusi udara, paparan bahan kimia, dan radikal ion. Diketahui bahwa asap rokok mengandung radikal bebas dalam jumlah yang sangat tinggi. Dalam satu kali hisap diperkirakan sebanyak 1014 molekul radikal bebas masuk ke dalam tubuh⁵. Sebuah studi menyatakan bahwa merokok meningkatkan SOR dan menurunkan antioksidan di seminal.⁶ Plasma seminal dari suami infertil mempunyai jumlah antioksidan yang lebih rendah daripada yang fertil, khususnya pasien yang motilitas spermanya rendah.⁷

Untuk melawan radikal bebas, sejak beberapa dasawarsa lalu sudah dikenal antioksidan. Menurut Cuppert (1997), antioksidan dinyatakan sebagai senyawa yang secara nyata dapat memperlambat oksidasi.⁸ Antioksidan sebagai pembuang radikal bebas melindungi spermatozoa melawan SOR. Beberapa antioksidan: superoksida dismutase (SOD), katalase, dan glutathion peroksidase (GPX). Selain itu, semen juga berisi antioksidan non enzimatik seperti vitamin C, vitamin E, piruvat, glutathion, dan karnitin.⁹

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 E yang digunakan adalah d-Alfa-Tocopherol yang merupakan bentuk paling poten . Satu tablet vitamin E yang mengandung 10 mg d-Alfa-Tokoferol dilarutkan dalam 5 ml aquadest, sehingga diberikan 0,2 cc pada dosis 0,02 mg/g BB; 0,4 cc pada dosis 0,04 mg/g BB; 0,6 cc pada dosis 0,06 mg/g BB; dan 1,2 cc pada dosis 0,12 mg/g BB.

Rokok yang digunakan adalah rokok kretek, karena rokok kretek mempunyai komponen yang lebih kompleks, kadar nikotin dan tar yang lebih dari 1,5 mg dan 20 mg dibanding rokok sigaret (rokok putih).¹⁰ Kandang pemaparan asap rokok adalah kotak berukuran 30x22x19 cm yang telah diberi ventilasi secukupnya. Pemaparan dilakukan dengan cara memasukkan 5 ekor tikus ke dalam kotak kemudian dipapar asap rokok sebanyak 1/2 batang per hari dengan menggunakan spuit 10 cc sebagai pompa rokok. Penelitian terdahulu menyebutkan dua ekor tikus dimasukkan ke dalam sangkar berukuran 26x12x12 cm dipapar 1 batang rokok per hari menggunakan *smoking pump*.

Hewan coba dalam penelitian ini adalah mencit strain Balb/C sebanyak 30 ekor, dan 20 ekor cadangan yang diperoleh dari Pusat Veterinaria Farma 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 E, kelompok K+ hanya diberi paparan asap rokok tanpa pemberian vitamin E, kelompok P1, P2, P3, dan P4 diberi paparan asap rokok dan vitamin E dosis 0,02 mg/g BB, kelompok P2 diberi paparan asap rokok dan vitamin E dosis 0,04 mg/g BB, kelompok P3 diberi paparan asap rokok dan vitamin E dosis 0,06 mg/g BB, kelompok P4 diberi paparan asap rokok dan vitamin E dosis 0,12 mg/g BB. Perlakuan dilakukan selama 14 hari. Pada hari ke15 mencit tersebut diterminasi, kemudian diambil sampel spermatozoa pada tiap–tiap kelompok untuk diperiksa motilitas spermatozoa. Pembuatan preparat dan pemeriksaan motilitas spermatozoa dilakukan di laboratorium Parasitologi FK UNDIP.

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 spermatozoa yang kualitasnya bagus yaitu dengan kriteria berjalan cepat lurus dan bergerak lambat (A+B). Analisis data menggunakan *SPSS 13.00 for Windows*,

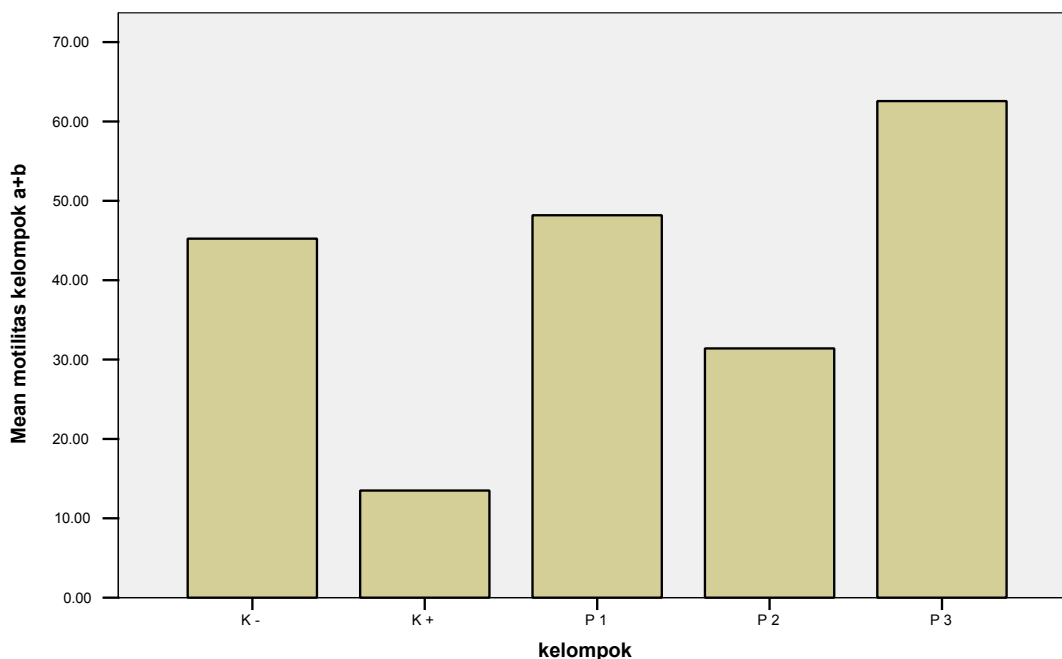
HASIL

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

Tabel 1. Deskripsi rerata motilitas spermatozoa kriteria A+B (%)

Kelompok	Mean	SD	Minimum	Maksimum
K-	45,23	18,18	14,34	57,15
K+	13,50	16,90	0,00	41,70
P1	48,19	23,61	13,89	73,50
P2	31,40	31,01	0,00	73,22
P3	65,57	12,77	43,56	76,64

Kelompok P4 tidak dapat diambil datanya karena semua sampel *drop out* (mati).



Histogram Rerata Motilitas Spermatozoa Tiap Kelompok

Dari tabel dan histogram diatas tampak pemberian vitamin E dapat mempertahankan motilitas spermatozoa (P1: $48,19 \pm 23,61$; P2: $31,40 \pm 31,01$; P3: $65,57 \pm 12,77$) dibandingkan kontrol positif ($13,50 \pm 16,90$); paparan asap rokok berpengaruh terhadap motilitas yang terlihat dari kelompok kontrol negatif dengan rerata motilitas adalah $45,23 \pm 18,18$ dan menurun pada kelompok kontrol positif yaitu $13,50 \pm 16,89$.

Dengan uji normalitas *Shapiro-Wilk* didapatkan data motilitas sperma tidak terdistribusi normal, sehingga uji selanjutnya adalah uji *Kruskal Wallis*. Dari uji tersebut didapatkan bahwa terdapat perbedaan bermakna dalam hal motilitas spermatozoa pada semua kelompok ($p < 0,05$).

Untuk mengetahui beda antar dua kelompok dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney*, dengan hasil sebagai berikut:

Tabel 2. Hasil uji *Mann-Whitney*

p	K-	K+	P1	P2	P3
K-	-	0.028*	0.917	0.347	0.076
K+	0.028*	-	0.028*	0.402	0,009*
P1	0.917	0.028*	-	0.347	0.295
P2	0.347	0.402	0.347	-	0.117
P3	0.076	0,009*	0.295	0.117	-

*bermakna $p < 0,05$

Dari tabel di atas dapat diketahui bahwa terdapat perbedaan yang bermakna terdapat antara kontrol

positif (K+) dengan kelompok P1 ($p=0,028$) dan kelompok P3 ($p=0,009$); dan kontrol negatif (K-) dengan kontrol positif ($p=0,028$).

PEMBAHASAN

Stress oksidatif adalah suatu kondisi yang berhubungan dengan peningkatan kerusakan seluler yang diinduksi oleh spesies oksigen reaktif (SOR).¹¹ Dalam rokok terdapat \pm 4000 komponen seperti alkaloid, nitrosamine, molekul anorganik, dan beberapa substansi berupa SOR. Komponen tersebut dapat mempengaruhi fertilitas pria. Dalam sebuah penelitian disebutkan adanya hubungan antara rokok dan fragmentasi DNA sperma seperti pada kerusakan axonema.¹²

Penelitian ini menunjukkan bahwa paparan asap rokok dapat mengakibatkan penurunan motilitas spermatozoa pada mencit jantan strain Balb/C. Hasil analisis data, secara statistik didapatkan motilitas spermatozoa mencit jantan strain Balb/C yang diberi paparan asap rokok lebih rendah secara bermakna dibandingkan dengan mencit jantan strain Balb/C tanpa perlakuan paparan asap rokok.

Motilitas spermatozoa yang turun disebabkan oleh kerusakan membran spermatozoa yang kaya lemak tak jenuh oleh SOR. SOR yang berasal dari asap rokok meningkatkan jumlah lipid peroksidase yang akan menyebabkan hilangnya ATP intraseluler. Hilangnya ATP ini mengakibatkan kerusakan aksonema (tubulus sentral tidak ada, mikrotubulus luar berkurang atau tidak ada sama sekali), menurunkan viabilitas, dan meningkatkan defek morfologi midpiece spermatozoa sehingga menurunkan kapasitas, reaksi akrosom, dan menghambat motilitas.¹³

Antioksidan digunakan sebagai pembuang radikal bebas yang akan melindungi spermatozoa. Antioksidan dapat dibagi menjadi beberapa golongan: (i) antioksidan enzimatis dan non enzimatis; (ii) antioksidan pencegah dan pemecah rantai; (iii) antioksidan eksogen dan endogen; dan (iv) antioksidan lipofilik dan hidrofilik. Contoh antioksidan enzimatis: superoksida dismutase (SOD), glutathion peroksidase (GSPx), dan katalase; antioksidan non enzimatis: vitamin C, vitamin E, dan β -karoten; antioksidan pencegah: SOD, GSPx, dan sistein; antioksidan pemutus rantai: vitamin E, vitamin C, dan β -karoten; antioksidan eksogen: vitamin E dan vitamin C; antioksidan endogen: SOD, GSPx; antioksidan lipofilik: vitamin E dan β -karoten; antioksidan hidrofilik: SOD, katalase, GSPx, dan vitamin C.^{14,15}

Vitamin E telah lama dikenal sebagai senyawa antioksidan. Beberapa penelitian menyebutkan bahwa vitamin E bisa membantu mencegah tersumbatnya arteri koronaria, kanker, mempercepat konduksi saraf,

mencegah katarak, menurunkan risiko arthritis, diabetes, infertilitas pria dan wanita.¹⁶

Vitamin E, terutama tokoferol bekerja sebagai antioksidan pemutus rantai (*chain-breaking anti-oxidants*) yang mencegah terjadinya tahap propagasi pada aktivitas radikal dengan cara kelompok hidroksil pada cincin kromanol bereaksi dengan radikal peroksil yang membentuk hidroperoksid dan tokoferoksil.¹⁴



Keterangan: ROO[·] : Radikal peroksil

AH : antioksidan

ROOH : hidroksiperoksid

A : tokoferoksil

Penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian vitamin E dapat mempertahankan motilitas spermatozoa setelah dipapar asap rokok sebagai oksidan.

Pemberian dosis tinggi vitamin E dapat berubah sifatnya menjadi prooksidan.¹⁷ Pada penelitian ini, kelompok P4 dengan dosis vitamin E 0,12 mg/g BB mengalami *drop out* (mati), hal ini terjadi karena dalam tubuh mencit terdapat oksidan dalam jumlah banyak yang berasal dari asap rokok dan vitamin E dosis berlebih. Reaksi kimianya sebagai berikut¹⁴:



Keterangan : ROO sebagai radikal peroksilipid

KESIMPULAN

1. Pemberian vitamin E dapat mempertahankan motilitas spermatozoa mencit jantan strain Balb/C yang diberi paparan asap rokok.
2. Paparan asap rokok menyebabkan penurunan motilitas spermatozoa.

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

Puji syukur kepada Allah SWT sehingga penelitian ini dapat terlaksana. Ucapan terima kasih saya sampaikan kepada dr. Ahmad Zulfa Juniarto, M.Si, Med atas bimbingan dan arahan selama penelitian ini berlangsung. Terima kasih kepada keluarga tercinta dan teman-teman atas motivasi dan do'anya, juga kepada kepala dan staf laboratorium Parasitologi FK Undip yang telah membantu terlaksananya penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Agarwal A, Prabakaran SA. Oxidative stress and antioksidants in male infertility: a difficult balance. *Iranian Journal of Reproductive Medicine* 2005; 3: 1
2. Dahlan MS, Tjokronegoro A. Oxidative stress and male infertility: pathophysiology and clinical implication. *Jurnal Kedokteran YARSI* 2002; 10(1): 50.
3. Sicca SC. Oxidative stress and role of antioksidants in normal and abnormal sperm function. *Frontiers in Bioscience* 1996; 1: 79
4. Twigg J, Fulton N, Gomez E, Irvine DT, Aitken RJ. Analysis of the impact of intracellular reactive oxygen species generation on structural and functional integrity of human spermatozoa: Lipid peroxidation, DNA fragmentation and effectiveness of antioxidants. *Human reproduction* 1998; 13: 1429-36.
5. Yuniwati Y, Mulyohadi A. Pengaruh paparan asap rokok kretek terhadap peroksidasi lemak dan system proteksi superoksid dismutase hepar tikus wistar. *Jurnal Kedokteran YARSI* 2004; 12: 89.
6. 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.
7. Lewis SEM, Boyle PM, Mc Kinnley KA, Young IS, Thompson W. *Fertility and sterility* 1995; 64: 868-70.
8. Trilaksani W. Antioksidan: jenis, sumber, mekanisme kerja dan peran terhadap kesehatan.[cited 2005 Des 5]. Available from: URL: <http://www.plasa.com>.
9. Agarwal A, Saleh RA. Role of oxidants in male infertility: rationale, significance, and treatment. *Urol Clin North Am* 2002; 29: 817-27.
10. Djamhuri A. Perbedaan gambaran histopatologik saluran nafas mencit pada pemberian asap rokok sigaret dan rokok kretek. *Majalah Farmakologi dan Terapi Indonesia* 1991; 18: 1-2.
11. Sikka SC, Rajasekaran M, Hellstrom WJ. Role of oxidative stress and antioxidants in male infertility. *J*

- Androl 1987; 16:464-8.
12. Sun JG, Jurisicova A, Casper RF. Detection of deoxiribonucleic in human sperm: corellation with fertilization in vitro. *Biol Reprod* 1997; 56: 602-7.
 13. Lamirande, Gagnon C. Reactive oxygen species and human spermatozoa. *J Androl* 1992; 13.
 14. Suryohudoyo P. Kapita selekta ilmu kedokteran molekuler. Jakarta: Infomedika 2000. h: 44-5.
 15. Widjaja S. Antioksidan: pertahanan tubuh terhadap efek oksidan dan radikal bebas. *Majalah Ilmiah Fakultas Kedokteran USAKTI* 1997; 16(1): 1666.
 16. Combs GF. *The vitamins: Fundamental aspects in nutrition and health*. San Diego: Academic Press; 1992.
 17. Widodo A. Seminar sehari free radikal update: Radikal bebas peranannya dalam pathogenesis penyakit dan penuaan. Malang: FKUB. 1996. h:10.