



PROPOSAL PENELITIAN KARYA TULIS ILMIAH

PENGARUH PEMBERIAN VITAMIN E

**TERHADAP PROSES SPERMATOGENESIS 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 : Siti Untari Subekti

NIM : G2A002160

FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS DIPONEGORO

SEMARANG

2006

*Pengaruh Pemberian Vitamin E Terhadap Spermatogenesis Mencit Jantan Strain Balb/c Yang Diberi
Paparasan Asap Rokok*

Siti Untari Subekti¹⁾, Achmad Zulfa Juniarto²⁾

ABSTRAK

Latar Belakang : Asap rokok mengandung radikal bebas dan menyebabkan pembentukan radikal bebas dalam tubuh manusia. Jumlah radikal bebas yang berlebihan akan menurunkan fertilitas pada pria. Suplementasi vitamin E dapat meningkatkan fertilitas pada pria

karena aktivitasnya sebagai antioksidan.

Tujuan : Membuktikan bahwa pemberian vitamin E dapat mempertahankan kualitas spermatogenesis mencit jantan strain Balb/c yang diberi paparan asap rokok.

Metode : Penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratorik dengan pendekatan *Post Test-Only Control Group Design* dengan mencit jantan strain Balb/c sebagai hewan coba sebanyak 30 ekor. Kemudian mencit dibagi menjadi enam kelompok secara acak. Kelompok pertama adalah kontrol negatif yang mendapat pakan standar selama 14 hari. Kelompok kedua adalah kontrol positif yang mendapat paparan asap rokok. Kelompok ketiga, keempat, kelima dan keenam adalah kelompok perlakuan yang mendapat paparan asap rokok dan vitamin E dengan dosis masing-masing 0,02 mg/gBB; 0,04 mg/gBB; 0,06 mg/gBB dan 0,12mg/gBB. Mencit diterminasi pada hari ke 15 dan testis diambil untuk dibuat preparat histopatologi. Preparat dinilai spermatogenesisnya dengan skor Johnson. Data diolah dengan *SPSS 13.00 for Windows*.

Hasil : Rerata skor spermatogenesis pada kelompok kontrol negatif adalah $8,80 \pm 4,00$; kontrol positif adalah $4,00 \pm 1,00$; kelompok ketiga $5,60 \pm 0,55$; kelompok keempat $6,60 \pm 0,55$ dan $7,80 \pm 0,45$ pada kelompok kelima. Semua sampel mati pada kelompok keenam.

Kesimpulan : Didapatkan perbedaan bermakna skor spermatogenesis pada mencit jantan strain Balb/c yang diberi paparan asap rokok dan suplementasi vitamin E dibanding dengan yang mendapatkan paparan asap rokok saja.

Kata kunci : Vitamin E, Spermatogenesis, Asap rokok, Mencit jantan strain Balb/c

- 1) Mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro
- 2) Staff Pengajar Bagian Biologi Fakultas Kedokteran Indonesia

The Effect of Vitamin E to Spermatogenesis of Balb/c Mice Exposed with Cigarette Smoke

Siti Untari Subekti¹⁾ , Achmad Zulfa Juniarto²⁾

Abstract

Background : *Cigarette smoke contains free radicals and cause free radical formation in human body. The excess of free radicals in the body will be decreased male fertility. Vitamin E supplementation increases male sexual performance and enhances male fertility for its antioxidant activities.*

Purpose : *To prove that vitamin E supplementation maintains quality of spermatogenesis of Balb/c mice exposed with cigarette smoke.*

Method : *The research is an experimental laboratory research with an approach of the post test-only control group design. The sample was 30 male strain Balb/c mice. Then mice was randomly divided into 6 groups. The first group was the negative control which feed with standart food. The second was positif control group which exposed with cigarette smoke. The third, fourth, fifth and sixth group was test group which exposed with cigarette smoke and given vitamin E supplementation with the dose 0,02 mg/gBW; 0,04 mg/gBW; 0,06 mg/gBW and 0,12mg/gBW. Then mice was killed in the 15th day and the testis were took to made a histopathological image, and grade based on the Johnson criteria. The data got was analyzed with SPSS 13.00 for Windows.*

Result : *The mean of spermatogenesis score in the negative control group was $8,80 \pm 4,00$; the positive control was $4,00 \pm 1,00$; third group was $5,60 \pm 0,55$; the fourth was $6,60 \pm 0,55$ and $7,80 \pm 0,45$ of the fifth group. The sample in sixth group were all died.*

Conclusion : *There is a significant differences of spermatogenesis score between Balb/c mice which exposed with cigarette smoke and vitamin E supplementation compare with those who doesn't get vitamin E supplementation.*

Key words: *vitamin E, spermatogenesis, cigarette smoke, male Balb/c mice*

- 1) *The Undergraduate Student Faculty of Medicine Diponegoro University*
- 2) *Lecturer in Biology Department Faculty of Medicine Diponegoro University*

PENDAHULUAN

Infertilitas didefinisikan sebagai tidak terjadinya kehamilan setelah satu tahun hubungan seksual tanpa alat kontrasepsi (WHO 1993). Problem ini terjadi pada kurang lebih 15% dari pasangan suami istri¹. Sekitar 40% dari kasus infertilitas disebabkan dari faktor pria¹. Infertilitas idiopatik, varicocele, dan infeksi merupakan penyebab paling umum kasus infertilitas². Bidang kesehatan reproduksi telah memfokuskan perhatian terhadap penelitian tentang *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang menjadi salah satu mediator terjadinya infertilitas dewasa ini. Produksi ROS akan meningkat dengan adanya pengaruh dari lingkungan dan faktor gaya hidup seperti polusi dan merokok³.

Rokok merupakan sumber utama radikal bebas yang berasal dari lingkungan, disamping polusi udara, paparan bahan kimia dan radiasi ion⁴. Diketahui bahwa asap rokok mengandung radikal bebas yang sangat tinggi. Dalam satu hisapan diperkirakan sebanyak 1014 molekul radikal bebas masuk ke dalam tubuh. Asap rokok juga dapat memicu terbentuknya radikal bebas dalam tubuh⁴.

Karena ROS mempunyai dua peran, fisiologis dan patologis, antioksidan dalam jumlah besar akan mempertahankan keadaan *steady state* ROS dalam cairan plasma semen. Antioksidan bertindak sebagai “pemangsa” radikal bebas untuk melindungi spermatozoa melawan ROS. Antioksidan–antioksidan tersebut adalah superoksida dismutase (SOD), katalase dan glutathion peroksidase (GPX). Semen juga mengandung berbagai antioksidan non-enzimatik, seperti vitamin C, vitamin E, piruvat, glutathion dan karnitin⁵.

Dalam beberapa studi *in vitro* sebelumnya disebutkan bahwa vitamin E merupakan antioksidan pemutus rantai yang utama dalam membran sperma dan efektivitasnya tergantung dari dosis⁶. Dalam *randomized double-blind controlled trial*, pasien asthenospermia mendapatkan vitamin E oral (300 mg/hari). Perlakuan ini menurunkan konsentrasi malondialdehid (marker untuk lipid peroksidase) dalam spermatozoa dan meningkatkan motilitas secara signifikan. Sebelas dari 52 pasien yang mendapat perlakuan (21%) berhasil membuahi⁷. Suplementasi vitamin E dan selenium dapat menurunkan konsentrasi MDA (malondialdehid) dan peningkatan motilitas sperma secara signifikan⁸.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik dengan pendekatan *post-test only control group design* yang menggunakan hewan coba sebagai subyek penelitian.

Pada penelitian ini digunakan mencit strain Balb/c yang diperoleh dari Pusat Veterinaria Farma (Pusvetma) Surabaya. Sampel penelitian diambil secara acak dengan kriteria inklusi : mencit strain Balb/c jantan, sehat, umur 8-12 minggu, berat badan 20-25 gram.

Sebanyak 30 ekor mencit jantan strain Balb/c diadaptasikan selama satu minggu serta diberi makan dan minum secara *ad libitum*, lalu dikelompokkan secara acak menjadi 6 kelompok, dengan jumlah sampel tiap kelompok 5 ekor mencit.

Kelompok pertama hanya mendapatkan makanan standar, kelompok kedua selain diberi makanan

standar juga diberi paparan asap rokok. Kelompok ketiga diberikan makanan standar, paparan asap rokok dan vitamin E dengan dosis 0,02 mg/gBB. Kelompok keempat, kelima dan keenam mendapat perlakuan sama dengan kelompok ketiga tetapi pemberian vitamin E dengan dosis 0,04 mg/gBB; 0,06 mg/gBB dan 0,12 mg/gBB. Perlakuan berlangsung selama 14 hari.

Pemaparan dengan asap rokok dilakukan satu kali sehari masing-masing sebanyak setengah batang. Lima ekor mencit dimasukkan ke dalam sangkar dengan ukuran 30x19x22cm. Setelah pemaparan tikus dikembalikan pada sangkar masing-masing secara berkelompok. Vitamin E yang diberikan adalah d-alfa tokoferol. Satu tablet vitamin E yang mengandung 10mg d-alfa tokoferol dilarutkan dalam 5ml aquadest.

Pada hari ke-15 mencit diterminasi, testisnya diambil untuk dibuat preparat di laboratorium histologi. Preparat tersebut diamati dengan mikroskop dan dinilai skor spermatogenesisnya dengan berdasarkan kriteria Johnson. Kriteria Johnson akan menilai secara kuantitatif elemen sel benih dan hubungan antara spermatogenesis dengan kepadatan spermatozoa pada cairan seminalis. Kriteria ini memiliki skor 1 sampai 10. Juga dinilai peningkatan massa tubulus seminiferus serta diameter tubulus seminiferus.⁹

Skor	Penilaian
10	Spermatogenesis yang lengkap serta tubulus seminiferus yang sempurna
9	Banyak terdapat spermatozoa tetapi tidak terdapat spermatogenesis yang lengkap
8	Hanya terdapat beberapa spermatozoa
7	Tidak terdapat spermatozoa tetapi terdapat banyak spermatid
6	Hanya terdapat beberapa spermatid
5	Tidak terdapat spermatozoa dan spermatid tetapi banyak terdapat spermatosit
4	Hanya terdapat beberapa spermatosit
3	Hanya terdapat spermatogonia
2	Tidak terdapat <i>germ cell</i>
1	Tidak terdapat <i>germ cell</i> dan sel sertoli

Data hasil penelitian diolah dan disajikan dalam bentuk tabel dan histogram. Data dianalisis normalitasnya dengan uji Saphiro-Wilk. Dari uji distribusi data tersebut didapatkan bahwa distribusi datanya tidak normal maka dilanjutkan dengan uji Kruskall-Wallis. Selanjutnya dilakukan uji Mann-Whitney untuk mengetahui beda antara dua kelompok. Analisis data menggunakan program *SPSS 13.00 for Windows*, dengan hasil penelitian dianggap signifikan bila $p < 0,05$.

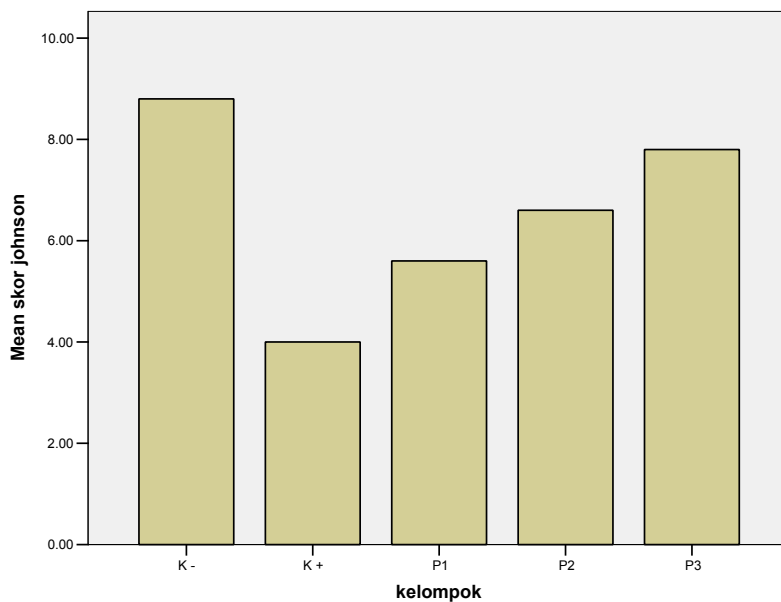
HASIL PENELITIAN

Hasil skoring preperat testis hewan coba dengan kriteria Johnson dapat dilihat pada lampiran.

Pengaruh pemberian vitamin E terhadap spermatogenesis mencit yang mendapatkan paparan asap rokok dapat dilihat pada tabel 1, tabel 2 dan gambar 1.

Tabel 1 Hasil analisis deskriptif masing-masing kelompok

Kelompok	N	Mean	SD	Min	Max
Kontrol -	5	8,80	0,45	8,00	9,00
Kontrol +	5	4,00	1,00	3,00	5,00
Vit. E 0,02 mg/gBB	5	5,60	0,55	5,00	6,00
Vit. E 0,04 mg/gBB	5	6,60	0,55	6,00	7,00
Vit. E 0,06 mg/gBB	5	7,80	0,45	7,00	8,00



Gambar 1 Histogram rerata skor spermatogenesis pada tiap kelompok

Nampak bahwa spermatogenesis menurun pada kelompok kontrol positif dibandingkan pada kelompok kontrol negatif. Pada kelompok kontrol negatif rerata skor spermatogenesis adalah $8,80 \pm 0,44$ dan menurun pada kelompok kontrol positif, dengan rerata $4,00 \pm 1,00$. Pada pemberian vitamin E pada mencit yang diberi paparan asap rokok meningkatkan rerata skor spermatogenesis sesuai dengan peningkatan besarnya dosis. Pada kelompok dengan pemberian vitamin E dosis 0,02 mg/gBB rerata adalah $5,60 \pm 0,55$; pada dosis 0,04 mg/gBB rerata adalah $6,60 \pm 0,55$ dan $7,80 \pm 0,45$ pada dosis 0,06 mg/gBB. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Kessopoullou dan Barrat (1997) yang dilakukan pada pria dengan penurunan infertilitas karena paparan asap rokok, terjadi peningkatan fertilitas dan penurunan kadar MDA (Malon Dialdehid).

Dari hasil analisis lanjutan dengan uji Mann-Whitney ditemukan perbedaan skor spermatogenesis yang bermakna ($p < 0,05$) antara kelompok kontrol negatif dengan kelompok kontrol positif, dan antara kelompok kontrol positif dengan kelompok perlakuan dengan pemberian vitamin E pada dosis 0,02 mg/gBB ; 0,04 mg/gBB dan 0,06 mg/gBB.

Tabel 2 Hasil uji analisis Mann-Whitney

P	Kontrol -	Kontrol +	P1	P2	P3
Kontrol -	-	0,007	0,006	0,006	0,015
Kontrol +	0,007	-	0,021	0,008	0,007
P1	0,006	0,021	-	0,031	0,006
P2	0,006	0,008	0,031	-	0,014
P3	0,015	0,007	0,006	0,014	-

Keterangan : berbeda bermakna jika $p < 0,05$

Pada kelompok enam tidak dapat dilakukan analisis data karena semua sampel pada kelompok ini mati.

PEMBAHASAN

Infertilitas dipengaruhi oleh banyak hal, antara lain yaitu karena penurunan produksi spermatozoa, hambatan penghantaran spermatozoa serta defisiensi testosteron.¹⁰

Spermatogenesis merupakan proses yang sangat kompleks dimana spermatogonia berkembang menjadi spermatozoa. Dalam spermatogenesis terdapat beberapa tahapan, yaitu spermatositogenesis, meiosis dan spermiogenesis.¹¹ Proses spermatogenesis berlangsung di dalam tubulus seminiferus testis. Selain itu testis juga memiliki peran menghasilkan hormon kelamin pria, proses ini terjadi di dalam sel-sel leydig.¹²

Pada penelitian sebelumnya telah diketahui bahwa pemaparan asap rokok menyebabkan peningkatan aktivitas radikal bebas yang akan mengakibatkan penurunan fertilitas pria.⁴ Dan dengan pemberian vitamin E pada pria yang mengalami penurunan infertilitas oleh karena peningkatan aktivitas radikal bebas pada paparan asap rokok, dapat memperbaiki fertilitasnya dan menurunkan kadar radikal bebas.¹³

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa mencit yang diberi paparan asap rokok dibandingkan dengan mencit kelompok kontrol negatif, memiliki proses spermatogenesis yang kurang lengkap. Dengan pemberian vitamin E, proses spermatogenesis lebih lengkap dibanding dengan kelompok yang diberi paparan asap rokok tanpa diberi vitamin E. Peningkatan kualitas spermatogenesis mencit menunjukkan hasil paling baik pada dosis vitamin E 0,06 mg/gBB.

Pada kelompok keenam tidak dapat dilakukan analisis data karena semua sampel pada kelompok tersebut mati. Hal ini mungkin disebabkan pemberian vitamin E dengan dosis yang terlalu besar. Jumlah antioksidan yang terlalu besar dalam tubuh mencit dapat menyebabkan terbentuknya prooksidan.

Penurunan spermatogenesis pada pemaparan asap rokok mungkin terjadi karena peningkatan aktivitas

radikal bebas dalam tubuh mencit yang akan memicu terjadinya stres oksidatif. Stres oksidatif mengakibatkan penurunan kualitas sperma melalui pembentukan lipid peroksida (LPO). LPO adalah oksidan utama dalam semen yang sangat reaktif.^{14,15} Proses peroksidasi lipid dapat dibagi menjadi 3 tahap, yaitu : (i) inisiasi ; (ii) propagasi ; dan (iii) terminasi. Terbentuknya oksidan yang reaktif dalam tubuh manusia akan dikontrol melalui mekanisme keseimbangan dengan antioksidan konsentrasi tinggi antagonisnya yaitu antioksidan. Antioksidan dibagi menjadi antioksidan enzimatik (superoksida dismutase, glutathion reduktase, dan katalase) dan antioksidan non-enzimatik (vitamin C dan vitamin E). Berdasarkan sumber-sumbernya antioksidan dibagi menjadi antioksidan endogen dan antioksidan eksogen.¹⁶ Diketahui bahwa asap rokok mengandung radikal bebas yang sangat banyak dan juga dapat memicu terbentuknya radikal bebas dalam tubuh.

Vitamin E dapat meningkatkan kualitas spermatogenesis pada mencit yang diberi paparan asap rokok, karena vitamin E mempunyai aktivitas sebagai antioksidan. Vitamin E adalah antioksidan pemutus rantai yang mencegah propagasi aktivitas radikal bebas. Aktivitas antioksidan vitamin E ditentukan oleh gugus hidroksil pada cincin kromanol. Gugus hidroksil akan bereaksi dengan radikal peroksil organik untuk membentuk senyawa hidroperoksida dan radikal tokoferoksil. Radikal tokoferoksil adalah bentuk prooksidan dari vitamin E dan akan kembali membentuk oksidan melalui reaksinya dengan antioksidan lain, seperti vitamin C dan glutathion.

KESIMPULAN

Pemberian suplementasi vitamin E dapat mempertahankan kualitas spermatogenesis mencit jantan yang diberi paparan asap rokok. Hasil terbaik ditunjukkan pada dosis 0,06 mg/g BB/ hari.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut bagaimanakah hasil klinis dan berapakah dosis efektif pada manusia.

UCAPAN TERIMA KASIH

Pada kesempatan ini penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada dr. Achmad Zulfa Juniarto, Msi.Med sebagai dosen pembimbing atas arahan selama penelitian ini, Kepala Bagian Histologi FK UNDIP beserta staf yang telah membantu dalam pembuatan preparat, Kepala Bagian Parasitologi FK UNDIP beserta staf yang telah membantu dalam pemeliharaan dan pengambilan sampel testis.

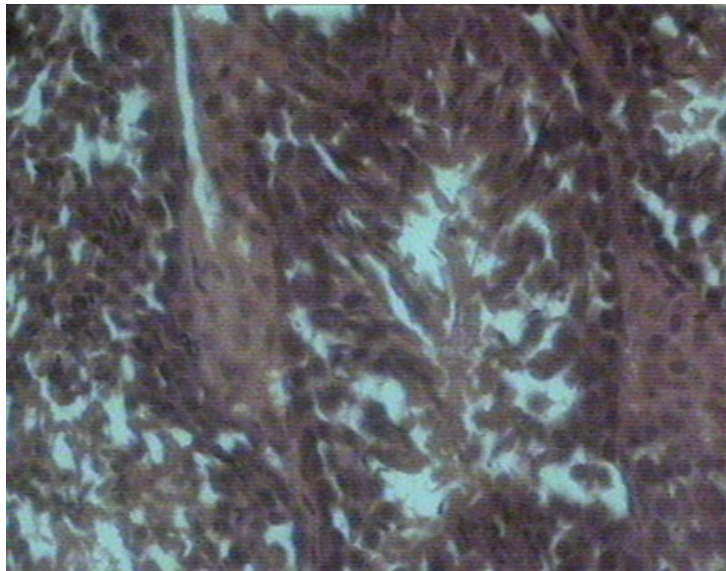
DAFTAR PUSTAKA

1. Chavins C. Infertility in Men, 1998 September. [Http://www.well-connected.com/](http://www.well-connected.com/)
2. Neischlag E, Leifke E 1997. Empirical therapies for idiopathic male infertility. In *Andrology : Male reproductive health and dysfunction*. Ed: Nieschlag E, Behre HM. Springer Berlin, 81-86.
3. Agarwal A 1999. Oxidative Stress in Male Infertility. Laboratory Research andrology/infertility. The Cleveland Clinic Foundation.
4. Yuneawati Y, Ali M 2004. Pengaruh paparan asap rokok kretek terhadap peroksidasi lemak dan system proteksi superoksida dismutase hepar tikus wistar. *Jurnal Kedokteran Yarsi*.
5. Dahlan MS, Tjokronegoro A 2002. Oxidative stress and male infertility : Pathophysiology and clinical implication. *Jurnal Kadokteran Yarsi*.
6. G.Huszar, & L. Vigue : Correlation between the level of lipid peroxidation and cellular maturity as measured by creatine kinase activity in human spermatozoa. *J Androl* 15. 71-77 (1994)
7. J.B. Ken: Functional cytology of the human testis. *Baillieres Clin Endocrin Metab* 6, 235-250 (1992)
8. W. Reichel: Lipofuscin pigment accumulation and distribution in various organisms as a function of age. *J Gerontol* 23, 145-153 (1968)
9. Juan Rosai, MD. *Ackerman's Surgical Pathology*. Eighth edition. Mosby Inc. St. Louis, Missouri : 1995. 1257
10. Shaban F.S, Male Infertility. <http://www.Urologychannel.com/maleinfertility/indexshtml>.
11. Granner D.K, *Hormon Gonad*. Dalam buku : *Biokimia Harper*, Edisi 24. Jakarta: EGC, 1999. 582 – 586
12. Klein E. A, *The Anatomy and Physiology of Normal Male Sexual Function*. Dalam buku : *Montaque D. K, editor. Disorder of*

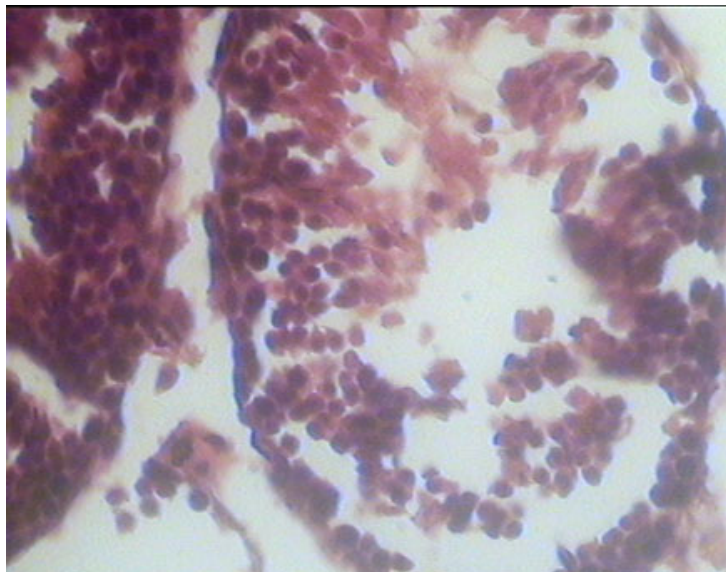
Male Sexual Function. Chicago : Yar Book Medical Publisher Inc, 1998. 2-6

13. Suleiman SA, Elamin M, Zaki ZMS, Malik EMA, Nasr MA. 1996. Lipid Peroxidation and Human Sperm Motility : Protective role of vitamin E. *Journal of Andrology*. Vol 17, no.5. 530-537
14. Alvarez JG, Storey BT 1997. Oxygen as ultimate spermicide : Implications for male infertility. *Oxidants and oxidative injury*. In Ochsendorf FR, Fuchs J (Eds). *Oxidative stress in male infertility*. Gardez, Verlag, St. Agustin.
15. Sikka S 1996. Oxidative stress and role of antioxidant in normal and abnormal sperm function. *Frontiers in bioscience* 1.
16. Fuchs J, Thiele J, Ochsendorf FR. 1997. Oxidants, antioxidants and oxidative injury. In Ochsendorf FR, Fuchs J (Eds). *Oxidative stress in male infertility*. Gardez, Verlag, St. Agustin.

LAMPIRAN 1

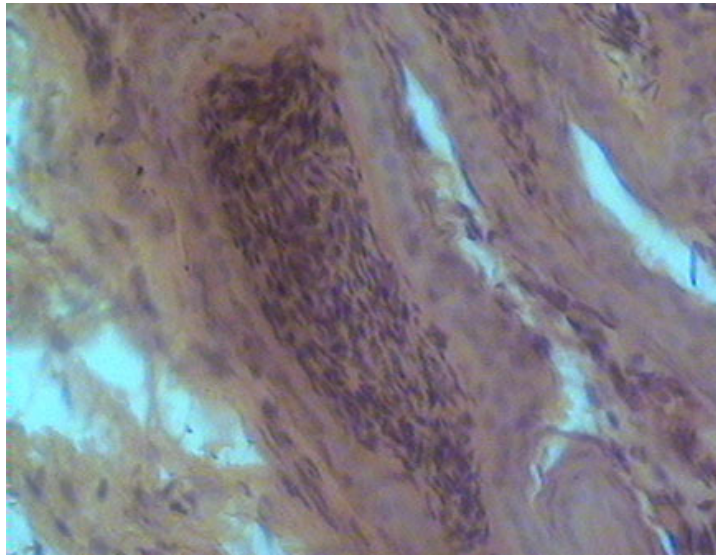


Gambar 1. Tubulus seminiferus pada kelompok kontrol

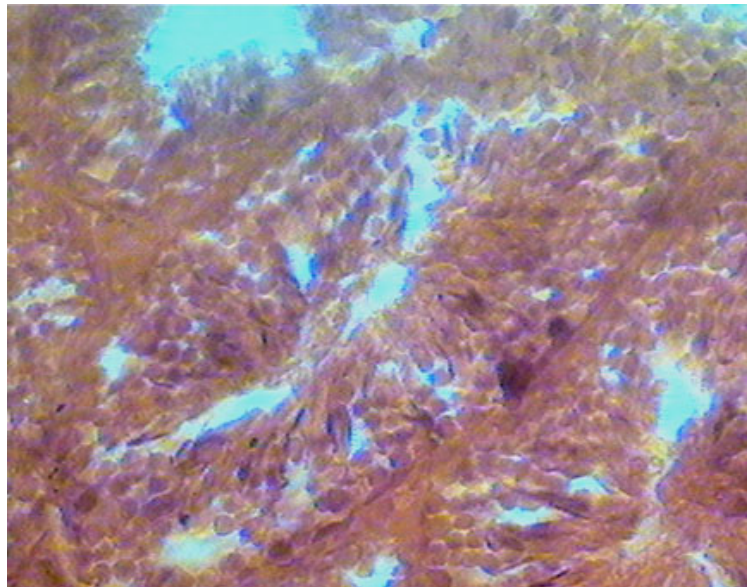


Gambar 2. Tubulus seminiferus pada kelompok dengan paparan asap rokok

LAMPIRAN 2

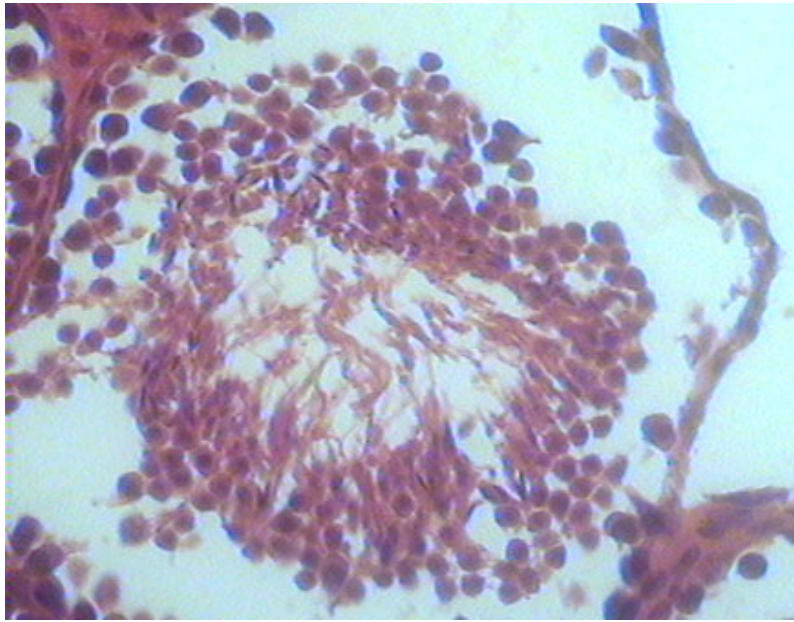


Gambar 3. Tubulus seminiferus pada kelompok vitamin C dosis 0,10 mg/g BB/hari

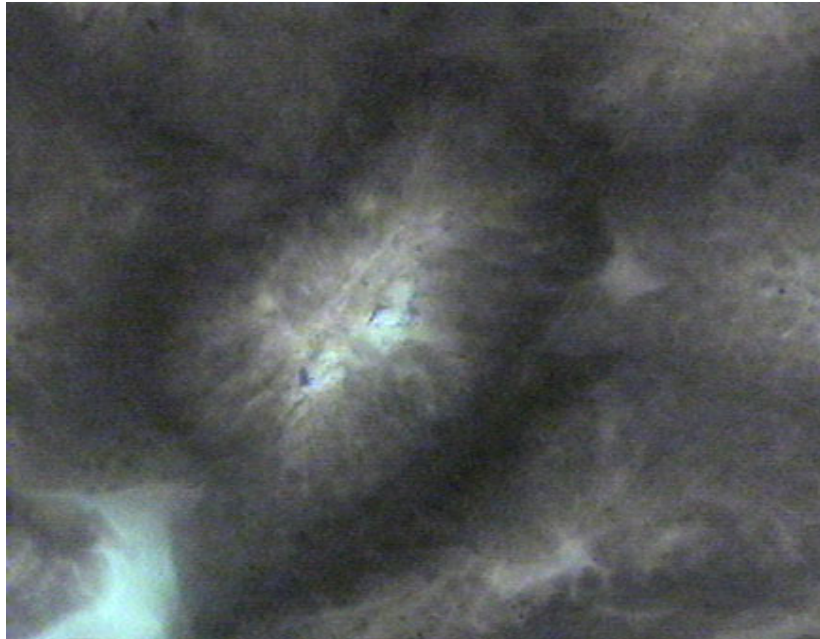


Gambar 4. Tubulus seminiferus pada kelompok vitamin C dosis 0,15 mg/g BB/hari

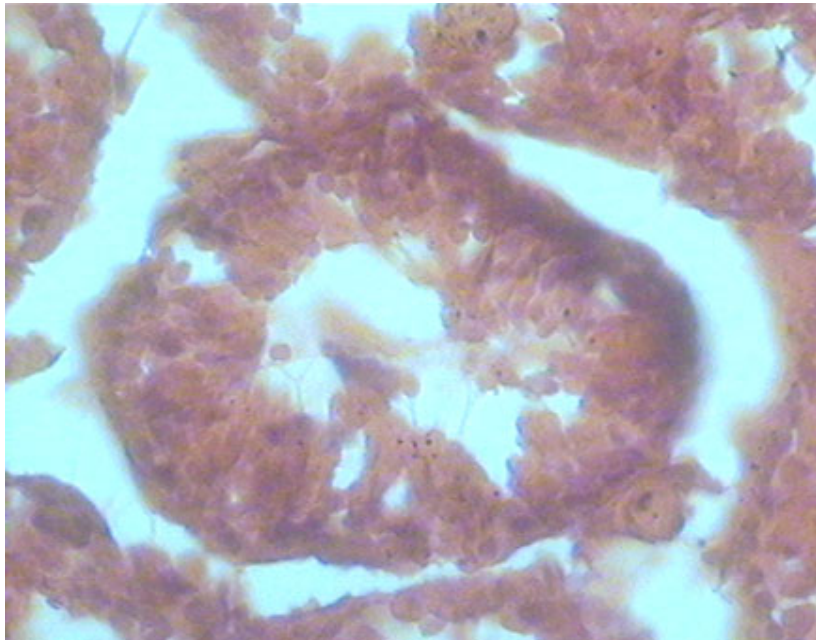
LAMPIRAN 3



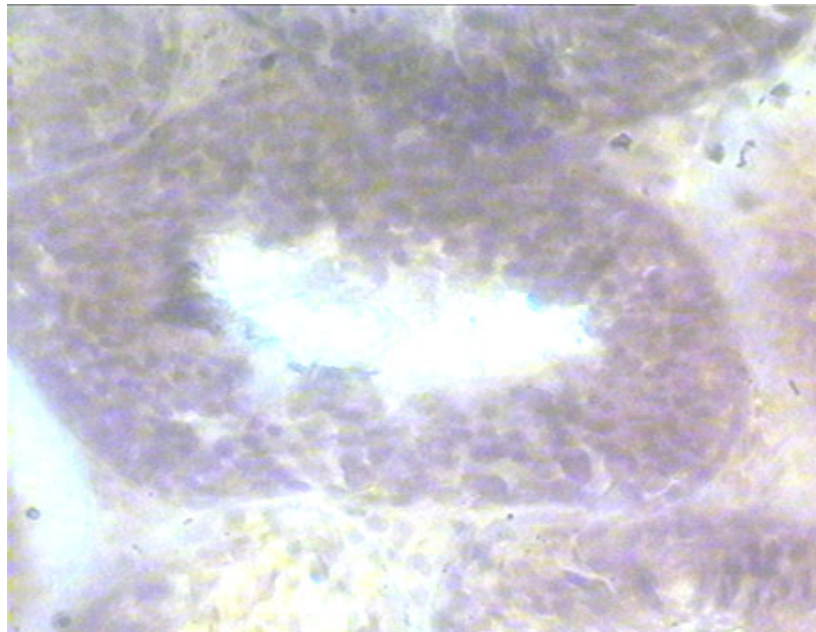
Gambar 5. Tubulus seminiferus pada kelompok vitamin C dosis 0,20 mg/g BB/hari



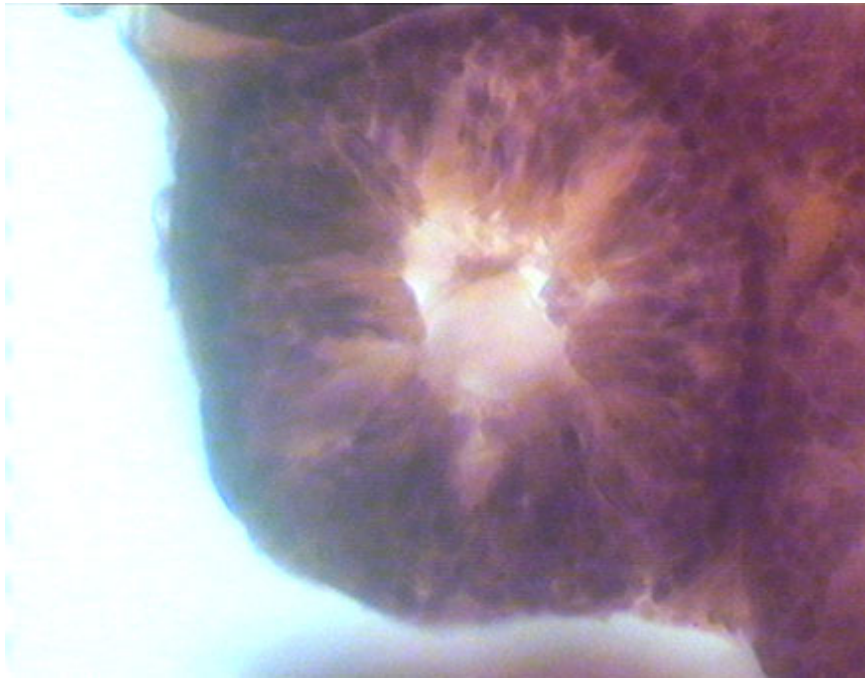
Gambar 6. Tubulus seminiferus pada kelompok vitamin C dosis 0,40 mg/g BB/Hari



Gambar 3. Tubulus seminiferus pada kelompok vitamin E dosis 0,02 mg/g BB/hari



Gambar 4. Tubulus seminiferus pada kelompok vitamin E dosis 0,04 mg/g BB/hari



Gambar 5. Tubulus seminiferus pada kelompok vitamin E dosis 0,06 mg/g BB/hari