

PERUBAHAN KUALITAS SPERMATOZOA DAN JUMLAH SEL-SEL SPERMATOGENIK TIKUS YANG TERPAPAR ASAP ROKOK

Changes in Sperm Quality and Amount Cells of Spermatogenic Rat that Exposed to Cigarette Smoke

Adrien Jems Akiles Unitly^{1,2}, Nastiti Kusumorini³, Srihadi Agungpriyono⁴, Aryani Sismin Satyaningtjas³, dan Arief Boediono⁵

¹Laboratorium Zoologi Program Studi Biologi

Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pattimura, Ambon

²Program Doktor Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor, Bogor

³Laboratorium Fisiologi Departemen Anatomi, Fisiologi dan Farmakologi
Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor, Bogor

⁴Laboratorium Anatomi Departemen Anatomi, Fisiologi dan Farmakologi
Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor, Bogor

⁵Laboratorium Embriologi Departemen Anatomi, Fisiologi dan Farmakologi
Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor, Bogor

E-mail: adebiologi@yahoo.co.id

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan mengetahui efek asap rokok terhadap perubahan kualitas spermatozoa dan jumlah sel-sel spermatogenik. Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan perlakuan asap rokok 10 batang/ekor/hari selama 2,5 jam dalam *smoking chamber* terhadap 24 ekor tikus jantan yang dibagi menjadi 4 kelompok, masing-masing 6 ekor dalam tiap kelompok. Kelompok P1 adalah kelompok yang tidak diberi perlakuan (kontrol), P2 adalah kelompok yang dipapar asap rokok selama 20 hari, P3 adalah kelompok yang dipapar asap rokok selama 40 hari, P4 adalah kelompok yang dipapar asap rokok selama 60 hari. Parameter yang diamati adalah kualitas spermatozoa dan jumlah sel-sel spermatogenik. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemaparan asap rokok dapat menurunkan konsentrasi spermatozoa dan viabilitas spermatozoa serta meningkatkan abnormalitas spermatozoa. Disimpulkan bahwa pemaparan asap rokok 10 batang/ekor/hari menyebabkan penurunan kualitas spermatozoa dan jumlah sel-sel spermatogenik yang tidak kembali ke kondisi normal setelah proses penyembuhan.

Kata kunci: asap rokok, spermatogenik, spermatozoa, testis

ABSTRACT

This research aimed to examine the effects of cigarette smoke on the changes of sperm quality and spermatogenic cells amount. This research used completely randomized design (CRD) with the treatment of exposed to cigarette smoke 10 cigarettes/rat/day for 2.5 hours in the smoking chamber containing 24 male rats divided into 4 groups, 6 rats each. P1 was untreated group, P2 was exposed to cigarette smoke for 20 days, P3 was exposed to cigarette smoke for 40 days, and P4 was exposed to cigarette smoke for 60 days. The parameters were sperm quality and spermatogenic cells amount. The results showed that the exposure of cigarettes smoke able to decrease the concentration and the viability of spermatozoa and increase spermatozoa abnormality as well. In conclusion, the exposure of cigarettes smoke 10 cigarettes/rat/day decrease sperm quality and spermatogenic cells amount which not return to normal conditions after recovery.

Key words: cigarette smoke, spermatogenic, spermatozoa, testes

PENDAHULUAN

Asap rokok merupakan aerosol heterogen dari pembakaran tembakau. Kandungan kimia tembakau yang sudah teridentifikasi jumlahnya mencapai 2.500 komponen, sedangkan dalam asap rokok telah teridentifikasi 4.800 macam komponen kimia yang dapat membahayakan kesehatan diantaranya tar, nikotin, gas karbon monoksida (CO), dan nitrogen oksida (NO) (Samsuri dan Murdiyati, 2010). Asap rokok dapat meningkatkan risiko infeksi termasuk perubahan struktural dalam saluran pernapasan dan penurunan respons imun (Arcavi dan Benewitz, 2004). Asap rokok mengeluarkan racun karsinogenik yang menyebabkan beraneka macam gangguan kesehatan seperti penyakit kardiovaskular, arteriosklerosis, tukak lambung, tukak usus, kanker, *chronic obstructive pulmonary disease* (COPD) (Susanna *et al.*, 2003). Beberapa penelitian mengenai dampak buruk dari asap rokok terhadap sistem reproduksi oleh Rajpurkar *et al.* (2000) menunjukkan bahwa pemaparan asap rokok

selama 15, 30, dan 45 hari menyebabkan rusaknya jaringan pada testis tikus sehingga dapat mengakibatkan spermatozoa menjadi abnormal. Pemaparan asap rokok 600 batang/15 ekor/10 minggu menurunkan jumlah sel-sel spermatogenik pada tikus (Ahmadnia *et al.*, 2007), dan pemaparan asap rokok selama 30 hari menyebabkan kerusakan pada tubulus seminiferus (Dewi, 2011). Asap rokok mengandung radikal bebas dalam jumlah yang sangat tinggi, yakni dalam satu kali hisapan rokok terdapat 1014 molekul radikal bebas (Baker, 2006). Radikal bebas yang terdapat dalam asap rokok menyebabkan kerusakan pada jaringan testis (Koskinen *et al.*, 2000).

Spermatogenesis adalah proses dinamis perkembangan sel-sel spermatogenik dari tahap spermatogonia sampai terbentuk spermatozoa. Spermatogenesis dipengaruhi oleh faktor endogen dan eksogen. Faktor endogen meliputi hormonal, psikologi, dan genetika. Faktor eksogen dapat berupa bahan kimia dan obat-obatan. Asap rokok adalah faktor eksogen yang dapat memengaruhi proses spermatogenesis. Penelitian ini

bertujuan mengkaji efek pemaparan asap rokok 10 batang/ekor/hari selama 20, 40, dan 60 hari terhadap spermatogenesis terutama pada perubahan kualitas spermatozoa dan jumlah sel-sel spermatogenik.

MATERI DAN METODE

Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) faktorial dengan faktor lama perlakuan dan waktu pengambilan. Pemaparan asap rokok dilakukan pada tikus jantan *Rattus norvegicus* dengan dosis 10 batang/ekor/hari yang dilakukan di dalam *smoking chamber*. Katup oksigen dibuka dengan tekanan 0,5 atmosfer, kemudian rokok dipasang pada pipa yang dihubungkan dengan pompa, selanjutnya rokok dibakar dan pompa dinyalakan sehingga asap akan masuk ke dalam *smoking chamber* dan terhirup tikus dengan waktu yang digunakan adalah 15 menit/batang/tikus jantan sehingga total waktu pemaparan untuk 10 batang rokok per ekor tikus jantan adalah 2,5 jam.

Sejumlah 24 ekor tikus jantan dibagi dalam 4 kelompok, masing-masing 6 ekor yaitu P1 adalah kelompok yang tidak diberi perlakuan/kontrol, P2 adalah kelompok yang dipapar asap rokok selama 20 hari, P3 adalah kelompok yang dipapar asap rokok selama 40 hari, dan P4 adalah kelompok yang dipapar asap rokok selama 60 hari. Setelah perlakuan pemaparan asap rokok (T1), 3 ekor tikus jantan pada masing-masing perlakuan dinekropsi untuk diamati kualitas spermatozoa dan jumlah sel-sel spermatogenik. Tiga ekor tikus tersisa dari setiap perlakuan dibiarkan hidup tidak terusik sesuai waktu pemaparan dan dinekropsi untuk diamati parameter-parameter seperti tersebut di atas (T2), untuk melihat kondisi tikus jantan setelah pemberhentian pemaparan (*recovery*).

Spermatozoa diperoleh dengan cara pemotongan 0,5 cm kauda epididimis, dimasukkan ke dalam gelas arloji yang berisi 1 ml natrium klorida (NaCl) fisiologis 0,9% hangat (37° C), kemudian dipotong-potong dengan gunting kecil hingga halus dan diaduk dengan gelas pengaduk. Larutan ini disebut suspensi spermatozoa (Modifikasi dari First, 1991). Suspensi spermatozoa dihisap dengan pipet leukosit sampai tanda 1. Pipet yang telah berisi suspensi spermatozoa kemudian diencerkan dengan larutan NaCl fisiologis 0,9% sampai tanda 11, kemudian pipet dikocok rata.

Sebelum menghitung spermatozoa, terlebih dahulu beberapa tetes campuran spermatozoa dibuang agar yang terhitung nanti adalah bagian yang benar-benar mengandung spermatozoa homogen. Campuran spermatozoa dimasukkan ke dalam kotak-kotak kamar hitung Neubauer. Jumlah spermatozoa kotak dihitung di bawah mikroskop dengan pembesaran 400x menggunakan rumus, $C = (nx5) \times 10^4 \times \text{pengenceran/ml}$. Hasil perhitungan merupakan jumlah spermatozoa dalam mm^3 suspensi. Viabilitas dan abnormalitas spermatozoa diperiksa dengan cara pewarnaan eosin 2%. Pada gelas obyek, satu tetes suspensi sperma ditambah satu tetes eosin, kemudian dibuat sediaan hapus. Pengamatan sediaan dilakukan di bawah mikroskop dengan pembesaran 400x dan dihitung dengan menggunakan *counter*. Penghitungan dilakukan pada 200 spermatozoa, spermatozoa hidup tidak berwarna, sedang spermatozoa yang mati kepalanya berwarna merah oleh eosin. Hasil pengamatan spermatozoa hidup dan abnormal dinyatakan dalam persen (%) (Soehadi dan Arsyat, 1983).

Pembuatan sediaan mikroanatomis testis untuk pengamatan sel-sel pada tahapan spermatogenesis menggunakan metode pewarnaan hematoksilin (HE) mengikuti cara Kiernan (1990). Pengamatan histopatologis pada jaringan testis mencakup jumlah spermatogonium, spermatosit primer, dan spermatid akhir. Pengamatan mikroskopis testis dilakukan di bawah mikroskop dengan pembesaran lensa obyek 40x dan 100x. Hasil yang diperoleh dianalisis dengan analisis varian dan dilanjutkan uji Duncan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kualitas Spermatozoa

Rataan kualitas spermatozoa (konsentrasi, viabilitas, dan abnormalitas spermatozoa) setelah pemaparan asap rokok disajikan pada Tabel 1. Perlakuan asap rokok berpengaruh sangat nyata ($P < 0,05$) terhadap kualitas spermatozoa.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemaparan asap rokok dapat menurunkan konsentrasi spermatozoa dan viabilitas spermatozoa serta meningkatkan abnormalitas spermatozoa. Peningkatan dan penurunan tersebut sejalan dengan lamanya pemaparan asap rokok. Penurunan kualitas spermatozoa diduga akibat radikal bebas asap rokok yang bersifat sitotoksik akan

Tabel 1. Rataan kualitas spermatozoa (konsentrasi, viabilitas, dan abnormalitas spermatozoa) setelah pemaparan asap rokok dan pemberhentian pemaparan (*recovery*)

Perlakuan	Kualitas spermatozoa					
	Konsentrasi spermatozoa (juta/ mm^3)		Viabilitas spermatozoa (%)		Abnormalitas spermatozoa (%)	
	(T1)	(T2)	(T1)	(T2)	(T1)	(T2)
P1	243,53±1,95 ^a	246,29±5,82 ^a	75,91±0,14 ^b	77,61±0,29 ^a	24,74±0,01 ^e	24,79±0,42 ^e
P2	171,11±13,17 ^b	178,10±0,96 ^b	39,86±0,01 ^c	39,63±0,09 ^c	49,53±0,46 ^d	49,75±0,23 ^d
P3	67,35±1,34 ^c	67,68±3,53 ^c	27,14±0,01 ^e	27,55±0,22 ^d	70,03±0,02 ^e	70,77±0,01 ^c
P4	46,86±0,18 ^d	49,18±0,02 ^d	8,46±0,02 ^f	8,07±0,01 ^g	84,96±0,21 ^a	84,61±1,99 ^b

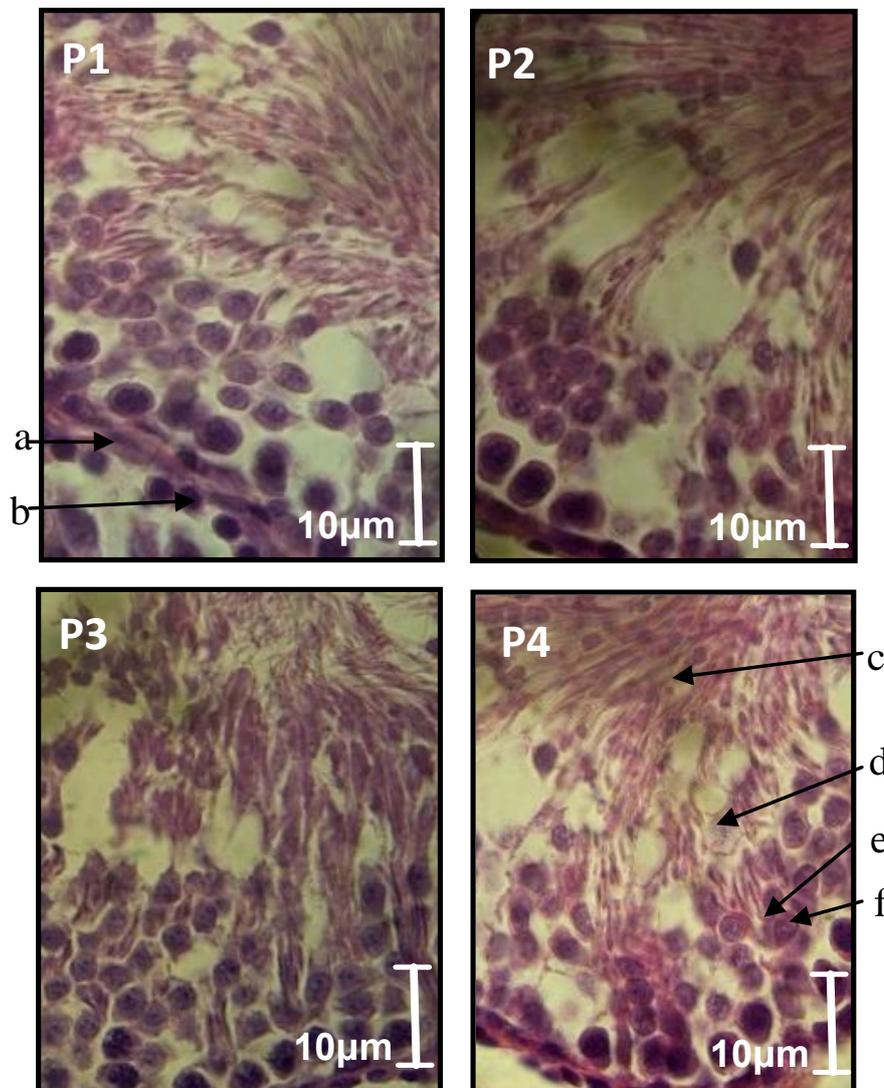
a, b, c, d, e, f, g Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0,05$) (T1= waktu setelah pemaparan, T2 = waktu setelah pemberhentian (*recovery*), P1= kelompok yang tidak diberi perlakuan (kontrol), P2= kelompok yang dipapar asap rokok 10 batang/ekor/hari selama 20 hari, P3= kelompok yang dipapar asap rokok 10 batang/ekor/hari selama 40 hari, dan P4= kelompok yang dipapar asap rokok 10 batang/ekor/hari selama 60 hari)

menghambat pembentukan adenosin trifosfat (ATP) mitokondria. Mitokondria merupakan tempat proses perombakan atau katabolisme untuk menghasilkan energi bagi spermatozoa (Anbasari *et al.*, 2005; Fitriani *et al.*, 2010). Pemberhentian pemaparan asap rokok selama 20, 40, dan 60 hari masing-masing untuk P2, P3, P4 tidak mengembalikan kualitas spermatozoa ke keadaan normal. Hal ini diduga karena sifat toksik asap rokok yang dapat menyebabkan kerusakan organ penghasil spermatozoa bersifat menetap. Fitriani *et al.* (2010) melaporkan semakin lama pemaparan asap rokok maka semakin menurun kualitas spermatozoa.

Histologi Tubulus Seminiferus dan Jumlah Sel-sel Spermatogenik

Pada penelitian ini tidak terlihat adanya kerusakan yang nyata pada tubulus seminiferus testis (Gambar 1). Sel-sel penyusun tubulus seminiferus yaitu sel-sel spermatogenik, sel Leydig dan sel mioid dapat diamati dengan baik pada penelitian ini.

Rataan jumlah sel-sel spermatogenik (spermatogonium, spermatosit primer, dan spermatid akhir) setelah pemaparan asap rokok disajikan pada Tabel 2. Hasil perlakuan menunjukkan bahwa perlakuan asap rokok berpengaruh sangat nyata ($P < 0,05$) terhadap penurunan jumlah sel-sel spermatogenik. Jumlah spermatogonium pada kelompok waktu pemaparan asap rokok selama 60 hari (P4) menunjukkan nilai yang paling rendah dibandingkan dengan waktu pemaparan 20 dan 40 hari. Setelah diberhentikan (*recovery*), jumlah spermatogonium pada P4 tetap berada pada kondisi yang sama. Jumlah spermatosit primer setelah pemaparan asap rokok selama 60 hari lebih rendah bila dibandingkan pemaparan selama 20 hari dan 40 hari. Setelah pemberhentian pemaparan asap rokok (*recovery*) menunjukkan jumlah spermatosit primer cenderung lebih rendah dibandingkan setelah dipapar asap rokok. Jumlah spermatid akhir setelah pemaparan asap rokok selama 40 dan 60 hari lebih rendah dibandingkan pemaparan



Gambar 1. Fotomikrograf menunjukkan struktur tubulus seminiferus dan sel-sel penyusunnya (P1= kelompok yang tidak diberi perlakuan/kontrol, P2= kelompok yang dipapar asap rokok 10 batang/ekor/hari selama 20 hari, P3= kelompok yang dipapar asap rokok 10 batang/ekor/hari selama 40 hari, dan P4= kelompok yang dipapar asap rokok 10 batang/ekor/hari selama 60 hari; a= sel mioid, b= sel Leydig, c= spermatozoa, d= spermatid akhir, e= spermatosit primer, f= spermatogonium; HE)

Tabel 2. Rataan jumlah sel-sel spermatogenik (spermatogonium, spermatosit primer, dan spermatid akhir) setelah pemaparan asap rokok dan pemberhentian pemaparan (*recovery*)

Perlakuan	Jumlah Sel-sel pada Tahapan Spermatogenesis					
	Spermatogonium		Spermatosit primer		Spermatid akhir	
	(T1)	(T2)	(T1)	(T2)	(T1)	(T2)
P1	37,00±1,00 ^a	38,33±0,58 ^a	48,00±1,00 ^a	47,33±1,53 ^a	61,33±1,15 ^a	60,33±0,58 ^a
P2	31,66±0,58 ^b	32,33±0,58 ^b	48,67±1,15 ^a	47,67±1,15 ^a	37,33±1,15 ^b	37,00±1,00 ^b
P3	22,33±1,53 ^c	20,33±0,58 ^d	32,00±1,00 ^b	30,67±1,15 ^b	27,67±1,53 ^c	27,33±0,58 ^c
P4	19,00±1,00 ^{de}	18,33±0,58 ^e	27,67±1,15 ^c	25,00±1,00 ^d	20,33±0,58 ^d	20,67±0,58 ^d

^{a, b, c, d, e}Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0,05$) (T1= waktu setelah pemaparan, T2 = waktu setelah pemberhentian (*recovery*), P1= kelompok yang tidak diberi perlakuan (kontrol), P2= kelompok yang dipapar asap rokok 10 batang/ekor/hari selama 20 hari, P3= kelompok yang dipapar asap rokok 10 batang/ekor/hari selama 40 hari, dan P4= kelompok yang dipapar asap rokok 10 batang/ekor/hari selama 60 hari)

asap rokok selama 20 hari. Setelah diberhentikan jumlah spermatid akhir tetap berada pada kondisi yang sama. Jumlah sel-sel spermatogenik lebih sedikit seiring dengan lamanya pemaparan asap rokok dan kondisi ini bersifat menetap meskipun pemaparan telah dihentikan. Hal ini menunjukkan bahwa pemberhentian pemaparan asap rokok tidak memperbaiki jumlah sel-sel spermatogenik pada tahapan spermatogenesis tikus yang pernah terpapar asap rokok. Turunnya jumlah sel-sel spermatogenik pada tahapan spermatogenesis diduga akibat adanya radikal bebas pada asap rokok yang dapat menghambat spermatogenesis.

Penurunan jumlah sel-sel spermatogenik yang berakibat terjadinya penurunan konsentrasi spermatozoa diduga sebagai akibat masuknya zat toksik dari asap rokok pada sistem tubuh sehingga dapat masuk ke organ reproduksi termasuk testis. Walaupun dalam penelitian ini kandungan asap rokok yang diberikan tidak diperiksa, asap rokok bersifat toksik karena mengandung bahan karsinogen, tar, nikotin, nitrosamin, karbon monoksida, senyawa *polynuclear aromatic hydrogen* (PAH), fenol, karbonil, klorin dioksin, dan furan (Fowles, 2000). Revel *et al.* (2001) melaporkan bahwa PAH menyebabkan atrofi testis, menghambat spermatogenesis, dan merusak morfologi spermatozoa. Nikotin dalam asap rokok yang dapat menstimulasi medula adrenal untuk melepaskan katekolamin. Katekolamin dapat memengaruhi sistem saraf pusat sehingga dapat mengganggu proses spermatogenesis (Fitriani *et al.*, 2010). Radikal bebas asap rokok yang terpapar pada tikus dapat menurunkan diameter tubulus seminiferus (Ahmadania, 2007), menurunkan jumlah spermatosit pakiten dan spermatid menciit (Sukmaningsih, 2009), menurunkan konsentrasi spermatozoa (Dewi, 2011), dan menyebabkan gangguan kronik pada tahapan spermatogenesis (Rajpurkar, 2000; Rajpurkar, 2002).

KESIMPULAN

Pemaparan asap rokok dengan dosis 10 batang rokok/ekor/hari selama 20, 40, dan 60 hari menyebabkan penurunan konsentrasi spermatozoa, viabilitas spermatozoa, peningkatan presentase abnormalitas spermatozoa dan penurunan jumlah sel-sel

spermatogenik tikus yang tidak kembali ke kondisi normal setelah proses penyembuhan (*recovery*).

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmadnia, H., M. Ghanbari, M.R. Moradi, and M. Khaje-Dalouee. 2007. Effect of cigarette smoke on spermatogenesis in rats. *Uro. J.* 4(3):154-163.
- Anbasari, K., G. Vani, and C.S. Devi. 2005. Protective effect of bacoside A on cigarette smoking-induced brain mitochondrial dysfunction in rats. *J. Environ Pathol. Toxicol. Oncol.* 24: 225-34
- Arcavi, L. and N.L. Benewitz. 2004. Cigarette smoking and infection. *Arch. Intern. Med.* 164:2206-2216.
- Baker, R.R. 2006. Smoke generation inside a burning cigarette: Modifying combustion to develop cigarettes that may be less hazardous to health. *Progress in Energy and Combustion Sci.* 32:373-385.
- Dewi, E.R.S. 2011. Pengaruh pemberian ekstrak buah mengkudu terhadap histopatologi testis tikus putih setelah menghirup asap rokok. *Biotropika*. 1(2):113-122.
- First, N.I. 1991. Collection and Preservation of Spermatozoa. In *Methods in Mamalian Embryology*. I.C. Daniel Jr (Ed.). Toppan Company Limited, Japan.
- Fitriani, E. Kartini, and E. Widya. 2010. The effect of cigarettes smoke exposed causes fertility of male mice (*Mus musculus*). *J. Natural.* 10(2):12-17.
- Fowles, J. and M. Bates. 2000. *The Chemical Constituents in Cigarettes and Cigarette Smoke: Priorities For Harm Reduction*. Epidemiology and Toxicology Group, ESR, Kenepuru Science Centre, New Zealand.
- Kiernan, J.A. 1990. *Histological and Histochemical Method: Theory and Practice*. 2nd ed. Pergamon Press, USA,
- Koskinen, L.O., O. Collin, and A. Bergh. 2000. Cigarette smoke and hypoxia induce acute changes in the testicular and cerebral microcirculation. *Ups. J. Med. Sci.* 105:215-226.
- Mc Lachland, R.L., N.G. Wreford, L.O. Donnell, D.M. de Kretser, and D.M. Robertson. 1996. Endocrine regulation of spermatogenesis: Independent roles for testosterone and FSH. *J. Endocrinol.* 148:1-9.
- Rajpurkar, A., C.B. Dhabuwala, Y. Jiang, and H. Li. 2000. Chronic cigarette smoking induces an oxidant antioxidant imbalance in the testis. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 19(4): 369-373.
- Rajpurkar, A., Y. Jiang, C.B. Dhabuwala, J.C. Dunbar, and H. Li. 2002. Cigarette smoking induces apoptosis in rat testis. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 21(3):243-248.
- Revel, A., N. Raanani, E. Younglai, J. Xu, and R. Han. 2001. Resveratrol, a natural aryl hydrocarbon receptor antagonist, protect sperm from DNA damage and apoptosis caused by benzo(a)pyrene. *Reproduct. Toxicol.* 15:479-486.
- Soehadi, K. dan K.M. Arsyat. 1983. *Analisis Sperma*. Airlangga University Press, Surabaya.
- Sukmaningsih, A.A.S.A. 2009. Penurunan jumlah spermatosit pakiten dan spermatid tubulus seminiferus testis pada menciit (*Mus musculus*) yang dipaparkan asap rokok. *J. Biologi.* XIII(2):31-35.
- Susanna, D., B. Hartono, dan H. Fauzan. 2003. Penentuan kadar nikotin dalam asap rokok. *Makara of Health Series.* 2:272-274.