

- SPERMATOZOA

IR-PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

- NIKOTINE

KK

KKA

TKR. 10/11

Rah

P

TESIS

**PENGARUH NIKOTIN TERHADAP JUMLAH SEL-SEL
SPERMATOSIT PRIMER, SPERMATID DAN LEYDIG
PADA MENCIT (*Mus musculus*)**



**IIS RAHMAWATI
NIM : 090810221**

**PROGRAM PASCA SARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2010**

UCAPAN TERIMA KASIH

Pertama-tama saya panjatkan puji syukur ke hadirat Allah SWT yang maha pengasih dan penyayang atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga tesis ini dapat diselesaikan.

Terimakasih tak terhingga dan penghargaan setinggi-tingginya penulis ucapkan kepada Prof. Ari Gunawan, dr, MS, Ph.D, pembimbing ketua yang dengan penuh perhatian dan kesabaran telah memberikan dorongan, bimbingan dan saran.

Terimakasih tak terhingga dan penghargaan setinggi-tingginya penulis ucapkan kepada Dr. Herry Agoes Hermadi, drh, M.Si, pembimbing yang dengan penuh perhatian dan kesabaran telah memberikan dorongan, bimbingan dan saran.

Saya mengucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada Pemerintah Republik Indonesia cq Menteri Pendidikan dan Kebudayaan atas bantuan financial sehingga dapat meringankan beban saya dalam menyelesaikan tesis ini.

Dengan selesainya tesis ini, perkenankan penulis mengucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Rektor Universitas Airlangga Prof. Dr. H. Fasich, Apt. atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan kepada penulis untuk mengikuti dan menyelesaikan pendidikan Program Magister.
2. Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga Prof. Dr. Ciptohadi S. atas kesempatan yang diberikan untuk mengikuti dan menyelesaikan pendidikan Program Magister.
3. Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Prof. Dr. Muhammad Amin, dr.Sp.P (K) atas kesempatan yang diberikan untuk mengikuti dan menyelesaikan pendidikan Program Magister.
4. Ketua TKPSM Universitas Airlangga atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan selama menjadi mahasiswa Program Magister di Unair.
5. Ketua Program Studi Ilmu Kesehatan Reproduksi Prof Eri Gumilar, Sp.OG (K) atas segala masukan dan perhatiannya sehingga tesis ini dapat diselesaikan tepat waktu.
6. Ketua Program Studi Ilmu Keperawatan Dr. Suyono Kardis, Sp.KJ yang telah banyak memberikan dorongan dan izinnya untuk mengikuti pendidikan Program Magister Universitas Airlangga
7. Ketua Laboratorium in vitro Fakultas Kedokteran Hewan Dr. Widjiati yang telah memberi dorongan dan semangat dan mengijinkan penulis untuk menggunakan Laboratorium in vitro untuk penelitian.
8. Para penguji tesis Dr Hermanto T.J, dr, Sp.OG(K), Dr Widati, dr, M.Kes dan Dr Hudi Winarso, dr, M.Kes, Sp.And yang telah memberikan bimbingan dan saran dengan tulus dan bersedia sebagai penguji.
9. Tim Laboratorium inVitro FKH Unair yang telah membantu dalam pelaksanaan penelitian ini.
10. Para dosen yang selama ini dengan tulus telah memberikan bekal berbagai ilmu pengetahuan yang sangat berguna pada saat penelitian dan penulisan tesis ini.
11. Kedua orang tua dan mertua, kakak-kakak dan seluruh keluarga yang telah memberikan doanya hingga saya berhasil menyelesaikan studi ini.

12. Suami dan anak tercinta, terimakasih atas segala dukungan dan kesabaran selama saya menjalani studi ini.
13. Teman-teman IKR 2008 : Bu Sum, Bu Yayuk, Mbak Henny, Mbak win, Mbak Lestari, Mbak Met dan Mbak Dina dan juga Mb. Ida Atas segala dorongan dan perhatian dan doanya hingga saya bisa menyelesaikan studi ini
14. Semua pihak yang telah banyak membantu studi saya hingga tesis ini selesai, yang namanya tidak dapat disebutkan satu-persatu.

Semoga Tuhan Yang Maha Esa selalu memberikan petunjuk, bimbingan, kemudahan, kebahagiaan, keselamatan dan rahmat-Nya. Saya sebagai manusia tidak lepas dari salah dan khilaf, memohon maaf kepada semua pihak atas segala kekurangan dan kesalahan yang pernah saya perbuat.

Surabaya, Agustus 2010

Iis Rahmawati

RINGKASAN

PENGARUH NIKOTIN TERHADAP JUMLAH SEL-SEL
SPERMATOSIT PRIMER, SPERMATID DAN LEYDIG
PADA MENCIT (*Mus musculus*)

Kebiasaan merokok di Indonesia dan beberapa negara berkembang lainnya terus meningkat. Perokok di Indonesia berjumlah 75% yang terdiri atas 60% berasal dari populasi pria dan 15% dari populasi wanita. Komponen utama dari rokok adalah nikotin sebesar 50% cepat diabsorpsi melalui saluran pernafasan, mukosa mulut dan kulit, setiap batang rokok mengandung 6-11 mg nikotin dan 1-2 mg akan diserap oleh setiap perokok, apabila setiap perokok menghisap 1 bungkus rokok perhari, maka jumlah nikotin yang dihisap sekitar 20-40 mg/hari. Nikotin diserap secara sistemik sebesar 0,3-2 mg selama merokok yaitu 80-90% dari nikotin yang terkandung didalam rokok. Nikotin yang diberikan secara subkutan akan menyebabkan kadarnya di dalam darah 15 ng/ml dengan bioavailabilitas 100%. Nikotin adalah bahan alkaloid toksik yang terdapat dalam tembakau, nikotin akan masuk ke sirkulasi darah setelah diabsorpsi, yaitu pada pH 7,4, kemudian didistribusikan ke jaringan tubuh. Nikotin yang masuk selama merokok tergantung dari volume rokok yang diisap, dalamnya inhalasi, komposisi udara di ruangan dan intensitas hisapan. Dampak dari Asap rokok tersebut dapat merusak viabilitas sperma, merusak proses pembuatan sperma (spermatogenesis), menimbulkan gangguan hormonal serta munculnya bahan toksik pada sperma, sehingga dapat mengakibatkan gangguan infertilitas pria.

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan pengaruh nikotin terhadap jumlah sel spermatosit primer, sel spermatid dan sel leydig. Rancangan penelitian ini menggunakan *Post Test Only Control Group Design*. Sampel yang digunakan adalah mencit (*Mus musculus*) jantan umur dewasa. Subjek penelitian terdiri dari 6 kelompok yang dipilih secara acak dan telah dihomogenkan. 3 kelompok sebagai kontrol dan 3 kelompok lainnya sebagai kelompok perlakuan yang diberikan injeksi nikotin subkutan selama 1 minggu, 2 minggu dan 3 minggu dengan dosis yang sama yaitu 5 mg/kgBB/hr. Pengamatan akhir adalah menghitung jumlah sel-sel spermatosit primer, spermatid dan leydig.

Hasil perhitungan sel-sel spermatosit primer, spermatid dan leydig. Rerata jumlah sel-sel spermatosit primer untuk K1 = 35,72, K2 = 32,30, K3 = 40,84 K4 = 29,7, K5 = 22,76, K6 = 24,50. Rerata jumlah sel-sel spermatid untuk K1 = 42,62, K2 = 41,52, K3 = 81,68, K4 = 31,42, K5 = 22,56, K6 = 44,28. Rerata jumlah sel-sel leydig untuk K1 = 13,70, K2 = 10,98, K3 = 18,90, K4 = 7,90, K5 = 5,70, K6 = 9,10.

Data penelitian dianalisis dengan Anava uji Anava satu arah pada taraf kepercayaan 95% dan dilanjutkan dengan uji BNT. Hasil uji Anava satu arah adalah jumlah sel-sel spermatosit primer, spermatid dan leydig memiliki perbedaan yang bermakna secara statistik pada berbagai kelompok perlakuan ($p < 0,05$). Hasil uji BNT tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara perlakuan 1 minggu, 2 minggu dan 3 minggu.

Hasil uji BNT untuk pasangan kelompok berbeda secara bermakna dari hasil sel-sel spermatosit primer adalah K4 dan K3; K5 dan K1, K2, K3; K6 dan

K1, K2, K3 ; pasangan kelompok berbeda secara bermakna dari hasil sel-sel spermatid adalah K4 dan K3; K5 dan K1, K3, K6; K3 dan K1, K2, K6; dan pasangan kelompok berbeda secara bermakna dari hasil sel-sel leydig adalah K2 dan K3; K1 and K4, K3; K4 and, K3, K5, K2; K5 and K2, K3; K6 and K3.

Penelitian ini membuktikan bahwa, nikotin menyebabkan penurunan jumlah sel-sel spermatosit primer, spermatid dan leydig. Saran yang diberikan adalah peraturan konsumsi rokok harus lebih diperhatikan lagi mengingat bahaya toksik dari nikotin yang terdapat pada rokok, yaitu dengan membuat UU tentang konsumsi rokok, sehingga diharapkan dapat meminimalkan salah satu faktor risiko infertilitas pada pria. Penelitian lebih lanjut perlu dilakukan untuk menyempurnakan hasil penelitian ini.

SUMMARY

THE EFFECT OF NICOTINE ON THE NUMBER OF PRIMARY SPERMATOCYTE CELLS, SPERMATID, AND LEYDIG IN MICE (*Mus musculus*)

There has been an increase in smoking habits in Indonesia and some other developing countries. The total number of Indonesian smokers is 75% consisting of 60% of male population and 15% female. The main component of cigarette is nicotine of 50% which is absorbed through the respiratory tract, mouth mucus, and skin. Each cigarette contains 6-11 mg nicotine and 1-2 mg will be absorbed by each smoker. Therefore, if a smoker smokes 1 pack of cigarette a day, he/she will inhale about 20-40 mg nicotine a day. Nicotine systemically absorbed is 0.3 – mg during one action of smoking namely 80 – 90% of the nicotine in the cigarette. Nicotine applied subcutaneously will remain in blood 15 ng/ml with bio-viability of 100%. Nicotine is an alkaloid toxic substance contained in tobacco. Nicotine will enter blood circulation after absorption, namely on pH 7,4. Then it is distributed to body tissues. Nicotine inhaled during smoking activity depends on the volume of the cigarettes smoked, in inhalation, the air composition in the room, and the inhalation intensity. The effect of cigarette smoke can spoil sperm viability and spermatogenesis. It can cause hormonal condition and trigger the emergence of toxic substance on sperm that it can harm male fertility.

This study was aimed at revealing the effect of nicotine on the number of primary spermatocyte, spermatid cell, and leydig cell. The research design employed in this study was Post Test Only Control Group Design. The samples were adult male *mus musculus*. There were six groups of research subject chosen randomly after homogenization. Three groups were the control group and the other three were the experimental group. The subjects in the experimental group were injected with nicotine subcutaneously for one week, two weeks, and three weeks with the same dosage namely 5 mg/kg bodyweight/day. The final observation was aimed at calculating the number of primary spermatocyte, spermatid, and leydig.

The result of the calculation of the number of primary spermatocyte, spermatid, and leydig showed the following details: The average number of the primary spermatocyte for K1 = 35.72, K2 = 32.30, K3 = 40.84, K4 = 29.7, K5 = 22.76, K6 = 24.50. The average number of the spermatid for K1 = 42.62, K2 = 41.52, K3 = 81.68, K4 = 31.42, K5 = 22.56, K6 = 44.28. The average number of the leydig cells for K1 = 13.70, K2 = 10.98, K3 = 18.90, K4 = 7.90, K5 = 5.70, K6 = 9.10.

The data obtained in the experiment were then analysed by one way Analysis of Variance (Anova) with level of significance of 95% and was continued by BNT. The result of the one way Anova showed that the primary spermatocyte, spermatid and leydig had a statistically significant difference on some experimental groups ($p < 0.05$). The result of BNT showed that there was no significant difference between the one week, two week, and three week experiments.

LSD test showed that there was significant difference between spermatocyt primary cells of K4 and K3; K5 and K1, K2, K3 ; K6 and K1, K2, K3 ; there was significant difference between spermatid cells of K4 and K3, K5 and K1, K5 and K1, K3, K6, K6 and K3 and K1, K2 and K6; and there was significant difference between leydig cells of K2 and K3; K1 and K4, K3; K4 and, K3, K5, K2; K5 and K2, K3; K6 and K3.

This research proved that nicotine can decrease the number of primary spermatocyte, spermatid, and leydig. Therefore, based on this result, it is suggested that there is more attention on the regulations on smoking, considering the danger of the toxic content of nicotine in the cigarette. Hopefully, there will be an Act on smoking that it will help reduce one of the risks of male infertility. In addition, further research needs to be done to generate data to support the results of this research.

ABSTRACT

THE EFFECT OF NICOTINE ON THE NUMBER OF PRIMARY SPERMATOCYTE CELLS, SPERMATID, AND LEYDIG IN MICE (*Mus musculus*)

There has been an increase in smoking habits in Indonesia and some other developing countries. The main component of cigarette is nicotine of 50% which is absorbed through the respiratory tract, mouth mucus, and skin. The effect of cigarette smoke can spoil sperm viability and spermatogenesis. It can cause hormonal condition and trigger the emergence of toxic substance on sperm that it can harm male fertility.

The research design employed in this study was Post Test Only Control Group Design. The samples were adult male *mus musculus*. There were six groups of research subject chosen randomly after homogenization. Three groups were the control group and the other three were the experimental group. The subjects in the experimental group were injected with nicotine subcutaneously for one week, two weeks, and three weeks with the same dosage namely 5 mg/kg bodyweight/day. The final observation was aimed at calculating the number of primary spermatocyte, spermatid, and leydig.

The result of the one way Anova showed that the primary spermatocyte, spermatid and leydig had a statistically significant difference on some experimental groups ($p < 0.05$). LSD test showed that there was significant difference between spermatocyt primary cells of K4 and K3; K5 and K1, K2, K3 ; K6 and K1, K2, K3 ; there was significant difference between spermatid cells of K4 and K3, K5 and K1, K5 and K1, K3, K6, K6 and K3 and K1, K2 and K6; and there was significant difference between leydig cells of K2 and K3; K1 and K4, K3; K4 and, K3, K5, K2; K5 and K2, K3; K6 and K3.

The conclusion of this research was that nicotine caused a decrease in the number of primary spermatocyte, spermatid and leydig.

Keywords : nicotine, primary spermatocyte, spermatid, leydig.

ABSTRAK

PENGARUH NIKOTIN TERHADAP JUMLAH SEL-SEL SPERMATOSIT PRIMER, SPERMATID DAN LEYDIG PADA MENCIT (*Mus musculus*)

Kebiasaan merokok di Indonesia dan beberapa negara berkembang lainnya terus meningkat. Komponen utama dari rokok adalah nikotin sebesar 50% cepat diabsorpsi melalui saluran pernafasan, mukosa mulut dan kulit. Dampak dari Asap rokok tersebut dapat merusak viabilitas sperma, merusak proses pembuatan sperma (spermatogenesis), menimbulkan gangguan hormonal serta munculnya bahan toksik pada sperma, sehingga dapat mengakibatkan gangguan infertilitas pria.

Rancangan penelitian ini bersifat eksperimental. Jenis rancangannya adalah *Post Test Only Control Group Design*. Sampel yang digunakan adalah mencit (*Mus musculus*) jantan umur dewasa. Subjek penelitian terdiri dari 6 kelompok yang dipilih secara acak dan telah dihomogenkan. 3 kelompok sebagai kontrol dan 3 kelompok lainnya sebagai kelompok perlakuan yang diberikan injeksi nikotin subkutan selama 1 minggu, 2 minggu dan 3 minggu dengan dosis yang sama yaitu 5 mg/kgBB/hr. Pengamatan akhir adalah menghitung jumlah sel-sel spermatosit primer, spermatid dan leydig.

Hasil penelitian adalah terdapat perbedaan yang bermakna antara jumlah sel-sel spermatosit primer, spermatid dan leydig pada berbagai kelompok ($p < 0,05$). Hasil uji BNT untuk pasangan kelompok berbeda secara bermakna dari hasil sel-sel spermatosit primer adalah K4 dan K3; K5 dan K1, K2, K3; K6 dan K1, K2, K3; pasangan kelompok berbeda secara bermakna dari hasil sel-sel spermatid adalah K4 dan K3; K5 dan K1, K3, K6; K3 dan K1, K2, K6; dan pasangan kelompok berbeda secara bermakna dari hasil sel-sel leydig adalah K2 dan K3; K1 and K4, K3; K4 and, K3, K5, K2; K5 and K2, K3; K6 and K3.

Kesimpulan penelitian ini adalah nikotin dapat menyebabkan penurunan jumlah sel-sel spermatosit primer, spermatid dan leydig.

Kata kunci : nikotin, sel-sel spermatosit primer, spermatid, leydig.

DAFTAR ISI

	Halaman
Sampul Depan.....	i
Sampul Dalam.....	ii
Prasyarat Gelar.....	iii
Persetujuan.....	iv
Penetapan Panitia Penguji.....	v
Ucapan Terima Kasih.....	vi
Ringkasan.....	vii
Summary.....	x
Abstract.....	xii
Daftar Isi.....	xv
Daftar Tabel.....	xvi
Daftar Gambar.....	xvii
Daftar Lampiran.....	xviii
BAB 1 PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan Penelitian.....	5
1.4 Manfaat Penelitian.....	5
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	7
2.1 Rokok dan Nikotin.....	7
2.2 Efek Nikotin Terhadap Sistem Reproduksi Pria.....	14
2.3 Sistem Reproduksi Mencit Jantan.....	21
2.2.1 Anatomi testis.....	21
2.2.2 Tubulus seminiferus.....	23
2.2.3 Spermatogenesis.....	24
2.4 Histologi Testis.....	33
2.5 Pengaturan Fungsi Testis.....	36
2.6 Pemilihan Hewan Coba.....	38
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN.....	39
3.1 Kerangka Konseptual.....	39
3.2 Hipotesis Penelitian.....	43
BAB 4 MATERI DAN METODE PENELITIAN.....	44
4.1 Rancangan Penelitian.....	44
4.2 Populasi, Sampel dan Besar Sampel.....	45
4.3 Variabel Penelitian.....	46
4.3.1 Klasifikasi variabel.....	46
4.3.2 Definisi operasional variabel.....	46
4.3.3 Jenis mencit.....	48
4.4 Bahan Penelitian.....	48
4.5 Instrumen Penelitian.....	49
4.6 Lokasi dan Waktu Penelitian.....	49



4.7	Prosedur Penelitian.....	50
4.7.1	Pembuatan larutan nikotin.....	50
4.7.2	Cara perlakuan dan pengamatan.....	50
4.7.3	Teknik pengumpulan data.....	52
4.8	Kerangka Operasional.....	53
4.9	Analisa Data.....	54
4.9.1	Analisis deskriptif.....	54
4.9.2	Analisis analitik.....	54
4.10	Persyaratan Etik.....	54
BAB 5	ANALISIS HASIL PENELITIAN.....	55
5.1	Hasil Penelitian.....	55
5.1.1	Jumlah sel spermatosit primer.....	55
5.1.2	Jumlah sel spermatid.....	56
5.1.3	Jumlah sel leydig.....	56
5.1.4	Gambaran histologi tubulus seminiferus.....	57
5.2	Analisis Hasil Penelitian.....	59
5.2.1	Jumlah sel spermatosit primer.....	60
5.2.2	Jumlah sel spermatid.....	62
5.2.3	Jumlah sel leydig.....	63
BAB 6	PEMBAHASAN	65
6.1	Jumlah Sel-Sel Spermatogenik.....	66
6.2	Jumlah Sel-Sel Leydig.....	70
BAB 7	KESIMPULAN DAN SARAN	75
7.1	Kesimpulan.....	75
7.2	Saran.....	76
	DAFTAR PUSTAKA.....	77
	LAMPIRAN.....	83

DAFTAR TABEL

		Halaman
Tabel 2.1	: Perbedaan waktu siklus spermatogenesis pada beberapa spesies	32
Tabel 4.1	: Definisi operasional variabel	47
Tabel 4.2	: Nutrisi standar mencit	49
Tabel 5.1	: Uji normalitas	60
Tabel 5.2	: Rangkuman Anova pengaruh perbedaan perlakuan terhadap jumlah sel-sel spermatosit primer	60
Tabel 5.3	: Rangkuman uji LSD terhadap jumlah sel-sel spermatosit primer	61
Tabel 5.4	: Rangkuman Anova pengaruh perbedaan perlakuan terhadap jumlah sel-sel spermatid	62
Tabel 5.5	: Rangkuman uji LSD terhadap jumlah sel-sel spermatid	62
Tabel 5.6	: Rangkuman Anova pengaruh perbedaan perlakuan terhadap jumlah sel-sel Leydig	63
Tabel 5.7	: Rangkuman uji LSD terhadap jumlah sel-sel Leydig	64

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 : Struktur nikotin	8
Gambar 2.2 : Rumus kimia nikotin	9
Gambar 2.3 : Metabolisme nikotin	10
Gambar 2.4 : Biosintesis nikotin	11
Gambar 2.5 : Mekanisme kerusakan protein membran sel	18
Gambar 2.6 : Pembentukan radikal bebas dan netralisasinya dengan mekanisme antioksidan seluler	19
Gambar 2.7 : Anatomi testis	21
Gambar 2.8 : Spermatogenesis	24
Gambar 2.9 : Histologi testis	35
Gambar 2.10 : Pengaturan fungsi testis	37
Gambar 3.1 : Kerangka konseptual penelitian	39
Gambar 3.2 : Kerja nikotin pada reseptor	41
Gambar 4.2 : Hewan coba	45
Gambar 4.3 : Pembedahan hewan coba	48
Gambar 4.4 : Kerangka operasional	49
Gambar 5.1 : Diagram batang jumlah sel spermatosit primer setelah pemberian injeksi nikotin selama 1 minggu, 2 minggu dan 3	52
Gambar 5.2 : Diagram batang jumlah sel spermatid setelah pemberian injeksi nikotin selama 1 minggu, 2 minggu dan 3	53
Gambar 5.3 : Diagram batang jumlah sel leydig setelah pemberian injeksi nikotin selama 1 minggu, 2 minggu dan 3	54
Gambar 5.4 : Penampang melintang tubulus seminiferus testis pada kelompok kontrol (A) dan kelompok perlakuan (B) selama 1 minggu	55
Gambar 5.5 : Penampang melintang tubulus seminiferus testis pada kelompok kontrol (A) dan kelompok perlakuan (B) selama 2 minggu	55
Gambar 5.6 : Penampang melintang tubulus seminiferus testis pada kelompok kontrol (A) dan kelompok perlakuan (B) selama 3 minggu	56

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1 : Jadwal Kegiatan Penulisan Tesis	83
Lampiran 2 : Prosedur Pembuatan Larutan Nikotin	84
Lampiran 3 : Pembuatan Preparat Histologi	85
Lampiran 4 : Data kasar hasil penelitian jumlah sel spermatosit primer, spermatid dan leydig selama perlakuan 1 minggu	87
Lampiran 5 : Data kasar hasil penelitian jumlah sel spermatosit primer, spermatid dan leydig selama perlakuan 2 minggu	88
Lampiran 6 : Data kasar hasil penelitian jumlah sel spermatosit primer, spermatid dan leydig selama perlakuan 3 minggu	89
Lampiran 7 : Uji normalitas	90
Lampiran 8 : Hasil analisa data jumlah sel-sel spermatosit primer	91
Lampiran 9 : Hasil analisa data jumlah sel-sel spermatid	93
Lampiran 10 : Hasil analisa data jumlah sel-sel leydig	95
Lampiran 11 : Hewan coba dalam kandang	97
Lampiran 12 : Penampang lintang tubulus seminiferus kelompok kontrol selama 1 minggu	98
Lampiran 13 : Penampang lintang tubulus seminiferus kelompok kontrol selama 2 minggu	99
Lampiran 14 : Penampang lintang tubulus seminiferus kelompok kontrol selama 3 minggu	100
Lampiran 15 : Penampang lintang tubulus seminiferus kelompok perlakuan selama 1 minggu	101
Lampiran 16 : Penampang lintang tubulus seminiferus kelompok perlakuan selama 2 minggu	102
Lampiran 17 : Penampang lintang tubulus seminiferus kelompok perlakuan selama 3 minggu	103
Lampiran 18 : Ijin kelayakan penelitian	104

DAFTAR SINGKATAN

ABP	:	<i>Adrogen Binding Protein</i>
Anova	:	Analisis varians
Ach	:	<i>Acetylcholin</i>
ACnRS	:	<i>Acetylcholin reseptor</i>
BB	:	Berat Badan
BNT	:	Beda Nyata Terkecil
BPS	:	Badan Pusat Statistik
CO	:	Karbonmonoksida
Ca ²⁺	:	Kalsium
CAD	:	<i>Caspase-activated deoxyribonuclease</i>
DNA	:	Deoksiribonuklead acid
DepKes RI	:	Departemen Kesehatan Republik Indonesia
dkk	:	dan kawan-kawan
FADD	:	<i>Fas Associated Protein Death Domain</i>
FSH	:	<i>Follicle Stimulating Hormone</i>
GnRH	:	<i>Gonadotropin Releasing Hormone</i>
HE	:	Hematoksin-eosin
HQ2	:	Hydroquinone
H·	:	Atom hidrogen
H ₂ O ₂ .	:	Hidrogen peroksida
g	:	Gram
Kg	:	Kilogram
ICSH	:	<i>Intertitial Cell Stimulating Hormon</i>
LH	:	<i>Luteinizing Hormone</i>
LSD	:	<i>Least Significant Difference</i>
mAchRs	:	<i>muscarin Acetylcholin Reseptor</i>
mg	:	Milligram
nAchRs	:	<i>nicotine Acetylcholin Reseptor</i>
NO	:	Nitrit Oksida
NO ₂	:	Nitrit Peroksida
NaCL	:	<i>Natrium Chloride</i>
NAD ⁺	:	<i>Nicotinamide Adenine Nucleotida</i>
OH·	:	Hidroksil
PDAM	:	Perusahaan Daerah Air Minum
PUFA	:	<i>Poly unsaturated fatty acid</i>
SSP	:	Susunan Saraf Pusat
HQ	:	Semiquinone
Unair	:	Universitas Airlangga
WHO	:	<i>World Health Organization</i>
Q	:	Quinine

BAB 1
PENDAHULUAN

BAB 1 PENDAHULUAN



1.1 Latar Belakang

Infertilitas merupakan masalah global yang mempengaruhi lebih dari 80 juta orang di dunia, terjadi sekitar 15% pada pasangan suami-istri. Insiden infertilitas meningkat sejak 40 tahun terakhir (Rayburn and Carey, 2000). 50% kasus infertil terjadi pada pria baik sebagai problem primer atau kombinasi dengan pasangan wanitanya (Pasquilotto, et al, 2004). Penyebab kejadian infertil sebesar 40% pada pihak pria dan 40% terdapat pada wanita (Speroff and Fritz, 2005). Menurut Panati (1989) menyatakan bahwa, pihak suami menyebabkan hampir sepertiga masalah infertilitas, hal ini didukung dengan *royal college of obstetricians and gynaecologist (RCOG)* sebagai hasil ESHRE Capri Workshop tahun 2000 yang menyatakan bahwa, analisa sperma merupakan penentu utama diagnosa infertilitas disamping potensi tuba, diagnosis ovulasi (*RCOG Guidelines*, 2000), sehingga faktor pembentukan sperma atau spermatogenesis sangat penting dalam mengatasi kasus infertilitas karena keberhasilan proses fertilisasi salah satunya dipengaruhi oleh proses spermatogenesis yang dihasilkan di testis. Olsen melaporkan bahwa, konsentrasi spermatozoa berkurang sebanyak 50% dalam kurun waktu 50 tahun (1940-1990), yaitu adanya penurunan konsentrasi sperma dari 113 juta spermatozoa/ml menjadi 66 juta spermatozoa/ml. Data rata-rata konsentrasi spermatozoa kelompok infertil selama satu tahun di poli Andrologi FK Unair-RSUD Dr. Soetomo (1993) adalah 21,1 juta/ml (Soehadi dan Winarso, 1996).

Faktor yang menyebabkan infertilitas antara lain hormon, infeksi, radiasi, obat dan bahan kimia baik alami maupun sintetik, yang dapat berinteraksi dengan sistem endokrin, salah satu bahan toksik yang dapat menyebabkan infertilitas adalah rokok. Risiko pria yang merokok mengalami infertilitas 2 kali lebih besar daripada pria yang tidak merokok, disebabkan karena dampak dari asap rokok dapat menyebabkan terganggunya spermatogenesis dalam tubulus seminiferus, merusak viabilitas sperma, menimbulkan gangguan hormonal serta munculnya bahan toksik pada sperma (Pasqualotto et al, 2004). Yardimci (1997) dan Yamamoto (1999) menyatakan bahwa, asap rokok menyebabkan terjadinya penurunan kadar hormon testosteron. FSH, testosteron dan LH adalah hormon yang berperan penting dalam spermatogenesis. Testosteron diperlukan untuk memulai proses meiosis sel spermatosit. Menurut Everitt and Johnson (1990) bahwa, spermatosit sangat sensitive terhadap pengaruh luar, salah satunya adalah pengaruh asap rokok dan cenderung mengalami kerusakan setelah meiosis pertama, penurunan jumlah spermatosit menyebabkan jumlah spermatid juga menurun dan akhirnya jumlah spermatozoa juga menurun. Penurunan jumlah sel-sel spermatosit terjadi karena penurunan hormon testosteron dan dampaknya dapat menimbulkan infertilitas.

Nikotin merupakan komponen utama dari rokok sebesar 50% dan cepat diabsorpsi melalui saluran pernafasan, mukosa mulut dan kulit (Hukkanen dkk, 2005). Setiap batang rokok mengandung 6-11 mg nikotin dan 1-2 mg akan diserap oleh setiap perokok, apabila setiap perokok menghisap 1 bungkus rokok perhari, maka jumlah nikotin yang dihisap sekitar 20-40 mg/hari (Durazzo et al, 2007). Nikotin merupakan salah satu komponen dalam asap rokok yang menjadi penyebab

dari kebiasaan merokok (Britton dkk, 2001). Nikotin terhadap reproduksi pria dapat menyebabkan rendahnya hormon testosteron intratestikular sehingga dapat menginduksi ekspresi protein fas pada sel germinal, seperti yang dinyatakan oleh Nair, R and Chandrima, S (2003) bahwa, penurunan hormon testikular dapat menimbulkan peningkatan ekspresi protein fas, sehingga *deoksiribonuklease (caspase-activated deoxyribonuclease, CAD)* teraktivasi pada nukleus yang akhirnya menginduksi apoptosis sel germinal yaitu terjadi pada sel-sel spermatogenik dan dapat menyebabkan produksi spermatozoa menjadi menurun. Aktivasi kaspase 3 merupakan jalur eksekutor sebelum terjadi apoptosis, aktivitas kaspase 3 yang lama secara tidak langsung dapat menyebabkan azoospermia dan dapat menimbulkan infertil (Kim et al, 2001 ; Said et al, 2004).

Hasil penelitian, 60-65% sperma pria terganggu karena kebiasaan merokok. Seseorang yang terus-menerus merokok selama bertahun-tahun, darahnya akan tercemar oleh nikotin yang melalui pembuluh darah akan menyebar ke seluruh tubuh, termasuk ke organ reproduksi, nikotin yang masuk ke dalam darah akan disaring dahulu oleh ginjal, dalam pembersihan nikotin dalam tubuh diperlukan waktu yang sangat lama (Al Mutairi et al, 2006). Hasil penelitian yang dilakukan oleh Mahanem et al (2006) membuktikan bahwa, adanya pengaruh asap rokok dapat menurunkan kualitas (jumlah, motilitas dan morfologi) sperma epididimis dan menyebabkan kerusakan sel-sel testis. Penelitian yang dilakukan Nor Aina (2005) menyebutkan bahwa, paparan asap rokok dapat menghambat proses spermatogenesis secara nyata yang ditandai dengan penurunan jumlah sel-sel spermatogonium, spermatosit primer, spermatid dan lapisan sel spermatogenik serta penurunan kualitas spermatozoa secara nyata

yang ditandai dengan penurunan prosentase spermatozoa normal, kecepatan gerak spermatozoa, motilitas spermatozoa dan spermatozoa hidup.

Penelitian yang lain menyebutkan bahwa, nikotin dapat menyebabkan degenerasi sel testikular dan jaringan (Latha et al, 1993 Ashakumary and Vijaya, 1997). Nikotin memiliki efek terhadap hubungan antara jaringan testis dan radikal bebas, radikal bebas menyebabkan sel *injury* (Bui et al, 1995). Nikotin menyebabkan stres oksidatif di sel germinal (Yildiz et al, 1998). Nikotin dapat menghambat sel Leydig, sehingga menghambat testosteron (Paccifi, 1993). Nikotin yang terdapat dalam asap rokok arus samping 4-6 kali lebih dari asap rokok arus utama, hampir 40% anak dibawah 5 tahun terpapar asap tembakau (Susana et al, 2003).

Penelitian terdahulu telah menggambarkan bahwa, pajanan asap rokok dapat menurunkan kualitas dan kuantitas sperma, walaupun berbagai usaha telah dilakukan oleh pihak-pihak yang peduli terhadap kesehatan lingkungan dari asap rokok, seperti larangan merokok di tempat-tempat umum, instalasi khusus dan lain-lain, bahkan peringatan pemerintah pada kemasan rokok yang menyatakan bahwa, merokok dapat merugikan kesehatan tidak mendapat tanggapan baik dari masyarakat yaitu masih banyaknya jumlah perokok yang dari tahun ke tahun mengalami peningkatan (Joewana, 2004). Penelitian ini dilakukan untuk mengkaji lebih lanjut tentang pengaruh nikotin yang terdapat dalam asap rokok terhadap jumlah sel spermatosit primer, spermatid dan Leydig. Penelitian ini berbeda dari penelitian sebelumnya, yaitu melakukan pemajanan nikotin dengan waktu pemajanan lebih pendek dari penelitian sebelumnya dan hanya pemajanan nikotin tanpa pemajanan yang lain, maka penelitian ini perlu dilakukan dan diharapkan

dapat menambah wawasan tentang dampak nikotin yang terdapat dalam asap rokok yang dapat menimbulkan infertil pada reproduksi pria, sehingga dapat merubah perilaku untuk tidak merokok. Penelitian ini merupakan penelitian terapan yang dikerjakan secara eksperimental laboratorik dengan menggunakan hewan coba mencit sebagai model.

1.2. Rumusan Masalah

Rumusan permasalahan dalam penelitian ini adalah :

- a. Apakah pemberian nikotin subkutan berpengaruh terhadap jumlah sel spermatosit primer, spermatid dan Leydig pada mencit?
- b. Barapakah waktu minimal pemberian nikotin subkutan dalam penelitian ini yang dapat memberikan pengaruh terhadap jumlah sel spermatosit primer, spermatid dan Leydig pada mencit?
- c. Apakah ada perbedaan pengaruh antara pemberian nikotin subkutan dengan dosis 5 mg/kg berat badan/hari selama 1 minggu, 2 minggu dan 3 minggu terhadap jumlah sel spermatosit primer, spermatid dan Leydig pada mencit?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan umum

Tujuan umum dalam penelitian ini adalah mempelajari dan mengamati pengaruh nikotin terhadap jumlah sel-sel spermatogenik dan sel-sel Leydig pada mencit.

1.3.2. Tujuan khusus

- a. Membuktikan adanya pengaruh pemberian nikotin subkutan berpengaruh terhadap jumlah sel spermatosit primer, spermatid dan Leydig pada mencit?
- b. Membuktikan adanya waktu minimal pemberian nikotin subkutan dalam penelitian ini yang dapat memberikan pengaruh terhadap jumlah sel spermatosit primer, spermatid dan Leydig pada mencit?
- c. Membuktikan adanya perbedaan pengaruh antara pemberian nikotin subkutan dengan dosis 5 mg/kg berat badan/hari selama 1 minggu, 2 minggu dan 3 minggu terhadap jumlah sel spermatosit primer, spermatid dan Leydig pada mencit?

1.4. Manfaat Penelitian

1. Manfaat Akademis :

- a. Memperkuat teori yang telah ada tentang pengaruh nikotin terhadap testis.
- b. Memberikan informasi tentang gangguan spermatogenesis akibat pengaruh nikotin yang dapat menyebabkan penurunan sel-sel spermatogenik dan sel leydig, melalui stres oksidatif dan gangguan hormon testosteron yang berakibat resiko tinggi terjadinya infertil pada pria.

2. Manfaat Praktis :

- a. Memberikan informasi kepada masyarakat dan pemegang kebijakan tentang efek toksik nikotin terhadap testis bahwa, nikotin yang terdapat dalam rokok dapat mengakibatkan efek negatif terhadap kesehatan reproduksi pria, yaitu dapat mengakibatkan infertil pada reproduksi pria.
- b. Menambah wawasan tentang pengaruh nikotin pada tubuh.

BAB 2
TINJAUAN PUSTAKA

BAB 2

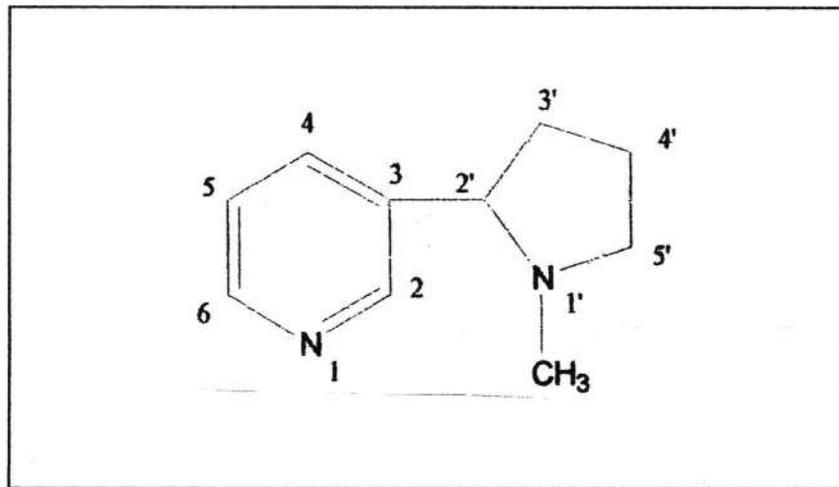
TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Rokok dan Nikotin

Nikotin terbentuk dalam akar tanaman tembakau pada tahap awal germinasi, namun dalam jumlah terbesar nikotin didapatkan dalam daun tanaman tembakau dan merupakan alkaloid utama (95%). Alkaloid merupakan senyawa yang bersifat basa yang mengandung satu atau lebih atom nitrogen. Alkaloid mengandung atom karbon, hidrogen, nitrogen dan pada umumnya mengandung oksigen. Senyawa alkaloid banyak terkandung dalam akar, biji, kayu maupun daun dari tumbuhan. Senyawa alkaloid merupakan hasil metabolisme dari tumbuh-tumbuhan dan digunakan sebagai cadangan bagi sintesis protein. Alkaloid merupakan kristal tak berwarna, tidak mudah menguap, tidak larut dalam air, larut dalam pelarut organik, bersifat basa, terasa pahit dan beracun, dapat membentuk endapan dengan larutan asam fosfowolframat, asam fosfomolibdat, asam pikrat, dan kalium merkuriiodida (Kakisina, 2003).

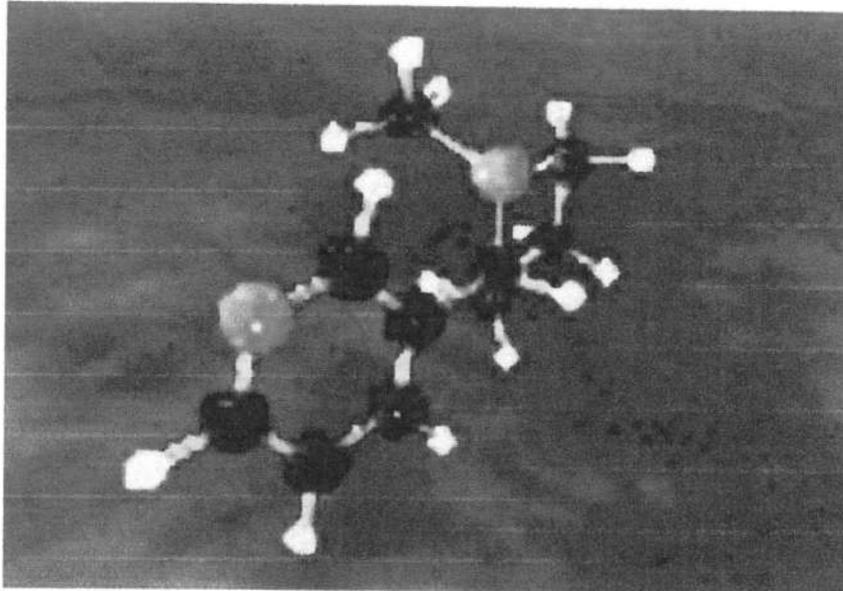
Nikotin adalah suatu alkaloid dengan nama kimia *3-(1-metil-2-pirolidil) piridin*, saat diekstraksi dari daun tembakau, nikotin tak berwarna, tetapi segera menjadi coklat ketika bersentuhan dengan udara. Nikotin dapat menguap dan dapat dimurnikan dengan cara penyulingan uap dari larutan yang dibasakan. Nikotin adalah bahan alkaloid toksik yang merupakan senyawa amin tersier, bersifat basa lemah dengan pH 8, pada pH tersebut, sebanyak 31% nikotin berbentuk bukan ion dan dapat melewati membran sel, sisanya nikotin berada

dalam bentuk ion dan tidak dapat melewati membran secara cepat sehingga di mukosa pipi hanya terjadi sedikit absorpsi nikotin dari asap rokok (Whalley et al, 1992).



Gambar 2.1 Struktur nikotin (*www. Nicotine independency index. Com, 2007*).

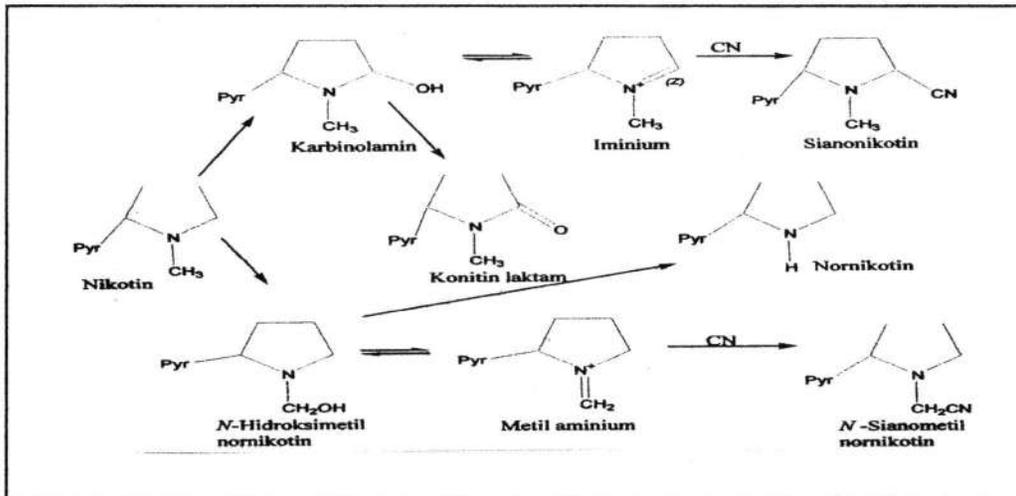
Nikotin adalah zat alkaloid yang ada secara natural di tanaman tembakau. Nikotin adalah unsur komposif yang amat beracun dan berbahaya untuk semua makhluk hidup. Nikotin adalah bahan alkaloid toksik yang terdapat dalam tembakau, banyak sigaret berisi kira-kira 8 - 9 mg nikotin, perokok umumnya mendapatkan 1 - 3 mg nikotin. Nikotin juga didapati pada tanaman-tanaman lain dari famili biologis Solanaceae seperti tomat, kentang, terung dan merica hijau pada level yang sangat kecil dibanding pada tembakau (*www. Nicotine independency index. Com, 2007*).



Gambar 2.2 Rumus kimia nikotin ([www. Nicotine independency index.com](http://www.Nicotine_independency_index.com), 2007)

Nikotin akan masuk ke sirkulasi darah setelah diabsorpsi, yaitu pada pH 7,4, kemudian didistribusikan ke jaringan tubuh. Afinitas ikatan nikotin dengan jaringan otak tinggi dan kapasitas ikatan reseptornya lebih besar pada perokok daripada bukan perokok. Nikotin dapat mencapai otak 10-20 detik setelah merokok, efek farmakologik nikotin tergantung dengan cara masuk dan dosis yang digunakan (Hukkanen dkk, 2005). Alkaloid nikotin mengalami proses metabolisme, yaitu suatu proses dimana nikotin mengalami perubahan struktur karena adanya senyawa-senyawa kimia di sekitarnya. Metabolit dari nikotin adalah konitin laktam. Transformasi metabolit ini mewakili semua oksidasi 4-elektron. Studi *in vitro* menunjukkan hilangnya nikotin dari campuran inkubasi tidak dihambat, walaupun pembentukan nikotin diblok secara sempurna. Metabolisme oksidatif pada nikotin dengan pembuatan mirkosomal hati kelinci dengan adanya ion sianida ditunjukkan dengan adanya isomer kedua senyawa siano nikotin. Pembentukan struktur *N*-(sianometil) nornikotin didapatkan dari gabungan nukleofilik oleh ion sianida pada senyawa antara jenis metil iminium.

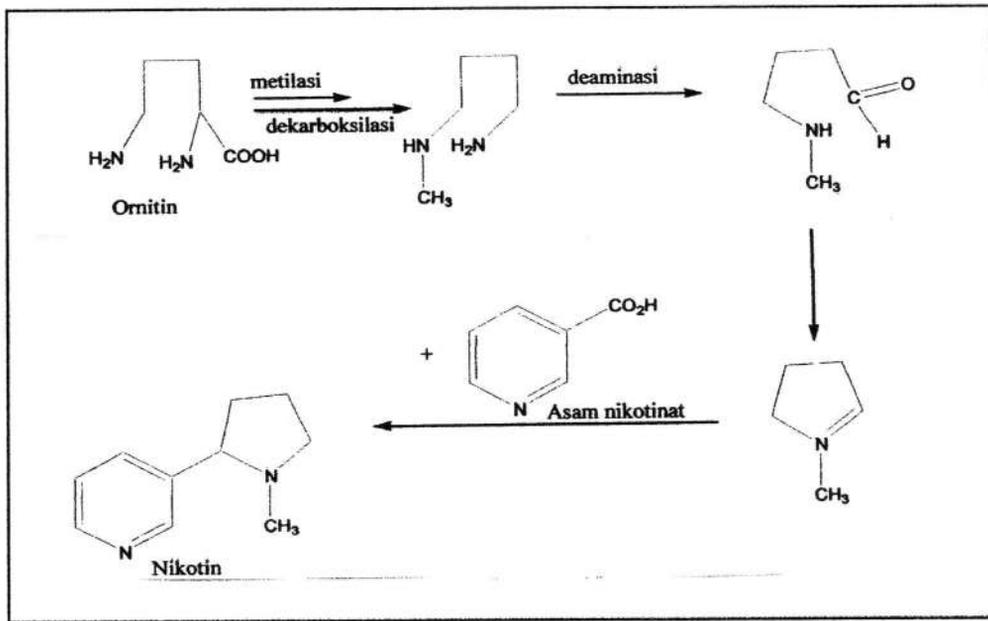
Senyawa ini dibentuk dengan ionisasi jenis *N* hidroksimetil normikotin. Senyawa antara karbinolamin yang sama terlihat pada *N*-demetilasi dari nikotin menjadi normikotin (Wolff, 1994).



Gambar 2.3 Metabolisme nikotin (Wolff, 1994).

Metabolisme nikotin berlangsung cepat terutama dalam sel hati, juga terjadi di jaringan lainnya walaupun tidak begitu aktif. Nikotin yang masuk dalam tubuh baik melalui hisapan rokok maupun suntikan akan menyebar dengan cepat hampir kesemua tubuh dan sebagian mengalami beberapa kali perubahan dan sisanya akan dikeluarkan melalui urin. Nikotin lebih cenderung ditransformasikan ke basis nitrogenisasi lain pada perokok sekunder, terutama didapatkan dalam fase partikel, karena itu didapatkan formasi banyak basis piridin dan sejumlah hidrokarbon aromatik atau heterosiklik, seperti naftalin dan kuinolin, didapatkan juga kotinin, perubahan nikotin oksigenasi yang dijumpai pada asap utama maupun asap sekunder. Kotinin adalah molekul yang hampir sama dengan nikotin, kecuali terdapat ketone yang disertai karbon dengan nitrogen dari siklus pirilodinik (Patterson et al, 1990).

Nikotin dapat disintesis dari sebuah asam amino yaitu ornitin, pada biosintesis nikotin, cincin pirolidin berasal dari asam amino ornitin dan cincin piridin berasal dari asam nikotinat yang ditemukan dalam tumbuhan tembakau. Gugus amino yang terikat pada ornitin digunakan untuk membentuk cincin pirolidin dari nikotin (Wolff, 1994).



Gambar 2.4. Biosintesis nikotin (Wolff, 1994).

Nikotin yang terdapat di tembakau, merupakan salah satu zat aditif. Nikotin adalah penghambat susunan syaraf pusat (SSP) yang mengganggu keseimbangan syaraf. Ketergantungan fisik dan psikologi pada nikotin berkembang sangat cepat, menghisap tembakau menghasilkan efek nikotin pada SSP dalam waktu kurang lebih sepuluh detik. Efek pada SSP dialami dalam waktu 3–5 menit, jika tembakau dikunyah. Rokok mengandung nikotin 8 - 9 mg, perokok umumnya menghisap satu hingga tiga miligram nikotin, pada perokok sigaret, kadar nikotin dalam darah naik secara cepat dan mencapai puncaknya pada waktu selesai

merokok, nikotin masuk ke otak secara cepat dalam waktu 10 detik, kemudian diedarkan ke seluruh tubuh (Britton J. dkk, 2001).

Nikotin membuat ketagihan. Ketagihan tersebut ditandai dengan keinginan yang menggebu untuk selalu mencari dan menggunakan, meskipun mengetahui akan konsekuensi negatif terhadap kesehatan. Nikotin mengaktifkan jaringan otak yang menimbulkan perasaan senang, tenang, dan rileks. Neurotransmitter dopamine adalah sebuah bahan kimia otak termasuk dalam perantara keinginan untuk terus mengkonsumsi, dalam penelitian menunjukkan bahwa nikotin meningkatkan kadar dopamine tersebut. Efek akut dari nikotin dalam beberapa menit menyebabkan perokok melanjutkan dosis secara frekuentif per harinya sebagai usaha mempertahankan efek kesenangan yang timbul dan mempertahankan diri dari efek ketergantungan. Nikotin dalam metabolisme dapat menghilang dari tubuh dalam beberapa jam, namun jika perokok terus menerus merokok dan semakin lama bertambah kuat sehingga merokok hanya untuk mendapatkan rangsangan yang diinginkan, jika menghentikan masukan nikotin biasanya diikuti dengan reaksi ketergantungan (*withdrawl syndrome*) yang mungkin membutuhkan waktu sekitar satu bulan atau lebih, hal tersebut termasuk gejalanya, yakni muncul sifat lekas marah, terlalu sensitif, kecanduan, pengurangan fungsi kognitif tubuh dan pemusatan perhatian, serta terjadi gangguan tidur (Britton dkk, 2001).

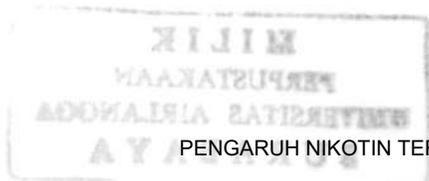
Nikotin bekerja dengan meniru bahan yang terjadi secara alami di dalam tubuh, bahan tersebut adalah neurotransmitter kimia *asetyholin (Ach)*, untuk bisa bekerja di dalam tubuh, segala sesuatu memerlukan mekanisme yang dapat menghubungkan ke bagian dalam sel (unit tubuh), seringkali mekanisme tersebut

melibatkan protein khusus yang disebut reseptor, reseptor ini biasanya hanya mengenali satu dari jutaan bahan kimia yang mengalir secara alami dalam tubuh, para ahli biologi menamakan reseptor yang mengenali *ACh* adalah *asetycolin reseptor (AChRs)*. Asetilkolin di dalam tubuh memiliki dua macam reseptor utama dan biasanya dinamakan menurut obat yang mengikat pada reseptor tersebut, yaitu nikotin dan muskarin. *Muscarin asetycholin reseptor (mAChRs)* dapat mengikat muskarin dan *ACh* berfungsi mengubah metabolisme sel (keseluruhan metabolisme tubuh), sedangkan reseptor nikotin yaitu *nicotine asetycholin reseptor (nAChRs)* bekerja pada reseptor asetilkolin, nikotin untuk membuka saluran atau pori dalam membran sel, bukaan tersebut memungkinkan beberapa jenis ion tertentu mengalir keluar masuk sel. *AChRs* nikotin terdapat di seluruh tubuh, terutama terkonsentrasi dalam sistem saraf yaitu otak, medula spinalis, dan sel saraf lain di dalam tubuh dan pada otot tubuh. Pemberian nikotin lewat merokok atau lainnya dapat menyebabkan kecanduan, efek nikotin beragam dan minimal tergantung pada cara kerjanya dalam sistem saraf (Goldfrank et al, 1990).

Dosis nikotin yang dapat membawa kematian mendadak pada dewasa kira-kira 60 mg basa dengan gejala sakit kepala, pusing, gangguan pendengaran dan penglihatan, gangguan mental serta lemah, kemudian pingsan dan sangat lemah, penurunan tekanan darah, pernafasan sukar, denyut nadi lemah, cepat dan tidak beraturan, kolaps serta kemungkinan diikuti kejang-kejang, kematian dapat terjadi dalam beberapa menit akibat kegagalan pernafasan (Whalley et al, 1992).

Kadar nikotin bisa berbeda-beda tergantung pada jenis rokok dan cara mengkonsumsinya, kadar yang dikonsumsi bisa 90% pada para perokok yang





menghirup asap tersebut dan 10% pada para perokok yang tidak sampai menghirupnya hanya disekitar mulut saja. Setiap perokok biasanya mengandung 2 miligram nikotin, kalau terdiri dari satu gram tembakau dan berat rokoknya sekitar lima gram, dapat disimpulkan bahwa, pecandu rokok yang seharusnya mengkonsumsi 50 batang tembakau, telah kemasukan 100 miligram tembakau dalam darahnya, ukuran itu sudah cukup membunuh manusia melauai nikotin tersebut (Patterson et al, 1990).

Kadar nikotin sejumlah 5 mgr (4-6 mgr) perhari dari rokok yang dihisap baru dapat menimbulkan ketagihan terhadap rokok dengan bioavabilitas nikotin 40% dari rokok yang dihisap. Benowitz memperhitungkan ambang batas kadar nikotin yang dihisap agar tidak ketagihan rokok adalah sebesar 0,4-0,5 mgr/batang rokok. Nikotin yang terkandung dalam rokok adalah sebesar 0,5 – 3 nanogram dan semuanya diserap sehingga didalam cairan ada sekitar 40-50 nanogram nikotin setiap 1 mlnya. Nikotin juga memiliki efek adiktif dan psikoaktif, perokok akan merasakan kenikmatan, kecemasan berkurang, toleransi dan keterikatan fisik, sehingga mengakibatkan para perokok sulit untuk berhenti (Benowitz, 1994).

2.2 Efek Nikotin Terhadap Sistem Reproduksi

Spermatogenesis dipengaruhi oleh berbagai faktor yaitu faktor endogen dan eksogen. Faktor endogen meliputi hormonal, psikologis dan genetik. Faktor eksogen berupa rokok, suhu, radiasi sinar-x, vitamin, gizi, trauma dan peradangan.(Mc. Lachland *et al*, 1996).

Rokok merupakan salah satu polutan berupa gas yang mengandung berbagai bahan kimia antara lain nikotin, karbonmonoksida dan tar. Bahan-bahan kimia tersebut bersifat toksik, terdiri dari nitrosamine dan oksigen reaktif yang dapat membentuk radikal bebas seperti nitrit oksida (NO), nitrit peroksida (NO₂) dalam fase gas serta quinine (Q), semiquinone (HQ) dan hydroquinone (HQ₂) dalam fase tar, zat-zat tersebut dapat bereaksi secara langsung dengan unsur-unsur ekstraseluler dan intraseluler seperti protein, lipid, karbohidrat dan DNA (Arief, 2006).

Rokok merupakan salah satu sumber radikal bebas yang berasal dari lingkungan luar. Asap rokok mengandung 1014-1015 partikel radikal bebas dalam satu kali hisap, radikal bebas ini dapat bereaksi dengan komponen sel yang penting untuk mempertahankan kehidupan, diantaranya adalah molekul penyusun membran sel, enzim dan DNA (Halliwell and Gutteridge, 1999). Radikal bebas adalah molekul atau senyawa yang mempunyai satu atau lebih elektron tidak berpasangan pada orbit terluarnya, karena adanya elektron tidak berpasangan tersebut, radikal bebas bersifat tidak stabil. Elektron yang tidak berpasangan tersebut cenderung menarik elektron lain dan mengubah molekul tersebut menjadi radikal bebas atau merusak struktur kimianya. Jumlah radikal bebas dalam batas tertentu akan bersifat positif terjadi pada keadaan metabolisme sel normal, yaitu untuk memelihara fungsi sel, keadaan ini dijaga oleh antioksidan sehingga fungsi sel tetap terjaga. Kadar radikal bebas yang rendah berperan untuk perangsangan kapasitas spermatozoa, reaksi akrosom dan penggabungan dengan oosit, pada kadar tinggi radikal bebas berpotensi menimbulkan efek toksik sehingga dapat berpengaruh pada konsentrasi dan fungsi spermatozoa. Stress oksidasi yang

menyebabkan oksidan lebih tinggi dari kadar antioksidannya menyebabkan efek patologik. Sel-sel spermatogenik sangat peka terhadap kerusakan yang ditimbulkan oleh radikal bebas, karena membran sel secara kuantitatif mengandung banyak asam lemak tidak jenuh, sitoplasmanya mengandung sedikit enzim peredam (*scavenging enzymes*) dan antioksidan intraseluler juga tidak cukup untuk melindungi membran sel, sementara penyediaan antioksidan sel-sel spermatogenik sebagian besar tergantung pada persediaan yang ada di ekstraseluler. Kadar radikal bebas yang tinggi tidak hanya mempengaruhi integritas DNA dalam inti sel-sel spermatogenik, tetapi juga kelenturan membran sel, sehingga menurunkan kualitas sel-sel spermatogenik. Kadar Peningkatan aktivitas radikal bebas mengakibatkan stress oksidatif, dimana terjadi ketidakseimbangan pro-oksidan dan antioksidan tidak dapat menetralkan reaksi radikal bebas. Stress oksidatif dapat memicu terjadinya peroksidasi lemak, denaturasi protein, bahkan kerusakan DNA (Silalahi, 2001).

Efek perusakan membran sel oleh radikal bebas terjadi melalui cara-cara sebagai berikut :

a. Peroksidasi lemak

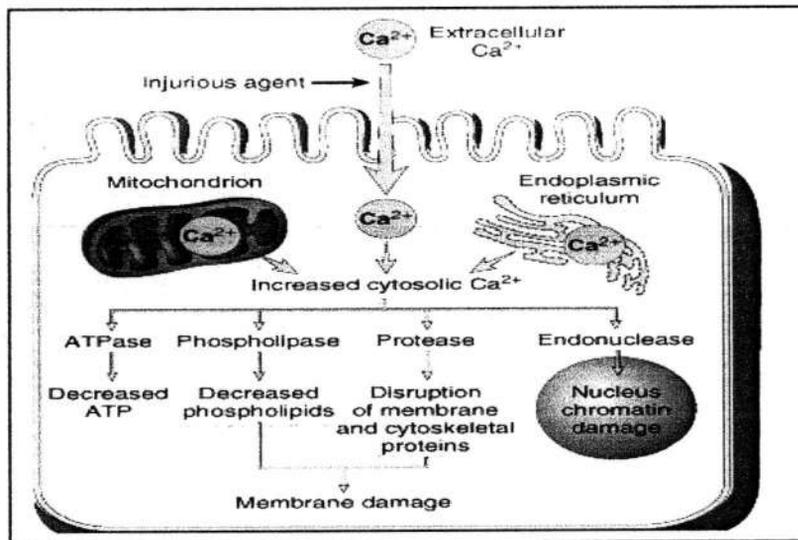
Lemak merupakan biomolekul yang sangat rentan terhadap serangan radikal bebas, sementara itu membran sel kaya akan sumber *poly unsaturated fatty acid* (PUFA) sehingga mudah sekali dirusak oleh bahan-bahan pengoksidasi. Membran sel terdiri dari fosfolipid bilayer. Protein tertanam didalam lapisan bilayer tersebut untuk suatu fungsi spesifik tertentu, seperti transfort molekul dan enzim, untuk dapat berfungsi dengan baik, membran harus memiliki fluiditas, unsur pokoknya harus dapat bergerak dengan bebas. Fluiditas sangat

ditentukan oleh keberadaan rantai samping PUFA pada lemak membran. Rantai samping PUFA sangat peka terhadap serangan radikal bebas yang mengakibatkan terjadinya peroksidasi lemak. Peroksidasi lemak terjadi karena radikal bebas yang bersifat reaktif dapat menarik atom hidrogen pada rantai samping PUFA. Atom hidrogen ($H\cdot$) itu sendiri hanya memiliki satu elektron. Hidrogen ini terikat pada rantai karbon yang terdapat dalam struktur asam lemak melalui ikatan kovalen atau berbagi pasangan elektron, oleh karena itu, karbon yang atom ($H\cdot$) nya diambil, sekarang memiliki elektron yang tidak berpasangan dan menjadi radikal bebas baru yaitu radikal karbon. Radikal karbon kemudian akan bereaksi dengan oksigen menjadi radikal peroksil. Radikal peroksil inilah yang menyerang ulang rantai samping PUFA menghasilkan radikal karbon dan radikal peroksil baru, reaksi ini akan berlangsung terus secara berantai, berakibat pada terjadinya kerusakan dari membran sel tersebut. Kerusakan membran sel menyebabkan terjadinya peningkatan permeabilitas membran dan kebocoran ion-ion sehingga mengakibatkan lisis dan kematian sel (Halliwell and Gutteridge, 1996).

b. Kerusakan protein

Stress oksidatif dapat menimbulkan kerusakan protein membran sel, yang salah satu fungsinya adalah sebagai kanal ion, sehingga akibatnya adalah terjadinya kebocoran ion dan berakhir pada peningkatan Ca^{2+} intrasel. Jumlah Ca^{2+} intrasel yang terlalu banyak akan mengaktifkan fosfolipase, protease dan endonuklease. Peningkatan aktivitas protease akan merusak komponen protein, fosfolipase akan merusak membran lipid sedangkan endonuklease akan merusak DNA dengan cara memotong rantai utama DNA tersebut sehingga

DNA menjadi terfragmentasi. Ca^{2+} yang tinggi juga akan mengaktifkan sel kehilangan “kerangka”nya sehingga sel tersebut mengalami perubahan bentuk dan terjadi pembengkakan sel atau *blebbing*, jika proses *blebbing* berlangsung terus-menerus, sel akan semakin membengkak dan mengalami lisis (Halliwell and Gutteridge, 1996).

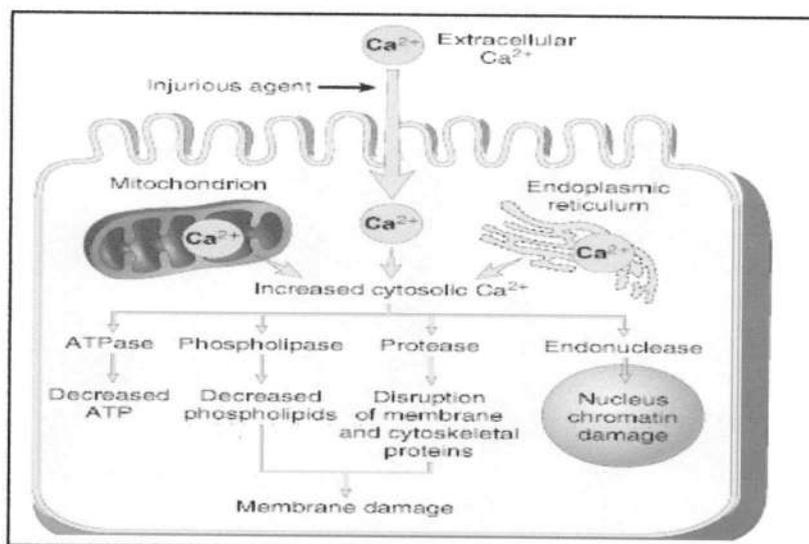


Gambar 2.5 Mekanisme kerusakan protein membran sel (Sherwood and Lauralee, 2004)

c. Kerusakan DNA

Perusakan DNA oleh radikal bebas juga dapat terjadi karena reaksi dengan radikal hidroksil ($\text{OH}\cdot$) yang terbentuk di dalam inti sel. Stress oksidatif dapat memicu pelepasan ion logam didalam sel, ion logam ini akan berikatan dengan DNA, ion logam yang berikatan dengan DNA tersebut dapat mengkatalis terbentuknya radikal hidroksil dari H_2O_2 melalui reaksi donor elektron dari ion logam kepada H_2O_2 . Fragmentasi DNA yang berlebihan, baik itu oleh radikal hidroksil maupun oleh enzim endonuklease, akan memicu terjadinya aktivasi enzim *poly (ADP-ribose) synthetase* didalam sel, enzim ini kemudian memecah molekul NAD^+ (*Nicotinamide Adenine Nucleotida*) dan mengikat pecahan

DNA menjadi terfragmentasi. Ca^{2+} yang tinggi juga akan mengaktifkan sel kehilangan “kerangka”nya sehingga sel tersebut mengalami perubahan bentuk dan terjadi pembengkakan sel atau *blebbing*, jika proses *blebbing* berlangsung terus-menerus, sel akan semakin membengkak dan mengalami lisis (Halliwell and Gutteridge, 1996).

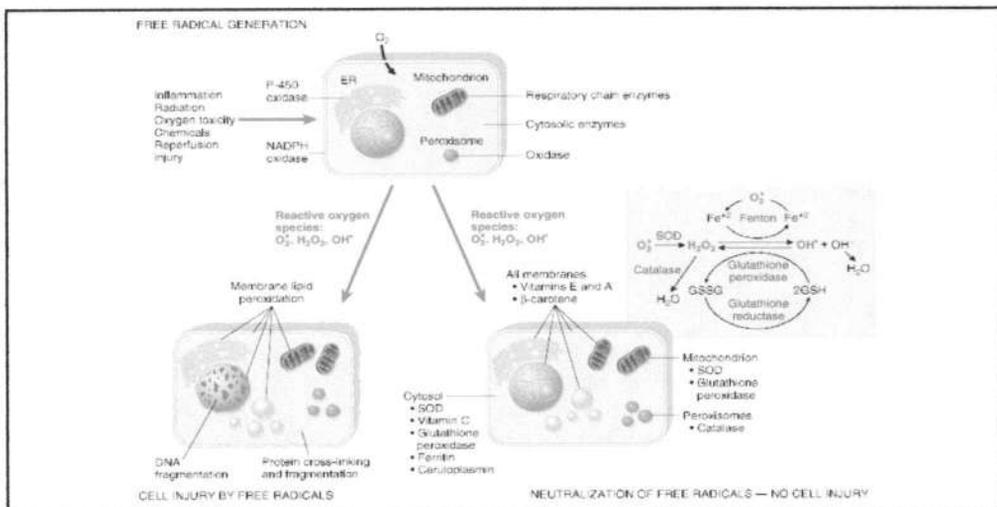


Gambar 2.5 Mekanisme kerusakan protein membran sel (Sherwood and Lauralee, 2004)

c. Kerusakan DNA

Perusakan DNA oleh radikal bebas juga dapat terjadi karena reaksi dengan radikal hidroksil ($\text{OH}\cdot$) yang terbentuk di dalam inti sel. Stress oksidatif dapat memicu pelepasan ion logam didalam sel, ion logam ini akan berikatan dengan DNA, ion logam yang berikatan dengan DNA tersebut dapat mengkatalis terbentuknya radikal hidroksil dari H_2O_2 melalui reaksi donor elektron dari ion logam kepada H_2O_2 . Fragmentasi DNA yang berlebihan, baik itu oleh radikal hidroksil maupun oleh enzim endonuklease, akan memicu terjadinya aktivasi enzim *poly (ADP-ribose) synthetase* didalam sel, enzim ini kemudian memecah molekul NAD^+ (*Nicotinamide Adenine Nucleotida*) dan mengikat pecahan

molekul NAD^+ tersebut dengan protein didalam inti sel yang memungkinkan terjadinya proses perbaikan DNA yang terfragmentasi. NAD^+ itu sendiri merupakan komponen yang penting dalam mengatur fungsi metabolisme sel, makin banyak ikatan DNA yang terputus, makin pula enzim *poly(ADP-ribose) synthetase* memecah molekul NAD^+ , dengan demikian jumlah NAD^+ yang diperlukan untuk mengatur fungsi metabolisme sel makin berkurang, konsekuensinya, metabolisme sel menjadi terganggu atau bahkan berhenti dan mengakibatkan terjadinya kematian sel (Halliwell and Gutteridge, 1996).



Gambar 2.6 Pembentukan radikal bebas dan netralisasinya dengan mekanisme antioksidan seluler (Sherwood and Lauralee, 2004).

Spermatozoa dilindungi oleh membran sel dari pengaruh lingkungan eksternal. Membran spermatozoa pada umumnya tersusun oleh lipid, glikolipid dan glikoprotein. Lipid membran bersifat hidrofilik dan hidropobik yang membentuk dua lapis lipid, lapisan ini berfungsi sebagai barier untuk molekul polar dan non polar. Protein membran berfungsi sebagai pompa, penghubung, reseptor dan transduser energi. Molekul ini terletak dipermukaan membran bagian tepi dan antara membran. Fungsi membran spermatozoa untuk menyelubungi

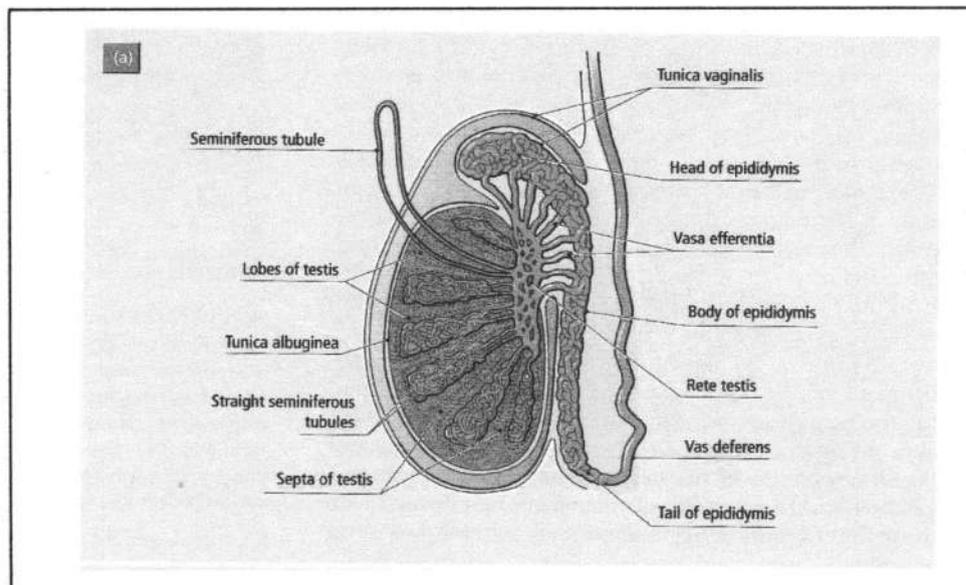
bagian luar sel mulai dari bagian kepala sampai ekor. Membran ini berfungsi untuk pendewasaan, motilitas, reaksi akrosom spermatozoa dan interaksi spermatozoa – sel telur. Membran sel dibagian kepala bagian depan adalah bagian yang stabil untuk reaksi akrosom, bagian ini mengandung *choline phospholipid* yang terdiri dari gliserol dan banyak rantai asam lemak tidak jenuh. Senyawa gliserol disebut juga plasmanogen yang berpotensi dalam pelepasan membran spermatozoa dan secara langsung menjaga membran sel dari stres oksidasi. Plasmanogen merupakan bagian utama dari membran spermatozoa saat proses pendewasaan. Biosintesis plasmanogen dikatalisis oleh enzim peroksisom yang terletak di membran spermatozoa. Secara fisiologik membran sel diperlukan untuk fertilisasi spermatozoa, proses ini sangat sulit jika kadar radikal bebas tinggi, sehingga terjadi peroksidasi yang dapat mengganggu fertilisasi (Alpiah, 2010).

Nikotin memberikan pengaruh yang kurang menguntungkan pada berbagai organ dan jaringan tubuh manusia, begitu juga pengaruhnya terhadap fungsi seksual pria, termasuk impotensi, sterilitas dan atrofi testis, selain itu pengaruh nikotin terhadap reproduksi pria dapat menyebabkan rendahnya hormon testosteron intratestikular sehingga dapat menginduksi ekspresi protein fas pada sel germinal, seperti yang dinyatakan oleh Nair, R and Chandrima, S (2003) bahwa, penurunan hormon testikular dapat menimbulkan peningkatan ekspresi protein fas, sehingga *deoksiribonuklease (caspase-activated deoxyribonuclease, CAD)* teraktivasi pada nukleus yang akhirnya menginduksi apoptosis sel germinal yaitu terjadi pada sel-sel spermatogenik dan dapat menyebabkan produksi spermatozoa menjadi menurun. Menurunnya produksi spermatozoa juga dapat terjadi karena pengaruh apoptosis sel germinal. Aktivasi kaspase 3 merupakan

jalur eksekutor sebelum terjadi apoptosis, aktivitas kaspase 3 yang lama secara tidak langsung dapat menyebabkan azoospermia (Kim et al, 2001 ; Said et al, 2004). Penurunan jumlah sel spermatozoa melalui beberapa mekanisme seperti adanya gangguan dalam proses meiosis, gangguan proses spermiogenesis awal karena lepasnya spermatid ke lumen tubulus dan karena terjadi apoptosis spermatid. Proses meiosis spermatosit primer menjadi spermatid sekunder dan membentuk spermatid diatur oleh testosteron dan FSH melalui aksinya pada sel sertoli. Penurunan tersebut dihubungkan dengan penurunan testosteron dan FSH. (Mc Lachlan, 2000).

2.3 Sistem Reproduksi Jantan

2.3.1 Anatomi testis



Gambar 2.7 Anatomi testis (Jhonson, 2006)

Testis terletak di luar rongga abdomen, dengan satu testis pada tiap-tiap sisi skrotum, bentuknya lonjong dengan ukuran tebal 2 cm, lebar 3 cm dan panjang 4 cm (Bloom dan Fawcet, 2002). Berat kedua testis antara 25-27 gr,

sedangkan berat testis tikus sekitar 3,7 gr (Paz et al, 1993). Testis terletak dalam skrotum dan dibungkus oleh simpai testis yang terdiri dari 3 lapisan yaitu lapisan terluar yaitu tunika vaginalis, lapisan tengah yaitu tunika albuginea dan lapisan terdalam yaitu tunika vaskulosa (Leeson, 1996 ; Junquiera, 1997 ; Bloom dan Fawcet, 2002).

Tunika albuginea testis menebal pada permukaan posterior testis dan menjorok masuk ke dalam kelenjar sebagai mediastinum testis, sekat-sekat fibrosa yang tipis menyebar dari mediastinum testis ke arah sampai testis dan membagi permukaan dalam testis menjadi kurang lebih 250 bangunan berbentuk piramid yang disebut lobuli testis dengan puncaknya menghadap mediastinum (Leeson, 1996). Tiap lobulus berisi 1-4 tubulus yang berkelok-kelok yaitu tubulus seminiferus, masing-masing tubulus mempunyai diameter 150-300 μm dan panjang sekitar 50 cm. Total panjang tubulus sekitar 250 m. Tubulus seminiferus merupakan bagian testis yang menghasilkan spermatozoa, lebih dari 200 juta spermatozoa dihasilkan tubulus perharinya (Nowak and Ilanford, 1999). Panjang rata-rata satu tubulus seminiferus dari ujung ke ujung kurang lebih 32,2 cm dan diameter kurang lebih 2,50 mikron pada tikus dewasa. Jumlah sel spermatozoa yang dihasilkan kurang lebih 86 juta perhari. Tiap tubulus seminiferus selanjutnya dekat mediastinum menjadi tubulus yang lurus yaitu tubulus rectus yang merupakan bagian pertama sistem saluran keluar. Tubulus rectus selanjutnya menuju ke rete testis, sistem ruang-ruang yang rumit di media. Tunika albuginea yang ada di sebelah luar, dibungkus oleh lapisan serosa yang membentuk lapisan viseralis, yaitu tunika vaginalis propria testis selama kehidupan fetal, testis turun dari rongga abdomen ke dalam skrotum dan bersama dengan itu membawa

kantung peritoneal yang membentuk tunika vaginalis propria. Tunika albuginea disebelah dalam, melanjutkan diri menjadi suatu jaringan ikat longgar yang vaskuler, yaitu jaringan interstisial yang mengelilingi tubulus seminiferus dan mengisi lobulus. Jaringan interstisial ini berisi pembuluh darah, saraf, limfe dan sel-sel epiteloid yang disebut sel-sel interstisial atau sel Leydig yang mempunyai fungsi endokrin (Geneser, 1994; Junquiera, 1997).

Alat dan organ kelamin jantan terdiri dari alat kelamin primer berupa sepasang testis dan alat kelamin sekunder berupa kelenjar aksesoris yaitu kelenjar bulbourethralis, kelenjar vesikula seminalis, dan kelenjar prostat, serta alat kelamin kopulasi yang disebut penis. Testis berkembang dalam rongga abdomen dan dalam keadaan normal bermigrasi ke skrotum selama perkembangan fetus dan agak bervariasi dari spesies mamalia satu ke spesies mamalia yang lain dalam hal bentuk, ukuran, dan lokasi tetapi stuktur penyusunan utamanya sama (Frandsen, 1992). Testis terletak pada rongga skrotum dan terbungkus oleh kantung skrotum yang berfungsi menjaga kestabilan suhu testis dan melindungi testis dari trauma benda keras. Testis pada golongan rodensia (kelinci, tikus, mencit) dapat dengan mudah berpindah-pindah dari skrotum ke dalam rongga perut. (Poernomo, 1999).

2.3.2 Tubulus seminiferus

Tubulus seminiferus terdiri atas suatu lapisan jaringan ikat fibrosa, lamina basalis yang berkembang baik dan suatu epitel germinal kompleks atau seminiferus yang merupakan modifikasi epitel berlapis kuboid (Leeson, 1996).

Spermatogenesis merupakan suatu proses yang diperkirakan terjadi selama 64 hari, pada tikus putih terjadi selama 40-50 hari, dimulai dengan spermatogonium yang letaknya tepat di atas lamina basalis. Spermatogonium merupakan satu-satunya sel benih yang ada sampai masa pubertas dan mengandung kromosom diploid dalam inti selnya yaitu 44 autosom dan 2 kromosom sex, x dan y. (Geneser, 1994; Leeson, 1996; Junquiera, 1997).

a. Spermatogonium

Spermatogonium adalah sel pertama dari spermatogenesis. Dibedakan dua jenis spermatogonium pada epitel tubulus seminiferus yaitu, 1). Spermatogonium tipe A intinya bulat atau lonjong, dengan kromatin yang sangat halus dan satu atau dua anak inti. Sel ini merupakan sel induk dan akan mengalami beberapa kali mitosis, beberapa di antara sel ini tetap menjadi spermatogonium tipe A dan beberapa lainnya menjadi tipe B dan 2). Spermatogonium tipe B intinya bulat dengan bintik-bintik kromatin yang bervariasi ukurannya dan hanya terdapat satu anak inti, bila sel ini membelah diri berdiferensiasi menjadi spermatosit primer (Geneser, 1994).

b. Spermatosit primer

Spermatosit primer bergerak ke arah lumen dan terletak dalam lapisan sel lebih ke arah lumen daripada spermatogonium, bersamaan dengan itu, sel bertambah besar (Geneser, 1994). Spermatosit primer merupakan sel benih terbesar yang terdapat dalam tubulus seminiferus, berdiferensiasi sel spermatosit primer, taut kedap atau *tight junction* di antara sel Sertoli yang berdekatan akan hilang, sehingga memungkinkan berpindahannya spermatosit dari ruang basal ke ruang adluminal. *Tight junction* selanjutnya akan terbentuk

kembali di antara spermatosit dan spermatogonium. Spermatosit menempati daerah tengah epitel, intinya bulat. Pembelahan yang terjadi pada spermatosit primer adalah meiosis yang menghasilkan spermatosit sekunder dengan membawa 23 kromosom terdiri dari 22 autosom; satu kromosom sex, x atau y) tiap selnya (Leeson, 1996).

c. Spermatosit sekunder

Spermatosit sekunder lebih kecil dibanding spermatosit primer. Sel ini dengan cepat memasuki pembelahan meiosis kedua dan jarang tampak pada sediaan histologik, inti bulat berisi kromatin kasar. Pembelahan spermatosit sekunder menghasilkan spermatid yang mengandung 23 kromosom tiap selnya (Junquiera, 1997).

d. Spermatid

Spermatid terletak dalam lapisan sel dekat lumen. Inti sel hampir memenuhi seluruh sitoplasmanya, warna inti pucat dan eksentris, sel sangat kecil hingga mudah dikenali (Wonodirekso, 2000).

e. Spermiogenesis

Spermiogenesis merupakan stadium akhir spermatogenesis. Prosesnya berupa spermatid yang berdiferensiasi menjadi spermatozoa. Tidak terdapat pembelahan sel pada proses ini (Geneser, 1994). Spermiogenesis dapat di bagi menjadi 3 fase yaitu 1). Fase Golgi, sitoplasma spermatid mengandung kompleks golgi yang mencolok dekat dengan inti, mitokondria, sepasang sentriol ribosom bebas dan retikulum endoplasmik halus. Granula proakrosom kecil berkumpul dalam komplek golgi dan kemudian menyatu membentuk satu granula akrosom yang terdapat di dalam gelembung akrosom berbatas membran. Sentriol

bermigrasi ke posisi dekat permukaan sel dan berlawanan dengan lokasi dari akrosom. Pembentukan aksonema berflagel dimulai dan sentriol bermigrasi kembali ke arah inti, sambil memilin komponen aksonema sewaktu bergeser (Junquiera, 1997). 2). Fase akrosomal, gelembung dan granula akrosomal menyebar untuk menutupi belahan anterior dari inti yang memadat dikenal sebagai akrosom. Akrosom menggandeng beberapa enzim hidrolitik. Akrosom berfungsi sebagai lisosom berjenis khusus. Enzim ini melepaskan sel sperma dari korona radiata dan mencernakan zona pelucida, bila spermatozoa bertemu dengan ovum, maka membran luar akrosom menyatu dengan membran plasma pada beberapa tempat dan membebaskan enzim akrosom. Proses ini dikenal sebagai reaksi akrosom (Junquiera, 1997). Pembentukan akrosom berlangsung di satu kutub inti, sentriol berhubungan dengan membran inti sel pada kutub berlawanan dan satu flagel halus tumbuh dari salah satu sentriol. Suatu selubung tipis yang disebut tabung kauda atau manset terbentuk mengelilingi sumbu flagel pada saat flagel tumbuh, sedangkan sentriol lain bergerak pindah ke arah permukaan sel dan melingkar sumbu panjang filamen seperti suatu cincin atau annulus. Inti sel memadat, agak gepeng-memanjang dan berpindah ke arah membran sel dan terbentuklah kepala sperma yang tetap, secara bersamaan terjadi pergeseran massa sitoplasma ke arah ujung ekor sel. Mitokondria yang selama itu tersebar secara tidak teratur di sitoplasma, bergerak ke daerah antara sentriol basal dan annulus. Mitokondria tersusun dalam bentuk spiral atau heliks, mengitari bagian proksimal flagel, membentuk selubung mitokondria sehingga membatasi bagian tengah spermatozoa yang sedang terbentuk, pada saat diferensiasi berlangsung, sebagian besar sitoplasma yang berlebihan dibuang sebagai badan-badan residu dan hanya

selapis tipis sitoplasma tertinggal yang membungkus inti, bagian tengah dan bagian ekor spermatozoa, badan-badan residu difagositosis oleh sel Sertoli, lemaknya tetap tertinggal di dalam sitoplasma sel Sertoli dan merupakan bagian terbesar lemak yang terdapat di dalam sel Sertoli, yaitu tempat spermatid melekat, terdapat bukti yang menunjukkan bahwa lemak tersebut digunakan oleh sel Sertoli untuk membentuk hormon yang mempunyai peranan penting dalam mengatur spermatogenesis setempat, susunan bagian ekor mirip dengan silia yaitu mempunyai susunan dan jumlah filamen longitudinal yang sama (Leeson, 1996).

3). Fase Pematangan, sitoplasma residu dibuang dan difagositosis oleh sel Sertoli dan spermatozoa dilepaskan ke dalam lumen tubulus atau spermiasi (Junquiera, 1997).

f. Spermiasi

Spermiasi adalah istilah yang menunjukkan pelepasan spermatozoa dari epitel seminiferus dengan diferensiasi spermatid, spermatozoa bergerak lambat ke arah permukaan epitelium dengan proliferasi generasi germinal berturut-turut di belakangnya. Stadium akhir perkembangan, ekornya berproyeksi ke dalam lumen, nukleus tertutup akrosom dan tambahan kelebihan sitoplasma berbentuk tabung menempati tempat yang sesuai pada permukaan apikal sel Sertoli, selama pelepasan spermatozoa, kepala tampak aktif dikeluarkan oleh sel Sertoli, dan tambahan kelebihan sitoplasma yang berbentuk tabung diambil, membebaskan spermatozoa dan meninggalkan massa sitoplasma spermatid tanpa nukleus, disebut badan residual (Bloom dan Fawcett, 2002).

g. Spermatozoa

Spermatozoa pada manusia terdiri atas bagian kepala, bagian tengah dan bagian ekor. Bagian kepala terdiri atas inti dan akrosom yang memadat di bagian anterior kepala. Bagian kepala mengandung DNA. Akrosom mengandung hyaluronidase yaitu enzim yang mempermudah masuknya spermatozoa ke dalam sel telur. Bagian tengah terpisah dari bagian kepala melalui leher sempit, yang mengandung filamen-filamen memanjang diselubungi mitokondria. Bagian ekor memiliki dua filamen pusat dan sembilan pasang filamen tepi. Sel spermatozoa ini biasanya terdapat dalam kelompok, menempel pada permukaan sel Sertoli (Wonodirekso, 2003).

2.3.4 Sel Sertoli

Sel Sertoli jumlahnya relatif lebih sedikit dan tersusun sepanjang tubulus pada jarak yang teratur di antara sel spermatogonium (Wonodirekso, 2003). Sel tinggi seperti tiang, dasarnya terletak pada lamina basalis, bentuk sel tidak teratur, tidak tampak jelas dan sangat kompleks karena kepala spermatozoa matang menempati cekungan sitoplasmanya. Inti bentuk bulat lonjong, pucat, tersusun radial, anak inti jelas (Leeson, 1996; Paz et al, 1993). Fungsi sel Sertoli adalah sebagai berikut 1). Menunjang, melindungi, mengatur nutrisi spermatozoa. 2). Fagositosis kelebihan sitoplasma spermatid atau residu. 3). Sekresi suatu cairan untuk transpor sperma ke tubulus seminiferus, juga mensekresikan peptida yang disebut inhibin, yang menekan sekresi FSH dan melepaskannya dalam kelenjar hipofisa anterior. 4). Produksi hormon anti-mullerian, hormon ini bekerja selama perkembangan embrional, untuk memudahkan regresi saluran muller atau paramesonefros (Junquiera, 1997; Vander et al, 2001).

2.3.5 Sel Leydig

Sel Leydig terdapat di jaringan interstisial di antara tubulus seminiferus. Sel Leydig berkelompok memadat, sel besar, sitoplasma sering tampak bervakuola, inti mengandung butir kromatin kasar, anak inti jelas, ditemui sel dengan 2 inti. Sitoplasma kaya *bends inclusi* seperti titik lipid. Fungsinya menghasilkan hormon testosteron (Geneser 1994 ; Bloom dan Fawcett, 2002).

Spermatogenesis adalah proses pembelahan dan perkembangan spermatogonis atau *germ cell* membentuk spermatozoa yang terjadi di dalam testis. Spermatogenesis adalah proses produksi dan maturasi gamet jantan yang berkembang secara progresif dari daerah basal tubulus seminiferus ke arah lumen. Tubulus seminiferus berperan sebagai unit fungsional untuk proses spermatogenesis. Bagian dalam tubulus seminiferus tersusun oleh jaringan ikat, sel somatik, dan sel germinal yang berkembang dengan susunan yang teratur. Sel germinal dalam tahap awal proses spermatogenesis dinamakan spermatogonia yang terletak pada bagian perifer, sedangkan tahap selanjutnya mengarah ke bagian interior hingga ke lumen. Proses spermatogenesis dibagi menjadi 2 yaitu spermatositogenesis dan spermiogenesis. Proses spermatositogenesis merupakan rangkaian perubahan sel spermatogonia menjadi spermatid. Spermatogonia merupakan sel bakal spermatozoa terletak pada membran basal epitelium tubulus seminiferus, dengan ciri-ciri inti vesikular dengan membran inti yang jelas. Spermatogonia memperbanyak diri atau mengadakan proliferasi secara kontinyu melalui proses mitosis menghasilkan spermatogonia dalam jumlah besar. (Augood et al, 1998).

Proses spermatogenesis pada mencit secara ringkas adalah sebagai berikut : spermatogonium A membelah secara mitosis menjadi spermatogonium intermediet yang selanjutnya membelah menjadi spermatogonium B. Spermatogonium B akhirnya membelah secara mitosis membentuk spermatosit primer *preleptene*. Tahap kedua spermatogenesis, spermatosit membelah secara meiosis yang akhirnya terbentuk spermatid. Pada tikus/mencit sel spermatogonia dapat dibedakan menjadi 2 tipe yaitu sel *dusty* atau spermatogonia tipe A dan sel *crusty* atau spermatogonia tipe B, diantara kedua tipe tersebut terdapat spermatogonia intermedia. Sel spermatogonia ini dibedakan menjadi 3 tipe yaitu spermatogonia tipe A gelap, tipe A pucat, dan tipe B. Spermatogonia A atau sel germinal mengalami proses pembelahan menjadi spermatogonia A-1 dan spermatogonia A-0 merupakan cadangan dan tidak berkembang sampai terbentuknya spermatosit primer. Spermatogonia A-1 masuk dalam siklus spermatogenesis dan mengalami pembelahan menjadi spermatogonia intermedia. Spermatogonia intermedia akan membelah dan kemudian menjadi lebih besar yang disebut dengan sel spermatogonia B. Spermatogonia B berkembang menjadi spermatosit primer. Spermatosit primer mengalami pembelahan meiosis yang mengakibatkan terjadinya reduksi jumlah kromosom dari diploid menjadi haploid. Pembelahan meiosis pertama diawali dengan stadium praleptoten, leptoten, zygoten, pakhiten, dan stadium diploten yang akhirnya akan menghasilkan spermatosit sekunder, kemudian memasuki pembelahan meiosis kedua yang menghasilkan spermatid yang haploid. Spermatid kemudian mengalami perubahan menjadi spermatozoa melalui proses diferensiasi yang kompleks yang disebut sebagai proses spermiogenesis. (Tienhoven,1983)

Spermiogenesis dibagi menjadi 4 fase, yaitu 1). Fase golgi ditandai dengan adanya gelembung akrosom dan kraniokaudal yang simetris. 2). Fase *cap*, spermatid memanjang dan kromosom tampak lebih berkembang menutup setengah bagian cranial sampai dua pertiga spermatid. 3). Fase akrosom, nucleus sel lebih terkondensasi dan sel lebih memanjang. 4). Fase maturasi spermatid ditandai dengan estrusi sisa sitoplasma yang disebut sebagai *residual body*. *Residual body* selanjutnya difagositosis oleh sel Sertoli, setelah melalui keempat fase tersebut, spermatozoa matang siap ditransportasikan ke lumen tubulus sebagai suatu spermiasi (Johnson and Everitt, 2000).

Proses ini dimulai dengan pembagian sel muda atau stem cell dan diakhiri dengan pembentukan spermatozoa. Waktu yang diperlukan untuk satu siklus spermatogenesis pada setiap spesies berbeda (Tienhoven, 1986).

Tabel.2.1 Perbedaan waktu siklus spermatogenesis pada beberapa spesies

No	Spesies	Siklus spermatogenesis
1	Mencit (<i>Mus musculus</i>)	34 hari
2	Tikus/rat (<i>Rattus norvegicus</i>)	49 hari
3	Rabbit (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	44 hari
4	Sheep (<i>Ovis aries</i>)	40-49 hari
5	Manusia (<i>Homo sapiens</i>)	74 hari

Sumber : Tienhoven, 1986

Tiga tahap utama yang terjadi dalam spermatogenesis adalah :1). Perbanyakkan spermatogonia melalui mitosis atau spermatositogenesis. 2). Reduksi jumlah kromosom melalui meiosis. 3). Transformasi sel menjadi spermatosit yang berstruktur kompleks melalui serangkaian perubahan tanpa disertai pembelahan sel atau spermiogenesis (Hafez,1993).

Spermatozoa tersusun atas tiga bagian pokok yaitu kepala yang mengandung kromosom, leher banyak mengandung mitokondria penghasil energi untuk metabolisme dan motilitas spermatozoa, ekor yang berguna dalam pergerakan, sebagian besar kepala berisi inti, dua pertiga bagian inti diselaputi tutup akrosom. Jika terjadi pembuahan maka tutup akrosom pecah, dari akrosom keluar enzim-enzim, yang terpenting diantaranya hialuronidase dan protease. (Yatim, 1994).

2. 4 Histologi Testis

Testis terdiri dari tubuli seminiferi dan sel-sel interstisial Leydig yang ada di dalam ruang-ruang berbentuk segitiga diantara buli. Interstisium mengandung banyak pembuluh darah dan limfa, namun tubuli sama sekali tidak berpembuluh, seluruh komponen epitel tubuli harus diberi nutrisi dan dipelihara kebutuhannya akan zat-zat esensial yang diberikan oleh sirkulasi secara difusi. Sel-sel germinal yang paling muda atau spermatogonium terdapat pada permukaan dalam membran basalis dan ditutupi oleh dasar elemen-elemen somatik yang sangat besar yang disebut sel Sertoli. Tunika propria atau dinding tubuli, juga mengandung sel-sel seperti otot polos atau mioid, berkas-berkas serabut seperti kolagen, dan suatu lapisan luar sel-sel endotel yang melapisi ruang-ruang limfa secara ekstensif yang ada di dalam interstisium. Lumen tubuli mengandung cairan yang mensuspensikan secara khas spermatozoa. Cairan ini secara aktif disekresikan oleh tubuli seminiferi dan rete testis serta dicurahkan oleh duktus deferens ke dalam epididimis, sekresi dapat dikumpulkan dengan memasukkan kanula ke

dalam tubuli atau rete testis. Analisis kimia menunjukkan bahwa komposisinya tidak seperti komposisi plasma darah maupun limfa dari testis. (Geneser, 1994).

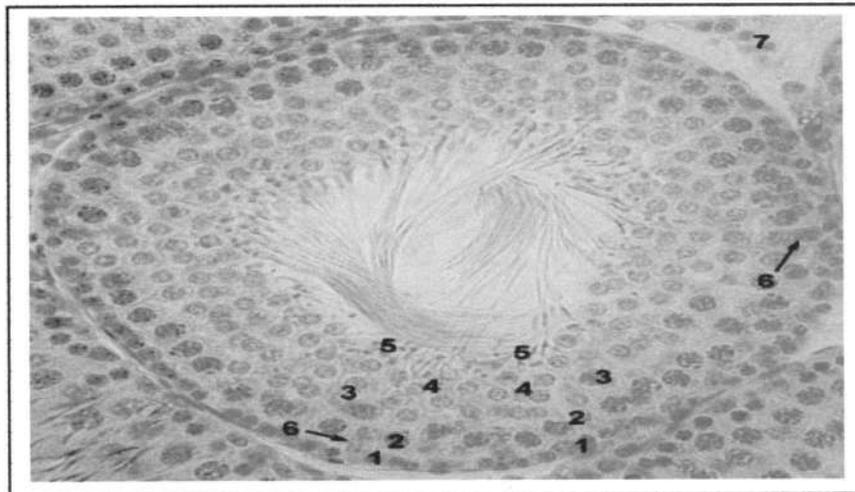
Sel-sel Sertoli bersama dengan sel-sel mioid peritubuler, menyusun sawar darah testis kira-kira sebanding dengan sawar darah otak. Spermatogonium menduduki kompartemen basal dan dapat terkena paparan hormon-hormon esensial apabila sambungan-sambungan mioid terbuka. Sel-sel germinal lain bergerak ke arah lumen diantara sel-sel Sertoli yang sambung-menyambung. Kompleks sambungan khusus terdapat diantara membran sel-sel Sertoli yang berdekatan, sambungan ini menandai awal kompartemen ad luminal, mengandung spermatosit dan spermatid, serta mengantur komposisi cairan tubuli (Ismudiono, 1999).

Permukaan luar testis dilapisi tunika vaginalis propria yang merupakan modifikasi dari lapisan peritoneal di bagian dalamnya dilapisi tunika albuginea yang merupakan lapisan tebal yang terdiri dari jaringan ikat fibrosa yang membungkus jaringan fungsional testis, lapisan ini membentuk sekat-sekat ke arah dalam yang disebut dengan septula testis, pada masing-masing lobuli terdapat suatu bentukan yang disebut dengan tubulus seminiferus, di dalam tubulus seminiferus inilah proses spermatogenesis terbentuk. (Poernomo,1999)

Potongan melintang dari testis akan nampak bentukan tubulus yang banyak sekali. Dinding yang ada pada tubulus seminiferus ini terdiri dari tiga lapisan, yaitu dari luar ke dalam adalah tunika propria yang terdiri dari jaringan fibroblastik, lamina basalis, dan lamina epithelium. Lapisan tunika propria ini pada hewan berfungsi sebagai alat transport sel spermatozoa dari tubulus seminiferus ke epididimis dengan berkontraksi, sehingga sel spermatozoa bisa

keluar. Lapisan epitelium terdiri dari dua jenis sel yaitu sel Sertoli dan sel germinatif. Sel-sel germinal atau sel-sel spermatogenik menyusun suatu lapisan epitelium berlapis pipih empat sampai delapan lapis sel yang meliputi bagian dalam tubulus seminiferus. Sel-sel ini mengalami perubahan yang progresif mulai dari daerah dasar tubulus seminiferus mengarah ke pusat lumen mengakibatkan jumlah yang meningkat maka sel-sel ini didesak ke arah lumen. (Frandsen, 1992)

Sel Sertoli mempunyai bentukan yang panjang dan kadang seperti piramid, terletak dekat diantara sel-sel germinal. Sel Leydig yang mempunyai peran penting dalam spermatogenesis yang terdapat di luar tubulus seminiferus, di luar tubulus seminiferus terdapat tenunan pengikat yang disebut dengan sel stoma yang kaya akan pembuluh darah, limfe, sel syaraf, dan sel makrofag (Ismudiono, 1999)



Gambar 2.9 Histologi testis

(www.histol.chuvashia.com histol.narod.ru histol.boom.ru)

Keterangan :

1. *Tubule seminiferous*
2. *Spermatogonia*
3. *Primary spermatocyte*
4. *Secondary spermatocytes*
5. *Spermatids*
6. *Nuclei of sertoli cells*
7. *Leydig cells*

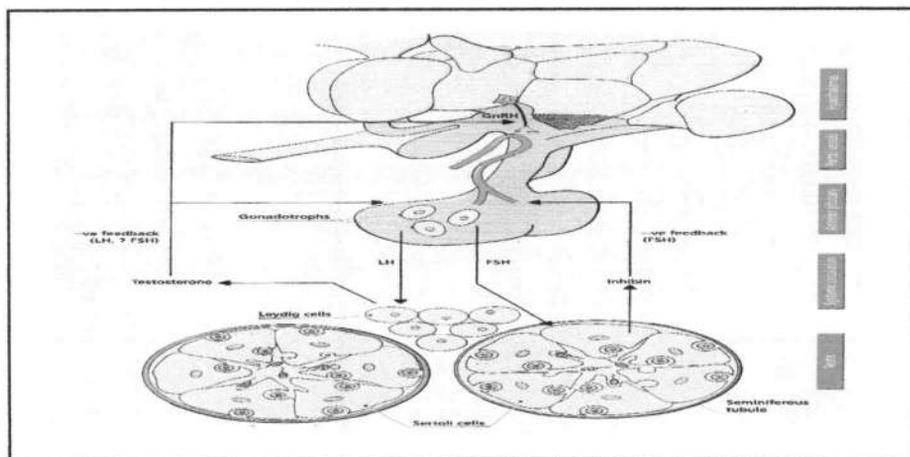
2.5 Pengaturan Fungsi Testis

Testis mempunyai dua fungsi utama yaitu fungsi endokrinologi dan fungsi reproduksi. Fungsi endokrin dari testis yaitu menghasilkan hormon steroid yaitu androgen dan estrogen dan hormon non steroid atau inhibin. Fungsi testis adalah menghasilkan sel kelamin jantan di dalam tubulus seminiferus. Perkembangan dan fungsi testis dipelihara oleh gonadotropin dari kelenjar hipofisis anterior. Testis dikontrol oleh dua hormon gonad yang disekresi oleh hipofisa anterior yaitu *Interstitial Cell Stimulating Hormon* (ICSH) atau LH dan *Folikel Stimulating Hormon* (FSH). Sekresi FSH dan LH dari hipofise anterior dirangsang oleh hormon hipotalamus yaitu *Gonadotropin releasing Hormon* (GnRH) (Hafez,1993).

Hipotalamus dalam system reproduksi mamalia berfungsi menghubungkan susunan syaraf pusat dan proses reproduksi dengan jalan mengirimkan sinyal neurohormonal (GnRH) ke hipofisis anterior. GnRH merangsang kelenjar hipofisa untuk mengeluarkan hormon gonadotropin yaitu FSH dan LH yang selanjutnya akan mempengaruhi testis untuk berfungsi. FSH menstimulir pertumbuhan sel-sel germinatif dari tubulus seminiferus dan mendorong terjadinya proses spermatogenesis secara sempurna. LH menstimulir aktifitas dan pertumbuhan sel-sel Leydig dalam jaringan interstitial untuk menghasilkan hormon testosteron, yang penting untuk spermatogenesis terutama pada proses pematangan spermatozoa di dalam epididimis, testosteron juga mengontrol sekresi hormon GnRH dan LH melalui mekanisme umpan balik negatif pada hipotalamus dan hipofise anterior, sebagian dari hormon testosteron ini akan mengalami proses aromatisasi menjadi estrogen (estradiol 17β) di dalam sel Sertoli. Sel Sertoli

merupakan sel target dari FSH dan berfungsi untuk memicu proses spermatogenesis serta memberi nutrisi sel-sel spermatozoa dan mempunyai kemampuan memakan sel spermatozoa yang telah mati atau mengalami degenerasi. Sel Sertoli juga berperan dalam menyediakan lingkungan yang perlu untuk berdiferensiasi dan pematangan sel kelamin, termasuk sekresi *Androgen Binding Protein* (ABP) sebagai respon terhadap FSH. ABP berfungsi untuk mengangkut dan mengkonsentrasikan testosteron ke dalam sel germinal. Sel Sertoli mempunyai dua mekanisme umpan balik negatif. Pertama, dengan membentuk inhibin yang bekerja pada hipofisis anterior. Kedua melalui umpan balik dari testosteron pada hipotalamus. (Sherwood,2004)

Hormon kelamin dihasilkan di bawah pengaruh gonadotropin dari hipofisis anterior, sebaliknya sekresi gonadotropin diatur oleh androgen dan estrogen. Hormon-hormon gonadotropin yang utama adalah FSH dan ICSH (LH) yang berfungsi mengontrol testis. Siklus ini kemudian secara langsung diatur oleh faktor *releasing* di dalam hipotalamus otak yang mengatur pelepasan FSH dan LH atau secara tidak langsung dipengaruhi oleh mekanisme umpan balik negatif dari estrogen dan testosteron apabila jumlahnya terlalu banyak. (Jhonson, 2006).



Gambar 2.10 Pengaturan fungsi hormon (Jhonson, 2006)

2.6 Pemilihan Hewan Coba

Penelitian ini menggunakan hewan coba mencit (*Mus musculus*) jantan dengan alasan : 1). Penelitian ini tidak memungkinkan untuk menggunakan testis manusia sebagai sediaan histologik, di samping efek negatif dari nikotin yang bersifat merugikan pada manusia, mencit sebagai hewan coba, mudah didapat dan murah. 2). Hewan coba mencit cukup jinak sehingga pemberian perlakuan dapat dilakukan dengan mudah. 3). Testis mencit jantan mempunyai struktur histologik yang cukup mirip dengan manusia. 4). Penggunaan hewan coba mencit juga mengacu pada penelitian-penelitian sejenis sebelumnya.

BAB 3
KERANGKA KONSEPTUAL DAN
HIPOTESIS PENELITIAN

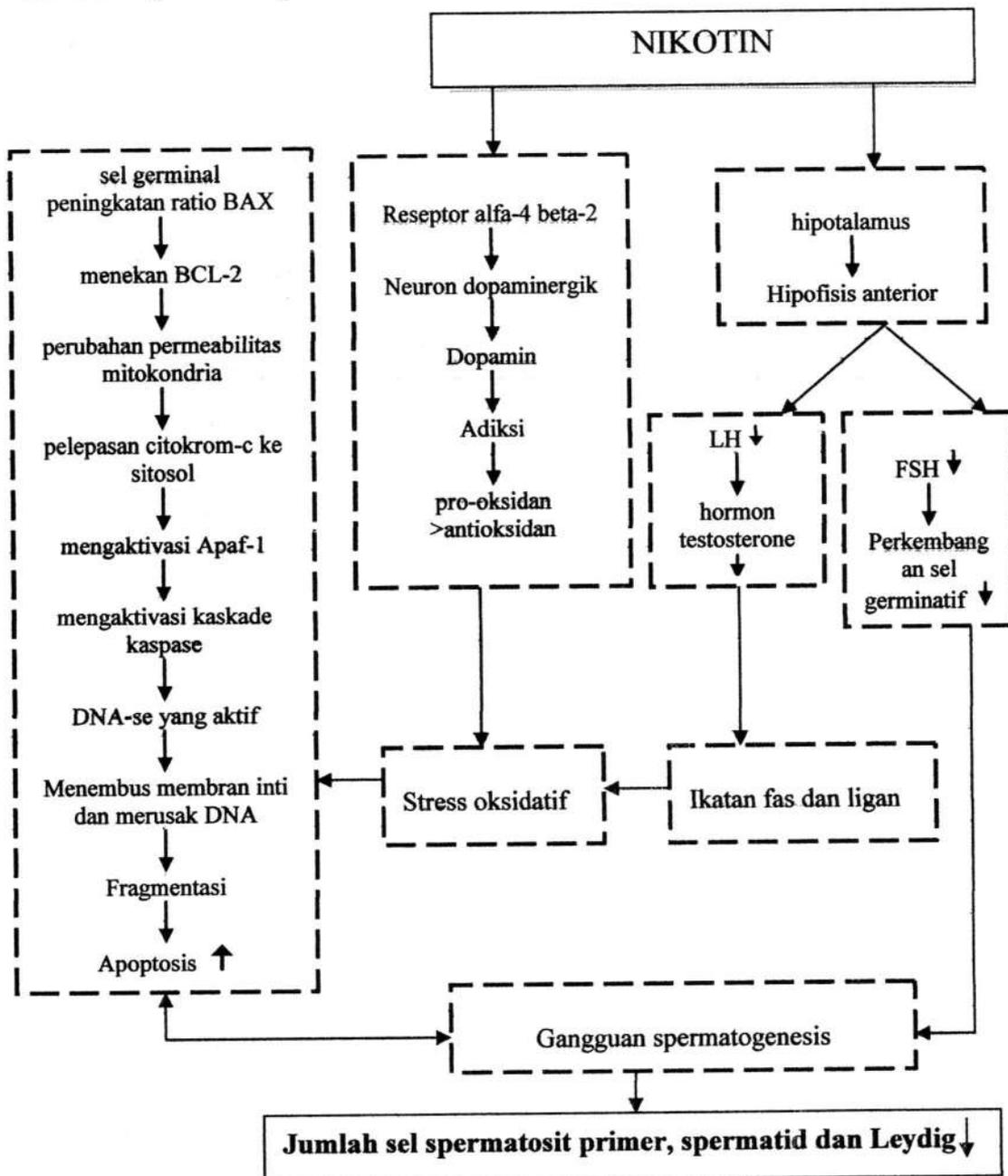
BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL DAN
HIPOTESIS PENELITIAN

BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

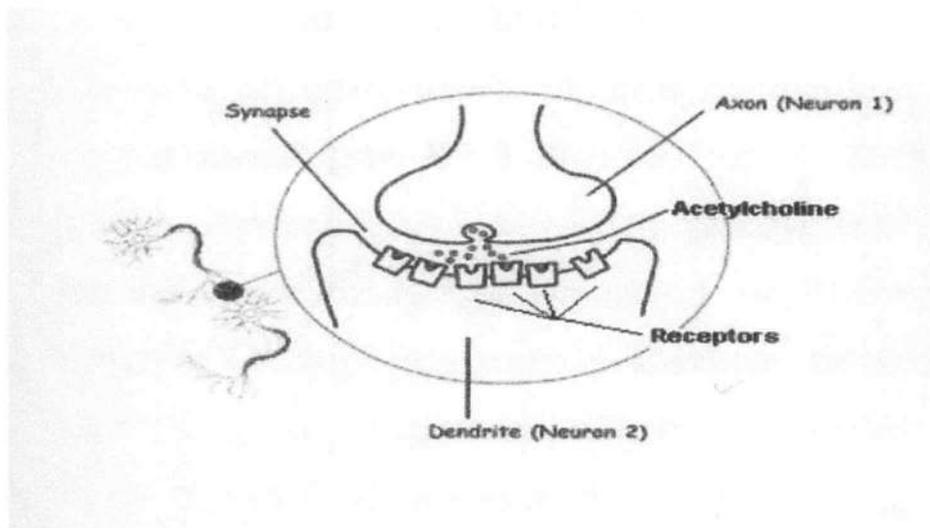
3.1 Kerangka Konseptual



Keterangan: : Tidak diteliti
 : Diteliti
 : Menurun
 : Meningkat

Gambar 3.1. Kerangka konseptual penelitian

Nikotin bekerja secara sentral di otak, di dalam otak terjadi interaksi elektrokimia yang terus-menerus berlangsung antar sel saraf yang terstruktur dan tersistem ke dalam kelompok fungsional. Kelompok fungsional bekerja sebagai pusat koordinasi yang mengatur semua aktivitas psikologis dan fisiologis. Antar sel pusat ada celah sinaps, didalam sinaps impuls saraf diteruskan dengan sinyal-sinyal molekul zat kimia yang ditransmisikan dari ujung saraf pre sinaps ke saraf post sinaps yang disebut neurotransmitter (NT). Mekanisme kerja nikotin adalah mempengaruhi proses elektrofisiologi membran saraf dan dapat merangsang system saraf pusat, secara sentral dapat mempengaruhi neuron dopaminergik, dengan menempelnya nikotin pada reseptor α (alfa) - 4 β (beta) -2 di presinaps akan mempengaruhi neuron dopaminergik untuk mengeluarkan dopamin dalam jumlah yang besar ke dalam celah sinaps untuk selanjutnya menempel pada reseptor dopamin di neuron pasca sinaps. Nikotin yang berikatan dengan reseptor inilah yang menimbulkan rasa nikmat dan nyaman sesaat, pada saat orang tersebut tidak merokok menyebabkan kadar dopamin di sentral otak berkurang sehingga mengakibatkan berkurangnya rasa nikmat dan dapat menimbulkan keinginan bagi orang tersebut untuk merokok kembali atau adiksi. Seseorang yang terus-menerus merokok selama bertahun-tahun, darahnya akan tercemar oleh nikotin yang melalui pembuluh darah akan menyebar ke seluruh tubuh, termasuk ke organ reproduksi. (Brust, 2004 ; Moore, 2005,).



Gambar 3.2 Kerja nikotin pada reseptor

Sumber : [http://www. White quite.com](http://www.Whitequite.com)

Asap rokok mengandung zat kimiawi yang akan membentuk radikal bebas. Radikal bebas merupakan atom atau molekul yang sifatnya tidak stabil, sehingga untuk memperoleh pasangan elektron senyawa ini sangat reaktif dan merusak jaringan (Nikki, 1997). Asap rokok yang diberikan secara berulang akan meningkatkan jumlah radikal bebas dalam tubuh, sementara itu antioksidan dalam tubuh tidak dapat mengimbangi peningkatan jumlah radikal bebas yang terbentuk sehingga terjadi stress oksidatif akibatnya akan terjadi reaksi antara radikal bebas dengan sel-sel tubuh menyebabkan terjadinya kerusakan sel (Halliwell and Gutteridge, 1996). Stres oksidatif akibat pajanan nikotin akan menyebabkan apoptosis pada sel spermatogenesis di tubulus seminiferus dengan meningkatkan ratio BAX, protein BAX ini akan menekan aktivitas BCL-2 pada membran mitokondria sehingga terjadi perubahan permeabilitas membran dari mitokondria, perubahan ini mengakibatkan terjadinya pelepasan *cytokrom-c* ke sitosol, di sitosol *cytokrom-c* akan mengaktivasi Apaf-1 yang selanjutnya akan mengaktivasi kaskade kaspase dan kaspase yang aktif ini akan mengakibatkan DNA-se,

kemudian DNA-se yang aktif menembus membran inti dan merusak DNA, sehingga DNA sel yang bersangkutan rusak atau fragmentasi dan akhirnya sel mengalami kematian atau apoptosis. Apoptosis tersebut akan menyebabkan sel germinal menjadi atresia dan jumlahnya berkurang (Yildiz et al, 1998). Nikotin dapat menurunkan kadar GnRH darah, yang dengan sendirinya menurunkan kadar LH dan FSH darah, di samping itu, dalam hipofisis nikotin juga menurunkan kepekaan dan respon gonadotropin terhadap GnRH, dengan menurunnya LH dan FSH dalam darah akan menurunkan stimuli terhadap sel Sertoli dan sel Leydig dalam testis. Sel Leydig yang berfungsi untuk melepaskan hormon testosteron akan terhambat oleh nikotin, di sisi lain nikotin sendiri merusak hormon testosteron dalam darah sehingga terjadi penurunan hormon testosteron. Penurunan hormon testosteron mengakibatkan spermatogonium pada tubulus seminiferus mengekspresikan fas sedangkan sel Sertoli mengekspresikan ligan, oleh karena itu dipermukaan spermatogonium akan terjadi ikatan kompleks antara fas dan ligan, adanya ikatan antara fas dan ligan tersebut menimbulkan sinyal transduksi ke dalam sitosol, sehingga di dalam sitosol dari sel tersebut terjadi aktivasi suatu protein yang disebut sebagai *Fas Associated Protein Death Domain* (FADD). FADD kemudian mengaktifkan kaspase kaskade selanjutnya kaspase yang aktif mengaktifkan DNA-se. DNA-se masuk ke dalam inti dan merusak DNA, sehingga sel mengalami apoptosis. Sel Sertoli yang bekerja merangsang pertumbuhan dan pematangan sel-sel spermatogenik juga mengalami hambatan oleh karena nikotin sehingga proses spermatogenesis pun akan mengalami gangguan (Baker and Dixon, 2006 ; Sudiana, 2008).

Berdasarkan keterangan di atas, maka perlu dibuktikan apakah pemberian nikotin secara injeksi subkutan dalam dosis yang sama dan waktu yang bervariasi, dapat menurunkan jumlah sel-sel spermatogenik, spermatid dan sel Leydig pada mencit jantan.

3.2. Hipotesis Penelitian

- a. Pemberian nikotin subkutan dapat berpengaruh terhadap jumlah sel spermatosit primer, spermatid dan Leydig mencit.
- b. Pemberian nikotin dengan waktu yang minimal yaitu 1 minggu dengan dosis 5mg/kg berat badan/hari sudah dapat memberikan pengaruh terhadap jumlah sel spermatosit primer, spermatid dan Leydig mencit.
- c. Ada perbedaan pengaruh pemberian nikotin subkutan dengan dosis 5 mg/kg berat badan/hari dengan waktu pemberian 1 minggu, 2 minggu, 3 minggu terhadap jumlah sel spermatosit primer, spermatid dan Leydig mencit.

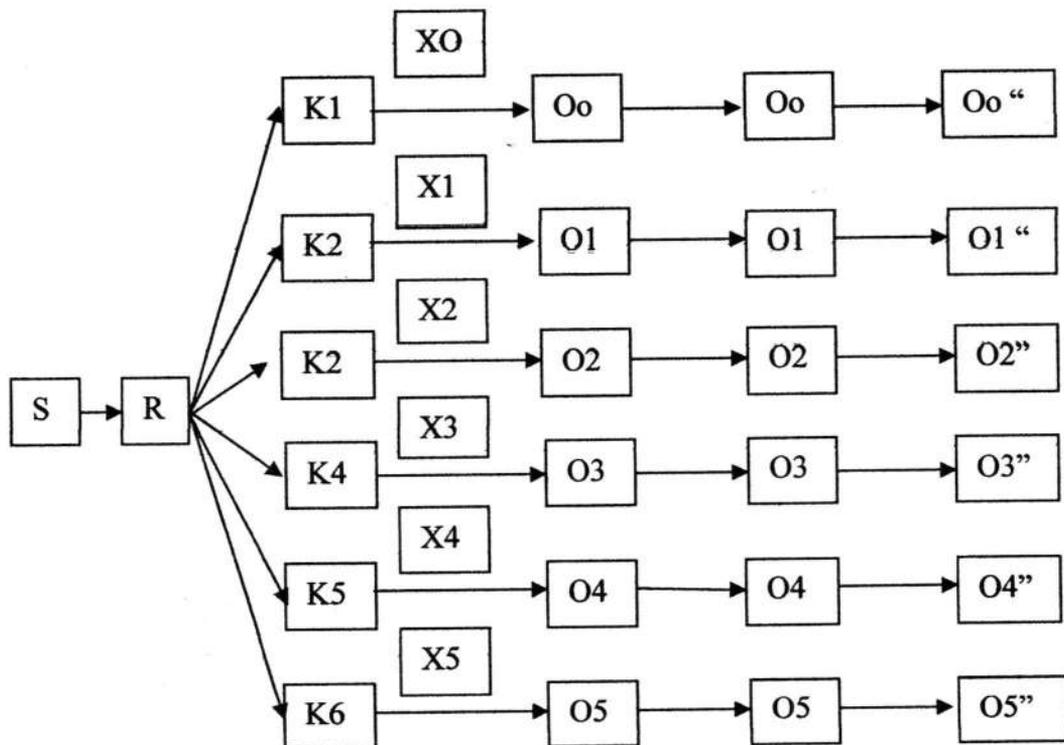
BAB 4
MATERI DAN METODE PENELITIAN

BAB 4

MATERI DAN METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian ini bersifat eksperimental, yaitu memberikan perlakuan terhadap mencit (*Mus musculus*) berupa injeksi nikotin subkutan dengan dosis yang sama dan lama perlakuan yang berbeda dan hasilnya akan dibandingkan dengan kontrol. Jenis rancangannya yang dipergunakan adalah *Post Test Only Control Group Design* (Sugiyono, 2008). Subjek penelitian terdiri dari 6 (enam) kelompok yang dipilih secara acak dan telah dihomogenkan. Tiga kelompok diberikan placebo sebagai kontrol dan kelompok sisanya diberikan nikotin dengan waktu yang berbeda. Skema rancangan penelitian ini adalah :



Gambar 4.1. Rancangan penelitian

Keterangan :

- S : sampel
 R : random
 K1-K3 : kelompok kontrol
 K4-K6 : kelompok perlakuan dengan perbedaan waktu perlakuan
 XO : kelompok kontrol (diberikan akuabidestilata subkutan selama 1 minggu)
 X1 : kelompok kontrol (diberikan akuabidestilata subkutan selama 2 minggu)
 X2 : kelompok kontrol (diberikan akuabidestilata subkutan selama 3 minggu)
 X3 : perlakuan 1 (diberikan nikotin 5 mg/kgBB subkutan selama 1 minggu)
 X4 : perlakuan 1 (diberikan nikotin 5 mg/kgBB subkutan selama 2 minggu)
 X5 : perlakuan 1 (diberikan nikotin 5 mg/kgBB subkutan selama 3 minggu)
 Oo-O5 : pengamatan jumlah sel spermatosit primer
 Oo'-O5' : pengamatan jumlah sel spermatid
 Oo''-O5'' : pengamatan jumlah sel leydig

4.2 Populasi, Sampel, dan Besar Sampel

Populasi penelitian ini adalah mencit jantan, umur 4 bulan, berat sekitar 20 gram. populasi tersebut dipilih beberapa ekor secara random sebagai sampel penelitian. Besar sampel minimal untuk pengujian hipotesis penelitian ditentukan berdasarkan rumus Kemas, (1991) sebagai berikut:

$$(t-1)(r-1) \geq 15$$

$$(6-1)(r-1) \geq 15$$

$$5(r-1) \geq 15$$

$$5r-5 \geq 15$$

$$5r \geq 15+5$$

$$r \geq 4$$

Keterangan :
 t = perlakuan
 r = ulangan

Sampel akan ditambahkan sebesar 10% tiap kelompok untuk menghindari kematian sehingga menjadi 5 ekor tiap kelompok, tetapi dalam perhitungan data yang diperoleh tetap dihitung 5 ekor/kelompok, sehingga jumlah hewan coba yang diperlukan secara keseluruhan adalah 30 ekor sampel.

Penelitian ini digunakan 5 ekor mencit untuk tiap perlakuan dan kontrol, mula-mula mencit diadaptasikan terlebih dahulu di kandang yang digunakan selama 1 (satu) minggu, dengan pemberian pakan dan minum secara ad-libitum. Dilakukan pemilihan secara acak yaitu dengan menandai semua mencit dengan angka 1 hingga 30 sesuai jumlah total mencit, kemudian secara acak memilih 15 nomor pertama untuk kelompok kontrol (kelompok 1-3), 15 nomor kedua untuk kelompok perlakuan (kelompok 4-6), mencit yang dimasukkan pada kelompok disesuaikan dengan nomor yang sudah diacak tadi.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1. Klasifikasi variabel

Variabel pada penelitian ini adalah variabel bebas, tergantung dan kendali. Variabel bebas (*independent variable*) adalah nikotin dengan dosis 5 mg/kgBB. Variabel tergantung (*dependent variable*) meliputi jumlah spermatosit primer, spermatid dan jumlah sel Leydig. Variabel terkendali pada penelitian ini antara lain jenis mencit, umur mencit, kesehatan mencit, jenis makanan dan minuman, perawatan dan sanitasi kandang, dan pembuatan preparat histologis.

4.3.2. Definisi operasional variabel penelitian

Definisi operasional dalam penelitian ini seperti pada tabel 4.1

Tabel 4.1 Definisi operasional variabel penelitian

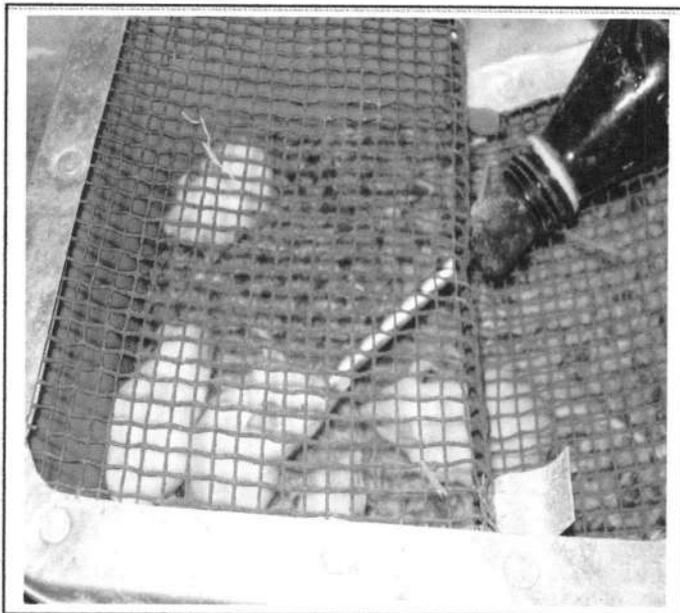
No	Variabel	Definisi operasional	Cara perhitungan	Hasil perhitungan	Skala data
1	Nikotin	Larutan alkaloid, tidak berwarna. Larutan murni dengan konsentrasi 97% akan diencerkan aquabidest sebelum diberikan pada mencit	5 mg/kg BB	mg	Ratio
2	Jumlah spermatisit primer	Banyaknya sel spermatisit primer dalam satu tubulus seminiferus yang ditandai dengan inti paling besar, sentral, interfase (+) butir-butir kromatin halus dan rata.	Perhitungan dilakukan pada 3 lapangan pandang tiap preparat pada pembesaran 400x dengan mikroskop cahaya.	Rerata jumlah spermatisit primer dari kedua testis tiap mencit	Interval
3	Jumlah sel spermatisid	Banyaknya sel spermatisid yang ditandai dengan inti eksentris, lonjong, warna inti pucat, berkelompok 4-8, inti sel hampir memenuhi seluruh sitoplasma, sel sangat kecil sehingga mudah dikenali	Perhitungan dilakukan pada 3 lapangan pandang tiap preparat pada pembesaran 400x dengan mikroskop cahaya.	Rerata jumlah sel spermatisid dari kedua testis tiap mencit	Interval
	Jumlah sel Leydig	Banyaknya sel Leydig yang ditandai dengan sel besar, sitoplasma bervakuola, butir-butir kromatin kasar, retikulum endoplasma agranuler. terletak di interstitial sel.	Perhitungan dilakukan pada 3 lapangan pandang tiap preparat pada pembesaran 1000x dengan mikroskop cahaya.	Rerata jumlah sel leydig dari kedua testis tiap mencit	Interval



4.3.3. Jenis mencit: strain BA LB/C

Kesehatan mencit dapat diamati dari morfologi dan berat badannya yaitu gerakan cukup lincah, tidak letih, kulit bersih tanpa luka, mata terang/ tidak sayu, berat badan kurang lebih 20 gram, jenis makanannya adalah pellet CP 511 dan jenis minuman adalah aqua, umur mencit 4 minggu.

Perawatan mencit meliputi pemberian makanan pellet 10 g/ekor/hari, pemberian minum secara ad libitum, penggantian sekam untuk alas tidur 2 hari sekali. Kebersihan kandang dibersihkan tiap hari, suhu sesuai suhu ruang, cukup ventilasi dan sinar matahari serta tidak lembab.



Gambar 4.2 Hewan coba

4.4 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan untuk penelitian ini adalah larutan nikotin dengan kemurnian 97% yang diproduksi oleh *Wako Pure Chemical Industries, Ltd* Jepang, minuman yang diberikan adalah air PDAM ad libitum, makanan berupa

BR 1CP 511 sebanyak 4-5 g/100 g BB/ekor yang diproduksi oleh PT. *Charoen Pokphand* Indonesia dengan rincian nutrisi standar mencit seperti pada tabel 4.2. Sekam untuk alas tidur diganti tiap 2 hari, bahan untuk pembuatan preparat testis adalah PZ, buffer formalin 10%, alkoliol, xylol, paraffin, asam cuka, albumin, aquadest, hematoxylin, eosin, kertas label dan untuk pengamatan menggunakan mikroskop cahaya, counter, kertas, alat tulis.

Tabel 4.2 Nutrisi standar mencit (kusumawati, 2004)

Jenis nutrisi	Kebutuhan nutrisi (%)
Protein	20-25
Lemak	5-12
Serat kasar	2,5
Karbohidrat	45-60

4.5 Alat/Instrumen Penelitian

Instrumen yang digunakan pada penelitian ini adalah kandang plastik ukuran 20 cm x 15 cm x 15 cm, terbuat dari kawat ayakan dengan ukuran lubang 6 mm, dilengkapi tempat makan dan botol minum, kandang dibersihkan tiap hari, suhu disesuaikan dengan suhu ruangan, ventilasi dan sinar matahari yang cukup dan tidak lembab, potongan kertas untuk alas kandang, alat bedah berupa gunting bedah, skapel dan papan diseksi, timbangan untuk mengukur berat badan. Alat untuk membuat preparat berupa *Object glass*, *cover glass*, mikrotom, mikroskop, *eyepiece*, mikrometer, alat fotografi dan film.

4.6. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Mei-Juni 2010. Pemeliharaan mencit dilakukan di Laboratorium *Invitro* FKH Unair Surabaya. Pemeriksaan sel-sel spermatogenik mencit dan sel leydig dilakukan di Laboratorium

Histopatologi FKH Unair Surabaya. Jadwal penelitian dapat dilihat pada Lampiran 1.

4.7. Prosedur Pengumpulan Data

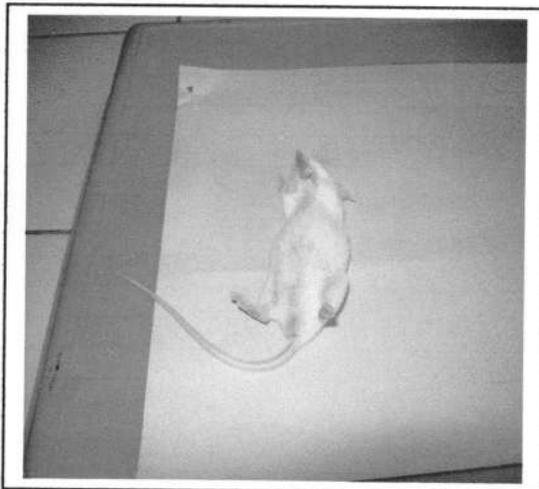
4.7.1. Pembuatan larutan nikotin

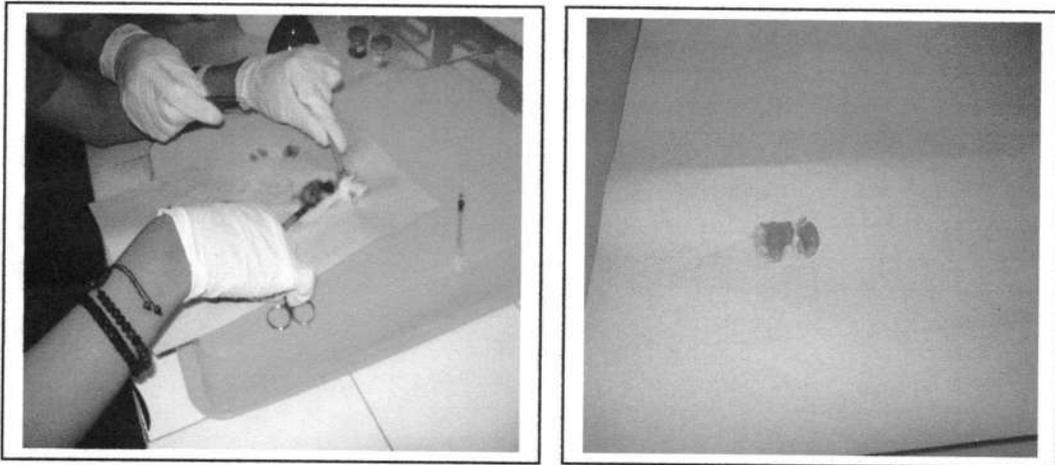
Dosis nikotin yang digunakan adalah 5 mg/kgBB diberikan selama 1 minggu, 2 minggu dan 3 minggu. Dosis tersebut kemudian disesuaikan dengan berat badan mencit yang digunakan. Nikotin cair dengan kemurnian 97% dilarutkan dengan aquabidestilata, kemudian diberikan sesuai dosis yang telah dihitung untuk tiap mencit. Cara melarutkan nikotin murni seperti pada Lampiran 2.

4.7.2 Cara perlakuan dan pengamatan

Tahapan yang dilakukan pada penelitian ini sesuai dengan kerangka operasional (gambar 4.2), yaitu diawali dengan persiapan hewan coba, seluruh mencit ditimbang sebelum digunakan sebagai subjek penelitian dan mencit strain BALB/C sebanyak 30 ekor diadaptasikan / aklimatisasi lebih dahulu selama 1 minggu agar terbiasa hidup dalam lingkungan yang baru, jika terdapat mencit yang sakit, maka dikeluarkan dari kandang, kemudian dipilih secara random menjadi 6 kelompok, masing-masing kelompok beranggotakan 6 ekor diberikan makanan berupa pellet CP 511 diberikan sebanyak 10 g / ekor / hari dan minuman mencit adalah aqua yang diberikan secara ad libitum. Perlakuan berupa pemberian nikotin kepada mencit mulai saat berusia 4 bulan selama 7 hari, 14 hari dan 21 hari . Larutan yang diberikan sebanyak 5 mg/ kg berat badan /hari saat pagi hari melalui injeksi sub kutan sesuai dosis masing-masing perlakuan. Pada usia minggu ke-1, ke-2 dan ke-3, berat badan ditimbang lalu mencit dikorbankan

dengan cara dislokasi pada leher mencit, mencit yang telah mati ditandai dengan mata redup, reflek pupil negatif. Mencit yang telah mati diambil testisnya. Jaringan segar dapat disimpan untuk dibuat sediaan histologik. Metode pembuatan preparat menggunakan metode parafin dengan teknik pewarnaan menggunakan HE, dapat dilihat pada lampiran 3. Preparat yang telah siap dilakukan pemeriksaan dibawah mikroskop dan hasilnya difoto dengan alat fotografi. Pemeriksaan preparat dilakukan oleh 2 orang dan dihitung reratanya



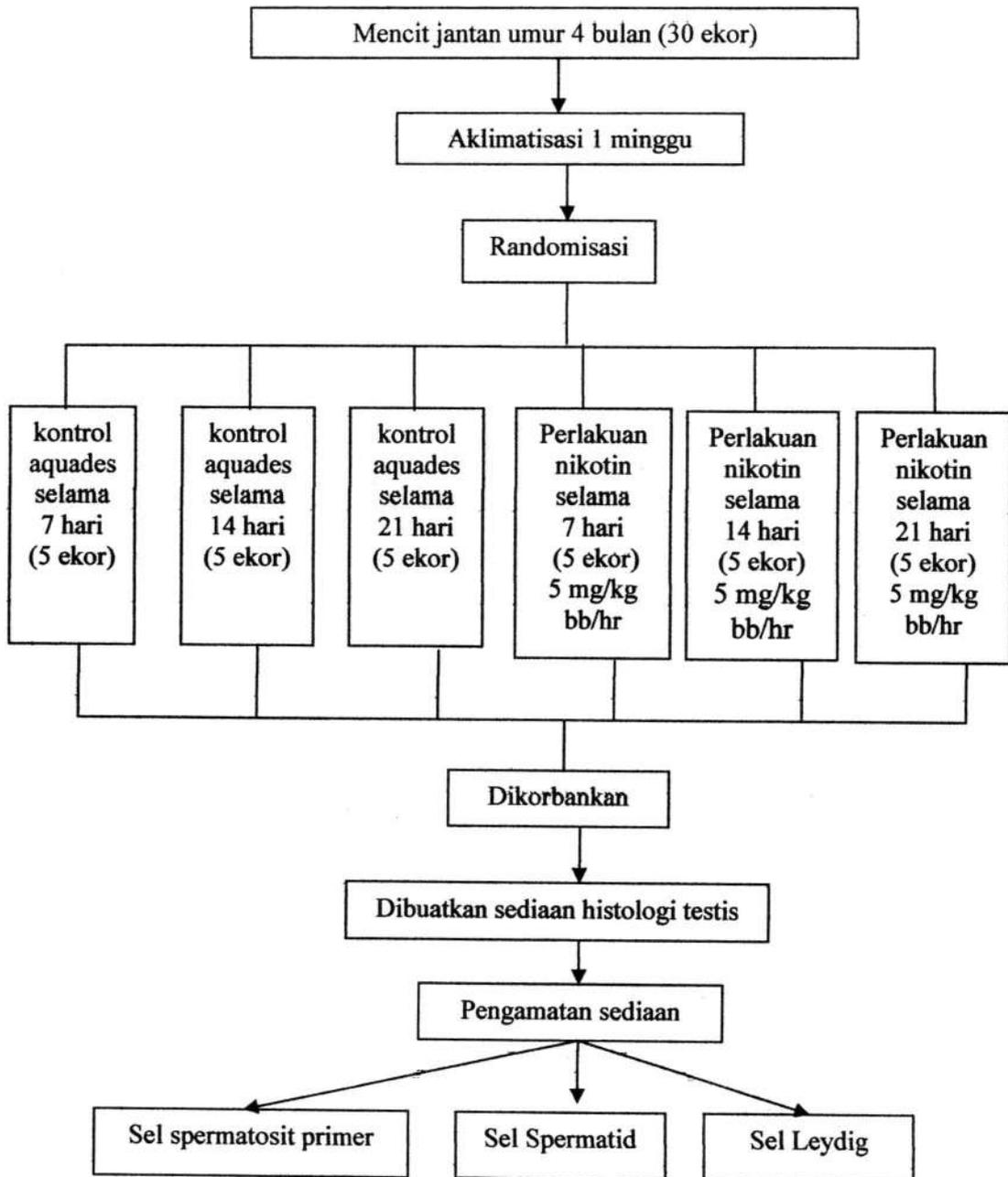


Gambar 4.3 Pembedahan hewan coba

4.7.3. Teknik pengumpulan data

Penelitian ini menggunakan preparat histologi testis mencit jantan dengan pengamatan secara mikroskopik, menggunakan mikroskop cahaya, pembesaran 400 X untuk pengamatan sel spermatosit primer dan sel spermatid, pengamatan sel leydig menggunakan pembesaran 1000 X.

4.8 Kerangka Operasional



Gambar 4.4 Kerangka operasional

4.9. Teknik Analisis Data

4.9.1 Analisis deskriptif

Masing-masing kelompok dilakukan analisis deskriptif untuk variabel sel spermatis primer, spermatid dan Leydig yang meliputi distribusi frekuensi, mean dan standar deviasi.

4.9.2 Analisis analitik

Analisis data untuk mengetahui beda nilai rata-rata jumlah sel spermatis primer, spermatid dan sel Leydig pada masing-masing kelompok perlakuan dilakukan dengan uji Anova satu arah, dengan asumsi data homogen dan terdistribusi normal dengan tingkat kesalahan sebesar 5 %. Jika terdapat perbedaan yang bermakna maka untuk mengetahui beda antar perlakuan dipergunakan uji LSD (*Least Significant Difference*) atau uji Beda Nyata Terkecil (BNT) (Dahlan, 2008; Riduwan, 2009).

4.10 Persyaratan Etik

Implikasi etik pada mencit sebagai subyek percobaan mengikuti *Ethical clearance*, yang perlu dilaksanakan sesuai dengan etik antara lain: perawatan mencit dalam kandang, pemberian makanan dan minuman, aliran udara dalam ruang kandang, perlakuan saat penelitian, pengambilan unit analisis penelitian, dan pemusnahannya. Penelitian ini sudah mendapatkan ijin dari komite etik kelayakan dapat dilihat pada lampiran 18.

BAB 5
ANALISIS HASIL PENELITIAN

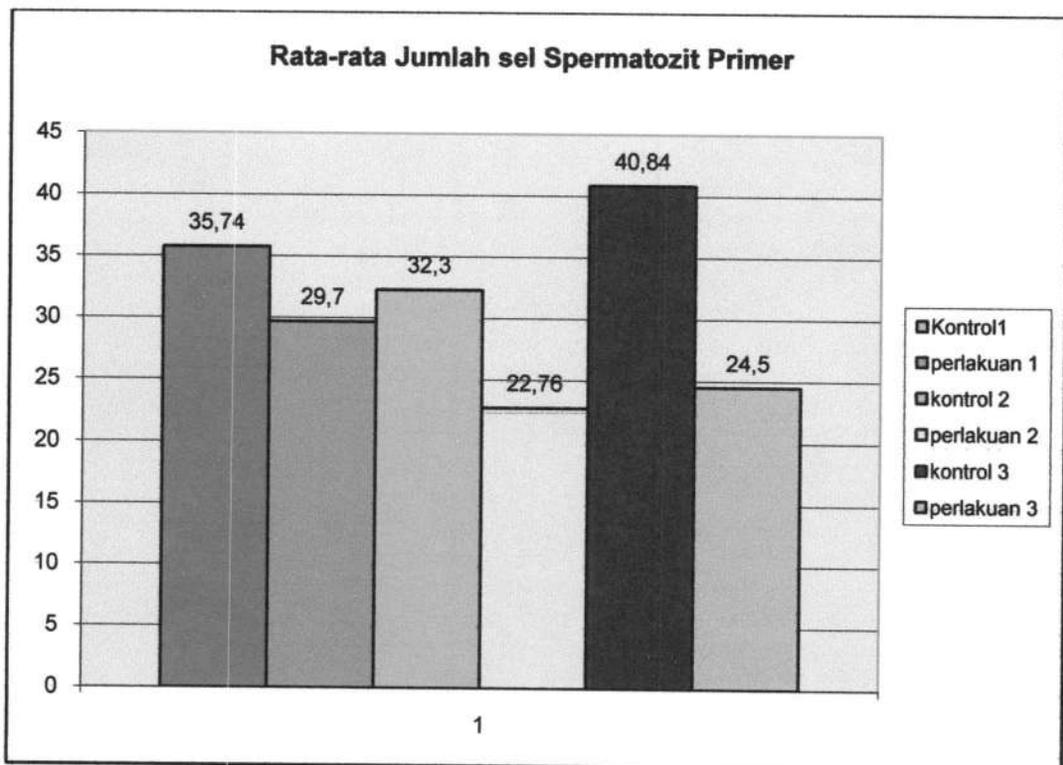
BAB 5

ANALISIS HASIL PENELITIAN

5.1 Hasil Penelitian

5.1.1 Jumlah sel spermatosit primer

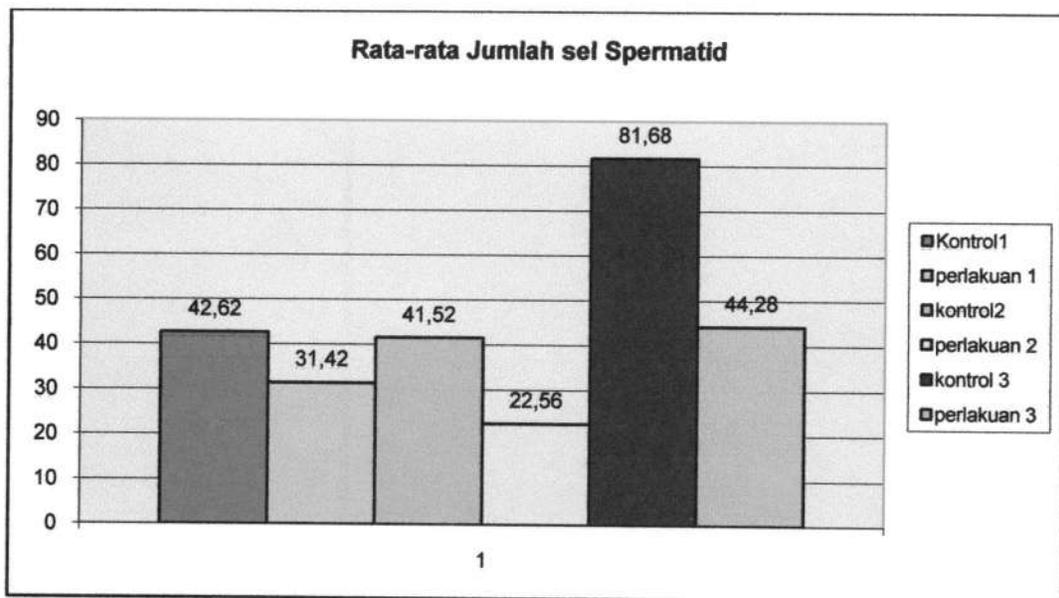
Rata-rata jumlah sel-sel spermatosit primer setelah pemberian injeksi nikotin pada tiap kelompok perlakuan 1 minggu, 2 minggu dan 3 minggu, mengalami penurunan, dapat dilihat dengan cara membandingkan dengan kelompok kontrol. Penurunan jumlah sel spermatosit primer dapat digambarkan pada diagram batang di bawah ini :



Gambar 5.1 Diagram batang jumlah sel spermatosit primer setelah pemberian injeksi nikotin selama 1 minggu, 2 minggu dan 3 minggu

5.1.2 Jumlah sel-sel spermatid

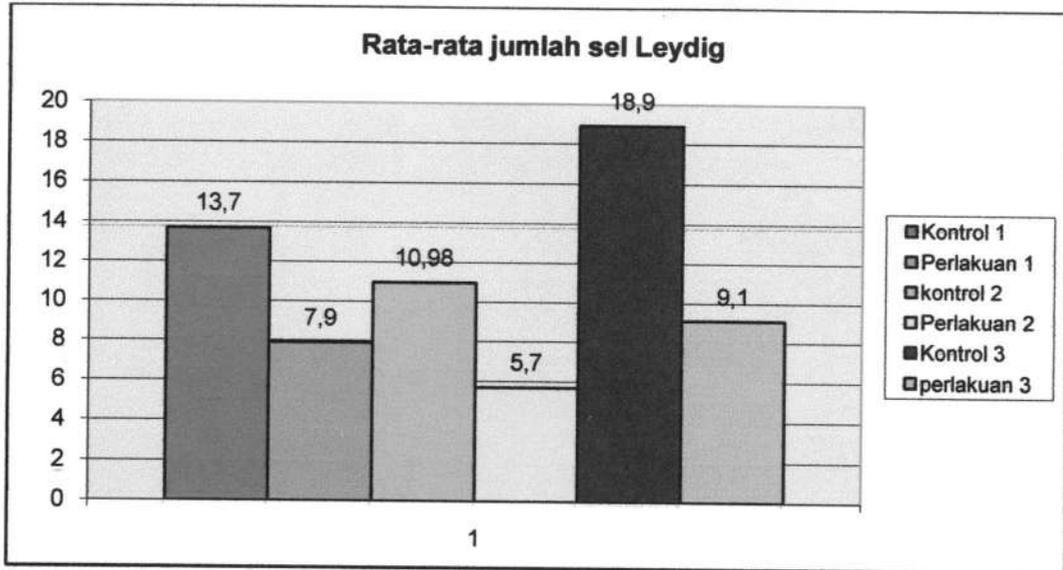
Rata-rata jumlah sel-sel spermatid setelah pemberian injeksi nikotin pada tiap kelompok perlakuan 1 minggu, 2 minggu dan 3 minggu, mengalami penurunan, dapat dilihat dengan cara membandingkan dengan kelompok kontrol. Penurunan jumlah sel spermatosit primer dapat digambarkan pada diagram batang di bawah ini :



Gambar 5.2 Diagram batang jumlah sel spermatid setelah pemberian injeksi nikotin selama 1 minggu, 2 minggu dan 3 minggu

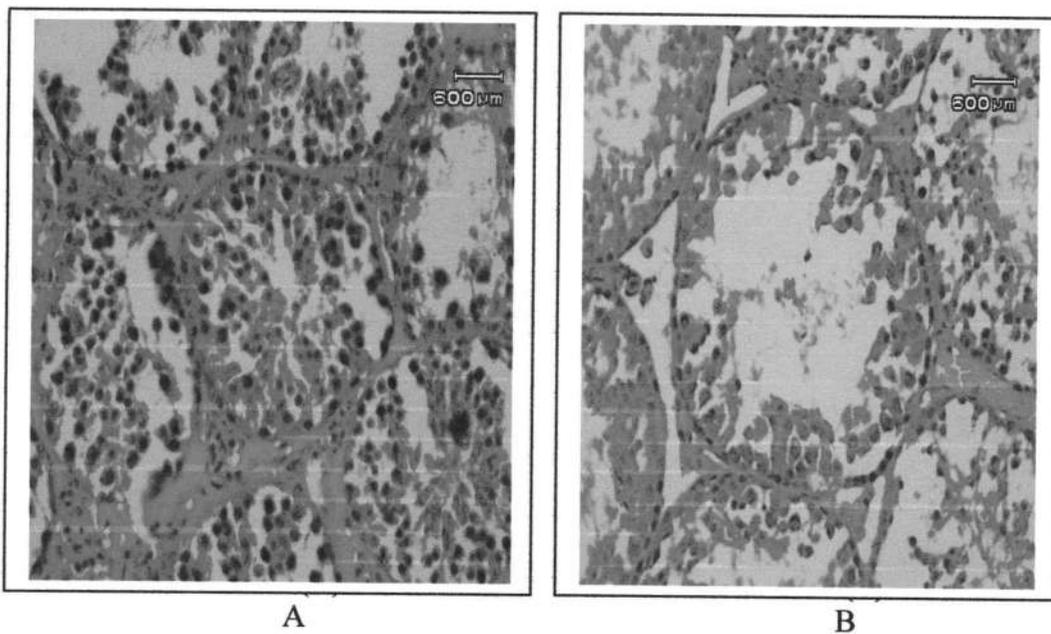
5.1 3 Jumlah sel-sel leydig

Rata-rata jumlah sel-sel leydig setelah pemberian injeksi nikotin pada tiap kelompok perlakuan 1 minggu, 2 minggu dan 3 minggu, mengalami penurunan, dapat dilihat dengan cara membandingkan dengan kelompok kontrol. Penurunan jumlah sel spermatosit primer dapat digambarkan pada diagram batang di bawah ini :

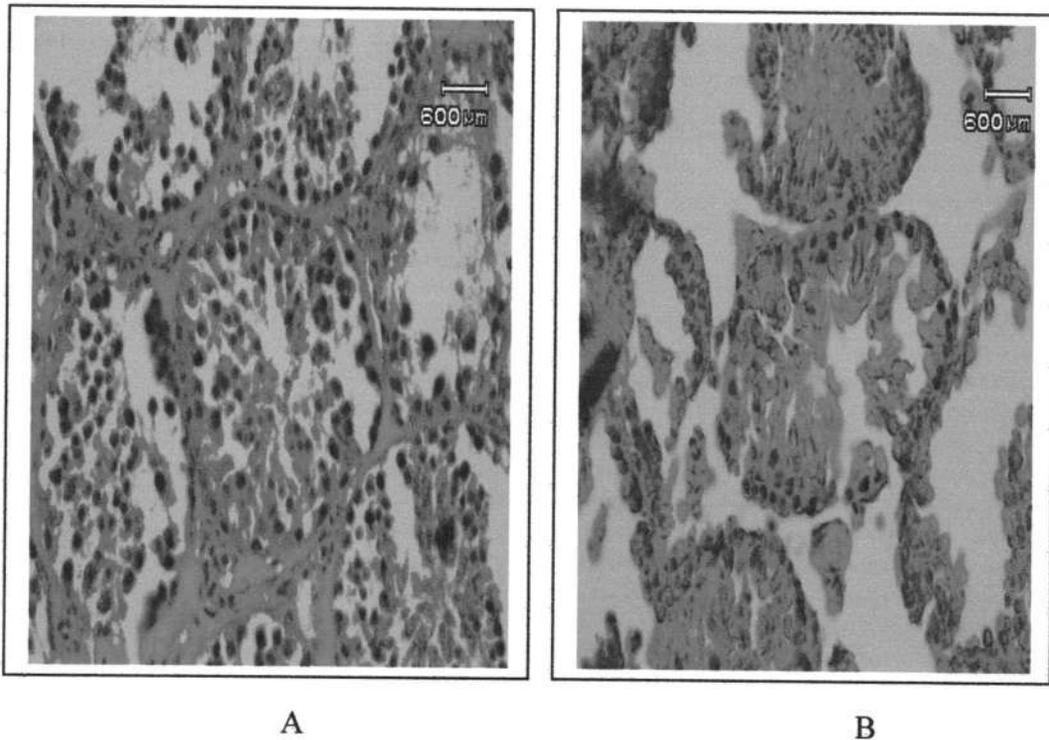


Gambar 5.3 Diagram batang jumlah sel leydig setelah pemberian injeksi nikotin selama 1 minggu, 2 minggu dan 3 minggu

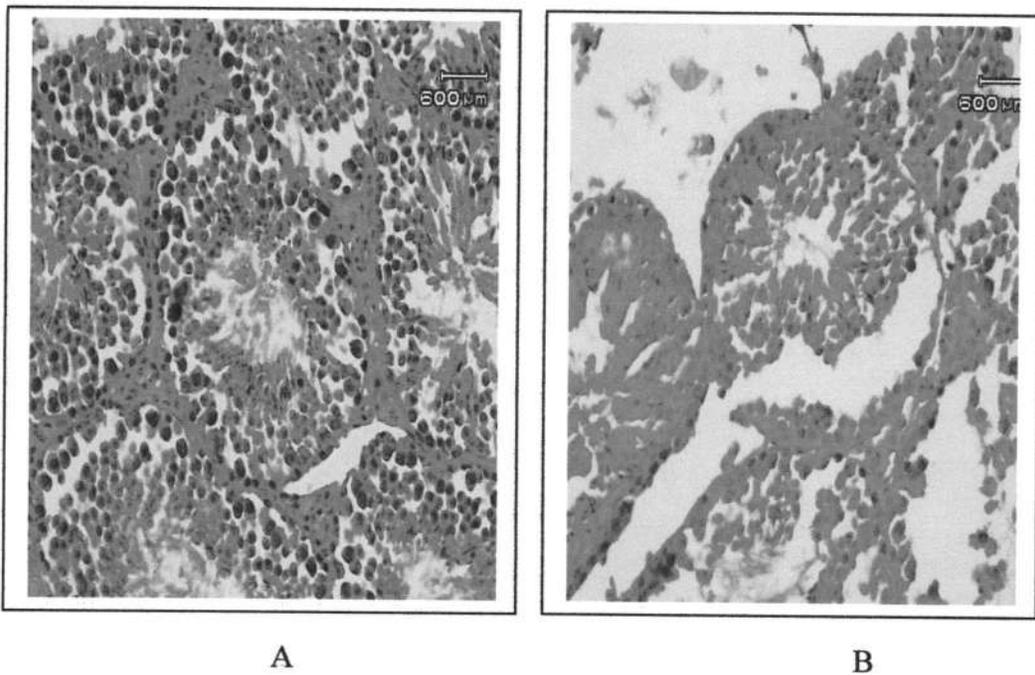
5.1.4 Gambaran Histologi Tubulus Seminiferus



Gambar 5.4 : Penampang melintang tubulus seminiferus testis pada kelompok kontrol (A) dan kelompok perlakuan (B) selama 1 minggu dengan pewarnaan PAS, pembesaran 400 x



Gambar 5.5 : Penampang melintang tubulus seminiferus testis pada kelompok kontrol (A) dan kelompok perlakuan (B) selama 2 minggu dengan pewarnaan PAS, pembesaran 400 x



Gambar 5.6 : Penampang melintang tubulus seminiferus testis pada kelompok kontrol (A) dan kelompok perlakuan (B) selama 3 minggu dengan pewarnaan PAS, pembesaran 400 x

Gambaran histologi kelompok kontrol selama 1 minggu, 2 minggu dan 3 minggu dapat di lihat pada gambar 5.4 (A), 5.5 (A), dan 5.6 (A), terlihat adanya asosiasi sel-sel spermatogenik (spermatosit primer, spermatid) dan Leydig tersusun berlapis sesuai dengan tingkat perkembangannya menuju ke arah lumen dengan susunan sel rapat dan kompak, terlihat perkembangan sel-sel spermatogenik mulai dari membran basalis ke arah lumen yaitu spermatogonia, spermatosit dan spermatid, lumen tampak terisi penuh oleh spermatozoa baik yang masih menempel pada sel Sertoli maupun yang telah mengalami spermiogenesis.

Gambaran histologi kelompok perlakuan injeksi nikotin selama 1 minggu, 2 minggu dan 3 minggu dengan dosis 5 mg/kg BB/hr, dapat di lihat pada gambar 5.4 (B), 5.5 (B) dan 5.6 (B), terlihat urutan pematangan sel-sel spermatogenik (sel spermatosit primer, spermatid) dan Leydig masih tetap, susunan sel-sel spermatogenik yang longgar dan tidak teratur, kepadatan spermatozoa didalam lumen tubulus tidak seperti pada kelompok kontrol (A), lumen pada kelompok ini mengandung spermatosit primer dan spermatid yang lebih sedikit sehingga lumen terlihat tidak penuh, dibandingkan dengan kelompok kontrol terlihat adanya penurunan jumlah sel-sel spermatogenik dan Leydig.

5.2 Analisis Hasil Penelitian

Analisis untuk mengetahui adanya perbedaan yang bermakna antar kelompok, maka semua data hasil penelitian dengan Anova pada $\alpha = 0,05$ sebelumnya dilakukan uji normalitas dan hasilnya ada pada tabel 5.1 di bawah ini

Tabel 5.1 Uji normalitas

		Spermatoosit		
		primer	Spermatid	Leydig
N		30	30	30
Normal Parameters(a,b)	Mean	30.970	44.013	11.047
	Std. Deviation	8.3146	23.1985	5.5117
	Asymp. Sig. (2-tailed)	.990	.459	.643

Hasil uji normalitas data tersebut didapat nilai p hitung lebih besar dari α untuk semua data, maka kesimpulan yang diambil bahwa penelitian ini memiliki distribusi normal dan dapat dilanjutkan dengan analisis varians (Anova), jika dengan Anova terdapat perbedaan yang bermakna antar perlakuan, maka dilanjutkan dengan *Least Significant Difference* (LSD).

5.2.1 Jumlah sel spermatoosit primer

Pengaruh perbedaan perlakuan pada penelitian ini terhadap jumlah sel spermatoosit primer dapat dilihat pada tabel 5.2 berikut ini.

Tabel 5.2 Rangkuman Anova pengaruh perbedaan perlakuan terhadap jumlah sel-sel spermatoosit primer

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1163.131	5	232.626	6.633	.001
Within Groups	841.692	24	35.071		
Total	2004.823	29			

Uji Anova tersebut didapatkan F hitung 6,633 dengan signifikansi (p) = 0,001, ini berarti $p < 0,05$ sehingga dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna antara perlakuan K1, K2, K3, K4, K5, K6 terhadap rata-rata jumlah sel spermatoosit primer, kemudian dari hasil tersebut dilakukan uji LSD

untuk mengetahui antar kelompok mana saja yang berbeda bermakna. Rangkuman uji LSD dapat dilihat pada tabel 5.3.

Tabel 5.3 Rangkuman uji LSD terhadap jumlah sel-sel spermatosit primer

Kelompok	Kelompok	Sig.	Keterangan
K4	K5	.076	Tidak bermakna
	K6	.178	Tidak bermakna
	K1	.121	Tidak bermakna
	K2	.494	Tidak bermakna
	K3	.007	Bermakna
K5	K4	.076	Tidak bermakna
	K6	.646	Tidak bermakna
	K1	.002	Bermakna
	K2	.018	Bermakna
	K3	.000	Bermakna
K6	K4	.178	Tidak bermakna
	K5	.646	Tidak bermakna
	K1	.006	Bermakna
	K2	.048	Bermakna
	K3	.000	Bermakna

Keterangan :

- K1 : kelompok kontrol 1
- K2 : kelompok kontrol 2
- K3 : kelompok kontrol 3
- K4 : kelompok perlakuan 1
- K5 : kelompok perlakuan 2
- K6 : kelompok perlakuan 3

Uji LSD diketahui bahwa terdapat perbedaan bermakna antara kelompok pasangan dari hasil sel-sel spermatosit primer adalah K4 dan K3; K5 dan K1, K2, K3 ; K6 dan K1, K2, K3. Sangat bermakna adalah pasangan kelompok K6 dan K3; K5 dan K3.

5.2.2 Jumlah sel spermatid

Pengaruh perbedaan perlakuan pada penelitian ini terhadap jumlah sel spermatosit primer dapat dilihat pada tabel 5.4 berikut ini.

Tabel 5.4 Rangkuman Anova pengaruh perbedaan perlakuan terhadap jumlah sel-sel spermatid

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	10229.223	5	2045.845	9.130	.000
Within Groups	5377.772	24	224.074		
Total	15606.995	29			

Uji Anova tersebut didapatkan F hitung 9,130 dengan signifikasi (p) = 0,001, ini berarti $p < 0,05$ sehingga dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna antara perlakuan K1, K2, K3, K4, K5, K6 terhadap rata-rata jumlah sel –sel spermatid, kemudian dari hasil tersebut dilakukan uji LSD untuk mengetahui antar kelompok mana saja yang berbeda bermakna. Rangkuman uji LSD dapat dilihat pada tabel 5.5.

Tabel 5. Rangkuman uji LSD terhadap jumlah sel-sel spermatid

Kelompok	Kelompok	Sig.	Keterangan
K4	K5	.359	Tidak bermakna
	K6	.187	Tidak bermakna
	K1	.248	Tidak bermakna
	K2	.297	Tidak bermakna
	K3	.000	Bermakna
K5	K4	.359	Tidak bermakna
	K6	.031	Bermakna
	K1	.045	Bermakna
	K2	.057	Tidak bermakna
	K3	.000	Bermakna
K6	K4	.187	Tidak bermakna
	K5	.031	Bermakna
	K1	.862	Tidak bermakna
	K2	.773	Tidak bermakna
	K3	.001	Bermakna

Keterangan :

- K1 : kelompok kontrol 1
- K2 : kelompok kontrol 2
- K3 : kelompok kontrol 3
- K4 : kelompok perlakuan 1
- K5 : kelompok perlakuan 2
- K6 : kelompok perlakuan 3

Uji LSD diketahui bahwa terdapat perbedaan bermakna antara kelompok dari hasil sel-sel spermatid adalah K4 dan K3; K5 dan K1, K3, K6; K3 dan K6. Sangat bermakna adalah pasangan kelompok K4 dan K3 ; K5 dan K3.

5.2.2 Jumlah sel Leydig

Pengaruh perbedaan perlakuan pada penelitian ini terhadap jumlah sel-sel Leydig dapat dilihat pada tabel 5.5 berikut ini.

Tabel 5.5 Rangkuman Anova pengaruh perbedaan perlakuan terhadap jumlah sel-sel Leydig

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	554.987	5	110.997	8.172	.000
Within Groups	325.988	24	13.583		
Total	880.975	29			

Hasil dari tabel tersebut didapatkan F hitung 8,172 dengan signifikansi (p) = 0,001, ini berarti $p < 0,05$ sehingga dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna antara perlakuan K1, K2, K3, K4, K5, K6 terhadap rata-rata jumlah sel –sel Leydig, kemudian dari hasil tersebut dilakukan uji LSD untuk mengetahui antar kelompok mana saja yang berbeda bermakna. Rangkuman uji LSD dapat dilihat pada tabel 5.6.

Tabel 5.6 Rangkuman uji LSD terhadap jumlah sel-sel Leydig

Kelompok	Kelompok	Sig.	Keterangan
K4	K5	.355	Tidak bermakna
	K6	.611	Tidak bermakna
	K1	.020	Bermakna
	K2	.199	Tidak bermakna
	K3	.000	Bermakna
K5	K4	.355	Tidak bermakna
	K6	.158	Tidak bermakna
	K1	.002	Bermakna
	K2	.033	Bermakna
	K3	.000	Bermakna
K6	K4	.611	Tidak bermakna
	K5	.158	Tidak bermakna
	K1	.060	Tidak bermakna
	K2	.428	Tidak bermakna
	K3	.000	Bermakna

Keterangan :

- K1 : kelompok kontrol 1
 K2 : kelompok kontrol 2
 K3 : kelompok kontrol 3
 K4 : kelompok perlakuan 1
 K5 : kelompok perlakuan 2
 K6 : kelompok perlakuan 3

Uji LSD untuk pasangan kelompok berbeda secara bermakna dari pasangan kelompok dari hasil sel-sel Leydig adalah K4 dan K1, K3: K5 and K1, K2, K3 ; K6 and K3. Sangat bermakna adalah pasangan kelompok K5 dan K3 ; K6 dan K3; K3 dan K4.

BAB 6
PEMBAHASAN

BAB 6

PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan pengaruh nikotin terhadap jumlah sel spermatosit primer, sel spermatid dan sel Leydig. Rancangan penelitian ini menggunakan *Post Test Only Control Group Design* (Sugiyono, 2008). Sampel yang diambil adalah mencit (*Mus musculus*) jantan umur dewasa bertujuan untuk mendapatkan kondisi tubulus seminiferus yang aktif. Pengukuran variabel tergantung, jumlah sel spermatosit primer dan sel spermatid digunakan untuk mengetahui pengaruh nikotin terhadap sel-sel spermatogenik yang merupakan bagian dari epitel tubulus seminiferus. Jumlah sel Leydig juga merupakan salah satu variabel yang dinilai sehubungan dengan fungsinya sebagai kelenjar endokrin khas karena tidak berkembang dari permukaan epitel seperti kelenjar kebanyakan tetapi berasal dari stroma mesenkim testis yang mensekresi hormon testosteron (Lesson, 1996).

Pengamatan dilakukan terhadap preparat jaringan testis mencit jantan yang diwarnai dengan PAS. Pada penelitian ini dilakukan pengamatan setelah 1 minggu, 2 minggu dan 3 minggu perlakuan dan dibandingkan dengan kelompok kontrol. Berdasarkan hasil penelitian dan analisa data, mencit jantan yang di beri perlakuan injeksi nikotin sub kutan menunjukkan penurunan jumlah sel spermatosit primer (gambar 5.1), spermatid (gambar 5.2) dan Leydig (gambar 5.3).

6.1 Jumlah Sel-Sel Spermatogenik

Tubulus seminiferus merupakan saluran tempat memproduksi spermatozoa. Tubulus seminiferus dilapisi oleh lapisan epitel germinal yang mengandung sel-sel spermatogenik yang dilindungi oleh membran dasar. Epitel tubulus seminiferus terdiri atas 2 kategori sel yang berbeda, yaitu sel-sel penyokong dan nutrisi atau sel Sertoli serta sel-sel spermatogenik. Sel-sel spermatogenik membentuk bagian terbesar dari lapisan epitel dan melalui proliferasi serta diferensiasi yang kompleks akan menghasilkan spermatozoa (Lesson, 1996). Penelitian ini hanya menggunakan dua jenis sel spermatogenik, yaitu sel spermatosit primer dan sel spermatid. Spermatosit primer merupakan sel yang mempunyai ukuran yang lebih besar dari sel spermatogenik yang lainnya dan spermatid yaitu sel yang jauh lebih kecil dan berinti, vesikuler dan terletak di sentral (Hayati, 2010). Hasil penelitian diketahui bahwa pemberian injeksi nikotin selama 1 minggu, 2 minggu dan 3 minggu dapat menurunkan jumlah sel spermatosit primer, spermatid mencit jantan (gambar 5.1, 5.2). Jumlah sel-sel spermatosit primer, spermatid mengalami penurunan pada lama perlakuan 1 minggu dan 2 minggu dengan dosis yang sama yaitu 5 mg/kg BB/hr, kemudian jumlahnya meningkat pada perlakuan minggu ketiga dengan dosis yang sama yaitu 5 mg/kg BB/hr dan setelah diuji dengan Anova ternyata penurunan jumlah kedua jenis sel spermatogenik ini bermakna ($p < 0,05$) bila dibandingkan dengan kelompok kontrol (tabel 5.2 dan 5.4).

Jumlah sel-sel spermatosit primer, spermatid mulai meningkat kembali pada lama perlakuan 3 minggu disebabkan oleh nikotin dapat meningkatkan kadar FSH sebagai mekanisme pertahanan tubuh terhadap gangguan spermatogenesis

yang ditimbulkannya. Hipotalamus dalam system reproduksi jantan berfungsi menghubungkan susunan syaraf pusat dan proses reproduksi dengan jalan mengirimkan sinyal neurohormonal (GnRH) ke hipofisis anterior. GnRH merangsang kelenjar hipofisa untuk mengeluarkan hormon gonadotropin yaitu FSH dan LH yang selanjutnya akan mempengaruhi testis untuk berfungsi. FSH menstimulir pertumbuhan sel-sel germinatif dari tubulus seminiferus dan mendorong terjadinya proses spermatogenesis secara sempurna. FSH dipengaruhi oleh mekanisme umpan balik negatif apabila jumlah sel-sel spermatogenik mengalami penurunan, sehingga jumlah sel-sel spermatogenik (sel-sel spermatosit primer, spermatid) jumlahnya bertambah pada lama perlakuan 3 minggu.

Mekanisme kompensasi tersebut hanya terjadi pada perlakuan yang terlama yaitu selama 3 minggu, sedangkan pada perlakuan 1 minggu dan 2 minggu pada penelitian ini tidak terjadi kompensasi, akibatnya adalah jumlah sel-sel spermatosit primer, spermatid dan leydig jumlahnya lebih sedikit pada lama perlakuan 1 minggu dan 2 minggu tapi kemudian jumlahnya meningkat lagi pada lama perlakuan 3 minggu. Peningkatan jumlah sel-sel spermatosit primer dan spermatid pada lama perlakuan 3 minggu ini masih tetap lebih rendah bila dibandingkan dengan jumlah sel-sel spermatosit primer, spermatid pada kelompok kontrol atau mencit yang tidak diberi perlakuan nikotin.

Penelitian terdahulu telah diketahui bahwa pemberian injeksi nikotin dapat menurunkan kadar testosteron, FSH dan LH (Paccifi, 1993). Hormon testosteron dihasilkan oleh sel interstitial atau sel Leydig diperlukan dalam jumlah yang tinggi untuk menjaga berlangsungnya proses spermatogenesis dalam tubulus seminiferus, perkembangan dan fungsi saluran reproduksi jantan. Testosteron

berperan dalam perkembangan dan memelihara perilaku seksual, hormon ini juga menstimuli karakteristik seksual sekunder, misalnya pertumbuhan jenggot, kumis, suara yang dalam (Hayati, 2010)

Penurunan jumlah sel-sel spermatogenik pada penelitian ini terjadi karena Penurunan hormon testosteron. *Interstitial cell stimulating hormone* (ICSH) bekerja pada reseptor spesifik dipermukaan sel Leydig dan berperan dalam produksi testosteron. Testosteron merupakan androgen yang berperan dalam inisiasi dan mempertahankan spermatogenesis serta fertilisasi pada pria (Matsumoto, 2001). Penurunan jumlah sel-sel spermatogenik karena penghambatan sekresi ICSH dan testosteron, hal tersebut terjadi karena nikotin mempengaruhi kerja system syaraf pusat dengan cara menghambat kerja GnRH, bila tidak ada GnRH dari hipotalamus, gonadotropin dalam kelenjar hipofisis tidak menyekresikan LH dan FSH. Testosteron disekresikan oleh sel-sel interstitial Leydig di dalam testis, tetapi hanya apabila sel-sel interstitial leydig dirangsang oleh LH dari kelenjar hipofisis yang disekresikan meningkat dengan tepat sebanding dengan LH yang tersedia dan apabila kerja GnRH terhambat karena pengaruh dari nikotin tersebut, maka pembentukan FSH dan LH juga terhambat, sehingga akan terjadi gangguan spermatogenesis. (Guyen et al, 1999). Menurut Bartlett (1999) menyatakan bahwa, perkembangan sel spermatogenik dipengaruhi oleh hormon testosteron dan FSH. FSH menstimulasi terjadinya spermatogenesis dan testosteron dalam konsentrasi intratestikular yang tinggi akan menjaga proses spermatogenesis. Testosteron diperlukan untuk memulai proses meiosis sel spermatosit primer. Penurunan jumlah sel-sel spermatosit primer ini di dukung oleh pernyataan Everitt dan Jhonson (1990) bahwa, sel-sel

spermatosit primer sangat sensitive oleh pengaruh luar dan cenderung mengalami kerusakan setelah profase meiosis, bila sel-sel spermatosit primer mengalami kerusakan seperti atrofi tubular, nekrosis tubular, hilangnya sel intermedia, maka akan mengalami degenerasi dan difagositosis oleh sel Sertoli sehingga jumlah sel-sel spermatosit primer menjadi berkurang.

Penurunan jumlah spermatosit menyebabkan jumlah spermatid juga menurun karena sel-sel spermatosit primer yang mengalami meiosis kedua menjadi spermatid juga menurun. Proses meiosis spermatosit primer menjadi spermatosit sekunder dan membentuk spermatid diatur oleh testosteron dan FSH melalui aksinya pada sel sertoli. Sel Sertoli berperan dalam menyediakan laktat, *transferring* dan *androgen binding protein* untuk metabolisme sel germinal (Walker and Cheng, 2005). Fungsi sel Sertoli diatur oleh FSH dan testosteron. Penelitian Mc Lachlan et al (1996) menyatakan bahwa, hormon testosteron dan FSH menyebabkan spermatid terikat pada sel Sertoli. Holdcraft dan Robert (2004) menyatakan bahwa, hormon testosteron akan menjaga semua tahap perkembangan spermatid. Penurunan hormon mengakibatkan terlepasnya spermatid dari sel Sertoli ke lumen tubulus dan mengakibatkan gagalnya tahap spermiogenesis. Sel sertoli mempunyai peranan penting dalam spermiogenesis tetapi nikotin bersifat toksik terhadap fungsi sel Sertoli. menyebabkan fungsi sel Sertoli menjadi tidak optimal sehingga terjadi gangguan proses spermatogenesis, gangguan metabolisme sel germinal dan dapat menyebabkan apoptosis sel (Henriksen et al, 1996).

Nikotin berdasarkan sifat toksiknya dapat menurunkan jumlah sel-sel spermatogenik secara langsung melalui jalur hormonal juga bisa melalui

kerusakan dan kematian sel akibat pengaruh dari nikotin yang diberikan bersifat pro-oksidan. Pro-oksidan yang masuk ke dalam tubuh menyebabkan ketidakseimbangan antara pro-oksidan dan antioksidan sehingga terjadi stres oksidatif. Stres oksidatif akibat pajanan nikotin akan menyebabkan apoptosis pada sel spermatogenesis di tubulus seminiferus dengan meningkatkan ratio BAX, protein BAX ini akan menekan aktivitas BCL-2 pada membran mitokondria sehingga terjadi perubahan permeabilitas membran dari mitokondria, perubahan ini mengakibatkan terjadinya pelepasan *cytokrom-c* ke sitosol, di sitosol *cytokrom-c* akan mengaktivasi Apaf-1 yang selanjutnya akan mengaktivasi kaskade kaspase dan kaspase yang aktif ini akan mengakibatkan DNA-se, kemudian DNA-se yang aktif menembus membran inti dan merusak DNA, sehingga DNA sel yang bersangkutan rusak atau fragmentasi dan akhirnya sel mengalami kematian atau apoptosis. Apoptosis tersebut akan menyebabkan sel germinal menjadi atresia dan jumlahnya berkurang (Yildiz et al, 1998).

6.2 Jumlah Sel Leydig

Perlakuan nikotin selama 1 minggu, 2 minggu dan 3 minggu dengan dosis 5 mg/kg BB/hr terhadap jumlah sel Leydig menunjukkan penurunan jumlah sel-sel leydig yang bermakna ($p < 0,05$) dibandingkan dengan kelompok kontrol (tabel 5.5). Jumlah sel Leydig mengalami penurunan pada lama perlakuan 1 minggu dan 2 minggu dengan dosis yang sama yaitu 5 mg/kg BB/hr, kemudian jumlahnya meningkat pada perlakuan minggu ketiga dengan dosis yang sama yaitu 5 mg/kg BB/hr disebabkan oleh nikotin dapat meningkatkan kadar FSH sebagai mekanisme pertahanan tubuh terhadap gangguan spermatogenesis yang

ditimbulkannya. Pengaturan poros hipotalamus – hipofisis – testis, terdapat hubungan timbal balik sekresi LH dan FSH hipofisis anterior oleh testis. LH berfungsi mengatur produksi hormon testosteron oleh sel-sel interstitial Leydig didalam testis. Sel Leydig ditempatkan di dekat tubulus seminiferus. Testosteron yang dihasilkan oleh testis mempunyai efek timbal balik dengan cara meningkatkan sekresi LH oleh hipofisis anterior apabila jumlah sel Leydignya menurun, sehingga jumlah sel Leydig bertambah pada lama perlakuan 3 minggu.

Mekanisme kompensasi tersebut hanya terjadi pada perlakuan yang terlama yaitu selama 3 minggu, sedangkan pada perlakuan 1 minggu dan 2 minggu pada penelitian ini tidak terjadi kompensasi, akibatnya adalah jumlah sel-sel spermatosit primer, spermatid dan Leydig jumlahnya lebih sedikit pada lama perlakuan 1 minggu dan 2 minggu tapi kemudian jumlahnya meningkat lagi pada lama perlakuan 3 minggu. Peningkatan jumlah sel-sel spermatosit primer dan spermatid pada lama perlakuan 3 minggu ini masih tetap lebih rendah bila dibandingkan dengan jumlah sel-sel spermatosit primer, spermatid pada kelompok kontrol atau mencit yang tidak di beri perlakuan nikotin.

Penurunan sel Leydig ini disebabkan karena pengaruh dari menurunnya hormon-hormon gonadotropin yang diproduksi oleh hipofisis anterior terutama LH yang berfungsi sebagai pemelihara sel Leydig, baik dalam pertumbuhan maupun dalam fungsinya untuk mensekresi testosteron (Geneser, 1994).

Perbedaan yang bermakna antara jumlah sel-sel spermatosit primer, spermatid dan Leydig dilanjutkan dengan uji BNT. Hasilnya adalah perbedaan yang bermakna mayoritas terjadi antara kelompok kontrol dan perlakuan. Jumlah sel-sel spermatosit primer, spermatid dan Leydig tidak semua berbeda secara

bermakna disebabkan oleh perbedaan lama perlakuan yang diberikan memberikan efek yang hampir sama untuk perkembangan jumlah sel-sel spermatosit primer, spermatid dan Leydig. Lama perlakuan nikotin selama 1 minggu, 2 minggu dan 3 minggu belum dapat memberikan efek yang berbeda secara bermakna untuk semua jenis sel-sel spermatosit primer, spermatid dan Leydig, walaupun secara deskriptif terlihat penurunan jumlah.

Hasil penelitian untuk kelompok kontrol atau kelompok yang tidak diberikan injeksi nikotin, didapatkan jumlah sel-sel spermatogenik dan sel Leydig yang berbeda-beda, disebabkan karena masing-masing mencit memiliki materi genetik penyusun spermatogenesis yang berbeda-beda. Secara teori bahwa sel germinal primordial mencit jantan muncul sekitar 8 hari kehamilan, dengan jumlah hanya 100 yang merupakan awal dari jutaan spermatozoa yang akan diproduksi dan masih berada di daerah ekstra gonad. Hari ke-9 dan 10 kehamilan sebagian mengalami degenerasi dan sebagian lagi mengalami proliferasi dan bahkan bergerak pada hari ke-11 dan 12 ke daerah genitalia, pada saat itu rata-rata jumlahnya mencapai sekitar 5000, tetapi masing-masing mencit jumlahnya berbeda-beda. Proses proliferasi dan diferensiasi berlangsung di daerah medulla testis. Kehilangan sel germinal berlangsung selama perjalanan dari bagian ekstra gonad menuju daerah genital pada kasus steril. Aktivitas mitosis sel germinal primordial dalam bagian genitalia berkurang dan beberapa sel mulai degenerasi menjelang hari ke-19 kehamilan pada akhir masa fetus. Sel tampak besar yaitu spermatogonia pada saat kelahiran terdapat dalam testis mencit sepanjang hidupnya terdiri dari 3 tipe yaitu tipe A, tipe intermediate dan tipe B. (Rugh, 1967).

6.3 Gambaran Histologi Tubulus Seminiferus

Tubulus seminiferus terdiri dari sejumlah besar sel-sel epitel germinal yang disebut spermatogonia terletak dalam 2 sampai 3 lapisan sepanjang batas luar epitel tubulus. Spermatogonia terus-menerus berproliferasi untuk memperbanyak diri dan sebagian dari spermatogonia berdiferensiasi melalui tahap-tahap perkembangan tertentu untuk menghasilkan spermatozoa.

Histologi tubulus seminiferus yang normal dapat dilihat pada gambar 5.4, 5.5 dan 5.6, menunjukkan adanya sel spermatogenik pada sayatan yang melintang tubulus seminiferus testis mencit. Kelompok mencit kontrol tergolong normal dengan susunan sel rapat dan kompak, terlihat perkembangan sel-sel spermatogenik mulai dari membran basalis ke arah lumen yaitu spermatogonia, spermatosit dan spermatid, lumen tampak terisi penuh oleh spermatozoa baik yang masih menempel pada sel Sertoli maupun yang telah mengalami spermiogenesis. Kelompok mencit yang diberi injeksi nikotin selama 1 minggu, 2 minggu dan 3 minggu, terlihat susunan sel-sel spermatogenik yang longgar dan tidak teratur, kepadatan spermatozoa didalam lumen tubulus tidak seperti pada kelompok kontrol, lumen pada kelompok ini mengandung spermatosit primer dan spermatid yang lebih sedikit sehingga lumen terlihat tidak penuh. Longgarnya susunan spermatogenik pada penampang tubulus seminiferus testis mencit pada kelompok perlakuan nikotin selama 1 minggu, 2 minggu dan 3 minggu dibandingkan dengan kelompok kontrol disebabkan oleh adanya kerusakan sel-sel spermatogenik yang selanjutnya akan berdegenerasi dan difagositosis oleh sel Sertoli.

Kerusakan tubulus seminiferus dapat dikelompokkan menjadi empat kategori.: 1). atropi tubular, yaitu hilangnya seluruh sel didalam tubulus

seminiferus, kecuali sel Sertoli, 2). nekrosis tubular, yaitu kerusakan seluruh unsur sel didalam tubulus seminiferus dan terlihat adanya sisa-sisa nekrosis mengisi lumen. 3). hilangnya sel-sel intermedia, di dalam tubulus terlihat sel Sertoli, spermatosit primer dan spermatid. Sel-sel intermedia adalah bentuk akhir spermatogonium A sebelum berubah menjadi spermatogonium B. 4). adalah penurunan spermatogenesis yaitu paling sedikit 75% jumlah spermatozoa yang terlihat dalam lumen dengan bentuk intermedia yang utuh (Burkitt, 1993).

BAB 7
KESIMPULAN DAN SARAN

BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Hasil penelitian dan analisis data yang telah dilakukan, maka hipotesis dapat terbukti kebenarannya, yaitu :

- a. Pemberian injeksi nikotin subkutan selama 1 minggu, 2 minggu dan 3 minggu dapat menurunkan jumlah sel-sel spermatogenik (sel spermatosit primer, spermatid) serta sel Leydig pada mencit jantan (*Mus musculus*).
- b. Waktu pemberian minimal (1 minggu) sudah menunjukkan penurunan dari jumlah sel-sel spermatogenik (sel spermatosit primer, spermatid) serta sel Leydig pada mencit jantan (*Mus musculus*).
- c. Perbedaan pengaruh yang sangat bermakna untuk sel-sel spermatosit primer yaitu perlakuan 3 minggu terhadap kontrol 3 minggu dan perlakuan 2 minggu terhadap kontrol 3 minggu. Perbedaan pengaruh yang sangat bermakna untuk sel-sel spermatid yaitu perlakuan 1 minggu terhadap kontrol 2 minggu dan perlakuan 2 minggu terhadap kontrol 3 minggu. Perbedaan pengaruh yang sangat bermakna untuk sel-sel Leydig yaitu perlakuan 2 minggu terhadap kontrol 3 minggu dan perlakuan 3 minggu terhadap kontrol tiga minggu dan perlakuan 1 minggu terhadap kontrol 3 minggu

7.2 Saran

Penelitian-penelitian yang berikutnya supaya dapat memperluas wawasan penelitian mengenai pengaruh nikotin terhadap system reproduksi pria, disarankan untuk melakukan penelitian, seperti :

- a. Mekanisme kerja nikotin dalam menghambat hormon-hormon yang berperan pada spermatogenesis.
- b. Mekanisme kerja nikotin dalam menimbulkan kerusakan dan kematian sel secara langsung dalam spermatogenesis.

DAFTAR PUSTAKA

DAFTAR PUSTAKA

- Arief, S, 2006. Radikal bebas. SMF Ilmu Kesehatan Anak FK Unair/RSU Dr. Soetomo. Surabaya, hal 45-50.
- Al Mutairi SS, Shihab AA, Mojiminiyi OA, and Anwar AA, 2006. Comparative analysis of the effects of hubble-dubble (Sheesha) and cigarette smoking on respiratory and metabolic parameters in hubble-bubble and cigarette smokers. *Respirology* 11 (4) : 449-445.
- Ashakumary, L. and Vijayammal, P.L, 1997. Additive effect of alcohol and nicotine on LPO and antioxidant defence mechanism in rats. *Journal of Application Toxicology*, 16:305 – 308.
- Augood, C,et al, 1998. Smoking and male infertility ; a systematic review and meta-analysis, *Human Reproduction Update*, vol.13,No. 6 pp : 1532-139.
- Baker RR and Dixon, 2006. The retention of tobacco smoke constituents in the human respiratory tract. *Inhalation Toxicology* 18 (4) : 255-294.
- Bartlett , 1999. Testosterone withdrawal promotes stage specific detachment of roun spermatid from the rat seminiferous epithelium. *Biology reproduction*, 55: 895-900.
- Bui L.M, Keen C.I, Dubick M.A, 1995. Comparative effect of 6 week nicotine treatment on blood pressure and components of the antioxidant system in male spontaneously hypertensive and normotensie wistar Kyoto rats. *Toxicology*, 98: 57-65.
- Burkitt HG, 1993. *Functional histology, a text and colour atlas*. London. Longman Group.p 46.
- Benowitz NL, 1994. Pharmacologic aspects of cigarette smoking and nicotine addiction. *New engle J. med. England*.pp. 235-237.
- Bloom dan Fawett, 2002. *Buku ajar histology*. Edisi ke-12. Alih bahasa : Jan Tamboyang, Jakarta : EGC, hal 24-30.
- Britton J, Jarvis M, McNeil A, Bates C, Cuthbertson Land Godfrey C, 2001. *Penanganan adiksi nikotin*.
<http://members.aol.com/profchm/davis.html>.akses 16 September 2009.
- Brust JCM, 2004. *Neurological aspects of substance abuse*, 2nd.ed. Philadelphia: Elsevier.pp. 34-38.

- Dahlan, 2008. Statistik untuk kedokteran dan kesehatan. Jakarta : Penerbit Salemba Medika, hal.40-45.
- Durazzo TC, Rothlind JC, Gazdzinski S, Banys P, and Meyerhoff DJ, 2007. A comparison of neurocognitive function in nonsmoking and chronically smoking short-term abstinent alcoholics. 39(1): 1-11.
- Frandsen, R.D, 1992. Anatomi dan fisiologi. Edisi 4. Terjemahan : B. Srigondo. GajahMada University Press. Yogyakarta, hal 774-779.
- Geneser F, 1994. Buku teks histology. Jilid 2. Alih bahasa : Arifin Wijaya dkk. Jakarta : Binarupa Aksara, hal 45-65.
- Guyen, M.C, Can, A. Ergun, Y. Aydos, 1999. Ultrastructure effect of cigarette smoke on rat testis. European Urology, 36 : 645-649.
- Goldfrank L, Melinek M and Blum A, 1990. Nicotine. Hospital Physician. pp. 56-68.
- [Http://www.image search.yahoo.com/images/view?back=http % 3A % .](http://www.image_search.yahoo.com/images/view?back=http%3A%2F%2Fwww.histol.chuvashia.com%2Fhistol.narod.ru%2Fhistol.boom.ru) Spermatogenesis. Diakses tanggal 11 Januari 2010.
- [Http ://www.histol.chuvashia.com](http://www.histol.chuvashia.com) [histol.narod.ru](http://www.histol.narod.ru) [histol.boom.ru](http://www.histol.boom.ru). histologi testis. Diakses tanggal 15 Januari 2010.
- [Http/www. White quite.com](http://www.whitequite.com) kerja nikotin pada reseptor. Diakses tanggal 11 Januari 2010.
- [Http://www. Nicotine independency index. Com](http://www.nicotineindependencyindex.com), 2007. Rumus kimia nikotin. Diakses tanggal 11 Januari 2010.
- Hafez E S E and D Garner, 1993, Spermatozoa and seminal plasma in reproduction in farm animal, 6 th ed, Philadelphia: Lea and Febiger, pp 165-73.
- Hayati, A, 2010. Spermatologi. Departemen Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga, hal. 64-70
- Halliwell B and Gutteridge J, 1999. Free radical in biology and medicine. Claredon Press : London. pp. 145-150.
- Henriksen K, Kangasniemi M, Parvinen M, 1996. In vitro, FSH prevents apoptosis and stimulating deoxyribonucleic acid synthesis in the rat seminiferous epithelium in a stage specific fashion. Endocrinology Journal. 137 (5) : 2141.
- Holdcraft, R.W., Braun, 2004. Hormonal regulation of spermatogenesis. International Journal of Andrology, 27: 335-342.

- Hukkanen J, Jacob P and Benowitz NL, 2005. Metabolism and disposition kinetics of nicotine. *Pharmacological Reviews* 57(1) : 79-115.
- Ismudiono, 1999. Fisiologi reproduksi pada ternak. Edisi 2, Surabaya; Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, hal. 29-36.
- Joewana S, 2004. Gangguan mental dan perilaku akibat penggunaan zat psikoaktif, Edisi 2. Jakarta:EGC, hal.154-179.
- Johnson M and Everitt B, 2000. Testicular function in the adult. Dalam *Essential Reproduction*.Fifth Ed, pp. 53-67.
- Junqueira LC, Carneiro J dan Kelley RO, 1997. Histology dasar. Edisi ke-8. Alih bahasa : Jan Tamboyang. Jakarta : EGC, hal. 44-50
- Kakisina P, 2003. Pengaruh nikotin terhadap perkembangan embrio mencit (*Mus musculus*). Tesis, Program Pascasarjana, Unair, Surabaya.
- Kusumawati D, 2004. Bersahabat dengan hewan coba. Yogyakarta: Gajah Mada Universitas Press, hal. 34-40.
- Kemas A.S, 1991. Rancangan percobaan. Universitas Sriwijaya Palembang. Jakarta : Rajawali Press, hal. 19-52.
- Kim, J.M, et al, 2001. Caspase 3 and caspase activated deoxyribonuclease are associated with testicular germ cell apoptosis resulting from reduced intratesticular testosterone. *Endocrinology* 142; 3809-3916.
- Latha, M.S, Vijayammal, P.L. & Kurup, P.A, 1993. Effect of nicotine administration on lipid metabolism in rats. *Indian Journal of Medical Research*, 98: 44-49.
- Lesson CR, Leeson TS dan Paparo AA, 1996. Buku ajar histology. Edisi ke-5. Alih bahasa : Jan Tamboyang. Jakarta : EGC, hal. 23-26.
- Mahanem M.N, Nor A.B, Phang H.T, Muhammad H.R, 2006. Effects of nicotine and co-administration of nicotine and vitamin e on testis and sperm quality of adult rats. Department of Physiology, Faculty of Medicine. University Kebangsaan Malaysia.
- Matsumoto AM, 2001. The testis in endocrinology and metabolism : Felig P. & Frohman L.A, MC Grawhill, USA, pp. 635-705
- Mc Lachlan RL, 2000. Male hormonal contraception, a safe, acceptable and reversible choice. *MJA*; 172:254-255.

- Nair, R and Chandrima, S, 2003. Diethylstilbestrol induced rat spermatogenic cell apoptosis in vivo through increased expression of spermatogenic cell fas/fas system. *J Bio Chem*, Vol.278. .No.8, pp.6470-6481.
- Neal MS, Zhu J, Holloway AC and Foster WG, 2007. Follicle growth is inhibited by benzo-[a]-pyrene at concentration representative of human exposure in an isolated rat follicle culter assay. *Human Reproduction* 22(4) : 961-967.
- Nor A, 2005. Pengaruh pajanan asap rokok terhadap spermatogenesis dan kualitas spermatozoa mencit. *Makara Kesehatan*, p. 10.
- Nowak TJ and Handford AG, 1999. *Essentials of pathophysiology. Concepts and application for health care professionals*. USA : WCB McGraw-Hill.
- Nikki E, 1997. *Free radical in chemistry and biochemistry, food and free radicals*. Plenum Press : New York.pp. 20-25.
- Poernomo, B.S. Widjiati, E.M. Luqman, M. Mafruchati dan D.M. Endang, 1999. *Diktat Embriologi. Laboratorium Ilmu Mudigah. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya*, hal. 19-25.
- Patterson TR, Stringham JD, Meikle AW, 1990. Nicotine and cotinine inhibit steroidogenesis in mouse Leydig cells. *Life Sci* 46:265-72.
- Pascualoto SS, Luxon AN, Supreyto SP, Pascualoto EB, and Arat S, 2004. Efek of medical therapy alcohol smoking and endocrine disturbs on meal infertility. *Edisi* 59, hal 375-382.
- Paz GF, Yavetz H, Hauser R, Yogev LM, Homonnai ZT, 1993. *Pathophysiology of human testis, infertility male and female*. Churchill Livingstone, pp. 23-26
- Riduwan, 2009. *Dasar-dasar statistika*. Bandung. Penerbit Alfabeta, hal.217-222, 238-243.
- Rayburn DS and Carey, 2004. *Obstetric and gynecology*. Alih bahasa oleh Kalik TMA. Jakarta : EGC, hal 313-332.
- RCOG Guidelines, 2000. The first category the basic routine infertility, investigation grade B recommendation 1999 in ESHRE Capri workshop. *National Guidelines Clearinghouse*.
- Said, T.M, Uwe P, Hans, J.G, and Ashok, A, 2004. Role of caspases in male infertility. *Human Reproduction Update*. Vol.10, No.1, pp; 39-51.
- Sudiana I, 2008. *Patobiologi molekuler kanker*. Jakarta : Salemba Medika, hal 14-17

- Sugiyono, 2008. Metode penelitian kuantitatif. Bandung : Penerbit Alfabeta, hal 10-25.
- Susanna D, Hartono B, Fauzan H, 2003. Penentuan kadar nikotin dalam asap rokok. Makara Kesehatan : 7-12.
- Silalahi, J, 2001. Free radicals and antioxidant vitamins in degenerative disease. The Journal of Indonesia Medical Association : 1-13.
- Soehadi K, dan Winarso H, 1996. Infertilitas pria masa kini dan masa akan datang. Dalam Seminar Penanganan Andrologik pada Infertilitas dan Impotensi. Poli Andrologi RSUD Dr. Soetomo Surabaya dan Lab. Biomedik Fakultas Kedokteran Unair. Surabaya : 20 April 1996.
- Sherwood, Lauralee, 2004. Human physiology. 5 th Edition. International Student Edition. Thomson Brooks/Cole. United States of Amerika.pp. 145-150.
- Speroff L and Fritz MA, 2005. Clinical gynecologic endocrinology and infertility. Seventh edition book 1 and 2. Philadelphia : Lippincot Williams and Wilkins.pp. 575-600.
- Tienhoven, V.A, 1983, Physiology of vertebrates. Cornell University Press. London.pp.300-305.
- Vander A, Sherman J, Luciano D, 2001. Human physiology, the mechanism of body function. New York : McGraw Hill.pp.324-330.
- Vasquez J, 2008. Human rights dan health : person exposed to second hand tobacco smoke. Washington DC : Pan America Health Organization.pp.23-25.
- Walker HW, Cheng J, 2005. FSH and testosterone signaling in sertoli cells. Reproduction 130 (1) : 15-28.
- Whalley Dm, et al, Fowler J, 1992. Comparison of the attentional and consolidation hypotheses for the facilitation of memory by nicotine. Phychopharmacology. 108 ; 443-7.
- Wonodirekso S, 2003. Penuntun praktikum histology. Bagian histology Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta : Dian Rakyat, hal 5-15.
- WHO, 2000. Air quality guidelines second edition. Copenhagen; WHO regional office for Europe.pp.23-30.
- Wolff, 1994. Azas-azas kimia medicinal. Edisi keempat. Yogyakarta : Gajah Mada Press, hal 22-27.

- Yamamoto Y, Isoyama, E, Sofikitis, N. & Miyagawa, I, 1998. Effect of smoking on testicular function and fertilizing potential in rats. *Urology Research*, 26: 45-48.
- Yardimci, S, Atan T, Delibasi K, Sunguroglu M, Guven C, 1997. Long term effect of cigarette smoke exposure on plasma testosterone, luteinizing hormone and follicle stimulating hormone levels in male rats. *Br J Urol*. 799 : 66 – 9.
- Yildiz. D., Ercal, N. & Armstrong, D.W, 1998. Nicotine enantiomers and oxidative stress. *Toxicology*, 130: 155-165.

LAMPIRAN

Lampiran 1.

Jadwal Kegiatan Penulisan Tesis

KEGIATAN	WAKTU PELAKSANAAN									
	BULAN (2009)		BULAN (2010)							
	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8
Pengusulan pembimbing										
Bimbingan proposal penelitian										
Ujian proposal penelitian										
Perbaikan proposal penelitian										
Ijin pelaksanaan penelitian										
Pelaksanaan penelitian										
Pengumpulan dan analisa data										
Bimbingan Tesis										
Ujian Tesis										
Perbaikan Tesis										

Lampiran 2

Prosedur Pembuatan Larutan Nikotin

Cara pembuatan larutan dengan dosis 10 mg/kgBB dengan bahan nikotin yang berbentuk cair dengan kemurnian 97%. BM nikotin = 58,464, BJ nikotin = 1,008.

Dosis 10 mg/kgBB akan disuntikan 0,1 ml/10 gBB = 10 ml/kgBB (10 g ~ 0,1 ml), 1 kg (1000gr) ~ 10 ml; 1000g/10 g x 0,1 ml = 10 ml; artinya dalam 10 ml larutan mengandung 12 mg nikotin, maka :

$$\begin{aligned} 10 \text{ mg/kgBB} &= 0,01 \text{ g} \\ &= 0,01/1,08 \\ &= 0,00992063 \text{ ml} \end{aligned}$$

Karena nikotin yang tersedia kemurnian 97%, maka harus diambil :

$$\begin{aligned} &= 0,00992063 \text{ ml} \times 100/97 \\ &= 0,01022745 \\ &= 10,22745 \mu\text{l} \end{aligned}$$

Jadi untuk membuat 10 ml larutan dosis 10 mg/kgBB dengan cara mengambil 10,22745 μl larutan nikotin murni, kemudian ditambahkan aquabidestilata hingga mencapai volume 10 ml. jumlah yang disuntikan adalah 0,1 ml/10 g BB

$$\begin{aligned} \text{Untuk dosis } 5 \text{ mg/kgBB} &= 5/10 \times 10,22745 \mu\text{l} \\ &= 5,113725 \mu\text{l} \end{aligned}$$

Jadi untuk membuat 10 ml larutan dosis 5 mg/kgBB dengan cara mengambil 5,113725 μl larutan nikotin murni, kemudian ditambahkan aquabidestilata hingga mencapai volume 10 ml. jumlah yang disuntikan adalah 0,1 ml/10 g BB mencit.

Lampiran 3.

Pembuatan Preparat Histologi

Metode yang dipergunakan dalam pembuatan preparat testis ini adalah dengan metode parafin dan teknik pengecatannya dengan pewarnaan H-E (*Hematoxylin-Eosin*). Hematoxylin dapat mewarnai inti sel dan memperlihatkan bagian dalam inti sel, sedangkan Eosin dapat mewarnai sitoplasma.

Tahapan-tahapan yang harus dilakukan antara lain:

1. Menyiapkan bahan / jaringan

Testis yang banyak mengandung darah dicuci dengan larutan isotonis (NaCl fisiologis). Kemudian dipotong seperlunya.

2. Potongan jaringan difiksasi dalam larutan buffer formalin 10% selama kira-kira 1 hari.

3. Dehidrasi dengan alkohol 70%, alkohol 80%, alkohol 95%, alkohol absolut, lalu alkohol absolut lagi, masing-masing dilakukan selama 30 menit.

4. *Clearing* (penjernihan) dengan merendam jaringan dengan menggunakan alkohol xylol = 1:1 selama 30 menit, diclearing lagi dengan xylol selama 30 menit sebanyak 3 kali.

5. Impregnasi menggunakan campuran parafin cair (pada suhu 65° C) : xylol = 1:1 selama 30 menit.

6. *Embeding* menggunakan parafin cair yang kemudian dituangkan ke dalam cetakan besi, kemudian irisan testis dimasukkan dengan posisi yang telah diatur sedemikian rupa, kemudian didinginkan hingga parafin membeku.

7. *Trimming*: cetakan parafin dipotong yang rapi sehingga nanti dapat diiris dengan mikrotom.

8. Pemotongan cetakan parafin dengan mikrotom sengan ukuran kira-kira 8 μm .
9. *Mounting* 1, yaitu meletakkan sayatan pada kaca dengan perekat campuran asam cuka, albumin dan air.
10. Deparafinisasi di dalam xylol selama 1 menit sebanyak 2 kali, kemudian dipindahkan ke dalam alkohol secara berurutan dari alkohol absolut selama 1 menit sebanyak 2 kali, lalu masuk ke dalam alkohol 95% 1 menit, alkohol 80% 1 menit sebanyak 2 kali, lalu terakhir ke dalam alkohol 70% selama 1 menit.
11. Hidrasi dengan aquadest selama 10 menit
12. Pewarnaan dengan H-E, berarti harus dimasukkan ke dalam Hematoxylin selama 5 menit, kemudian dicuci di bawah air mengalir selama 5-10 menit, lalu dimasukkan ke dalam Eosin selama 1 menit, kemudian dicuci lagi di bawah air mengalir selama beberapa detik.
13. Dehidrasi kembali dengan merendam sediaan secara berturut-turut masing - masing ke dalam larutan alkohol 70% beberapa detik, alkohol 80% beberapa detik, alkohol 95% selarnal menit sebanyak 2 kali, lalu alkohol absolut selama 1 menit juga sebanyak 2 kali.
14. *Clearing* dengan merendam di dalam larutan xylol selama 1 menit sebanyak 2 kali sambil dibersihkan.
15. *Mounting* II: melekatkan kaca penutup dengan entellan.
16. *Labelling* supaya tidak tertukar dengan preparat lainnya.

Lampiran 4

Tabel Data Kasar Hasil Penelitian Jumlah Sel Spermatisit Primer, Spermatisid dan Leydig Selama Perlakuan 1 Minggu

Mencit ke-1						
LPD	K1	P1	K 2	P 2	K 3	P 3
1	39	30	70	45	22	7
2	27	25	73	22	7	3
3	40	28	15	10	10	6
X	35,5	27,7	52,7	25,7	13	5,4
Mencit ke-2						
1	40	33	30	29	14	13
2	50	39	28	25	15	15
3	40	38	35	15	15	15
X	43,4	36,7	31	23	14,7	14,4
Mencit ke-3						
1	28	25	15	14	10	7
2	30	25	25	14	15	8
3	20	18	20	19	17	6
X	26	22,7	20	15,7	14	7
Mencit ke-4						
1	40	39	65	45	8	3
2	35	30	40	40	25	7
3	51	29	50	40	13	8
X	42	32,7	51,7	41,7	15,4	6
Mencit ke-5						
1	25	21	63	54	10	8
2	45	43	60	51	15	7
3	25	22	50	48	9	5
X	31,7	28,7	57,7	51	11,4	6,7

Lampiran 6

Tabel Data Kasar Hasil Penelitian Jumlah Sel Spermatisit Primer, Spermatisid dan Leydig Selama Perlakuan 3 Minggu

Mencit ke-1						
LPD	K1	P1	K 2	P 2	K 3	P 3
1	45	18	92	44	21	16
2	36	21	71	37	41	13
3	41	26	86	77	15	10
X	40,7	21,7	83	52,7	25,7	13
Mencit ke-2						
1	35	32	70	60	8	6
2	40	21	58	37	12	5
3	57	33	79	76	9	6
X	44	28,7	69	57,7	9,7	5,7
Mencit ke-3						
1	37	36	86	71	26	14
2	31	31	122	88	23	18
3	48	36	40	36	23	11
X	38,7	34,4	82,6	65	24	14,4
Mencit ke-4						
1	45	12	110	27	16	3
2	23	11	67	3	20	7
3	44	16	61	18	13	6
X	37,4	13	79,4	16	16,4	5,4
Mencit ke-5						
1	40	18	105	28	21	5
2	45	26	88	12	15	8
3	45	30	90	50	20	8
X	43,4	24,7	94,4	30	18,7	7

Lampiran 7

Uji Normalitas

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
spermatisid primer	30	30.970	8.3146	13.0	44.0
spermatid	30	44.013	23.1985	15.7	94.4
leydig	30	11.047	5.5117	3.7	25.7

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		spermatisid primer	spermatid	leydig
N		30	30	30
Normal Parameters(a,b)	Mean	30.970	44.013	11.047
	Std. Deviation	8.3146	23.1985	5.5117
Most Extreme Differences	Absolute	.080	.156	.135
	Positive	.059	.156	.135
	Negative	-.080	-.111	-.103
Kolmogorov-Smirnov Z		.440	.854	.741
Asymp. Sig. (2-tailed)		.990	.459	.643

a Test distribution is Normal.

b Calculated from data.

Lampiran 8

Hasil Analisis Jumlah Sel-Sel Spermatisit Primer

Descriptives

spermatisid primer

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound
perlakuan 1	5	29.700	5.2915	2.3664	23.130	36.270
perlakuan 2	5	22.760	7.1842	3.2129	13.840	31.680
perlakuan 3	5	24.500	7.9966	3.5762	14.571	34.429
kontrol	5	35.720	7.2303	3.2335	26.742	44.698
perlakuan 1 kontrol	5	32.300	2.5189	1.1265	29.172	35.428
perlakuan 2 kontrol	5	40.840	2.8711	1.2840	37.275	44.405
perlakuan 3 kontrol	5	30.970	8.3146	1.5180	27.865	34.075
Total	30	30.970	8.3146	1.5180	27.865	34.075

Minimum	Maximum
22.7	36.7
15.0	32.4
13.0	34.4
26.0	43.4
30.4	36.7
37.4	44.0
13.0	44.0

Test of Homogeneity of Variances

spermatisid primer

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.820	5	24	.147

ANOVA

spermatisid primer

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1163.131	5	232.626	6.633	.001
Within Groups	841.692	24	35.071		
Total	2004.823	29			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: spermatisid primer

LSD

* The mean difference is significant at the .05 level.

(I) GROUP	(J) GROUP	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
perlakuan 1	perlakuan 2	6.940	3.7454	.076	-.790	14.670
	perlakuan 3	5.200	3.7454	.178	-2.530	12.930
	kontrol perlakuan 1	-6.020	3.7454	.121	-13.750	1.710
	kontrol perlakuan 2	-2.600	3.7454	.494	-10.330	5.130
	kontrol perlakuan 3	-11.140(*)	3.7454	.007	-18.870	-3.410
perlakuan 2	perlakuan 1	-6.940	3.7454	.076	-14.670	.790
	perlakuan 3	-1.740	3.7454	.646	-9.470	5.990
	kontrol perlakuan 1	-12.960(*)	3.7454	.002	-20.690	-5.230
	kontrol perlakuan 2	-9.540(*)	3.7454	.018	-17.270	-1.810
	kontrol perlakuan 3	-18.080(*)	3.7454	.000	-25.810	-10.350
perlakuan 3	perlakuan 1	-5.200	3.7454	.178	-12.930	2.530
	perlakuan 2	1.740	3.7454	.646	-5.990	9.470
	kontrol perlakuan 1	-11.220(*)	3.7454	.006	-18.950	-3.490
	kontrol perlakuan 2	-7.800(*)	3.7454	.048	-15.530	-.070
	kontrol perlakuan 3	-16.340(*)	3.7454	.000	-24.070	-8.610
kontrol perlakuan 1	perlakuan 1	6.020	3.7454	.121	-1.710	13.750
	perlakuan 2	12.960(*)	3.7454	.002	5.230	20.690
	perlakuan 3	11.220(*)	3.7454	.006	3.490	18.950
	kontrol perlakuan 2	3.420	3.7454	.370	-4.310	11.150
	kontrol perlakuan 3	-5.120	3.7454	.184	-12.850	2.610
kontrol perlakuan 2	perlakuan 1	2.600	3.7454	.494	-5.130	10.330
	perlakuan 2	9.540(*)	3.7454	.018	1.810	17.270
	perlakuan 3	7.800(*)	3.7454	.048	.070	15.530
	kontrol perlakuan 1	-3.420	3.7454	.370	-11.150	-4.310
	kontrol perlakuan 3	-8.540(*)	3.7454	.032	-16.270	-.810
kontrol perlakuan 3	perlakuan 1	11.140(*)	3.7454	.007	3.410	18.870
	perlakuan 2	18.080(*)	3.7454	.000	10.350	25.810
	perlakuan 3	16.340(*)	3.7454	.000	8.610	24.070
	kontrol perlakuan 1	5.120	3.7454	.184	-2.610	12.850
	kontrol perlakuan 2	8.540(*)	3.7454	.032	.810	16.270

Lampiran 9

Hasil Analisis Jumlah Sel Spermatid**Descriptives**

spermatid

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minim	Max
					Lower Bound	Upper Bound		
perlakuan 1	5	31.420	14.4895	6.4799	13.429	49.411	15.7	51.0
perlakuan 2	5	22.560	6.3987	2.8616	14.615	30.505	16.7	32.7
perlakuan 3	5	44.280	20.5182	9.1760	18.803	69.757	16.0	65.0
kontrol perlakuan 1	5	42.620	16.2646	7.2737	22.425	62.815	20.0	57.7
kontrol perlakuan 2	5	41.520	18.0396	8.0676	19.121	63.919	26.4	71.4
kontrol perlakuan 3	5	81.680	9.0880	4.0643	70.396	92.964	69.0	94.4
Total	30	44.013	23.1985	4.2355	35.351	52.676	15.7	94.4

Test of Homogeneity of Variances

spermatid

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.445	5	24	.063

ANOVA

spermatid

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	10229.223	5	2045.845	9.130	.000
Within Groups	5377.772	24	224.074		
Total	15606.995	29			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: spermatid
LSD

* The mean difference is significant at the .05 level.

(I) GROUP	(J) GROUP	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
perlakuan 1	perlakuan 2	8.860	9.4673	.359	-10.680	28.400
	perlakuan 3	-12.860	9.4673	.187	-32.400	6.680
	kontrol perlakuan 1	-11.200	9.4673	.248	-30.740	8.340
	kontrol perlakuan 2	-10.100	9.4673	.297	-29.640	9.440
	kontrol perlakuan 3	-50.260(*)	9.4673	.000	-69.800	-30.720
perlakuan 2	perlakuan 1	-8.860	9.4673	.359	-28.400	10.680
	perlakuan 3	-21.720(*)	9.4673	.031	-41.260	-2.180
	kontrol perlakuan 1	-20.060(*)	9.4673	.045	-39.600	-.520
	kontrol perlakuan 2	-18.960	9.4673	.057	-38.500	.580
	kontrol perlakuan 3	-59.120(*)	9.4673	.000	-78.660	-39.580
perlakuan 3	perlakuan 1	12.860	9.4673	.187	-6.680	32.400
	perlakuan 2	21.720(*)	9.4673	.031	2.180	41.260
	kontrol perlakuan 1	1.660	9.4673	.862	-17.880	21.200
	kontrol perlakuan 2	2.760	9.4673	.773	-16.780	22.300
	kontrol perlakuan 3	-37.400(*)	9.4673	.001	-56.940	-17.860
kontrol perlakuan 1	perlakuan 1	11.200	9.4673	.248	-8.340	30.740
	perlakuan 2	20.060(*)	9.4673	.045	.520	39.600
	perlakuan 3	-1.660	9.4673	.862	-21.200	17.880
	kontrol perlakuan 2	1.100	9.4673	.908	-18.440	20.640
	kontrol perlakuan 3	-39.060(*)	9.4673	.000	-58.600	-19.520
kontrol perlakuan 2	perlakuan 1	10.100	9.4673	.297	-9.440	29.640
	perlakuan 2	18.960	9.4673	.057	-.580	38.500
	perlakuan 3	-2.760	9.4673	.773	-22.300	16.780
	kontrol perlakuan 1	-1.100	9.4673	.908	-20.640	18.440
	kontrol perlakuan 3	-40.160(*)	9.4673	.000	-59.700	-20.620
kontrol perlakuan 3	perlakuan 1	50.260(*)	9.4673	.000	30.720	69.800
	perlakuan 2	59.120(*)	9.4673	.000	39.580	78.660
	perlakuan 3	37.400(*)	9.4673	.001	17.860	56.940
	kontrol perlakuan 1	39.060(*)	9.4673	.000	19.520	58.600
	kontrol perlakuan 2	40.160(*)	9.4673	.000	20.620	59.700

Lampiran 10

Hasil Analisis Jumlah Sel Leydig**Descriptives**

leydig

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Max
					Lower Bound	Upper Bound		
perlakuan 1	5	7.900	3.6865	1.6486	3.323	12.477	5.4	14.4
perlakuan 2	5	5.700	1.9723	.8820	3.251	8.149	3.7	9.0
perlakuan 3	5	9.100	4.2708	1.9100	3.797	14.403	5.4	14.4
kontrol perlakuan 1	5	13.700	1.5620	.6986	11.760	15.640	11.4	15.4
kontrol perlakuan 2	5	10.980	1.5944	.7130	9.000	12.960	9.4	13.4
kontrol perlakuan 3	5	18.900	6.3871	2.8564	10.969	26.831	9.7	25.7
Total	30	11.047	5.5117	1.0063	8.989	13.105	3.7	25.7

Test of Homogeneity of Variances

leydig

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3.058	5	24	.028

ANOVA

leydig

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	554.987	5	110.997	8.172	.000
Within Groups	325.988	24	13.583		
Total	880.975	29			

Multiple Comparisons

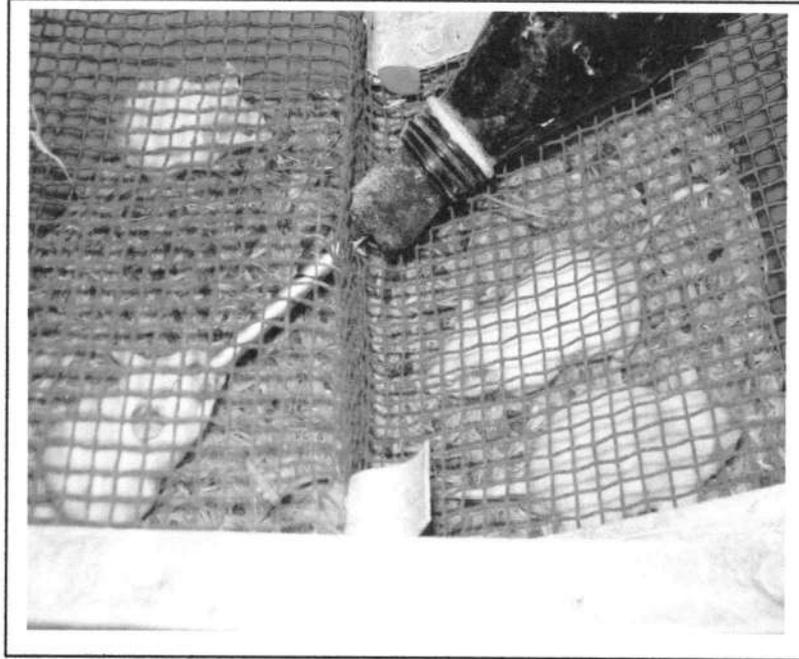
Dependent Variable: leydig
LSD

* The mean difference is significant at the .05 level.

(I) GROUP	(J) GROUP	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
perlakuan 1	perlakuan 2	2.200	2.3309	.355	-2.611	7.011
	perlakuan 3	-1.200	2.3309	.611	-6.011	3.611
	kontrol perlakuan 1	-5.800(*)	2.3309	.020	-10.611	-.989
	kontrol perlakuan 2	-3.080	2.3309	.199	-7.891	1.731
	kontrol perlakuan 3	-11.000(*)	2.3309	.000	-15.811	-6.189
perlakuan 2	perlakuan 1	-2.200	2.3309	.355	-7.011	2.611
	perlakuan 3	-3.400	2.3309	.158	-8.211	1.411
	kontrol perlakuan 1	-8.000(*)	2.3309	.002	-12.811	-3.189
	kontrol perlakuan 2	-5.280(*)	2.3309	.033	-10.091	-.469
	kontrol perlakuan 3	-13.200(*)	2.3309	.000	-18.011	-8.389
perlakuan 3	perlakuan 1	1.200	2.3309	.611	-3.611	6.011
	perlakuan 2	3.400	2.3309	.158	-1.411	8.211
	kontrol perlakuan 1	-4.600	2.3309	.060	-9.411	.211
	kontrol perlakuan 2	-1.880	2.3309	.428	-6.691	2.931
	kontrol perlakuan 3	-9.800(*)	2.3309	.000	-14.611	-4.989
kontrol perlakuan 1	perlakuan 1	5.800(*)	2.3309	.020	.989	10.611
	perlakuan 2	8.000(*)	2.3309	.002	3.189	12.811
	perlakuan 3	4.600	2.3309	.060	-.211	9.411
	kontrol perlakuan 2	2.720	2.3309	.255	-2.091	7.531
	kontrol perlakuan 3	-5.200(*)	2.3309	.035	-10.011	-.389
kontrol perlakuan 2	perlakuan 1	3.080	2.3309	.199	-1.731	7.891
	perlakuan 2	5.280(*)	2.3309	.033	.469	10.091
	perlakuan 3	1.880	2.3309	.428	-2.931	6.691
	kontrol perlakuan 1	-2.720	2.3309	.255	-7.531	2.091
	kontrol perlakuan 3	-7.920(*)	2.3309	.002	-12.731	-3.109
kontrol perlakuan 3	perlakuan 1	11.000(*)	2.3309	.000	6.189	15.811
	perlakuan 2	13.200(*)	2.3309	.000	8.389	18.011
	perlakuan 3	9.800(*)	2.3309	.000	4.989	14.611
	kontrol perlakuan 1	5.200(*)	2.3309	.035	.389	10.011
	kontrol perlakuan 2	7.920(*)	2.3309	.002	3.109	12.731

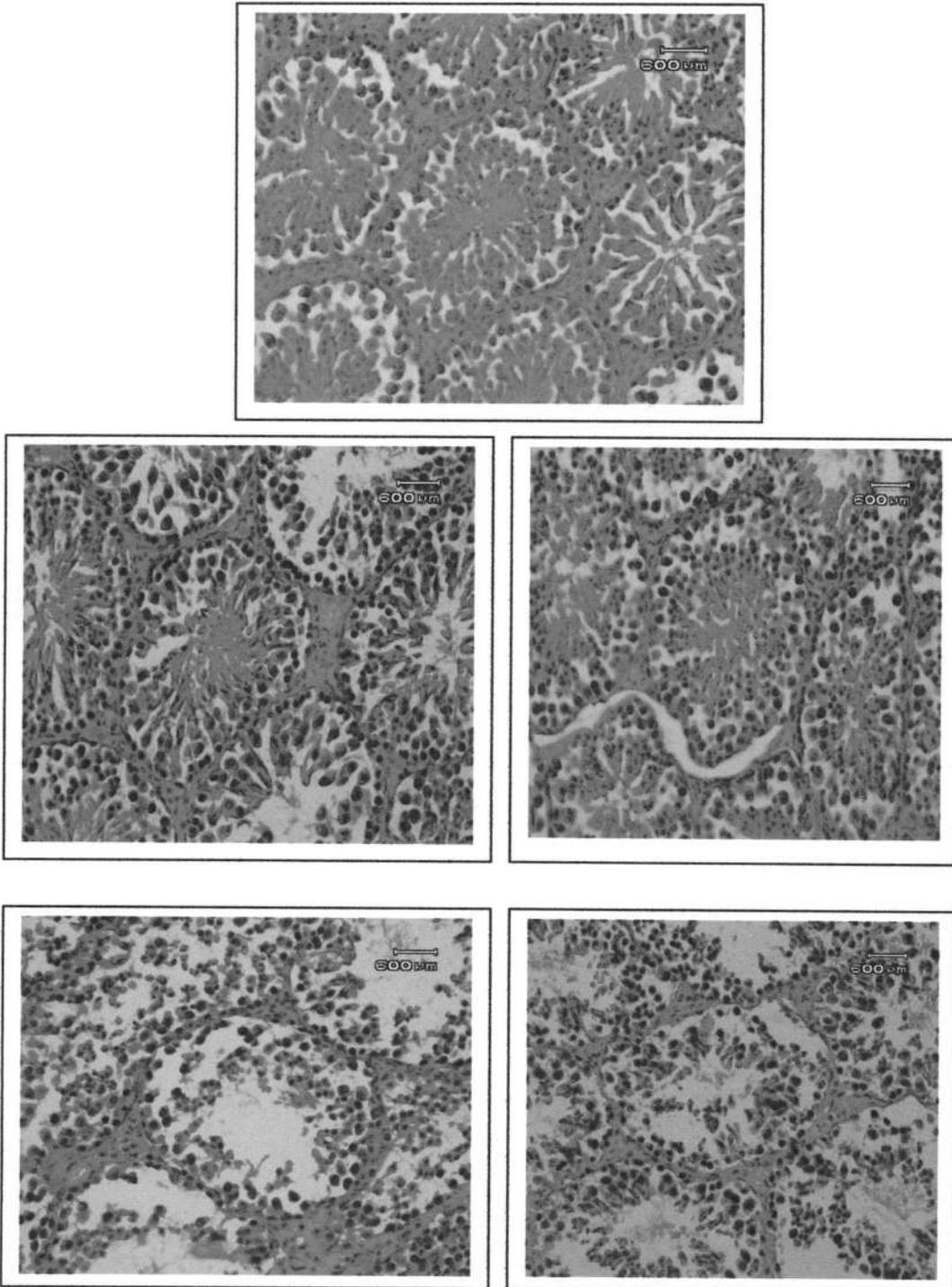
Lampiran 11

Hewan Coba



Lampiran 12

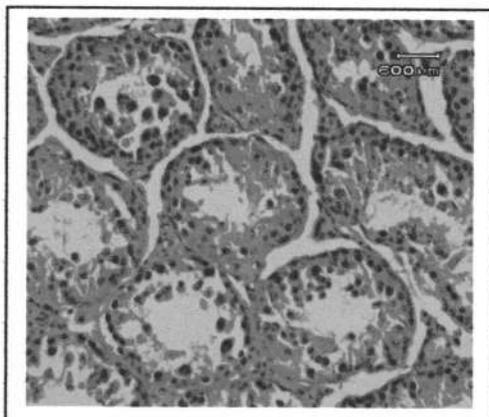
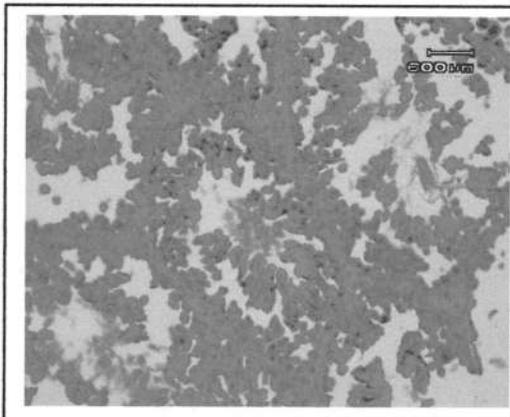
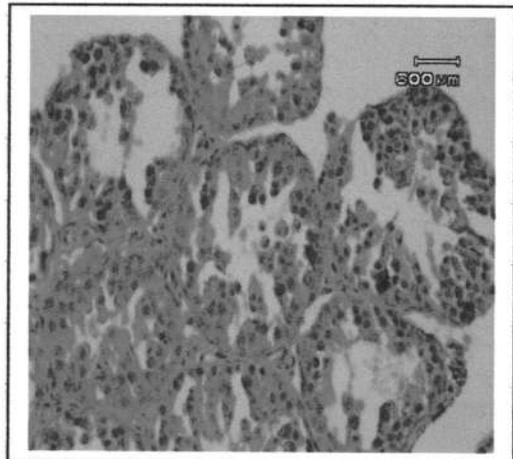
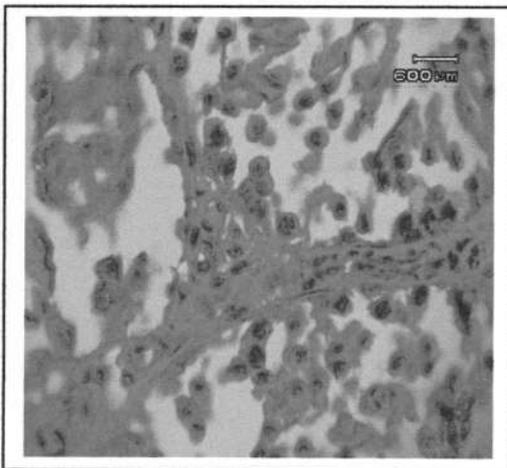
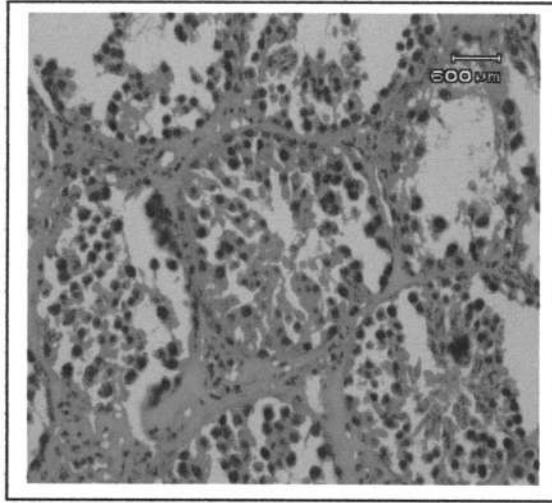
Penampang Lintang Tubulus Seminiferus Kelompok Kontrol Selama 1 Minggu



Ket : Pewarnaan dengan menggunakan PAS, pembesaran 400x untuk sel-sel spermatosit primer dan 1000x untuk sel Leydig

Lampiran 13

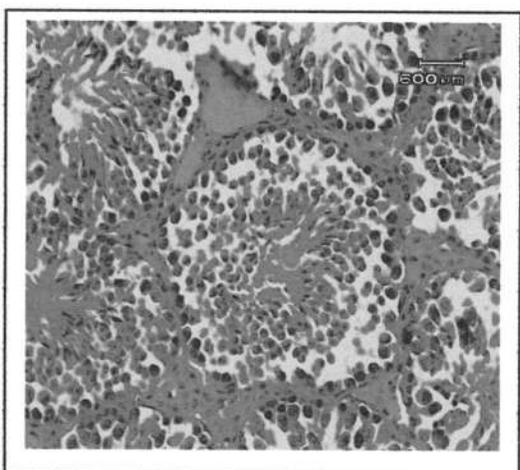
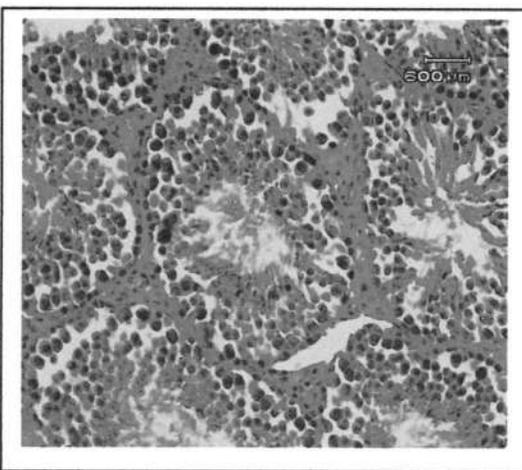
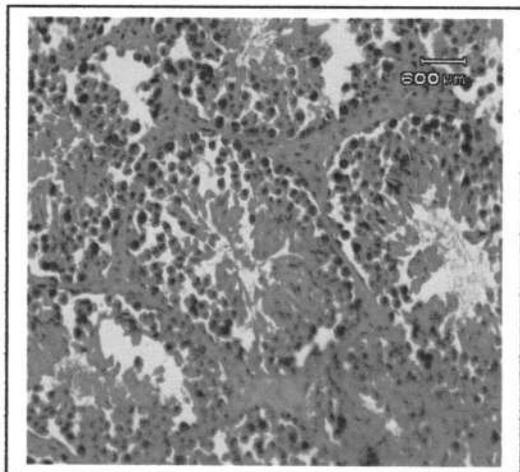
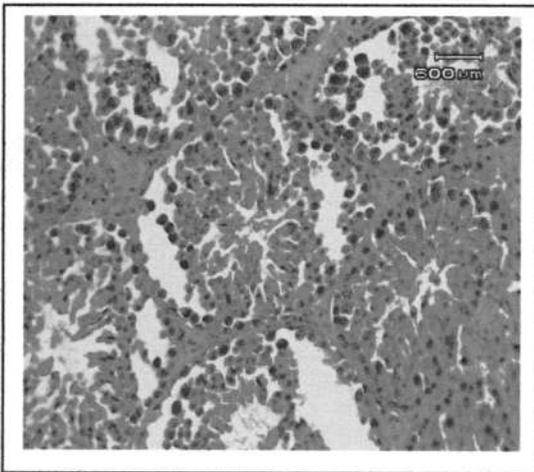
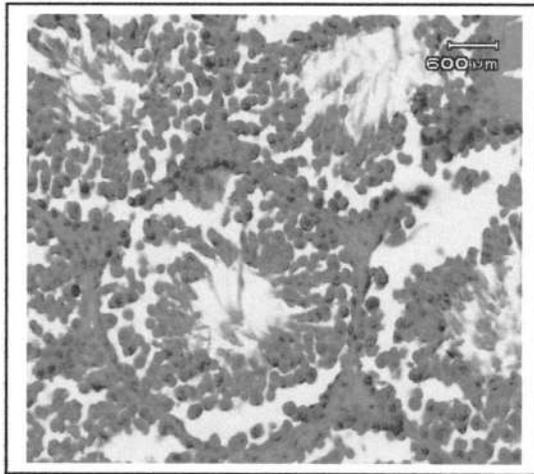
Penampang Lintang Tubulus Seminiferus Kelompok Kontrol Selama 2 Minggu



Ket : Pewarnaan dengan menggunakan PAS, pembesaran 400x untuk sel-sel spermatosit primer dan 1000x untuk sel Leydig

Lampiran 14

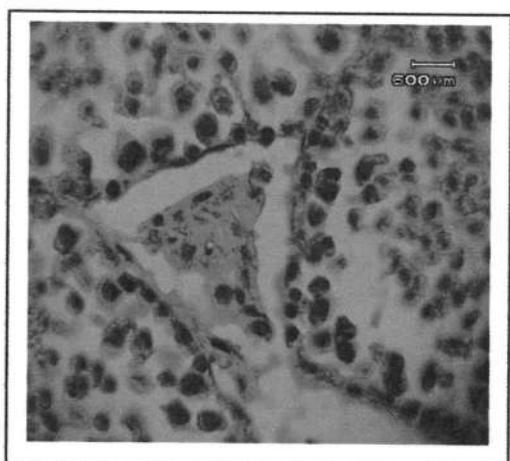
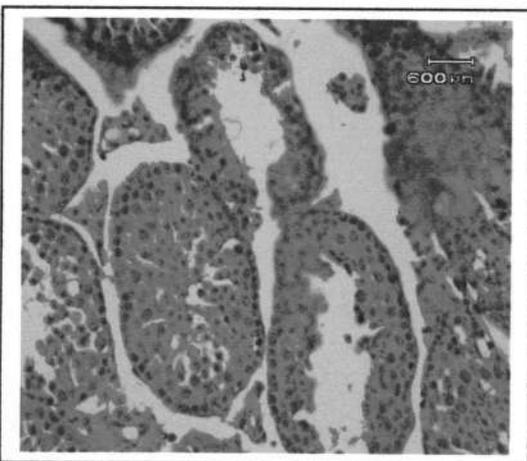
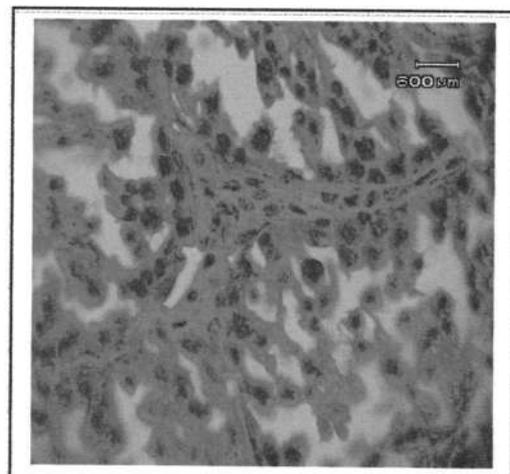
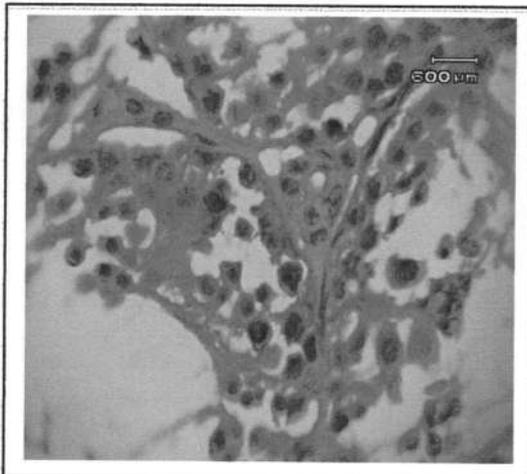
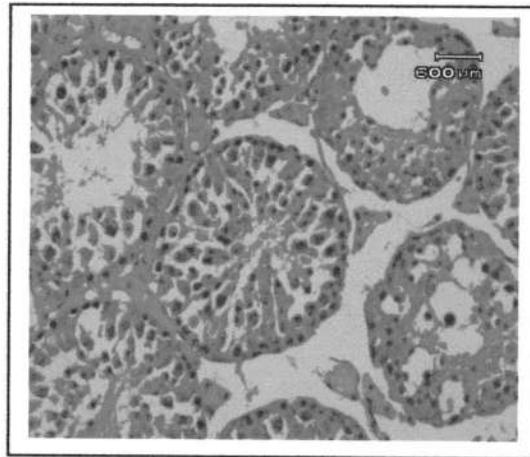
Penampang Lintang Tubulus Seminiferus Kelompok Kontrol Selama 3 Minggu



Ket : Pewarnaan dengan menggunakan PAS, pembesaran 400x untuk sel-sel spermatosit primer dan 1000x untuk sel Leydig

Lampiran 15

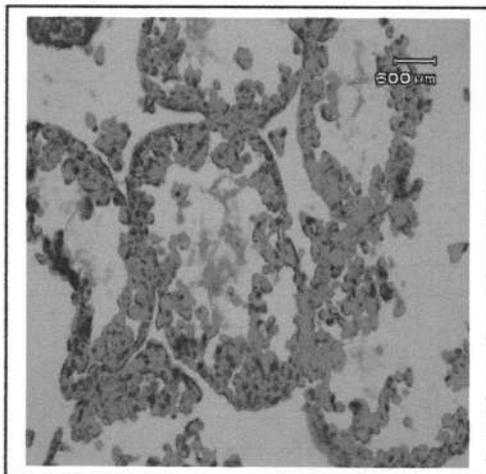
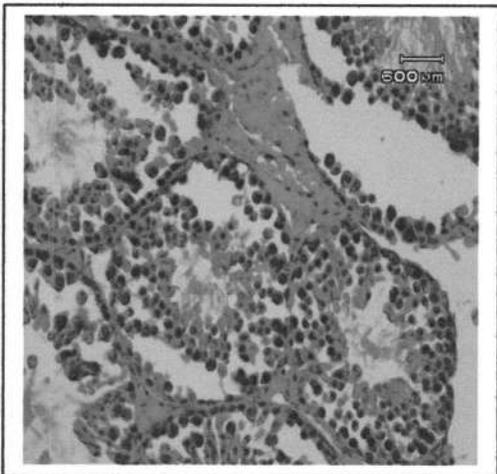
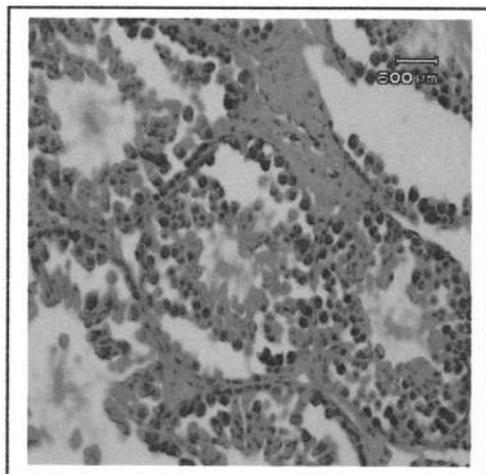
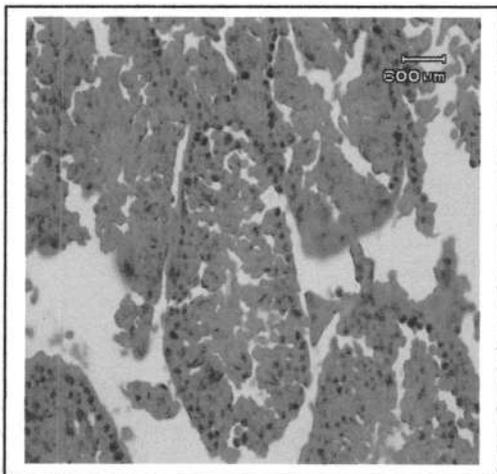
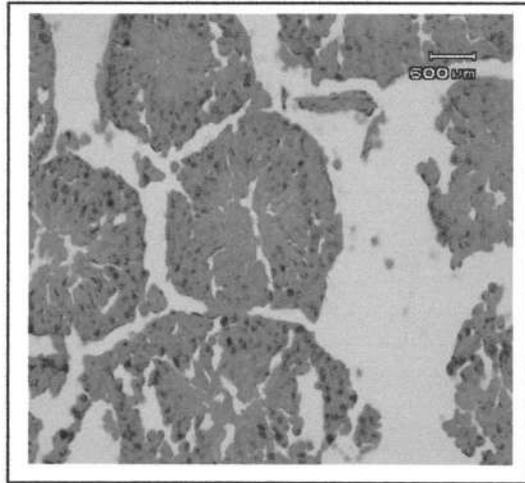
Penampang Lintang Tubulus Seminiferus Kelompok Perlakuan Selama 1 Minggu



Ket : Pewarnaan dengan menggunakan PAS, pembesaran 400x untuk sel-sel spermatosit primer dan 1000x untuk sel Leydig

Lampiran 16

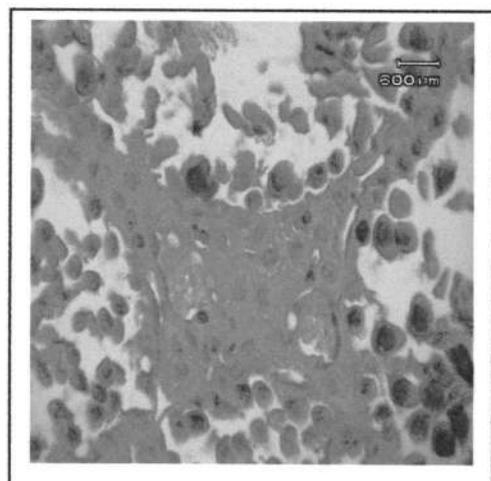
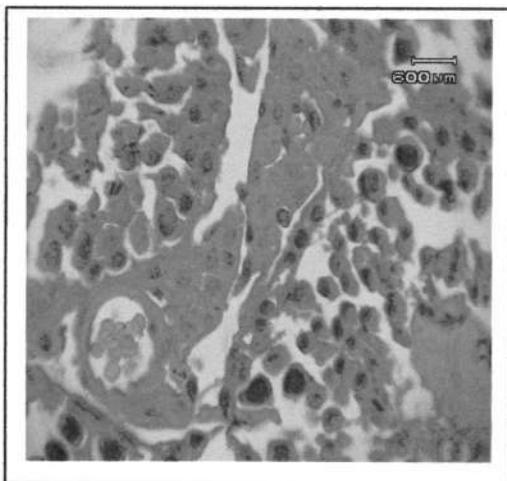
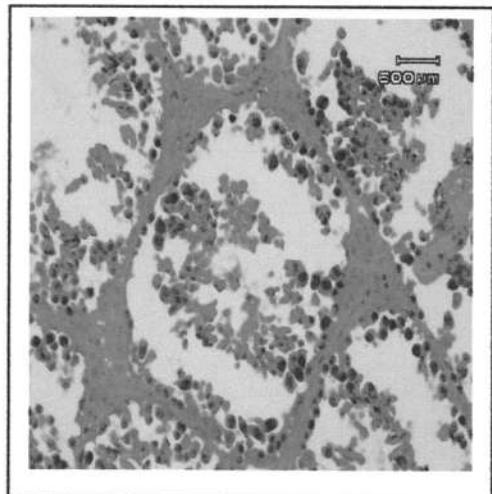
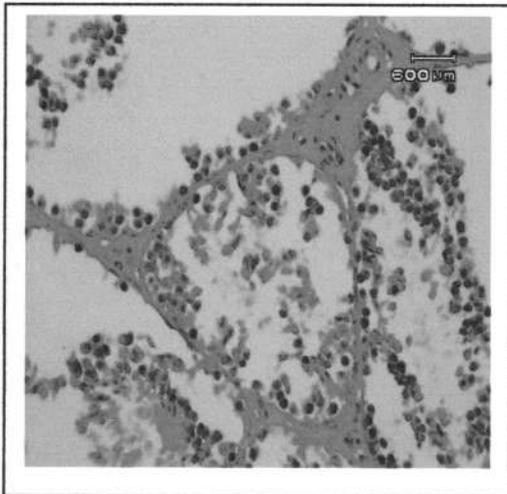
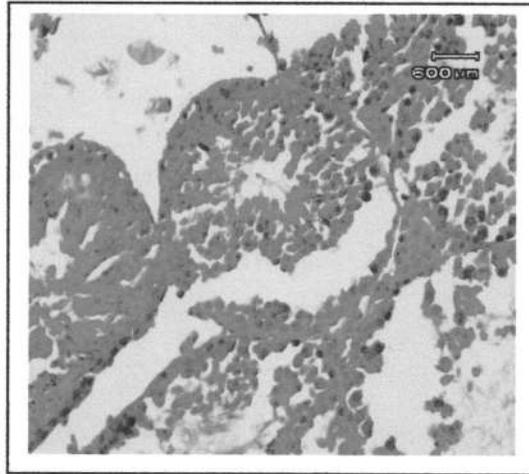
Penampang Lintang Tubulus Seminiferus Kelompok Perlakuan Selama 2 minggu



Ket : Pewarnaan dengan menggunakan PAS, pembesaran 400x untuk sel-sel spermatosit primer dan 1000x untuk sel Leydig

Lampiran 17

Penampang Lintang Tubulus Seminiferus Kelompok Perlakuan Selama 3 Minggu



Ket : Pewarnaan dengan menggunakan PAS, pembesaran 400x untuk sel-sel spermatis primer dan 1000x untuk sel Leydig

Lampiran 18

Ijin Kelayakan Penelitian



**KOMISI ETIK PENELITIAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
*Animal Care and Use Committee (ACUC)***

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK
“ETHICAL CLEARANCE”**

No : 090-KE

**KOMISI ETIK PENELITIAN (ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE)
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN UNIVERSITAS AIRLANGGA SURABAYA,
TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG
DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA :**

- PENELITIAN BERJUDUL** : Pengaruh Nikotin Terhadap Jumlah Sel Spermatisit Primer, Spermatisid dan Leydig pada Mencit (*Mus musculus*)
- PENELITI UTAMA** : Iis Rahmawati
- UNIT/LEMBAGA/TEMPAT PENELITIAN** : Program Studi Ilmu Kesehatan Reproduksi
Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga
- DINYATAKAN** : LAIK ETIK

Surabaya, 7 Mei 2010

Mengetahui
Dekan FKH Unair

Prof. Romziah Sidik, Ph.D., drh.
NIP. 130687305

Ketua

Dr. E. Bimo Aksono, M.Kes., Drh.
NIP. 132014464