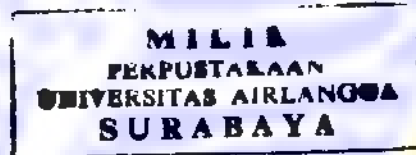


**TESIS**

Kx  
Tulis  
di  
1

**PENGARUH PEMBERIAN KAFEIN TERHADAP BERAT TESTIS,  
DIAMETER DAN TEBAL EPITEL TUBULUS SEMINIFERUS TESTIS  
TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus strain Wistar*)**

**Penelitian Eksperimental Laboratorik**



**ELIESER**

**PROGRAM PASCASARJANA  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA**

**2005**

**T E S I S**

**PENGARUH PEMBERIAN KAFEIN TERHADAP BERAT TESTIS,  
DIAMETER DAN TEBAL EPITEL TUBULUS SEMINIFERUS TESTIS  
TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus strain Wistar*)**

**Penelitian Eksperimental Laboratorik**

**MILIK  
PERPUSTAKAAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA**

**ELIESER**

**PROGRAM PASCASARJANA  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA**

**2005**

**PENGARUH PEMBERIAN KAFEIN TERHADAP  
BERAT TESTIS, DIAMETER DAN TEBAL EPITEL  
TUBULUS SEMINIFERUS TESTIS TIKUS PUTIH**

*(Rattus norvegicus strain Wistar)*

**PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIK**

**TESIS**

Untuk memperoleh Gelar Magister  
Dalam Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar  
Pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga

Oleh :

**ELIESER**

**NIM. 090214740.M**

**PROGRAM PASCASARJANA  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA**

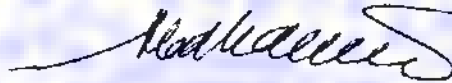
**2005**

**9 Agustus 2005**

Lembar Pengesahan

TESIS TELAH DISETUJUI  
PADA TANGGAL : 9 AGUSTUS 2005

Pembimbing Ketua



Abd. Kamid Iskandar, dr, MS  
NIP. 130 541 811

Pembimbing



Prof Ari Gunawan, dr, MS, Ph.D  
NIP. 130 531 759

Mengetahui :

Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar  
Program Pascasarjana Universitas Airlangga



Prof Retno Handajani, dr, MS, Ph.D  
NIP. 130 541 984

Diuji pada

Tanggal 9 Agustus 2005

**PANITIA PENGUJI TESIS**

Ketua : M. Wirono Aman Santoso, dr, MS

Anggota : Abd. Kamid Iskandar, dr, MS

Prof Ari Gunawan, dr, MS, Ph.D

Subagjo, dr, MS

Chairul Anwar, drh, MS

## UCAPAN TERIMA KASIH

Dengan mengucapkan syukur kepada Tuhan Yang Maha Esa atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulisan tesis ini dapat diselesaikan. Adapun penulisan tesis ini merupakan salah satu persyaratan dalam menempuh pendidikan Program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya.

Pada kesempatan ini saya menyampaikan rasa terima kasih dan penghargaan yang tak terhingga kepada para pembimbing yaitu Abd Kamid Iskandar, dr, MS, sebagai pembimbing ketua dan Prof Ari Gunawan, dr, MS, Ph.D sebagai pembimbing yang dengan penuh perhatian dan kesabaran telah memberikan dorongan, bimbingan dan saran selama penulisan tesis ini maupun selama menempuh pendidikan di Bagian Anatomi-Histologi Universitas Airlangga.

Saya menyampaikan rasa terima kasih yang tak terhingga kepada Pemerintah Provinsi Papua yang telah memberikan bantuan dana selama mengikuti pendidikan di Program Pascasarjana; B Kambuaya, Drs, MBA sebagai Rektor Universitas Cenderawasih yang telah memberikan kesempatan untuk mengikuti pendidikan Program Pascasarjana; Paulina Watofa, dr, SpR sebagai Ketua Program Pendidikan Dokter Universitas Cenderawasih yang telah memberikan kesempatan dan telah membantu mengurus segala fasilitas selama mengikuti pendidikan Program Pascasarjana; Prof Dr Med Puruhito, dr, SpBTKV sebagai Rektor Universitas Airlangga dan Prof Dr Muhammad Amin, dr, SpP sebagai Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga yang telah memberikan kesempatan dan fasilitas untuk mengikuti dan menyelesaikan

Program Pascasarjana; Prof Dr HMS Wiyadi, dr, SpTHT sebagai Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga yang telah memberikan kesempatan dan fasilitas untuk mengikuti dan menyelesaikan Program Pascasarjana; Prof Soetjipto, dr, MS, Ph.D sebagai mantan Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar dan Prof Retno Handajani, dr, MS, PhD sebagai Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar yang telah memberikan bimbingan dan dorongan selama mengikuti Program Pascasarjana; seluruh staf pengajar Bagian Anatomi-Histologi yang telah memberikan bimbingan dan dorongan selama mengikuti pendidikan di Bagian Anatomi-Histologi; seluruh staf pegawai Bagian Anatomi-Histologi dan laboratorium Biokimia yang telah memberikan bantuan selama mengikuti pendidikan dan selama proses penelitian.

Teman-teman : Irianto Ramandey, dr sekeluarga; Riami, dr; Anike, dr; Antonius Oktavian Ibo Ilambra Christianto Ngaji Foa, dr; Agnes Supraptiwi Rahayu, dr, MKes; Herlambang Budi Mulyono, dr; Victor Eka Nugraha Putra, dr, dan Rica J. Kapisa, dr, yang telah memberikan bantuan dan dorongan selama pendidikan dan penulisan tesis ini.

Nenek, ibu, adik-adikku dan sanak famili serta kekasihku yang senantiasa mendoakan dan memberikan dorongan semangat selama mengikuti Program Pascasarjana.

Semua pihak yang tidak dapat saya cantumkan, yang telah membantu selama mengikuti Program Pascasarjana.

Akhirnya, dengan segenap kerendahan hati saya sebagai manusia biasa mohon maaf atas segala kekurangan.

**RINGKASAN**  
**PENGARUH PEMBERIAN KAFEIN TERHADAP BERAT TESTIS,  
DIAMETER DAN TEBAL EPITEL TUBULUS SEMINIFERUS TESTIS  
TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus strain Wistar*)**

**Elieser**

Kafein ditemukan orang dalam banyak sediaan seperti minuman kopi, teh, cola dan bahan makanan dengan bumbu coklat.

Kafein tidak dapat dipisahkan dari kehidupan manusia baik pria maupun wanita karena manfaat penggunaannya membangkitkan kembali kesegaran jasmani. Ini dimungkinkan karena kafein memacu system saraf pusat untuk menghasilkan epinefrin guna meningkatkan denyut jantung sehingga tubuh siap bekerja.

Selain efek yang menguntungkan ternyata kafein juga mempunyai efek yang merugikan diantaranya pengaruh teratogenik dan mutagenik yang dapat berpengaruh terhadap sel-sel embrional termasuk sel-sel epitel germinal di dalam tubulus seminiferus testis. Ini terbukti dari penelitian Panghiyangani (2001) bahwa pemberian kafein menyebabkan kelainan morfologi spermatozoa mencit jantan.

Dengan penelitian ini kami ingin mengetahui lebih lanjut pengaruh kafein terhadap sel-sel epitel germinal di dalam tubulus seminiferus testis dengan cara memberikan kafein kepada tikus putih jantan sehingga dapat dibuktikan apakah pemberian kafein secara oral dapat menurunkan berat testis, diameter dan tebal epitel tubulus seminiferus testis tikus putih (*Rattus norvegicus strain Wistar*).

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental laboratorik dengan menggunakan rancangan penelitian *The Post Test Only Control Group Design* dan data penelitian dianalisis secara statistik menggunakan Anova dengan derajat kemaknaan kurang dari 0,05 ( $p < 0,05$ ).

Penelitian ini dilakukan dengan memberikan perlakuan terhadap 36 ekor tikus putih jantan yang dibagi menjadi 4 kelompok secara random dan setiap



kelompok sudah terdapat satu ekor tikus putih jantan sebagai cadangan jika ada yang mati selama masa perlakuan 45 hari. Pemberian dosis kafein berdasarkan  $LD_{50}$  kafein untuk tikus jantan yaitu 355 mg/kgBB/peroral. Pemberian dosis kafein berkelompok yaitu 35,5 mg/kgBB/hari peroral, 71 mg/kgBB/hari peroral dan 117 mg/kgBB/hari peroral dibandingkan dengan kelompok kontrol yang diberikan larutan NaCl 0,9% 5ml/hari peroral.

Setelah masa perlakuan, hewan coba dikorbankan dan diambil testisnya lalu ditimbang dengan timbangan elektronik. Selanjutnya testis tersebut dibuat menjadi sediaan histologik metode parafin dengan pewarnaan PAS. Hasilnya diamati dengan mikroskop cahaya pembesaran  $10 \times 10$  dan digunakan gratikulae garis untuk mengukur diameter dan tebal epitel tubulus seminiferus.

Dari data penelitian rata-rata berat testis, diameter dan tebal epitel tubulus seminiferus pada kelompok kontrol lebih besar daripada kelompok perlakuan yang diberikan kafein. Semakin besar dosis kafein yang diberikan, semakin menurun rata-rata berat testis, diameter dan tebal epitel tubulus seminiferus. Data penelitian tersebut dianalisis secara Anova dan didapatkan berat testis  $p = 0,001$ , diameter tubulus seminiferus  $p = 0,000$  dan tebal epitel tubulus seminiferus  $p = 0,000$ . Ini berarti ada perbedaan yang bermakna pada keseluruhan kelompok perlakuan untuk berat testis, diameter dan tebal epitel tubulus seminiferus karena nilai  $p < 0,05$ . Untuk mengetahui pasangan kelompok mana adanya perbedaan yang bermakna dari tiap variabel maka dilanjutkan dengan uji LSD.

Dari penelitian ini disimpulkan bahwa pemberian kafein secara oral terbukti dapat menurunkan berat testis, diameter dan tebal epitel tubulus seminiferus testis tikus putih.

Guna mendukung keakuratan penelitian ini maka diperlukan penelitian lebih lanjut untuk menghitung jumlah sel-sel spermatogenik dalam tubulus seminiferus testis tikus putih.

## SUMMARY

### THE INFLUENCE OF CAFFEINE FEEDING ON TESTICULAR WEIGHT, DIAMETER AND THICKNESS OF TESTICULAR SEMINIFEROUS TUBULE EPITHELIUM IN WHITE RATS (*Wistar strain Rattus norvegicus*)

Elieser

Caffeine is commonly found in various types of provisions, such as coffee, tea, cola, and chocolate-flavored foods. Caffeine is an important part in the life of human beings today, since its use is beneficial to restore physical fitness. Caffeine enhances central nervous system to produce epinephrin that increases heart beat, so that the body becomes ready to do activities. In addition to its beneficial effects, caffeine has also disadvantageous effects, such as its teratogenic and mutagenic effect that may influence embryonal cells, including germinal epithelial cells in testicular seminiferous tubule. This is confirmed from a study by Panghiyangani (2001), in which it is found that caffeine results in spermatozoa morphological abnormalities in male mice.

In this study, we investigated the effect of caffeine on germinal epithelial cells in testicular seminiferous tubule by feeding caffeine to male white rats to prove that oral caffeine feeding may reduce testicular weight, diameter and thickness of testicular seminiferous tubule epithelium in white rats (*Wistar strain Rattus norvegicus*).

This was a laboratory experimental study using The Post Test Only Control Group Design and data were analyzed statistically using Anova with significance level of less than 0.05. Treatment was given to 36 male white rats, divided into 4 groups in random, and each group had been provided with one rat as replacement if there was dead rat during the treatment for 45 days. Caffeine was given based on caffeine LD<sub>50</sub> for male rats, 355 mg/kgBW/per oral. The doses of caffeine given to treatment groups were 35.5 mg/kgBW/day per oral, 71 mg/kgBW/day per oral and 117 mg/kgBW/day per oral, compared to control group that received caffeine solvent, 0.9% NaCl as much as 5 ml/day per oral.

After treatment period, the animals were sacrificed to remove the testis, which was subsequently scaled using electronic scale. Afterwards, histological preparations were made using paraffin method with PAS staining. The results were observed using light microscope in 10 x 10 magnification and graticulae was used to measure the diameter and thickness of seminiferous tubule epithelium.

Data showed that the average of testicular weight, the diameter and thickness of seminiferous tubule epithelium in control group was higher than those in treatment groups receiving caffeine. The higher the dose given, the lower the average of testicular weight, the diameter and thickness of seminiferous tubule epithelium. All data were analyzed using Anova, and it was found that testicular weight had  $p = 0.001$ , seminiferous tubule diameter had  $p = 0.000$ , and the thickness of seminiferous tubule epithelium had  $p = 0.000$ . This indicated

significant difference in all treatment groups in testicular weight, the diameter and thickness of seminiferous tubule epithelium, as the p value was less than 0.05. To identify which group had significant difference in each variable, the analysis was continued with LSD test.

In conclusion, oral caffeine feeding can reduce testicular weight, the diameter and thickness of seminiferous tubule epithelium in white rats. To confirm the accuracy of this study, further research is needed to count spermatogenic cells in testicular seminiferous tubule in white rats.

## ABSTRACT

### THE INFLUENCE OF CAFFEINE FEEDING ON TESTICULAR WEIGHT, DIAMETER AND THICKNESS OF TESTICULAR SEMINIFEROUS TUBULE EPITHELIUM IN WHITE RATS (*Wistar strain Rattus norvegicus*)

Elieser

Caffeine has advantageous as well as disadvantageous effects. One of these adverse effects is its teratogenic and mutagenic influence that may affect embryonal cells, including germinal epithelial cells in testicular seminiferous tubule. This study was aimed to prove that oral caffeine feeding may reduce testicular weight, diameter and thickness of testicular seminiferous tubule epithelium in white rats (*Wistar strain Rattus norvegicus*).

This was a laboratory experimental study using The Post Test Only Control Group Design and data were analyzed statistically using Anova with significance level of less than 0.05. Caffeine was given based on caffeine LD<sub>50</sub> for male rats, 355 mg/kgBW/per oral. The doses of caffeine given to treatment groups were 35.5 mg/kgBW/day per oral, 71 mg/kgBW/day per oral and 117 mg/kgBW/day per oral, compared to control group that received caffeine solvent, 0.9% NaCL as much as 5 ml/day per oral. Treatment was undergone for 45 days to 36 male white rats, divided into 4 groups in random.

All data were analyzed using Anova, and it was found that testicular weight had  $p = 0.001$ , seminiferous tubule diameter had  $p = 0.000$ , and the thickness of seminiferous tubule epithelium had  $p = 0.000$ . This indicated significant difference in all treatment groups in testicular weight, the diameter and thickness of seminiferous tubule epithelium, as the  $p$  value was less than 0.05. In conclusion, oral caffeine feeding can reduce testicular weight, the diameter and thickness of seminiferous tubule epithelium in white rats.

**Keywords:** *caffeine, testicular weight, diameter and thickness of seminiferous tubule epithelium*

**DAFTAR ISI**

	<b>Halaman</b>
Sampul Depan .....	i
Sampul Dalam .....	ii
Prasyarat Gelar .....	iii
Persetujuan .....	iv
Penetapan Panitia Penguji .....	v
Ucapan Terima Kasih .....	vi
Ringkasan .....	viii
Summary .....	x
Abstract .....	xii
Daftar Isi .....	xiii
Daftar Tabel .....	xvi
Daftar Gambar .....	xvii
Daftar Lampiran .....	xviii
 <b>BAB 1 PENDAHULUAN</b>	
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	2
1.3 Tujuan Penelitian .....	2
1.4 Manfaat Penelitian .....	3
 <b>BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1 Kafein .....	4
2.1.1 Tinjauan umum .....	4
2.1.2 Farmakodinamik .....	5
2.1.3 Farmakokinetik .....	9
2.1.4 Intoksikasi .....	9
2.1.5 Sediaan dan dosis .....	10
2.1.6 Kegunaan klinik .....	10
2.2 Testis .....	11

2.2.1 Struktur anatomi testis .....	12
2.2.2 Struktur histologis testis .....	16
2.2.3 Spermatogenesis .....	25
2.2.4 Pengaturan hormonal fungsi testis .....	28
2.3 Pemilihan Hewan Percobaan .....	28

### **BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN**

3.1 Kerangka Konseptual Penelitian .....	30
3.2 Hipotesis .....	32

### **BAB 4 MATERI DAN METODE PENELITIAN**

4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian .....	33
4.2 Populasi, Sampel, Besar Sampel dan Teknik Pengambilan Sampel .....	34
4.3 Variabel Penelitian .....	35
4.3.1 Klasifikasi variabel .....	35
4.3.2 Definisi operasional .....	36
4.4 Bahan Penelitian .....	37
4.4.1 Bahan perlakuan .....	37
4.4.2 Bahan pemeriksaan .....	37
4.5 Instrumen Penelitian .....	38
4.5.1 Alat untuk pemeliharaan tikus putih jantan .....	38
4.5.2 Alat untuk pembiusan dan pengambilan jaringan testis .....	38
4.5.3 Alat untuk pembuatan dan pengamatan histologis .....	39
4.6 Prosedur Penelitian .....	39
4.6.1 Lokasi dan waktu penelitian .....	39
4.6.2 Persyaratan etik penelitian .....	39
4.6.3 Pemeliharaan dan pembagian kelompok hewan coba .....	40
4.6.4 Perlakuan hewan coba .....	40
4.6.5 pembiusan .....	41
4.6.6 Pengambilan jaringan testis .....	41
4.6.7 Pembuatan sediaan histologis dan pewarnaan .....	42

4.6.8 Pengumpulan data .....	44
4.7 Rancangan Analisis Data .....	45
4.8 Kerangka Operasional Penelitian .....	46

**BAB 5 DATA PENELITIAN DAN ANALISIS DATA PENELITIAN**

5.1 Data Penelitian .....	48
5.1.1 Berat testis .....	48
5.1.2 Diameter tubulus seminiferus .....	50
5.1.3 Tebal epitel tubulus seminiferus .....	52
5.2 Analisis Data Penelitian .....	54
5.2.1 Berat testis .....	55
5.2.2 Diameter tubulus seminiferus .....	57
5.2.3 Tebal epitel tubulus seminiferus .....	59

**BAB 6 PEMBAHASAN**

6.1 Berat Testis .....	61
6.2 Diameter Tubulus Seminiferus .....	63
6.3 Tebal Epitel Tubulus Seminiferus .....	64

**BAB 7 PENUTUP**

7.1 Kesimpulan .....	67
7.2 Saran .....	67

<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	68
-----------------------------	----

<b>LAMPIRAN</b> .....	74
-----------------------	----

## DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 5.1 : Rata-rata (mean) dan simpangan baku (standar deviasi) berat testis tikus putih ( <i>Rattus norvegicus strain Wistar</i> ) ...	49
Tabel 5.2 : Rata-rata (mean) dan simpangan baku (standar deviasi) diameter tubulus seminiferus tikus putih ( <i>Rattus norvegicus strain Wistar</i> ) .....	51
Tabel 5.3 : Rata-rata (mean) dan simpangan baku (standar deviasi) tebal epitel tubulus seminiferus tikus putih ( <i>Rattus norvegicus strain Wistar</i> ) .....	53
Tabel 5.4 : Rangkuman hasil analisis varian satu arah berat testis .....	55
Tabel 5.5 : Rangkuman hasil uji LSD berat testis pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan .....	56
Tabel 5.6 : Rangkuman hasil analisis varian satu arah diameter tubulus seminiferus .....	57
Tabel 5.7 : Rangkuman hasil uji LSD diameter tubulus seminiferus pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan .....	58
Tabel 5.8 : Rangkuman hasil analisis varian satu arah tebal epitel tubulus seminiferus .....	59
Tabel 5.9 : Rangkuman hasil uji LSD tebal epitel tubulus seminiferus pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan .....	60



## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 : Sistem reproduksi pria .....	11
Gambar 2.2 : Diagram potongan testis dan duktus-duktusnya .....	15
Gambar 2.3 : Penampang lintang tubulus seminiferus .....	17
Gambar 2.4 : Sel spermatozoa matang .....	21
Gambar 2.5 : Sel Sertoli .....	23
Gambar 2.6 : Diagram spermatogenesis .....	27
Gambar 5.1 : Diagram batang rata-rata (mean) berat testis tikus putih ( <i>Rattus norvegicus strain Wistar</i> ) .....	49
Gambar 5.2 : Diagram batang rata-rata (mean) diameter tubulus seminiferus testis tikus putih ( <i>Rattus norvegicus strain Wistar</i> ) .....	51
Gambar 5.3 : Diagram batang rata-rata (mean) tebal epitel tubulus seminiferus testis tikus putih ( <i>Rattus norvegicus strain Wistar</i> ) .....	53

## DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1 : Berat testis tikus putih .....	74
Lampiran 2 : Diameter tubulus seminiferus .....	75
Lampiran 3 : Tebal epitel tubulus seminiferus .....	79
Lampiran 4 : Analisis berat testis .....	83
Lampiran 5 : Uji LSD berat testis .....	84
Lampiran 6 : Analisis diameter tubulus seminiferus .....	85
Lampiran 7 : Uji LSD diameter tubulus seminiferus .....	86
Lampiran 8 : Analisis tebal epitel tubulus seminiferus .....	87
Lampiran 9 : Uji LSD tebal epitel tubulus seminiferus .....	88
Lampiran 10 : Foto kelompok kontrol (larutan NaCl 0,9% 5 ml/hr peroral) .....	89
Lampiran 11 : Foto kelompok perlakuan dosis kafein 35,5 mg/ kgBB/hr peroral .....	90
Lampiran 12 : Foto kelompok perlakuan dosis kafein 71 mg/ kgBB/hr peroral .....	91
Lampiran 13 : Foto kelompok perlakuan dosis kafein 117 mg/ kgBB/hr peroral .....	92

**BAB 1****PENDAHULUAN****1.1 Latar Belakang Masalah**

Kafein ditemukan orang dalam banyak sediaan yang berbeda, mencakup minuman seperti kopi, teh dan minuman cola; resep obat-obatan seperti Cafergot dan senyawa Darvon; sediaan obat analgetik; sediaan obat flu dan sediaan obat stimulan. Kafein juga terdapat dalam bahan makanan walaupun secara relatif jumlahnya kecil seperti bahan tambahan rasa kopi pada es krim, coklat batangan dan makanan dengan bumbu coklat (Iserson, 1990).

Saat ini, kafein tidak dapat dipisahkan dari kehidupan manusia baik pria maupun wanita karena manfaat penggunaan kafein antara lain membangkitkan kembali kesegaran jasmani. Hal ini dimungkinkan karena kafein memacu sistem saraf pusat untuk menghasilkan epinefrin guna meningkatkan denyut jantung sehingga tubuh siap bekerja (Brooks, 1984; Panghiyangani, 2001).

Selain menimbulkan efek yang bermanfaat terhadap tubuh ternyata kafein juga mempunyai efek samping, diantaranya pengaruh teratogenik dan mutagenik yang dapat berpengaruh terhadap sel-sel embrional termasuk sel-sel epitel germinal di dalam tubulus seminiferus testis. Ini terbukti dengan penelitian yang dilakukan terhadap mencit (*Mus musculus*) jantan dan hasil yang diperoleh yaitu pemberian kafein menyebabkan kelainan morfologi spermatozoa, meliputi spermatozoa dengan kelainan berupa kepala kecil, kepala besar, kepala ganda; spermatozoa dengan kelainan ekor membesar, ekor spiral, ekor bercabang,

aglutinasi ekor dan spermatozoa dengan kelainan bagian tengah spiral (Panghiyngani, 2001).

Dari penelitian di atas, kami ingin meneliti lebih lanjut tentang pengaruh pemberian kafein terhadap berat testis, diameter dan tebal epitel tubulus seminiferus testis tikus putih sehingga dari penelitian ini dapat diketahui apakah ada perubahan berat testis, diameter dan tebal epitel tubulus seminiferus testis tikus putih setelah pemberian kafein secara oral dengan beberapa dosis yang berbeda.

### 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang masalah di atas, dapat dirumuskan permasalahan sebagai berikut :

1. Apakah pemberian kafein secara oral dapat menurunkan berat testis tikus putih (*Rattus norvegicus strain Wistar*)?
2. Apakah pemberian kafein secara oral dapat menurunkan diameter tubulus seminiferus testis tikus putih (*Rattus norvegicus strain Wistar*)?
3. Apakah pemberian kafein secara oral dapat menurunkan tebal epitel tubulus seminiferus testis tikus putih (*Rattus norvegicus strain Wistar*)?

### 1.3 Tujuan Penelitian

1. Membuktikan bahwa pemberian kafein secara oral dapat menurunkan berat testis tikus putih (*Rattus norvegicus strain Wistar*).

2. Membuktikan bahwa pemberian kafein secara oral dapat menurunkan diameter tubulus seminiferus testis tikus putih (*Rattus norvegicus strain Wistar*).
3. Membuktikan bahwa pemberian kafein secara oral dapat menurunkan tebal epitel tubulus seminiferus testis tikus putih (*Rattus norvegicus strain Wistar*).

#### 1.4 Manfaat Penelitian

##### 1. Manfaat akademis

Mengetahui pengaruh yang ditimbulkan akibat pemberian kafein secara oral terhadap berat testis, diameter dan tebal epitel tubulus seminiferus testis tikus putih (*Rattus norvegicus strain Wistar*).

##### 2. Manfaat terapan

Sebagai bahan masukan dan bahan pertimbangan untuk orang-orang yang sering mengonsumsi kafein dalam jumlah yang berlebihan karena efek samping penggunaan kafein bukan hanya pada susunan saraf pusat, sistem kardiovaskuler, dan sistem gastrointestinal tetapi juga pada sistem reproduksi pria, khususnya testis.

## **BAB 2**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **2.1 Kafein**

##### **2.1.1 Tinjauan umum**

Konsumsi kafein terutama berkaitan dengan kopi, teh dan minuman tanpa alkohol. Di Amerika Serikat, diperkirakan bahwa kopi berperan 75% untuk total masukan kafein, teh 15% dan minuman soda yang berkafein 10%(Spiller, 1998). Coklat dan makanan lain yang mengandung kafein serta obat-obatan yang mengandung kafein menyokong secara relatif keseluruhan penggunaan kafein (Hamilton, 1988; Spiller, 1998).

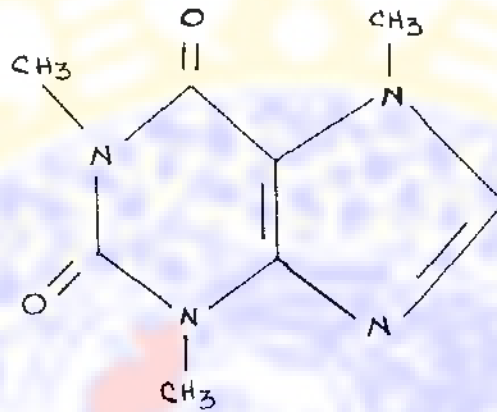
Satu botol minuman Cola berisi 35 – 55 mg kafein (Ganiswarna, 1995). Satu cangkir kopi rata-rata berisi 100 – 150 mg kafein, satu cangkir teh rata-rata berisi 30 – 40 mg kafein dan satu cangkir coklat rata-rata berisi 15 – 18 mg kafein (Craig, 1986).

Penelitian membuktikan bahwa kafein berefek stimulasi. Inilah daya tarik minuman yang mengandung kafein. Tidak dapat disangkal lagi bahwa popularitas minuman kafein ditentukan oleh daya stimulasinya sedangkan daya stimulasi ini berbeda pada tiap individu (Fox, 1993; Ganiswarna, 1995).

Kafein adalah suatu alkaloida yang strukturnya merupakan 1,3,7 trimethylxanthine. Ini merupakan suatu derivat xantine alami yang dapat ditemukan dalam daun teh, kacang kola, biji coklat dan biji kopi. Kafein merupakan suatu serbuk kristal yang berwarna putih, tidak berbau dan diekstrak

pertama kali dari tumbuhan oleh Friedlieb Runge pada tahun 1820 (Goldberg, 1994; Iserson, 1990).

Adapun struktur kimiawi dari kafein seperti gambar di bawah ini (Craig, 1986; Goodman, 1996; Katzung, 1995; Murray, 2000).



### 2.1.2 Farmakodinamik

Derivat xantin terdiri dari kafein, teofilin dan teobromin. Ketiga derivat xantin ini mempunyai efek farmakologi yang sama bermanfaat secara klinis.

Mekanisme kerja dari kafein meliputi :

#### 1. Susunan saraf pusat

Pada dosis rendah dan sedang, metilxantin terutama kafein menyebabkan rangsangan korteks ringan dengan peningkatan kewaspadaan dan penundaan kelelahan (Katzung, 1995). Orang yang minum kafein merasakan tidak begitu mengantuk, tidak begitu lelah dan daya pikirnya lebih cepat dan lebih jernih tetapi kemampuannya berkurang dalam pekerjaan yang memerlukan koordinasi otot halus (kerapihan), ketepatan waktu atau ketepatan berhitung. Efek diatas timbul pada pemberian kafein 85-250 mg (1 – 3 cangkir kopi). Bila dosis pemberian kafein ditinggikan, akan menyebabkan gugup, gelisah, insomnia, tremor, hiperestesia, kejang fokal atau kejang umum. Kejang akibat

kafein ternyata lebih lemah dibandingkan akibat teofilin (Ganiswarna, 1995; Goodman, 1996).

Metilxantin dosis rendah dapat merangsang SSP yang sedang mengalami depresi. Misalnya dosis 0,5 mg/kg BB kafein sudah cukup untuk merangsang nafas pada individu yang mendapat morfin 10 mg (Ganiswarna, 1995).

Kekuatan relatif kafein sebagai perangsang SSP rupanya bervariasi, tergantung dari spesies dan parameter percobaan yang dikerjakan (Ganiswarna, 1995).

## 2. Sistem kardiovaskuler

Kadar rendah kafein dalam plasma akan menurunkan denyut jantung yang mungkin disebabkan oleh perangsangan nucleus n. vagi di medulla oblongata. Sebaliknya, kadar kafein yang lebih tinggi menyebabkan takikardi bahkan pada individu yang sensitif mungkin menyebabkan aritmia, misalnya kontraksi ventrikel yang prematur. Aritmia ini dapat dialami oleh orang yang minum kafein berlebihan (Ganiswarna, 1995).

Pada pembuluh darah, kafein menyebabkan dilatasi pembuluh darah termasuk pembuluh darah koroner dan pulmonal karena efek langsung pada otot pembuluh darah. Dosis terapi akan menyebabkan vasodilatasi pembuluh darah perifer yang bersama dengan peninggian curah jantung mengakibatkan bertambahnya aliran darah. Vasodilatasi perifer ini hanya berlangsung sebentar sehingga tidak mempunyai kegunaan terapi (Ganiswarna, 1995).

## 3. Otot rangka

Pada manusia, kemampuan kafein untuk meningkatkan kapasitas kerja otot dari atlet telah lama diketahui (Fox, 1993; Goodman, 1996; Strauss, 1979).



Para pemain ski yang minum kafein sebanyak 6 mg/kgBB meningkat kinerja fisiknya, khususnya di dataran tinggi. Kaitannya secara langsung belum jelas dengan transmisi neuromuskuler (Ganiswarna, 1995; Goodman, 1996).

Dalam kadar terapi, ternyata kafein dapat memperbaiki kontraktilitas dan mengurangi kelelahan otot diaphragma pada orang normal maupun pada penderita Chronic Obstructive Pulmonary Disease (Ganiswarna, 1995; Goodman, 1996).

Pada manusia, xantin terutama kafein menyebabkan bertambahnya kemampuan kerja otot karena efeknya terhadap susunan saraf pusat dan perifer (Ganiswarna, 1995).

#### 4. Sistem gastrointestinal

Kombinasi histamin dan kafein memperlihatkan efek potensiasi pada peningkatan sekresi pepsin dan asam. Pada hewan coba didapati perubahan patologis dan pembentukan ulkus pada saluran cerna akibat pemberian kafein dosis tunggal yang tinggi dan dosis kecil berulang. Peranan kopi dan minuman kola dalam patogenesis tukak lambung agaknya bersifat individual (Ganiswarna, 1995).

Kafein merangsang sel-sel parietal sehingga mengakibatkan peningkatan sekresi lambung (Iserson, 1990).

Sekresi lambung setelah pemberian kafein memperlihatkan gambaran khas pada orang normal maupun pada orang dengan tukak lambung atau tukak duodenum. Individu dengan predisposisi tukak peptic atau penderita tukak peptic yang sedang mengalami remisi juga menunjukkan respon yang abnormal terhadap pemberian kafein (Ganiswarna, 1995).

## 5. Sistem reproduksi

Beberapa penelitian menyatakan bahwa mengkonsumsi kafein dengan dosis 300 mg perhari atau lebih berhubungan dengan peningkatan resiko terjadinya ketidaksuburan. Pada wanita terjadi gangguan siklus menstruasi sehingga siklus menstruasinya menjadi tidak teratur dan pada pria terjadi penurunan motilitas spermatozoa (Spiller, 1998).

Penelitian dari Ifante-Rivard dkk, berkesimpulan bahwa wanita yang mengkonsumsi kafein 300 mg atau lebih per hari selama masa kehamilan mengakibatkan tiga kali lebih beresiko mengalami abortus spontan dibandingkan dengan wanita yang tidak mengkonsumsi kafein selama masa kehamilan. Sedangkan mereka yang mengkonsumsi kafein 150 - 300 mg perhari, dua kali lebih beresiko mengalami abortus spontan dibandingkan dengan wanita yang tidak mengkonsumsi kafein selama masa kehamilan (Spiller, 1998).

Penelitian Panghiyangan (2001) pada mencit jantan berkesimpulan bahwa pemberian kafein menyebabkan :

- penurunan persentase morfologi normal dan viabilitas spermatozoa mencit
- peningkatan kecepatan gerak maju spermatozoa mencit. Ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Satmoko dan Soeradi (1995) pada spermatozoa manusia dan dari hasil penelitian tersebut diketahui bahwa kafein meningkatkan kecepatan gerak lurus spermatozoa.
- kelainan morfologi spermatozoa yaitu spermatozoa dengan kelainan kepala besar, kepala kecil, kepala ganda, spermatozoa dengan kelainan ekor

membesar, ekor spiral, ekor bercabang, spermatozoa dengan kelainan bagian tengah spiral dan aglutinasi ekor (Panghiyangani, 2001).

### 2.1.3 Farmakokinetik

Kafein cepat diabsorpsi setelah pemberian oral, rectal dan subkutaneus. Kafein dimetabolisir dengan cepat di hati dan diekskresi bersama urin dalam bentuk asam metilurat dan metilxantin. Sekitar 10% kafein akan ditemukan di urin dalam bentuk utuh. Waktu paruh plasma kafein sekitar 3,5 jam dan waktu paruh plasma berkurang pada perokok serta bertambah pada wanita hamil (Iserson, 1990).

Setelah minum kopi, pengaruh kafein terjadi relatif lebih cepat, sekitar 30 menit akan mencapai pengaruh maksimum dan akan hilang perlahan-lahan mulai 2 – 3 jam (Mutschler, 1999).

Dalam keadaan perut kosong, sediaan kafein dapat menghasilkan kadar puncak plasma dalam waktu 1 jam dan didistribusikan ke seluruh tubuh bahkan dapat melewati plasenta serta masuk ke dalam air susu ibu (Ganiswarna, 1995; Goodman, 1996).

### 2.1.4 Intoksikasi

Pada manusia, kematian akibat keracunan kafein jarang terjadi. Gejala yang biasanya paling mencolok pada penggunaan kafein dosis berlebihan ialah muntah dan kejang. Walaupun dosis letal akut kafein pada orang dewasa antara 5 – 10 gram, namun reaksi yang tidak diinginkan telah terlihat pada penggunaan kafein 1 gram (15 mg/kgBB) yang menyebabkan kadar dalam plasma di atas 30 µg/ml. Gejala permulaan berupa sukar tidur, gelisah dan eksitasi yang dapat berkembang menjadi delirium ringan. Gangguan sensoris berupa tinitus dan

kilatan cahaya yang sering dijumpai. Otot rangka menjadi tegang dan gemetar, sering pula ditemukan takikardi dan ekstrasistol, sedangkan pernafasan menjadi lebih cepat (Ganiswarna, 1995; Goodman, 1996).

#### 2.1.5 Sediaan dan dosis

Kafein merupakan kristal putih yang larut dalam air dengan 1:46. Kafein - Na Benzoat dan kafein sitrat berupa senyawa putih, agak pahit, larut dalam air. Kafein - Na benzoat tersedia dalam ampul 2 ml mengandung 500 mg untuk suntikan IM sedangkan kafein sitrat terdapat dalam bentuk tablet 60mg, 120 mg dan 200 mg untuk pemakaian oral (Craig, 1986; Ganiswarna, 1995).

Pada dosis biasa yaitu 50 - 200 mg, kafein terutama bekerja pada korteks serebri. Pada orang yang lelah, gejala kelelahan akan hilang dan kemampuan psikis akan meningkat (Mutschler, 1999).

Dosis kafein yang dianggap relatif aman untuk orang dewasa perhari sampai 600 mg atau sama dengan 5 - 6 cangkir kopi (Pinger, 1998).

Dosis terapi kafein untuk mencit (*Mus musculus*) yaitu  $10\% \times LD_{50}$  dan dosis teratogeniknya  $0,33 \times LD_{50}$ , dimana  $LD_{50}$  kafein untuk mencit jantan : 127 mg/kgBB (Donatus, 1992 cit Panghiyangani, 2001).

Untuk tikus jantan  $LD_{50}$  kafein yaitu 355 mg/kgBB dan untuk tikus betina  $LD_{50}$  kafein yaitu 247 mg/kgBB melalui pemberian secara oral (Thompson, 1993).

#### 2.1.6 Kegunaan klinik

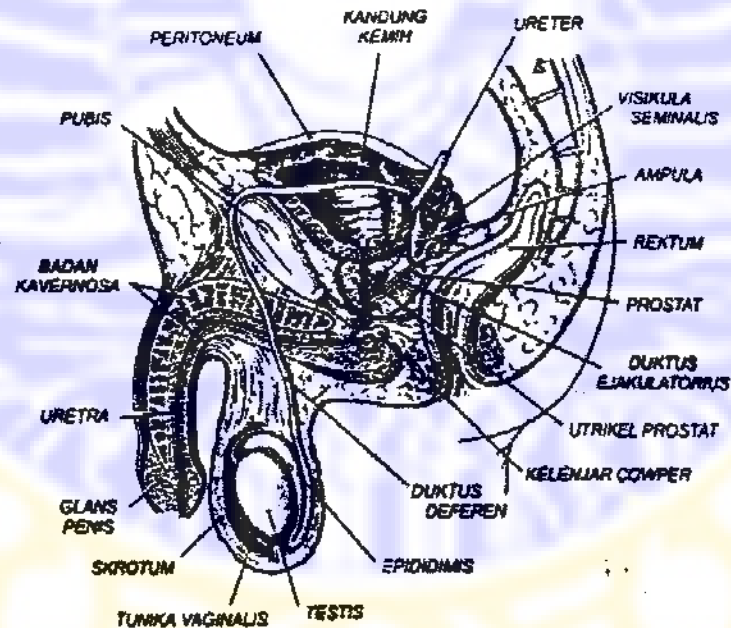
Kombinasi kafein dengan analgetik, misalnya aspirin, digunakan untuk pengobatan berbagai sakit kepala. Tetapi sedikit data yang dapat memperkuat indikasi ini. Kafein juga digunakan dalam kombinasi dengan alkaloid ergot untuk

mengobati migren; perbaikan ini didasarkan atas kemampuan kafein menyebabkan vasokonstriksi pembuluh darah otak dan penurunan tekanan likuor atau tekanan cairan serebrospinal (Goodman, 1996; Mutschler, 1999).

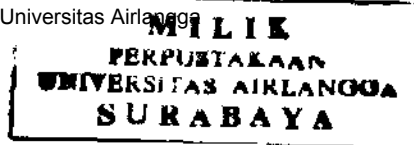
## 2.2 Testis

Sistem reproduksi pria terdiri atas testis, saluran kelamin, kelenjar tambahan dan penis (Junqueira, 1997). Testis mempunyai fungsi ganda. Pertama, testis menghasilkan sel kelamin pria atau gamet yaitu spermatozoa dan kedua, testis menghasilkan hormon kelamin pria yaitu testosteron (Geneser, 1994).

Menurut Frandson (1992) dalam bukunya yang berjudul *Anatomi dan Fisiologi Ternak*, menyatakan bahwa testis bervariasi dari satu spesies dengan spesies yang lain dalam hal bentuk, ukuran dan lokasi tetapi struktur dasarnya adalah sama (Rosida, 2002).



Gambar 2.1 Sistem reproduksi pria (Bloom dan Fawcet, 2002)



### 2.2.1 Struktur anatomi testis

Testis ada 2, kiri dan kanan, yang kiri lebih berat dan lebih besar daripada yang kanan. Bentuk testis ovoid, beratnya 10-14 gram, panjangnya 4 cm, diameter anteroposteriornya sekitar 3 cm, tebalnya dari medial ke lateral sekitar 2,5 cm (Tirthaningsih, 2002).

Kedua testis terletak dalam scrotum. Scrotum adalah suatu kantong kulit yang terdiri dari dua lapis yaitu kulit dan fascia superfisialis. Kulit scrotum tipis, berkerut, berpigmen dan membentuk kantong tunggal dengan sedikit peninggian digaris tengah, yang menunjukkan suatu garis persatuan. Sedangkan fascia superfisialis tidak mengandung jaringan lemak, tetapi pada fascia superfisialis terdapat selembur otot polos yang tipis, dikenal sebagai tunica dartos, yang berkontraksi sebagai reaksi terhadap dingin (Moore, 2002; Snell, 1997).

Testis kiri biasanya terletak lebih rendah dibandingkan testis kanan dan testis berada pada suhu sekitar 3<sup>o</sup>C lebih rendah dari suhu abdomen. Ini yang dibutuhkan untuk proses spermatogenesis karena spermatogenesis normal hanya dapat terjadi bila testis berada dalam suhu yang lebih rendah dari suhu abdomen (Snell, 1997).

Suhu sangat penting dalam regulasi spermatogenesis, yang hanya berlangsung pada suhu di bawah suhu badan 37<sup>o</sup>C. Suhu testis sekitar 35<sup>o</sup>C dan dikendalikan oleh beberapa mekanisme. Sebuah pleksus venosa luas (Pleksus pampiniformis) mengelilingi setiap arteri testicularis dan membentuk sebuah sistem arus balik pertukaran panas yang penting dalam mempertahankan suhu testis yang rendah. Faktor lain adalah penguapan keringat dari scrotum, yang membantu melenyapkan panas dan kontraksi musculus cremaster dari funiculus

spermaticus, yang menarik testis ke dalam canalis inguinalis, yang suhunya dapat ditingkatkan (Junqueira, 1997).

Funiculus spermaticus menggantungkan testis dalam scrotum dan berisi struktur-struktur yang melintas dari dan menuju testis. Funiculus spermaticus berawal pada anulus inguinalis profundus, lateral dari arteria epigastrica inferior melalui canalis inguinalis dan berakhir pada tepi dorsal testis dalam scrotum. Funiculus spermaticus diliputi oleh fascia pembungkus yang berasal dari dinding abdomen (Moore, 2002).

Pembungkus funiculus spermaticus dibentuk oleh tiga lapisan fascia yang terdiri atas (Tirthaningsih, 2002) :

- Fascia spermatica eksterna

Merupakan lanjutan dari fascia musculus obliquus abdominis eksternus. Dibagian cranial melekat pada crura dari annulus inguinalis superficialis.

- Fascia cremasterica

Lapisan ini ditandai dengan adanya serabut-serabut otot bergaris yang dinamakan musculus cremaster, yang merupakan lanjutan dari musculus obliquus abdominis internus.

- Fascia spermatica interna

Merupakan lanjutan dari fascia transversa abdominis (fascia transversalis).

Komponen funiculus spermaticus ialah ductus deferens (vas deferens) untuk menyalurkan sperma dari epididymis, arteri testicularis, arteri untuk ductus deferens, arteri cremasterica, pleksus pampiniformis, serabut saraf simpatis pada

arteri, ramus genitalis nervus genitofemoralis yang mempersarafi musculus cremaster dan pembuluh limfe untuk menyalurkan limfe dari testis (Moore, 2002).

Pada fascia cremasterica terdapat ikal (loops) musculus cremaster dan fungsi musculus cremaster adalah mengangkat testis dan scrotum ke atas untuk menghangatkan suhu sewaktu dingin dan untuk melindungi terhadap cedera (Moore, 2002; Snell, 1997). Pada waktu suhu panas atau setelah aktivitas, otot polos pada tunica dartos dan musculus cremaster akan relaksasi yang menyebabkan kulit scrotum menjadi longgar dan tipis serta diikuti dengan penurunan testis dari posisi semula (Seeley, 1998 cit Rosida, 2002).

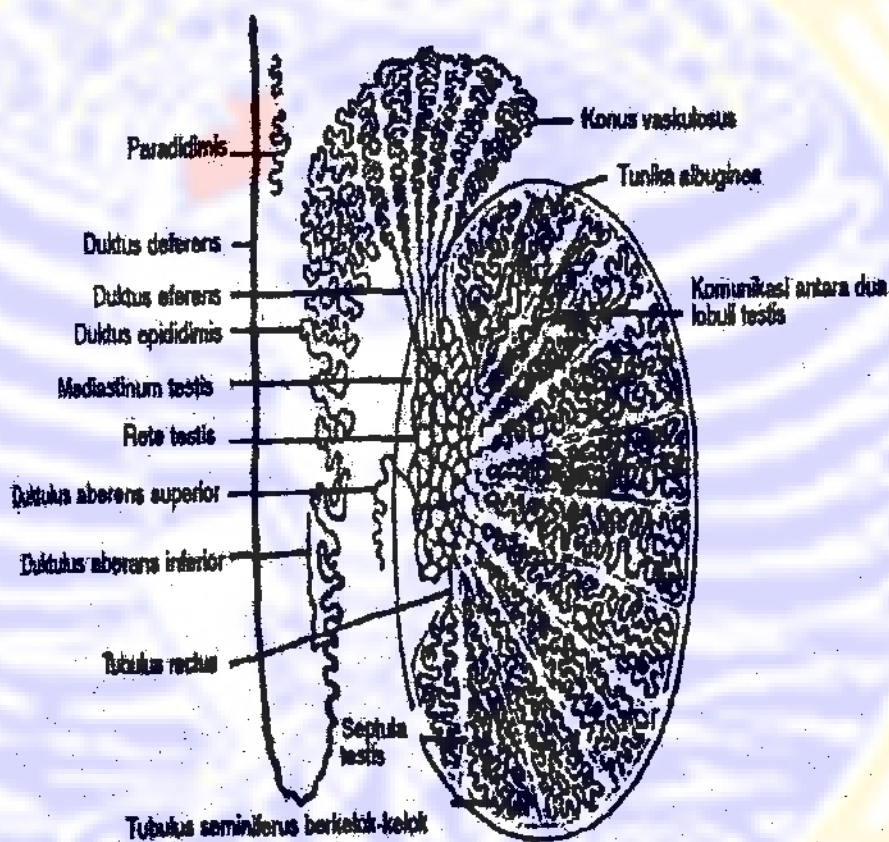
Testis dibungkus oleh simpai testis yang terdiri atas tiga lapis (Bloom dan Fawcett, 2002; Gray, 2002, Leeson, 1996) yaitu :

1. Lapisan terluar, tunica vaginalis
2. Lapisan tengah, tunica albuginea
3. Lapisan terdalam, tunica vasculosa

Tunica vaginalis yang berasal dari peritoneum terdiri atas lapisan sebelah luar parietal dan lapisan sebelah dalam, visceral, membungkus tunica albuginea. Tunica albuginea mengelilingi masing-masing testis dan merupakan kapsula fibrosa yang kuat (Nowak, 1999). Lapisan terdalam simpai testis adalah tunika vaskulosa, yang terdiri atas jala-jala kapiler darah yang terbenam di dalam jaringan ikat kendur. Pada permukaan dalam kapsula terbentang banyak septa fibrosa yang membagi bagian dalam testis menjadi lobulus-lobulus. Di dalam setiap lobulus terdapat satu sampai tiga tubulus seminiferus yang berkelok-kelok. Tubulus seminiferus bermuara ke dalam jaringan saluran yang dinamakan rete testis. Ductus efferentes testis yang kecil menghubungkan rete testis dengan



ujung atas epididymis. Ujung atas epididymis melebar, terdiri dari caput, corpus dan cauda yang arahnya ke inferior. Epididymis merupakan saluran berkelok-kelok yang panjangnya sekitar 6 meter, terbenam dalam jaringan ikat (Snell, 1997; Thibodeau, 1991). Epididymis ini merupakan tempat penyimpanan spermatozoa dan cauda epididymis berlanjut menjadi ductus deferens (vas deferens), yang masuk ke funiculus spermaticus (Snell, 1997).



Gambar 2.2 Diagram potongan testis dan duktus-duktusnya (Geneser, 1994)

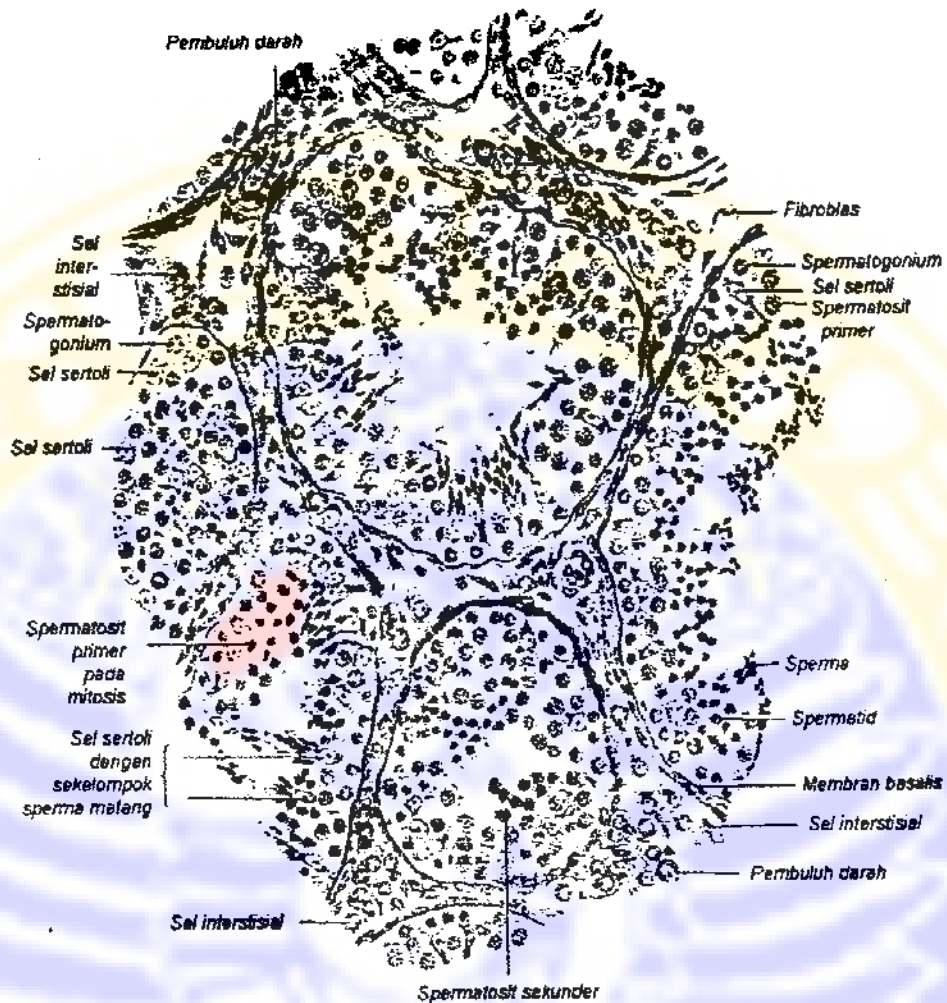
Testis mendapat vaskularisasi dari arteri testicularis yang berasal dari pars abdominalis aortae, tepat caudal arteri renalis. Vena-vena meninggalkan testis dan berhubungan dengan pleksus pampiniformis berlanjut menjadi vena testicularis dalam canalis inguinalis. Limfe dari testis disalurkan ke lymphonodi lumbales dan lymphonodi pre-aortici. Saraf autonom testis berasal dari pleksus testicularis di sekeliling arteri testicularis. Saraf ini mengandung serabut parasimpatis dari nervus vagus dan serabut simpatis dari segmen medulla spinalis thoracal tujuh (Moore, 2002).

### 2.2.2 Struktur histologis testis

Testis dikelilingi oleh simpai tebal jaringan ikat kolagen yaitu tunica albuginea. Tunica albuginea menebal pada permukaan posterior testis, membentuk mediastinum testis, dari situ terjulur septa fibrosa ke dalam kelenjar, membaginya menjadi lebih kurang 250 kompartemen pyramidal yang disebut lobulus testis. Septa ini tidak utuh dan sering ada hubungan antar lobulus. Setiap lobulus dihuni oleh 1-4 tubulus seminiferus, terpendam dalam dasar jaringan ikat longgar yang banyak pembuluh darah, pembuluh limfe, saraf dan sel interstitial atau sel Leydig (Junqueira, 1997).

#### A. Tubulus seminiferus

Tubulus seminiferus terdiri atas tunica propria, lamina basalis dan epitel germinal kompleks. Tunica propria, yang merupakan lapisan paling luar sebagai pembungkus tubulus seminiferus, terdiri atas beberapa lapis fibroblas. Lapisan paling dalam yang melekat pada lamina basalis terdiri atas sel-sel mioid gepeng, yang memperlihatkan ciri otot polos (Junqueira, 1997).



Gambar 2.3 Penampang lintang tubulus seminiferus  
(Bloom dan Fawcett, 2002)

Setiap tubulus seminiferus mempunyai garis tengah  $\pm 150\text{-}250 \mu\text{m}$  dan panjangnya 30-70 cm. Panjang seluruh tubulus satu testis mencapai 250 meter (Mountcastle, 1980). Tubulus seminiferus ini membentuk jalinan, tempat masing-masing tubulus berakhir buntu atau dapat bercabang. Pada ujung setiap tubulus, lumennya menyempit dan berlanjut ke dalam ruas pendek yang dikenal sebagai

tubulus rektus atau tubulus lurus, yang menghubungkan tubulus seminiferus dengan labirin saluran-saluran berlapis epitel yang bersinambungan yaitu rete testis. Rete testis terdapat dalam jaringan ikat mediastinum, dihubungkan dengan bagian kepala epididymis oleh 10-20 duktulus efferentes (Junqueira, 1997).

Tubulus seminiferus dibatasi oleh suatu epitel germinal kompleks atau epitel seminiferus, yang merupakan modifikasi epitel berlapis kuboid. Epitel seminiferus terdiri atas 2 kategori sel berbeda yaitu sel-sel spermatogenik atau sel benih dan sel untuk penyokong serta nutrisi (sel Sertoli). Sel-sel spermatogenik membentuk bagian terbesar dari lapisan epitel dan melalui proliferasi serta diferensiasi yang kompleks akan menghasilkan spermatozoa (Leeson, 1996).

#### Sel-sel Spermatogenik

Sel-sel spermatogenik yang terdapat dalam tubulus seminiferus (Geneser, 1994; Gunawan, 1979; Halim, 1995; Leeson, 1996; Rosida, 2002).

##### a. Spermatogonia

Spermatogonia adalah sel pertama dari proses spermatogenesis yang merupakan perkembangan awal spermatogonia menjadi spermatozoa matang. Spermatogonia melekat pada membrana basalis tubulus seminiferus dan sebelum pubertas tetap dormant dalam tubulus seminiferus meskipun sel ini kadang-kadang tampak mengalami mitosis. Pada pubertas, sel ini mulai berproliferasi secara mitosis, sebagaimana spermatozoa dihasilkan secara terus menerus, ini bergantung pada penggantian populasi spermatogonia dengan yang baru.

Pada manusia dibedakan 2 jenis spermatogonia, yaitu:

1. Spermatogonia tipe A

Inti bentuk bulat atau lonjong dengan kromatin yang sangat halus, mempunyai satu atau dua anak inti terletak di sebelah dalam nukleolema.

2. Spermatogonia tipe B

Inti bentuk bulat dengan bintik-bintik kromatin yang bervariasi ukurannya dan sering melekat pada nukleolema. Hanya terdapat satu anak inti yang terletak di tengah.

Spermatogonia tipe A merupakan sel induk. Sel ini mengalami beberapa kali mitosis dan beberapa sel ini tetap sebagai spermatogonia tipe A, sedangkan sel yang lain menjadi spermatogonia tipe B. Spermatogonia tipe B tidak mampu kembali menjadi sel induk dan melalui mitosis menjadi spermatogonia tipe B yang lebih banyak. Akhir mitosis spermatogonia tipe B terbentuk spermatosit primer.

b. Spermatosit primer

Akhir mitosis spermatogonia tipe B berbentuk spermatosit primer yang merupakan sel benih terbesar yang terdapat dalam tubulus seminiferus. Ketika dibentuk pertama kali, sel-sel tersebut terletak di ruang basal tubulus seminiferus. Dengan berdiferensiasinya sel spermatosit primer, taut kedap (tight junction) di antara sel-sel Sertoli yang berdekatan akan menghilang sehingga memungkinkan berpindahannya spermatosit primer dari ruang basal ke ruang adluminal. Sifat-sifat spermatosit primer :

- inti besar sekali dan jelas terlihat, lokalisasi inti umumnya terletak sentral
- pada interfase, terlihat butir-butir kromatin tersebar merata secara halus

### c. Spermatisit sekunder

Sel ini berasal dari spermatisit primer melalui pembelahan meiosis pertama. Volume spermatisit sekunder kira-kira separuh dari spermatisit primer dan letaknya lebih ke arah lumen. Spermatisit sekunder jarang terlihat dalam potongan melintang tubulus seminiferus karena umur selnya pendek dan cepat membelah menjadi spermatid. Sifat-sifat spermatisit sekunder :

- pada interfase terlihat inti lebih kecil daripada spermatisit primer yang sedang membagi, tetapi lebih besar daripada spermatid muda
- inti berbentuk bulat, letak ditengah dan berisi kromatin kasar

### d. Spermatid

Sel ini berasal dari spermatisit sekunder melalui pembelahan meiosis kedua dan juga haploid. Letaknya hampir berbatasan dengan lumen. Sifat-sifat spermatid :

- inti pucat dan pada umumnya terletak eksentris, terdapat berkelompok-kelompok antara 4-8 spermatid
- sel ini sangat kecil (10  $\mu\text{m}$ ) sehingga mudah dikenali

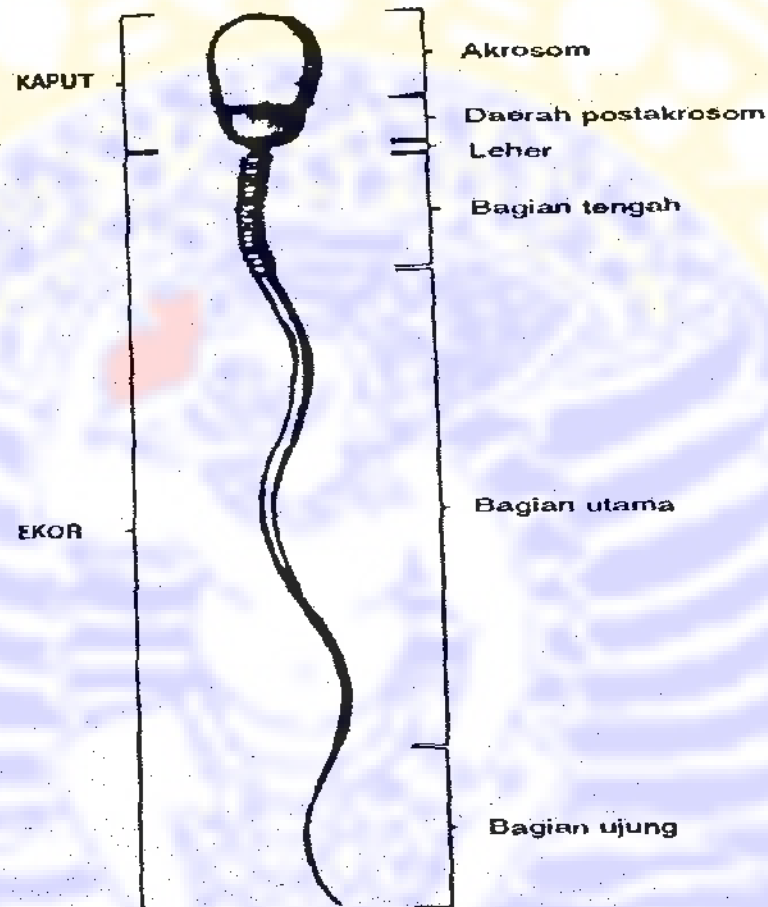
### e. Spermatozoa

Spermatozoa merupakan hasil dari transformasi spermatid melalui proses spermiogenesis dan pada proses ini tidak terdapat pembelahan sel. Spermatozoa pada manusia terdiri atas :

- Bagian kepala

terdiri atas inti yang memadat dan tudung kepala, termasuk akrosom yang memadat di bagian tepi anterior yang merupakan suatu bentukan seperti bulan sabit kecil tepat di ujung inti. Bagian kepala mengandung DNA dan akrosom

mengandung *enzim-enzim* yaitu akrosin, hyaluronidase, CPE (Corona Penetrating Enzyme), ATP-ase, fosfatase asam, aspartil amidase dan glukoronidase (Moelock, 1979).



Gambar 2.4 Sel spermatozoa matang (Bloom dan Fawcett, 2002)

- **Bagian tengah**

bagian ini terpisah dari bagian kepala melalui suatu bagian leher yang sempit, mengandung filamen-filamen memanjang yang dikelilingi oleh selubung

mitokondria dan diduga berperan dalam mengatur gerakan-gerakan bagian ekor.

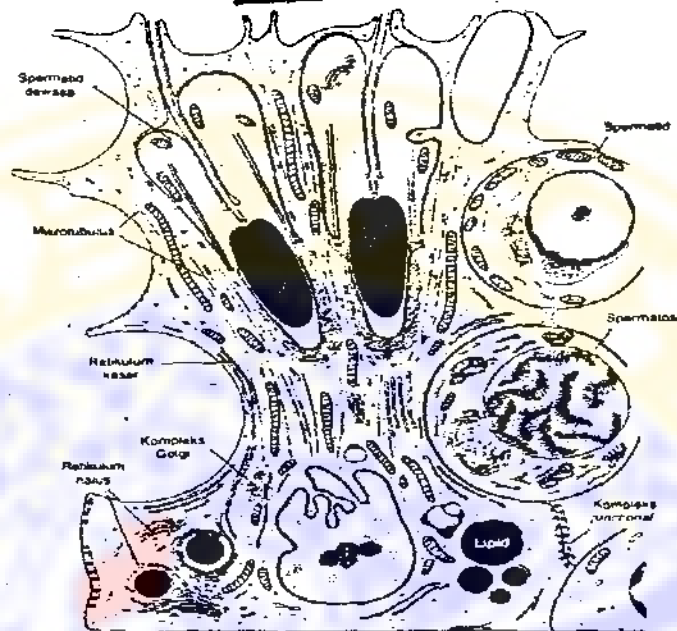
- Bagian ekor

memiliki dua filamen pusat dan sembilan pasang filamen tetapi (suatu susunan yang mirip sekali dengan silia) dan bagian ekor penting untuk pergerakan.

### Sel Sertoli

Sel ini jauh lebih sedikit daripada sel-sel spermatogenik bahkan sel Sertoli terletak diantara sel spermatogenik (Wonodirekso, 2003). Pada dasarnya sel ini berbentuk kolumnar, terbentang dari membrana basalis ke permukaan epitel yang menghadap lumen. Sitoplasma mempunyai bentuk tidak beraturan dengan sejumlah tonjolan yang ramping di sebelah lateral diantara sel-sel spermatogonia dan batas sitoplasma tidak tampak dengan mikroskop cahaya. Inti sel Sertoli berbentuk lonjong atau lebih sering bersudut dan khas mempunyai lekukan yang dalam pada membran inti. Inti sel terletak pada jarak tertentu di atas dasar sel, inti sel besar, berwarna pucat, bentuknya lonjong dengan sumbu panjangnya tersusun secara radial. Sering mempunyai anak inti sangat besar dan anak inti sel ini sangat jelas, sehingga mudah membedakannya dari unsur-unsur spermatogenik lain yang terdapat di tubulus seminiferus. Anak inti tampak mencolok, terdiri atas bagian sentral yang asidofil dan bagian tepi yang bersifat basofil (Geneser, 1994; Leeson, 1996).





Gambar 2.5 Sel Sertoli (Bloom dan Fawcett, 2002)

Fungsi sel Sertoli, yaitu:

1. Menunjang, melindungi dan mengatur nutrisi spermatozoa yang berkembang. Karena spermatosit, spermatid dan spermatozoa terisolasi dari suplai darah oleh sawar darah testis, maka sel-sel spermatogenik ini bergantung pada sel Sertoli untuk pengaturan pertukaran bahan makanan dan metabolit. Sawar sel Sertoli juga melindungi sel sperma dari serangan imunologis (Junqueira, 1997; Leeson, 1996).
2. Fagositosis  
Selama proses spermiogenesis, kelebihan sitoplasma spermatid dilepaskan sebagai badan residu. Keping sitoplasma ini difagositosis dan dirombak oleh lisosom sel Sertoli (Junqueira, 1997; Leeson, 1996).

3. Sebagai salah satu komponen sawar darah testis (blood testis barrier), sel Sertoli menghalangi protein dari sel spermatogenik yang terdapat dalam ruangan adluminal mencapai jaringan vascular interstisial dan mencetuskan pembentukan antibody (Fox, 1999; Ganong, 2001; Junqueira, 1997; Leeson, 1996; Thibodeau, 1995).

#### 4. Sekresi

Sel Sertoli secara terus menerus mensekresikan, ke dalam tubulus seminiferus, suatu cairan yang mengalir ke saluran kelamin dan digunakan untuk transport sperma. Sel Sertoli juga mensekresi protein pengikat androgen yang berada di bawah kendali FSH dan testosteron serta berfungsi melekatkan testosteron dalam tubulus seminiferus karena diperlukan untuk proses spermatogenesis. Sel Sertoli dapat mengkonversi testosteron menjadi estradiol. Sel Sertoli juga mensekresikan peptida yang disebut inhibin, yang akan menekan sintesis FSH dan pelepasannya dalam kelenjar hipofisis anterior (Junqueira, 1997; Leeson, 1996).

#### B. Jaringan interstisial

Jaringan interstisial terletak diantara tubulus seminiferus. Jaringan interstisial mengandung beberapa serat kolagen, pembuluh darah dan limfe, saraf, bermacam-macam jenis sel termasuk fibroblast, makrofag, sel mast dan beberapa sel mesenkim yang belum berkembang (Leeson, 1996).

Setelah pubertas, muncul jenis sel tambahan, berbentuk bulat atau polygonal, memiliki inti di pusat, sitoplasma eosinofilik dan mengandung banyak tetesan lipid halus. Sel ini dikenal sebagai sel interstisial atau sel Leydig (Junqueira, 1997). Sebenarnya, sejak masa embrio sel Leydig telah ada namun dalam waktu

beberapa minggu setelah lahir sel Leydig mengalami regresi menjadi sel menyerupai fibroblast dan tetap berada pada stadium ini sampai waktu pubertas (Geneser, 1994).

Sel Leydig terletak berkelompok, memadat pada daerah segitiga yang terbentuk oleh susunan-susunan tubulus seminiferus. Sel-sel tersebut besar dengan sitoplasma sering nampak bervakuol pada sajian mikroskop cahaya. Inti selnya mengandung butir-butir kromatin kasar dan anak inti yang jelas. Sitoplasma sel kaya dengan benda-benda inklusi seperti titik-titik lipid dan pada manusia juga mengandung kristaloid berbentuk batang, dikenal dengan nama kristal Reinke (Leeson, 1996).

Sel Leydig ini menghasilkan hormon pria, testosteron, yang berfungsi bagi perkembangan ciri kelamin pria sekunder, rangsang seks dan perkembangan serta pemeliharaan saluran-saluran kelamin dan kelenjar-kelenjar tambahan. Produksi testosteron tergantung pada rangsangan LH (Luteinizing Hormone) dari lobus anterior hipofisis (Junqueira, 1997; Leeson, 1996).

### 2.2.3 Spermatogenesis

Spermatogenesis adalah segala proses yang terjadi dari spermatogonia menjadi spermatozoa (Gunawan, 1979). Sel-sel spermatogenik ini membentuk lapisan epitel berlapis dengan ketebalan 4 - 8 sel melapisi tubulus seminiferus. Sel-sel berkembang secara progresif dari daerah basal tubulus ke arah lumen dan yang paling dekat dengan lumen berubah menjadi spermatozoa, untuk selanjutnya melepaskan diri dari epitel dan terletak bebas dalam lumen (Leeson, 1996).

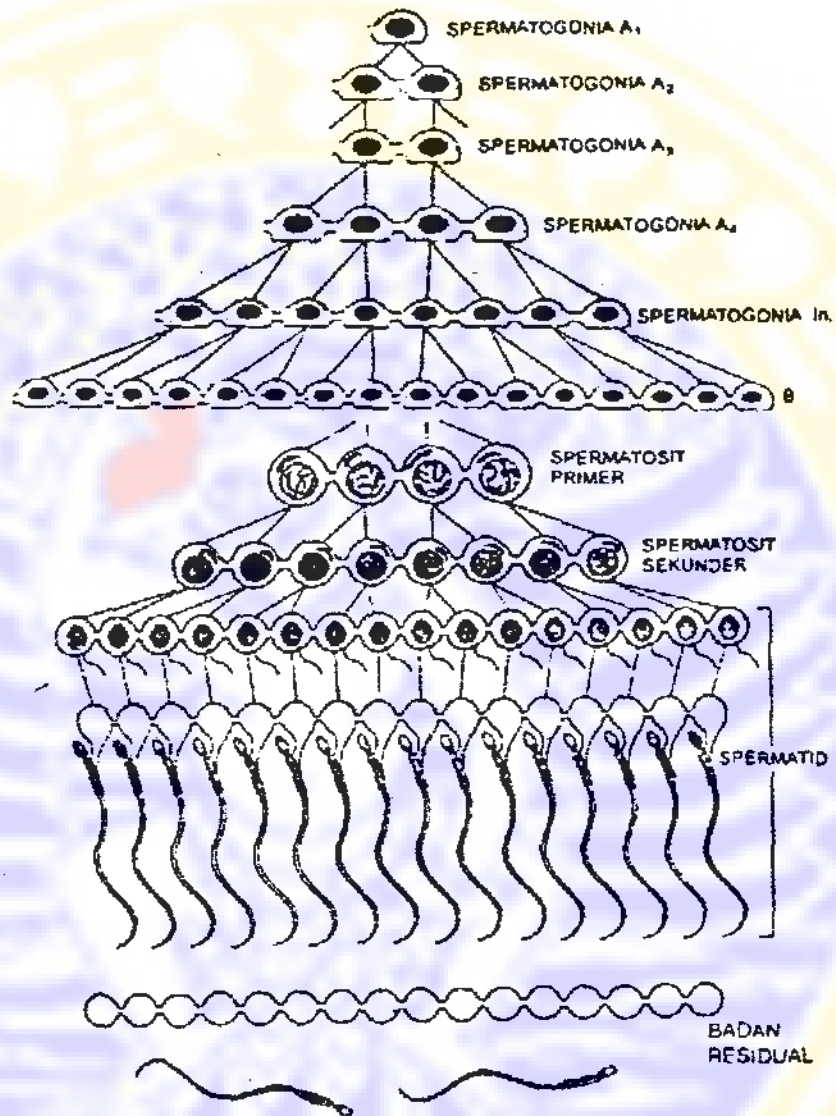
Urutan kejadian spermatogenesis, dimulai dengan spermatogonia yang letaknya tepat di atas lamina basal. Spermatogonia merupakan satu-satunya sel

benih yang ada sampai masa pubertas. Tiap spermatogonia mengandung jumlah kromosom diploid dalam inti selnya yaitu 44 autosom dan 2 kromosom seks, x dan y (Leeson, 1996).

Spermatogonia terdiri dari 2 tipe, yaitu tipe A yang merupakan sel induk untuk garis keturunan spermatogenik, sementara tipe B merupakan sel progenitor yang berdiferensiasi menjadi spermatisit primer. Jumlah kromosom sampai spermatisit primer adalah diploid. Spermatisit primer mengalami meiosis I menjadi spermatisit sekunder yaitu haploid (22 autosom ditambah dengan satu kromosom seks, x atau y). Spermatisit sekunder mengalami meiosis II menjadi spermatid dan pembelahan ini tanpa didahului oleh duplikasi DNA sehingga spermatid bersifat haploid (Junqueira, 1997; Leeson, 1996).

Stadium terakhir dari proses spermatogenesis disebut spermiogenesis, dimana tiap-tiap spermatid mengalami perubahan (transformasi) melalui diferensiasi menjadi spermatozoa (Geneser, 1994; Lecson, 1996).

Lama siklus spermatogenesis dapat diukur mulai dari perubahan spermatogonia sampai menjadi spermatozoa yang matang. Lama siklus spermatogenesis pada tiap spesies berbeda, menurut Clermont dan Perey (1957) bahwa lama satu siklus spermatogenesis pada tikus berkisar antara 40-50 hari dan pada manusia selama 64 hari (Leeson, 1996; Witono, 1998).



Gambar 2.6 Diagram spermatogenesis (Bloom dan Fawcett, 2002)

#### 2.2.4 Pengaturan hormonal fungsi testis

Bagian utama dari pengaturan fungsi seksual dimulai dengan sekresi hormon pelepas gonadotropin (GnRH) oleh hipotalamus. Hormon ini selanjutnya merangsang hipofisa anterior untuk mensekresikan dua hormon lain yang disebut hormon-hormon gonadotropin, hormon Lutein (LH) dan hormon perangsang folikel (FSH). LH merupakan rangsangan utama untuk sekresi testosteron oleh testis, dan FSH terutama merangsang spermatogenesis. Testosteron disekresikan oleh sel-sel interstesi Leydig di dalam testis tetapi hanya apabila sel-sel interstisial Leydig dirangsang oleh LH dari kelenjar hipofisis. FSH berikatan dengan reseptor-reseptor FSH spesifik yang melekat pada sel-sel Sertoli di dalam tubulus seminiferus. Pengikatan ini mengakibatkan sel-sel tumbuh dan mensekresikan berbagai unsur spermatogenik. Disisi lain, testosteron yang terdifusi ke dalam tubulus dari sel-sel Leydig, juga mempunyai pengaruh tropik yang kuat terhadap spermatogenesis. Ketika tubulus seminiferus gagal menghasilkan sperma, sekresi FSH meningkat. Sebaliknya bila spermatogenesis berjalan terlalu cepat, sekresi FSH berkurang. Penyebab pengaruh umpan balik negatif ini adalah suatu hormon yang disekresi oleh sel Sertoli yaitu inhibin. Hormon ini mempunyai pengaruh langsung yang kuat terhadap hipofisis anterior dalam menghambat sekresi FSH (Ganong, 2001; Guyton, 1997; Silverthorn et al, 2001; Soeradi, 1979; Vander, 2001).

#### 2.3 Pemilihan Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus strain Wistar*) jantan dengan beberapa alasan :

1. Tikus putih merupakan salah satu spesies hewan percobaan yang sering digunakan untuk uji teratogenik karena ukuran tubuh dan organ-organnya lebih besar dibanding mencit (Kusumawati, 2003).
2. Tikus putih mudah diperoleh, harganya relatif murah dan cukup jinak sehingga pemberian perlakuan dapat dilakukan dengan mudah (Witono, 1998).
3. Testis tikus putih mempunyai struktur histologis yang cukup mirip dengan testis manusia (Witono, 1998).
4. Mengacu pada penelitian-penelitian sebelumnya yang menggunakan tikus putih sebagai hewan percobaan.

**BAB 3****KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS****3.1 Kerangka Konseptual Penelitian**

Kafein mempengaruhi kelainan kromosom baik pada tumbuhan dan kultur sel mamalia dan mempunyai efek mutagenik kuat pada mikroorganisme manapun baik sendiri maupun berkombinasi dengan mutagen lain (Timson, 1977 *cit* Goodman, 1985). Efek ini nampaknya berhubungan dengan penghambatan proses penyusunan DNA. Ini hanya dapat diamati pada penggunaan kafein yang lebih banyak pada makanan dan obat-obatan. Pada dosis sangat tinggi, kafein tampak mempunyai beberapa aktivitas teratogenik pada hewan menyusui (Goodman, 1985).

Dilaporkan bahwa kafein mempunyai pengaruh teratogenik dan mutagenik sehingga dapat diasumsikan bahwa kafein mempunyai pengaruh terhadap sel epitel germinal di dalam tubulus seminiferus testis, sehingga sel epitel germinal yang dihasilkan terganggu pertumbuhan dan perkembangannya yang akhirnya menyebabkan spermatozoa yang dihasilkan belum matang (Gufron, 1990 *cit* Panghiyangani, 2001).

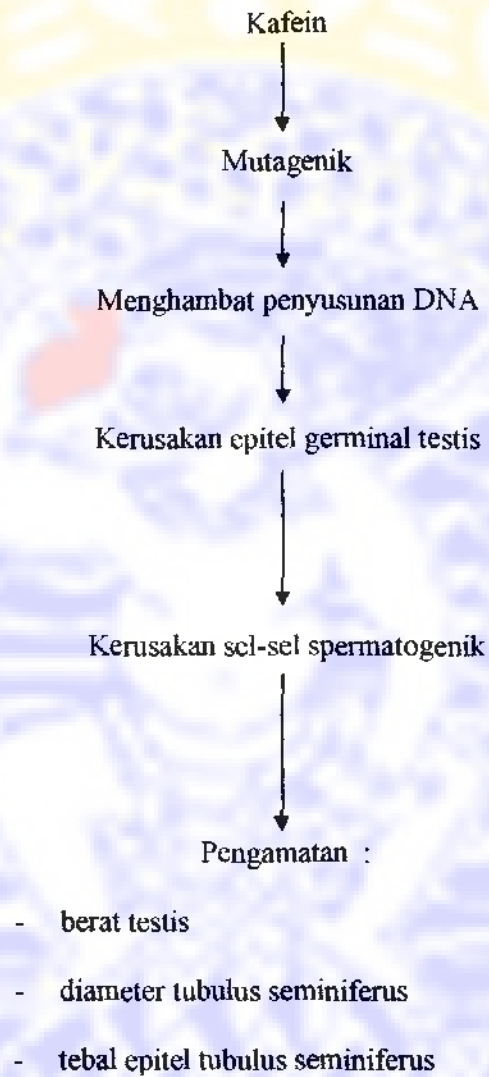
Pada penelitian kualitas spermatozoa mencit (*Mus musculus*) jantan setelah perlakuan kafein didapatkan bahwa kafein menyebabkan penurunan persentase morfologi normal dan penurunan viabilitas spermatozoa (Panghiyangani, 2001).

Berdasarkan alasan di atas maka perlu dibuktikan apakah benar pemberian kafein dengan dosis yang berbeda dapat juga menyebabkan perubahan berat



testis, diameter tubulus seminiferus dan tebal epitel tubulus seminiferus testis tikus putih (*Rattus norvegicus strain Wistar*).

Kerangka konseptual dapat digambarkan dengan diagram di bawah ini :



### 3.2 Hipotesis

Dari kerangka konseptual di atas, maka dapat dikemukakan hipotesis penelitian sebagai berikut :

1. Pemberian kafein secara oral dapat menurunkan berat testis tikus putih (*Rattus norvegicus strain Wistar*).
2. Pemberian kafein secara oral dapat menurunkan diameter tubulus seminiferus tikus putih (*Rattus norvegicus strain Wistar*).
3. Pemberian kafein secara oral dapat menurunkan tebal epitel tubulus seminiferus testis tikus putih (*Rattus norvegicus strain Wistar*).

## BAB 4

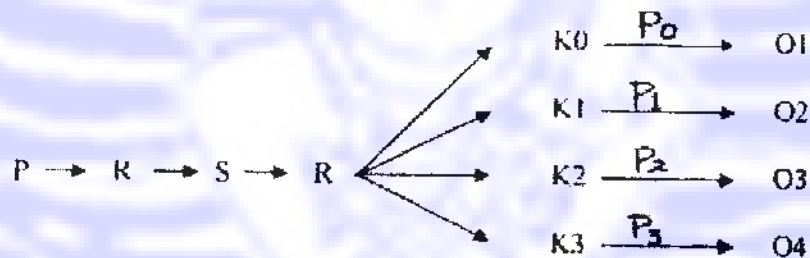
### MATERI DAN METODE PENELITIAN

#### 4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental laboratorik dengan menggunakan rancangan penelitian *The Post Test Only Control Group Design* (Zainuddin, 2000).

Rancangan penelitian ini disusun sebagai langkah untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan pengaruh antara kelompok-kelompok perlakuan dan kelompok kontrol setelah pemberian kafein pada tikus putih (*Rattus norvegicus* strain Wistar).

Secara sistematis, rancangan penelitian tersebut dapat digambarkan sebagai berikut (Zainuddin, 2000).



P : Populasi

R : Randomisasi

S : Sampel

K0 : Kelompok kontrol dengan pemberian larutan NaCl 0,9% 5 ml/hr peroral

- K1 : Kelompok dengan pemberian kafein 35,5 mg/kgBB/hr peroral
- K2 : Kelompok dengan pemberian kafein 71 mg/kgBB/hr peroral
- K3 : Kelompok dengan pemberian kafein 117 mg/kgBB/hr peroral
- P0 : Perlakuan kontrol dengan pemberian larutan NaCl 0,9% 5 ml/hr peroral
- P1 : Perlakuan dengan pemberian kafein 35,5 mg/kgBB/hr peroral
- P2 : Perlakuan dengan pemberian kafein 71 mg/kgBB/hr peroral
- P3 : Perlakuan dengan pemberian kafein 117 mg/kgBB/hr peroral
- O1 : Data kelompok kontrol setelah 45 hari perlakuan
- O2 : Data kelompok K1 setelah 45 hari perlakuan
- O3 : Data kelompok K2 setelah 45 hari perlakuan
- O4 : Data kelompok K3 setelah 45 hari perlakuan

#### 4.2 Populasi, Sampel, Besar Sampel dan Teknik Pengambilan Sampel

Populasi penelitian adalah seluruh tikus putih (*Rattus norvegicus strain Wistar*) jantan yang diperoleh dari laboratorium Biokimia FK Unair. Sampel penelitian 36 ekor tikus putih jantan yang berumur sekitar 40 – 60 hari (umur dewasa) dan mempunyai berat rata-rata 200 - 250 gram (Smith, 1988). Besar sampel yang ditetapkan menurut rumus sebagai berikut (Steel and Torrie, 1991 cit Rosida, 2002) :

$$(k - 1)(r - 1) \geq 20, \text{ dimana}$$

k = jumlah macam perlakuan

r = jumlah replikasi untuk tiap kelompok

Hasil, k = 4 dan r = 8

Dari rumus tersebut diperoleh besar sampel untuk tiap kelompok minimal 8 ekor. Karena selama perlakuan terdapat kemungkinan mati ( $f$ )  $\pm$  10%, maka besar sampel tersebut dikalikan  $1 / 1-f$ , sehingga besar sampel keseluruhan adalah 9 ekor tikus putih per kelompok perlakuan.

Teknik pengambilan sampel dilakukan dengan cara random karena populasi pada penelitian ini dianggap homogen maka cara random yang digunakan adalah simple random sampling (Zainuddin, 2000).

### **4.3 Variabel Penelitian**

#### **4.3.1 Klasifikasi variabel**

##### **a. Variabel bebas (independen)**

Kafein yang diberikan dengan dosis yang bervariasi

##### **b. Variabel tergantung (dependen)**

1. makroskopis
  - berat testis
2. mikroskopis
  - diameter tubulus seminiferus
  - tebal epitel tubulus seminiferus

##### **c. Variabel kendali**

1. Umur dan jenis kelamin hewan percobaan
2. Berat badan hewan coba sebelum perlakuan
3. Waktu penelitian
4. Pemeliharaan dan perlakuan hewan percobaan

#### 4.3.2 Definisi operasional

Variabel-variabel yang digunakan pada penelitian ini didefinisikan sebagai berikut :

1. Serbuk kafein adalah serbuk kafein murni yang diperoleh dari PT Brataco Chemika dengan no batch : J 722/03 dan menggunakan pelarut larutan NaCl 0,9% (Denadai, 1994)
2. Berat testis adalah berat testis yang diambil dari tubuh hewan coba dan telah dibersihkan dari pembungkusnya. Testis hewan coba ditimbang dengan timbangan analitik Librar Shimadzu dalam satuan gram dengan ketelitian 3 angka dibelakang koma.
3. Diameter tubulus seminiferus adalah pengukuran diameter tubulus seminiferus di bawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 10 x 10, menggunakan cara Weissbach dan Bach (Witono, 1998), menggunakan alat ukur gratikulae garis dalam satuan micron.
4. Tebal epitel tubulus seminiferus adalah pengukuran tebal epitel tubulus seminiferus di bawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 10 x 10, menggunakan cara Weissbach dan Bach (Witono, 1998), menggunakan alat ukur gratikulae garis dalam satuan micron.
5. Umur dan jenis kelamin yaitu umur tikus putih 40 – 60 hari dengan jenis kelamin jantan.
6. Berat badan tikus putih jantan sebelum perlakuan adalah berat badan rata-rata pada tikus putih dewasa yaitu 200-250 gram yang diukur dengan timbangan dalam satuan gram.

7. Waktu perlakuan dimulai pada waktu yang sama setiap harinya yaitu pada pukul 08.00 WIB.
8. Pemeliharaan dan perawatan hewan percobaan dilakukan di tempat yang sama (Laboratorium Biokomia FK Unair) dan kondisi kandang sama serta makanan standar dan minum air aquades.

#### 4.4 Bahan Penelitian

##### 4.4.1 Bahan perlakuan

Bahan yang digunakan pada hewan coba adalah :

- a. Pellet
- b. Air aquades
- c. Serbuk kafein
- d. Larutan NaCl 0,9%

##### 4.4.2 Bahan pemeriksaan

- a. Ether untuk pembiusan
- b. Larutan NaCl 0,9% untuk mencuci testis
- c. Testis tikus putih (*Rattus norvegicus strain Wistar*)
- d. Bahan untuk pembuatan preparat histologis metode paraffin
  - larutan Bouin untuk fiksasi yang dibuat dari (Liben, 1992)
    - asam pikrat jenuh 1,22%                      750 ml
    - formaldehid 37-40%                              250 ml
    - asam asetat glacial                              50 ml
  - alkohol 70%, 80%, 90%, 95% dan absolut untuk dehidrasi
  - larutan xylol atau xylene untuk clearing

- paraffin cair untuk blok jaringan
- albumin meyer, dibuat dari putih telur dan gliserin 1 : 1
- Canada Balsam untuk mounting
- e. Bahan untuk pewarnaan Periodic Acid-Schiff (PAS)
  - larutan Xylol
  - larutan alkohol 95% dan absolut
  - larutan periodic acid 5 %
  - reagen Schiff
  - larutan hematoksilin
  - *acid* alkohol

#### **4.5 Instrumen Penelitian**

##### **4.5.1 Alat untuk pemeliharaan tikus putih (*Rattus norvegicus strain Wistar*)**

jantan

- a. kandang tempat pemeliharaan
- b. botol untuk tempat minum
- c. tempat makanan
- d. Sonde (feeding tube no.8), untuk pemberian kafein peroral.

##### **4.5.2 Alat untuk pembiusan dan pengambilan jaringan testis**

- a. toples dengan tutup untuk pembiusan
- b. alat fiksasi dan diseksi hewan coba
- c. botol kecil dengan tutup untuk fiksasi jaringan
- d. seperangkat alat bedah minor
- e. timbangan elektronik untuk menimbang berat testis



#### 4.5.3 Alat untuk pembuatan dan pengamatan sediaan histologik testis

- a. mikrotom
- b. *object glass* dan *cover glass*
- c. cetakan dari logam yang berbentuk L. untuk embedding
- d. *water bath*
- e. *staining jar*
- f. mikroskop cahaya
- g. alat pengukur *gratikulae* garis

#### 4.6 Prosedur Penelitian

##### 4.6.1 Lokasi dan waktu penelitian

Penelitian ini dilakukan di laboratorium Biokimia FK Unair untuk pemeliharaan dan perlakuan hewan percobaan serta pengambilan jaringan. Di laboratorium Histologi Bagian Anatomi-Histologi FK Unair untuk preparasi jaringan dan pengambilan data penelitian. Waktu penelitian mulai bulan September – Nopember 2004.

##### 4.6.2 Persyaratan etik penelitian

Implikasi etik pada tikus putih sebagai hewan percobaan mengikuti *animals ethic*. Hal yang perlu dilaksanakan sesuai dengan etik antara lain perawatan mencit dalam kandang, pemberian makan minum, aliran udara ke dalam ruang kandang, perlakuan saat penelitian, pengambilan unit analisis penelitian dan pemusnahannya. Menurut Soeparto Pitono (2002), etik penelitian pada hewan coba yaitu penggunaan hewan laboratorium hanya diijinkan bila perlu dan hanya dengan perlakuan yang baik.

#### 4.6.3 Pemeliharaan dan pembagian kelompok hewan percobaan

Sebelum diberikan perlakuan, hewan percobaan diaklimatisasi selama 1 minggu dalam kondisi laboratorium, di laboratorium Biokimia FK Unair. Tikus putih dipelihara pada kandang yang ditutup kawat kassa dan dilengkapi dengan tempat makan-minum serta beralaskan sekam. Makanan tikus putih menggunakan makanan standard dan minum air aquades. Untuk menjaga kebersihan kandang, sekam diganti tiap 2 hari.

Pembagian kelompok hewan percobaan dilakukan secara acak menjadi

4 kelompok yaitu :

- a. Kelompok K0 : kelompok kontrol yang diberi larutan NaCl 0,9% sebanyak 5 ml / hr peroral selama 45 hari.
- b. Kelompok K1 : kelompok perlakuan yang diberi kafein 35,5 mg/kgBB/hr peroral selama 45 hari.
- c. Kelompok K2 : kelompok perlakuan yang diberi kafein 71 mg/kgBB/hr peroral selama 45 hari.
- d. Kelompok K3 : kelompok perlakuan yang diberi kafein 117 mg/kgBB/hr peroral selama 45 hari.

Masing-masing kelompok terdiri dari 9 ekor tikus putih jantan umur 40 – 60 hari dengan berat sekitar 200 - 250 gram.

#### 4.6.4 Perlakuan hewan percobaan

Kafein yang telah dilarutkan dalam larutan NaCl 0,9% diberikan pada kelompok perlakuan satu kali perhari pada waktu yang sama peroral dengan menggunakan sonde no.8. Volume pemberian yang digunakan untuk tiap ekor tikus putih berdasarkan berat badan dengan volume maksimum larutan obat yang

diberikan peroral pada tikus putih dengan berat badan 100 gram adalah 5 ml (Kusumawati, 2003).

Dosis kafein yang diberikan pada K1 yaitu:

$$1/10 \times LD_{50} (355 \text{ mg/kgBB}) = 35,5 \text{ mg/kgBB/hari.}$$

Dosis kafein yang diberikan pada K2 yaitu:

$$1/5 \times LD_{50} (355 \text{ mg/kgBB}) = 71 \text{ mg/kgBB/hari.}$$

Dosis kafein yang diberikan pada K3 yaitu :

$$1/3 \times LD_{50} (355 \text{ mg/kgBB}) = 117 \text{ mg/kgBB/hari.}$$

Perlakuan ini diberikan selama 45 hari (1 siklus spermatogenesis tikus) dengan harapan pengaruh mutagenik pada sel-sel spermatogenik tikus putih jantan sudah memperlihatkan hasil yang diharapkan.

#### **4.6.5 Pembiusan**

Pembiusan dilakukan dengan menggunakan ether. Tikus putih dimasukkan ke dalam toples kaca dan ditutup dengan kaca, kemudian larutan ether diteteskan ke dalam botol tersebut. Tikus putih diangkat dari toples jika sudah tidak bergerak lagi ( $\pm \frac{1}{2}$  - 1 menit setelah ether diteteskan) kemudian diletakkan di papan bedah untuk pengambilan jaringan testis.

#### **4.6.6 Pengambilan jaringan testis**

Tikus putih diletakkan di atas meja bedah dalam posisi terlentang dengan kecmpat anggota gerak difiksasi. Testis diambil dengan cara membuka scrotum. Scrotum dijepit dengan pinset kemudian diangkat sedikit. Kulit scrotum yang terangkat digunting pelan-pelan sampai kantong terbuka dan tampak testis. Testis diangkat dengan memotong ductus epididymis yang berbatasan dengan testis. Setelah testis dikeluarkan, dengan pelan-pelan, testis dibersihkan dari jaringan ikat

dan lemak serta pembungkusnya, kemudian ditimbang dengan timbangan elektronik dan setelah itu seluruhnya segera dimasukkan ke dalam larutan fiksatif dan dilabelisasi.

#### 4.6.7 Pembuatan sediaan histologik dan pewarnaan

Setelah semua testis terkumpul kemudian dibawa ke laboratorium Histologi untuk dibuat sediaan histologik metode parafin dengan pewarnaan PAS, karena dengan pewarnaan PAS dapat diketahui dengan jelas bentuk spermatid (Witono, 1998) yaitu :

a. Langkah-langkah pembuatan sediaan histologik model parafin adalah sebagai berikut :

1. Fiksasi : dengan larutan Bouin
2. Dehidrasi : dengan larutan alkohol 70% selama 2 jam  
dengan larutan alkohol 80% selama 2 jam  
dengan larutan alkohol 90% selama 2 jam  
dengan larutan alkohol 95% selama 2 jam  
dengan larutan alkohol absolut I selama 1 jam  
dengan larutan alkohol absolut II selama 1 jam
3. *Clearing* : dengan larutan Xylol I selama 2 jam  
dengan larutan Xylol II selama 2 jam
4. Infiltrasi : parafin cair I selama 3 jam  
parafin cair II selama 3 jam  
parafin cair III selama 3 jam
5. *Embedding* : dicetak bentuk blok kemudian didinginkan selama 24 jam
6. *Trimming* : dikepris menjadi cetakan yang rapi

7. *Sectioning* : dilakukan penyayatan/pemotongan dengan mikrotom, dengan tebal 5-7 mikron
8. *Mounting* : hasil potongan diletakkan diatas obyek gelas yang diberi albumin Meyer, dikeringkan dan sediaan siap untuk diwarnai.

b. Langkah-langkah pewarnaan dengan Periodic Acid Schiff (PAS) adalah sebagai berikut :

1. Masukkan obyek glass yang berisi jaringan xylene.
2. Masukkan ke alkohol absolut kemudian alkohol 90%.
3. Cuci dengan air.
4. Masukkan ke dalam Periodic acid 0,5% selama 5 menit.
5. Cuci dengan air.
6. Masukkan ke dalam Reagen Schiff selama 15 menit.
7. Cuci dengan air selama  $\pm$  10 menit sampai warna menjadi merah muda.
8. Masukkan ke dalam acid alkohol selama 2 menit.
9. Cuci dengan air.
10. Masukkan ke amoniak *water* sampai berwarna biru.
11. Cuci dengan air.
12. Masukkan ke Hematoksilin selama 5 menit.
13. Cuci dengan air.
14. Masukkan ke dalam alkohol 95% kemudian alkohol absolut.
15. Masukkan ke dalam Xylene.
16. *Mounting* : jaringan ditetesi Canada Balsam kemudian ditutup dengan gelas penutup (Gridley, 1960; Suidiana).

#### 4.6.8 Pengumpulan data

Pengumpulan data dilakukan dengan melihat sediaan histologis testis tikus putih di bawah mikroskop cahaya dengan pembesaran okuler 10 x dan pembesaran objektif 10 x dan dilakukan pengukuran dengan menggunakan gratikulae garis.

Satu sediaan testis dibuat menjadi 8 irisan testis dan dari antara 8 irisan tersebut, diamati lalu dilakukan pengukuran terhadap 10 potongan melintang tubulus seminiferus (Rosida, 2002).

Potongan melintang tubulus seminiferus dicari sedapat mungkin yang benar-benar terpotong tegak lurus dengan sumbunya, yaitu tubulus seminiferus yang penampang melintangnya tampak benar-benar bundar lalu dilakukan pengukuran diameter tubulus seminiferus dan tebal epitel tubulus seminiferus (Sarno, 2000).

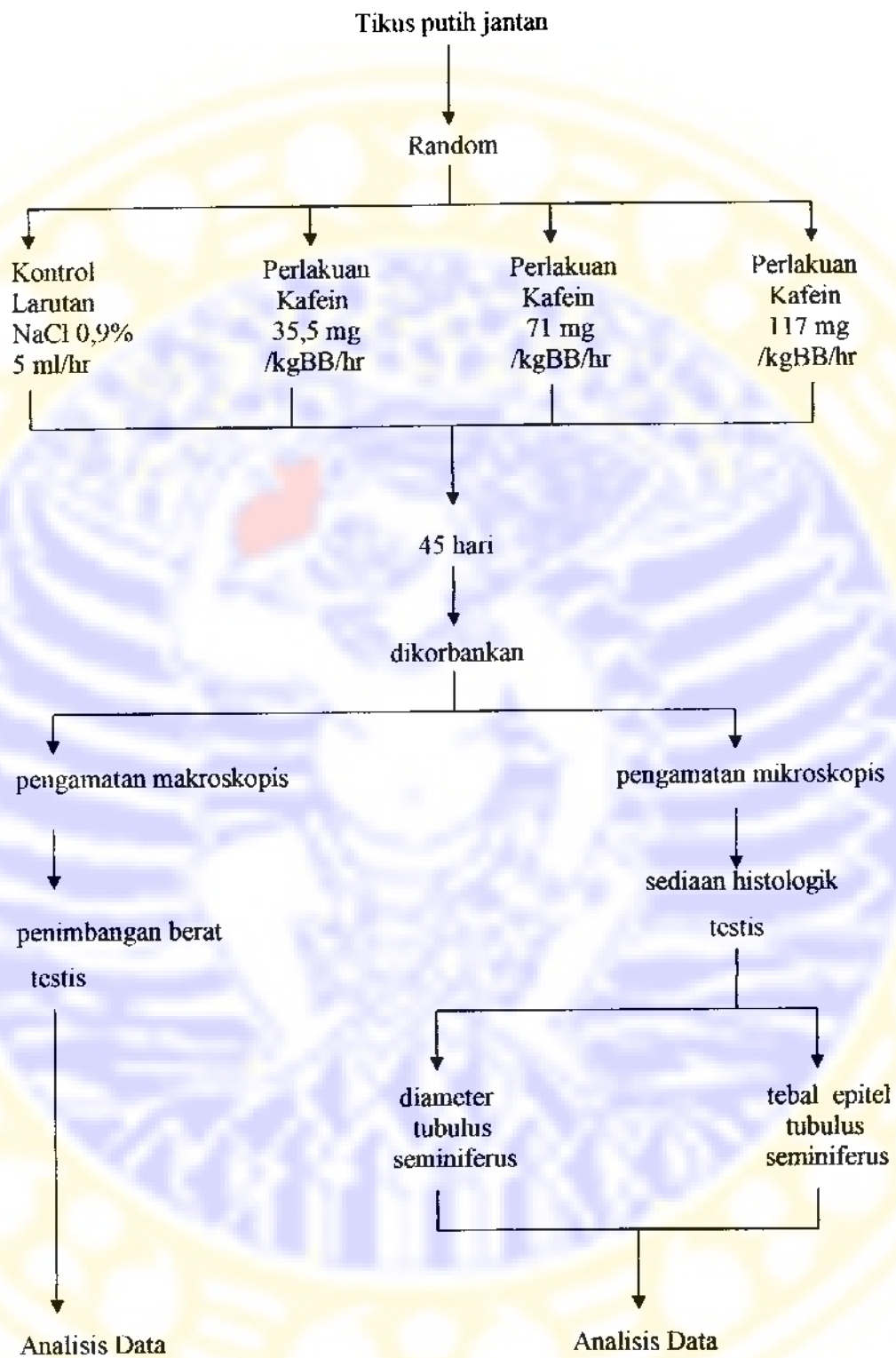
Pengukuran diameter tubulus seminiferus dan tebal epitel tubulus seminiferus dilakukan dengan gratikulae menurut Weissbach dan Bach (1978) yaitu dengan mengukur jarak terdekat antara 2 titik yang berseberangan pada garis tengahnya, dimana titik-titik tersebut berada pada batas antara membran basalis dan sel-sel spermatogenik. Pengukuran tebal epitel tubulus seminiferus juga dimulai dari titik itu sampai ke permukaan lumen (Witono, 1998)

#### 4.7 Rancangan Analisis Data

Data yang diperoleh dari penelitian ini akan dianalisa secara statistik dengan Analisis Varian atau Anova (Zainuddin, 2000).

Bila diketahui terdapat perbedaan antara kelompok perlakuan dan kontrol, maka dilanjutkan dengan uji LSD (*Least Significant Difference*) atau BNT (Beda Nyata Terkecil).

#### 4.8 Kerangka Operasional Penelitian





**BAB 5****DATA PENELITIAN DAN ANALISIS DATA PENELITIAN**

Pada penelitian ini dilakukan dengan memberikan perlakuan terhadap 36 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus strain Wistar*) jantan yang dibagi menjadi 4 kelompok secara random dan setiap kelompok sudah terdapat 1 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus strain Wistar*) jantan sebagai cadangan jika ada yang mati selama masa perlakuan. Adapun pemberian dosis kafein berdasarkan LD<sub>50</sub> kafein untuk tikus jantan yaitu 355 mg/kgBB/peroral. Pemberian dosis kafein perkelompok yaitu 35,5 mg/kgBB/hr peroral, 71 mg/kgBB/hr peroral dan 117 mg/kgBB/hr peroral dibandingkan dengan kelompok kontrol yang diberikan bahan pelarut kafein berupa larutan NaCl 0,9% 5 mL/hr peroral.

Setelah diberikan perlakuan pada ke-empat kelompok, maka 36 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus strain Wistar*) jantan dikorbankan lalu diambil testisnya dan dilakukan penimbangan. Sesudah penimbangan, testis tersebut dibuat menjadi sediaan histologik. Dari sediaan histologik testis dilakukan pengamatan terhadap diameter dan tebal epitel tubulus seminiferus, menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran okuler 10x dan pembesaran objektif 10x. Pengukuran dilakukan dengan menggunakan gratikulac garis dan gratikulae garis ini ada 2 macam yaitu gratikulae garis okuler yang tidak memiliki satuan ukuran dan gratikulae garis objektif yang memiliki satuan ukuran 0,01 mm untuk jarak antara 2 garis strip.

Pengukuran diameter dan tebal epitel tubulus seminiferus testis tikus putih (*Rattus norvegicus strain Wistar*) menggunakan gratikulae garis okuler. Untuk

mengetahui nilai satuan antara 2 garis strip pada gratikulae garis okuler maka dilakukan kalibrasi dengan gratikulae garis objektif. Dari hasil kalibrasi didapatkan 30 garis strip pada gratikulae garis okuler sama dengan 40 garis strip pada gratikulae garis objektif dan jarak antara 2 garis strip pada gratikulae garis objektif nilainya 0,01 mm. Secara matematik untuk mendapatkan nilai satuan untuk jarak 2 garis strip pada gratikulae garis okuler yaitu :

$$30 \times Y = 40 \times 0,01 \text{ mm}$$

$$Y = \frac{40}{30} \times 0,01 \text{ mm}$$

$$Y = 1,33 \times 0,01 \text{ mm}$$

$$Y = 0,0133 \text{ mm}$$

Jadi hasil dari setiap pengukuran dengan gratikulae garis okuler dikalikan 0,0133 mm dan hasil dari perkalian tersebut dikalikan lagi dengan 1000 untuk memperoleh satuan micrometer (micron).

## 5.1 Data Penelitian

Data dari hasil penelitian ini berupa data berat testis (gram); data diameter tubulus seminiferus (micron) dan data tebal epitel tubulus seminiferus (micron) testis tikus putih (*Rattus norvegicus strain Wistar*).

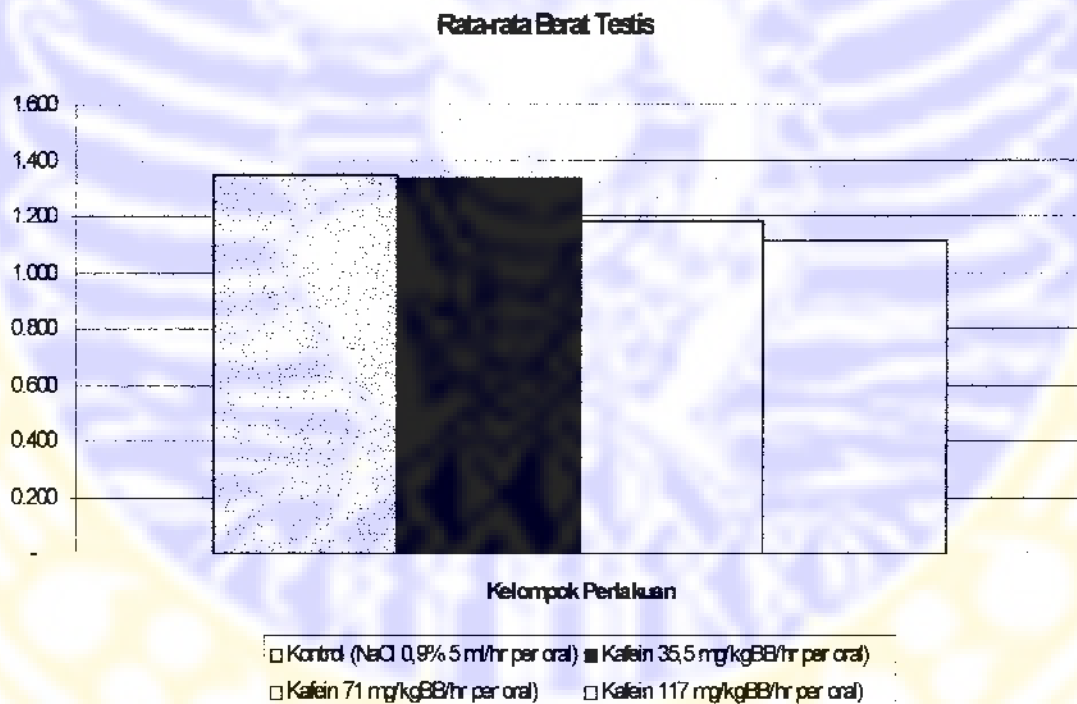
### 5.1.1 Berat testis

Berat testis adalah berat testis yang diambil dari tubuh hewan coba dan telah dibersihkan dari pembungkusnya. Testis hewan coba ditimbang dengan timbangan analitik Librar Shimadzu dalam satuan gram dengan ketelitian 3 angka dibelakang koma.

Data lengkap hasil penimbangan berat testis terdapat pada lampiran 1. Adapun rata-rata (mean) dan simpangan baku (standar deviasi) data hasil penimbangan berat testis diperlihatkan pada tabel 5.1 dan gambar 5.1.

Tabel 5.1 Rata-rata (mean) dan simpangan baku (standar deviasi) berat testis tikus putih (*Rattus norvegicus strain Wistar*) (gram)

Kelompok	Jumlah Pengamatan	Rata-rata (mean) dan Simpangan Baku (SD)
Kontrol NaCl 0,9% 5 mL/hr peroral	8	1,34562 ± 0,09641
Kafein 35,5 mg/kgBB/hr peroral	8	1,33138 ± 0,06084
Kafein 71 mg/kgBB/hr peroral	8	1,18287 ± 0,19272
Kafein 117 mg/kgBB/hr peroral	8	1,11263 ± 0,06120



Gambar 5.1 Diagram batang rata-rata (mean) berat testis tikus putih (*Rattus norvegicus strain Wistar*) (gram)

Dari hasil penimbangan berat testis tikus putih (*Rattus norvegicus strain Wistar*) didapatkan penurunan rata-rata berat testis pada kelompok pemberian kafein 35,5 mg/kgBB/hr peroral, kelompok pemberian kafein 71 mg/kgBB/hr peroral dan kelompok pemberian kafein 117 mg/kgBB/hr peroral jika dibandingkan dengan kelompok kontrol pemberian larutan NaCL 0,9% 5 mL/hr peroral. Penurunan rata-rata berat testis sesuai dengan peningkatan pemberian dosis kafein, artinya semakin besar dosis kafein yang diberikan maka semakin menurun rata-rata berat testis.

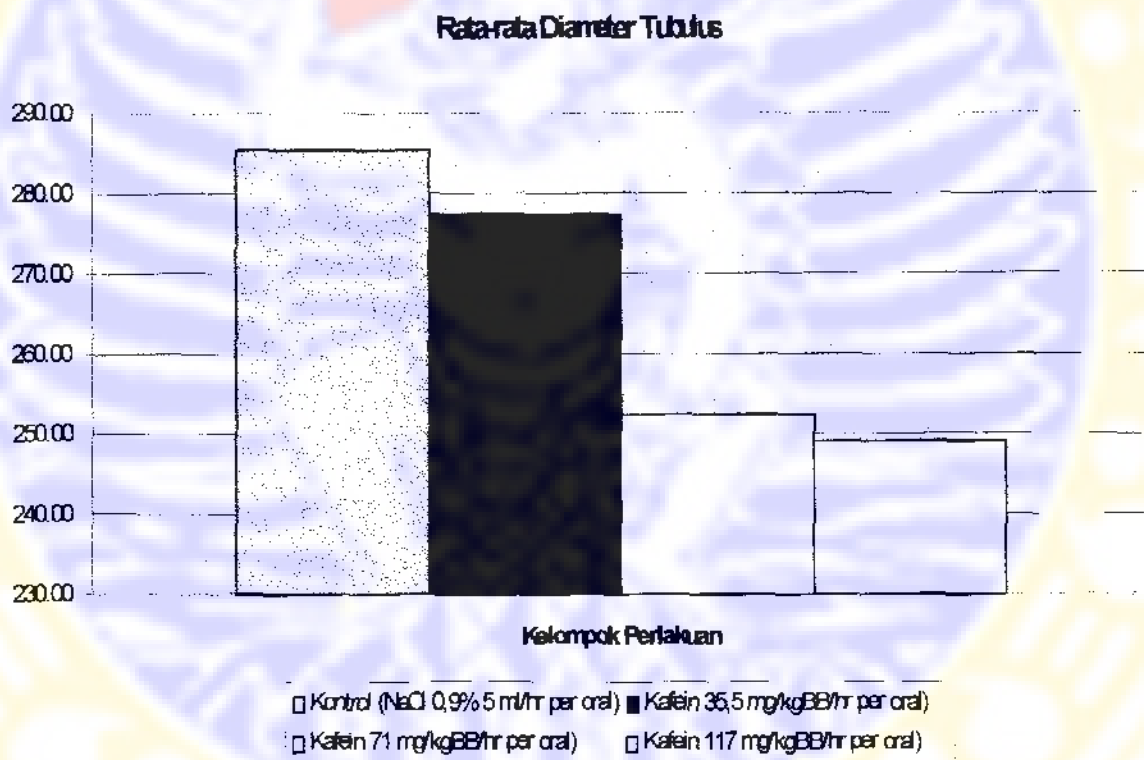
### 5.1.2 Diameter tubulus seminiferus

Pengukuran diameter tubulus seminiferus dilakukan dengan menggunakan alat ukur gratikulae garis dalam satuan micron dan pengukuran dilakukan pada tubulus seminiferus yang penampangnya melintangnya tampak benar-benar bundar. Cara pengukuran menurut Weissbach dan Bach yaitu dengan mengukur jarak terdekat antara 2 titik yang berseberangan pada garis tengahnya, dimana titik-titik tersebut berada pada batas antara membran basalis dan sel-sel spermatogenik.

Data lengkap hasil pengukuran diameter tubulus seminiferus terdapat pada lampiran 2. Adapun rata-rata (mean) dan simpangan baku (standar deviasi) data hasil pengukuran diameter tubulus seminiferus diperlihatkan pada tabel 5.2 dan gambar 5.2.

Tabel 5.2 Rata-rata (mean) dan simpangan baku (standar deviasi) diameter tubulus seminiferus testis tikus putih (*Rattus norvegicus strain Wistar*) (micron)

Kelompok	Jumlah Pengamatan	Rata-rata (mean) dan Simpangan Baku (SD)
Kontrol NaCl 0,9% 5 mL/hr peroral	8	285,38 ± 11,66
Kafein 35,5 mg/kgBB/hr peroral	8	277,38 ± 4,75
Kafein 71 mg/kgBB/hr peroral	8	252,50 ± 9,46
Kafein 117 mg/kgBB/hr peroral	8	249,00 ± 7,03



Gambar 5.2 Diagram batang rata-rata (mean) diameter tubulus seminiferus testis tikus putih (*Rattus norvegicus strain Wistar*) (micron)

Dari hasil pengukuran diameter tubulus seminiferus testis tikus putih (*Rattus norvegicus strain Wistar*) didapatkan penurunan rata-rata diameter tubulus seminiferus pada kelompok pemberian kafein 35,5 mg/kgBB/hr peroral, kelompok pemberian kafein 71 mg/kgBB/hr peroral dan kelompok pemberian kafein 117 mg/kgBB/hr peroral jika dibandingkan dengan kelompok kontrol pemberian larutan NaCl 0,9% 5 mL/hr peroral. Penurunan rata-rata diameter tubulus seminiferus sesuai dengan peningkatan pemberian dosis kafein, artinya semakin besar dosis kafein yang diberikan maka semakin menurun rata-rata diameter tubulus seminiferus.

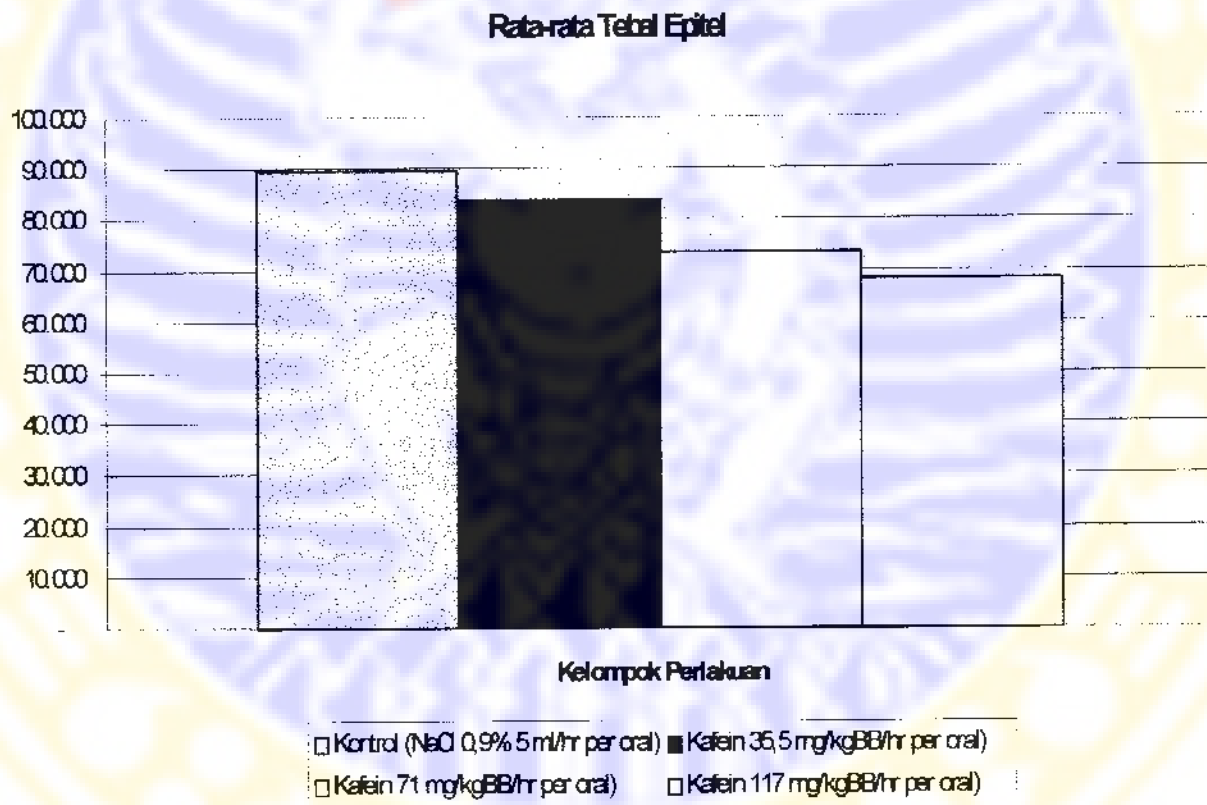
### 5.1.3 Tebal epitel tubulus seminiferus

Pengukuran tebal epitel tubulus seminiferus dilakukan dengan menggunakan alat ukur gratikulae garis dalam satuan micron dan pengukuran dilakukan pada tubulus seminiferus yang penampang melintangnya tampak benar-benar bundar. Cara pengukuran menurut Weissbach dan Bach yaitu pengukuran dimulai dari titik yang berada pada batas antara membran basalis dan sel-sel spermatogenik sampai ke permukaan lumen.

Data lengkap hasil pengukuran tebal epitel tubulus seminiferus terdapat pada lampiran 3. Adapun rata-rata (mean) dan simpangan baku (standar deviasi) data hasil pengukuran tebal epitel tubulus seminiferus diperlihatkan pada tabel 5.3 dan gambar 5.3.

Tabel 5.3 Rata-rata (mean) dan simpangan baku (standar deviasi) tebal epitel tubulus seminiferus testis tikus putih (*Rattus norvegicus strain Wistar*) (micron)

Kelompok	Jumlah Pengamatan	Rata-rata (mean) dan Simpangan Baku (SD)
Kontrol NaCl 0,9% 5 mL/hr peroral	8	89,75 ± 4,53
Kafein 35,5 mg/kgBB/hr peroral	8	83,88 ± 4,26
Kafein 71 mg/kgBB/hr peroral	8	73,38 ± 4,75
Kafein 117 mg/kgBB/hr peroral	8	68,38 ± 2,26



Gambar 5.3 Diagram batang rata-rata (mean) tebal epitel tubulus seminiferus testis tikus putih (*Rattus norvegicus strain Wistar*) (micron)

Dari hasil pengukuran tebal epitel tubulus seminiferus testis tikus putih (*Rattus norvegicus strain Wistar*) didapatkan penurunan rata-rata tebal epitel tubulus seminiferus pada kelompok pemberian kafein 35,5 mg/kgBB/hr peroral, kelompok pemberian kafein 71 mg/kgBB/hr peroral dan kelompok pemberian kafein 117 mg/kgBB/hr peroral jika dibandingkan dengan kelompok kontrol pemberian larutan NaCl 0,9% 5 mL/hr peroral. Penurunan rata-rata tebal epitel tubulus seminiferus sesuai dengan peningkatan pemberian dosis kafein, artinya semakin besar dosis kafein yang diberikan maka semakin menurun rata-rata tebal epitel tubulus seminiferus.

## 5.2 Analisis Data Penelitian

Keseluruhan data berat testis, data diameter tubulus seminiferus dan data tebal epitel tubulus seminiferus dianalisis secara statistik dengan menggunakan analisis varian (Anova) satu arah untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan pengaruh antara kelompok perlakuan yang diberikan kafein dengan dosis 35,5 mg/kgBB/hr peroral, 71 mg/kgBB/hr peroral dan 117 mg/kgBB/hr peroral dibandingkan dengan kelompok kontrol yang diberikan bahan pelarut kafein berupa larutan NaCl 0,9% 5 mL/hr peroral.

Sebelum dilakukan analisis varian, dilakukan uji homogenitas menggunakan *test of homogeneity of variances* untuk menentukan apakah varian kelompok tersebut homogen atau tidak. Jika hasil *test of homogeneity of variances* memiliki nilai *significance level* atau derajat kemaknaan  $> 0,05$  ( $p > 0,05$ ) maka varian kelompok tersebut homogen sehingga dapat dilanjutkan



dengan analisis varian (Anova) dianggap bermakna bila *significance level* atau derajat kemaknaan  $< 0,05$  ( $p < 0,05$ ).

### 5.2.1 Berat testis

Dari tabel 5.1 dan gambar 5.1, diketahui rata-rata berat testis kelompok kontrol lebih berat daripada kelompok perlakuan. Semakin besar dosis kafein yang diberikan maka rata-rata berat testis semakin menurun.

Data berat testis secara lengkap terdapat pada lampiran 4. Dari data tersebut dilakukan *test of homogeneity of variances* yang terdapat pada lampiran 4 dan diperoleh nilai  $p = 0,073$  ( $p > 0,05$ ) sehingga dapat dilanjutkan dengan analisis varian satu arah. Rangkuman hasil analisis varian satu arah diperlihatkan pada tabel 5.4.

Tabel 5.4 Rangkuman hasil analisis varian satu arah berat testis

ANOVA

Berat Testis					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.312	3	.104	7.712	.001
Within Groups	.377	28	1.347E-02		
Total	.689	31			

Dari hasil analisis varian satu arah berat testis diketahui  $p = 0,001$  ( $p < 0,05$ ), berarti terdapat perbedaan berat testis yang bermakna antara kelompok perlakuan dan kelompok kontrol.

Untuk mengetahui pasangan kelompok mana adanya perbedaan berat testis yang bermakna maka dilanjutkan dengan uji LSD = *Least Significant Difference*

(BNT – Beda Nyata Terkecil). Hasil uji LSD berat testis terdapat pada lampiran 5 sedangkan rangkuman hasil uji LSD berat testis diperlihatkan pada tabel 5.5.

Tabel 5.5 Rangkuman hasil uji LSD berat testis pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan

Pasangan Kelompok Penelitian	Kesimpulan
Kel. Kontrol – Kel. Perlakuan 1	Tidak bermakna
Kel. Kontrol – Kel. Perlakuan 2	Bermakna
Kel. Kontrol – Kel. Perlakuan 3	Bermakna
Kel. Perlakuan 1 - Kel. Perlakuan 2	Bermakna
Kel. Perlakuan 1 - Kel. Perlakuan 3	Bermakna
Kel. Perlakuan 2 - Kel. Perlakuan 3	Tidak bermakna

Keterangan :

- kelompok kontrol = pemberian larutan NaCL 0,9% 5 mL/hr peroral.
- kelompok perlakuan 1 = pemberian kafein 35,5 mg/kgBB/hr peroral
- kelompok perlakuan 2 = pemberian kafein 71 mg/kgBB/hr peroral
- kelompok perlakuan 3 = pemberian kafein 117 mg/kgBB/hr peroral

Dari hasil uji LSD berat testis pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan diketahui bahwa pada pasangan kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan 1 tidak terdapat perbedaan berat testis yang bermakna. Demikian juga pada pasangan kelompok perlakuan 2 dengan kelompok perlakuan 3 tidak terdapat perbedaan berat testis yang bermakna sedangkan pasangan kelompok lainnya terdapat perbedaan berat testis yang bermakna.

### 5.2.2 Diameter tubulus seminiferus

Dari tabel 5.2 dan gambar 5.2, diketahui rata-rata diameter tubulus seminiferus kelompok kontrol lebih besar daripada kelompok perlakuan. Semakin besar dosis kafein yang diberikan maka rata-rata diameter tubulus seminiferus semakin menurun.

Data diameter tubulus seminiferus secara lengkap terdapat pada lampiran 6. Dari data tersebut dilakukan *test of homogeneity of variances* yang terdapat pada lampiran 6 dan diperoleh nilai  $p = 0,284$  ( $p > 0,05$ ) sehingga dapat dilanjutkan dengan analisis varian satu arah. Rangkuman hasil analisis varian satu arah diperlihatkan pada tabel 5.6.

Tabel 5.6 Rangkuman hasil analisis varian satu arah diameter tubulus seminiferus

ANOVA

Diameter Tubulus Seminiferus (mikron)

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	7808.125	3	2602.708	35.007	.000
Within Groups	2081.750	28	74.348		
Total	9889.875	31			

Dari hasil analisis varian satu arah diameter tubulus seminiferus diketahui nilai  $p = 0,000$  ( $p < 0,05$ ), berarti terdapat perbedaan diameter tubulus seminiferus yang bermakna antara kelompok perlakuan dan kelompok kontrol.

Untuk mengetahui pasangan kelompok mana adanya perbedaan diameter tubulus seminiferus yang bermakna maka dilanjutkan dengan uji LSD. Hasil uji LSD diameter tubulus seminiferus terdapat pada lampiran 7 sedangkan

rangkuman hasil uji LSD diameter tubulus seminiferus diperlihatkan pada tabel 5.7.

Tabel 5.7 Rangkuman hasil uji LSD diameter tubulus seminiferus pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan

Pasangan Kelompok Penelitian	Kesimpulan
Kel. Kontrol - Kel. Perlakuan 1	Tidak bermakna
Kel. Kontrol - Kel. Perlakuan 2	Bermakna
Kel. Kontrol - Kel. Perlakuan 3	Bermakna
Kel. Perlakuan 1 - Kel. Perlakuan 2	Bermakna
Kel. Perlakuan 1 - Kel. Perlakuan 3	Bermakna
Kel. Perlakuan 2 - Kel. Perlakuan 3	Tidak bermakna

Keterangan :

- kelompok kontrol = pemberian larutan NaCl 0,9% 5 mL/hr peroral.
- kelompok perlakuan 1 = pemberian kafein 35,5 mg/kgBB/hr peroral
- kelompok perlakuan 2 = pemberian kafein 71 mg/kgBB/hr peroral
- kelompok perlakuan 3 = pemberian kafein 117 mg/kgBB/hr peroral

Dari hasil uji LSD diameter tubulus seminiferus pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan diketahui bahwa pada pasangan kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan 1 tidak terdapat perbedaan diameter tubulus seminiferus yang bermakna. Demikian juga pada pasangan kelompok perlakuan 2 dengan kelompok perlakuan 3 tidak terdapat perbedaan diameter tubulus

seminiferus yang bermakna, sedangkan pada pasangan kelompok lainnya terdapat perbedaan diameter tubulus seminiferus yang bermakna.

### 5.2.3 Tebal epitel tubulus seminiferus

Dari tabel 5.3 dan gambar 5.3, diketahui rata-rata tebal epitel tubulus seminiferus kelompok kontrol lebih tebal daripada kelompok perlakuan. Semakin besar dosis kafein yang diberikan maka rata-rata tebal epitel tubulus seminiferus semakin menurun.

Data tebal epitel tubulus seminiferus secara lengkap terdapat pada lampiran 8. Dari data tersebut dilakukan *test of homogeneity of variances* yang terdapat pada lampiran 8 dan diperoleh  $p = 0,485$  ( $p > 0,05$ ) sehingga dapat dilanjutkan dengan analisis varian satu arah. Rangkuman hasil analisis varian satu arah diperlihatkan pada tabel 5.8.

Tabel 5.8 Rangkuman hasil analisis varian satu arah  
tebal epitel tubulus seminiferus

ANOVA

Tebal Epitel Tubulus Seminiferus<sup>2</sup> (mikron)

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2270.094	3	756.698	45.651	.000
Within Groups	464.125	28	16.576		
Total	2734.219	31			

Dari hasil analisis varian satu arah tebal epitel tubulus seminiferus diketahui  $p = 0,000$  ( $p < 0,05$ ), berarti terdapat perbedaan tebal epitel tubulus seminiferus yang bermakna antara kelompok perlakuan dan kelompok kontrol.

Untuk mengetahui pasangan kelompok mana adanya perbedaan tebal epitel tubulus seminiferus yang bermakna maka dilanjutkan dengan uji LSD. Hasil uji LSD tebal epitel tubulus seminiferus terdapat pada lampiran 9, sedangkan rangkuman hasil uji LSD tebal epitel tubulus seminiferus dilihat pada tabel 5.9.

Tabel 5.9 Rangkuman hasil uji LSD tebal epitel tubulus seminiferus pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan.

Pasangan Kelompok Penelitian	Kesimpulan
Kel. Kontrol – Kel. Perlakuan 1	Bermakna
Kel. Kontrol – Kel. Perlakuan 2	Bermakna
Kel. Kontrol – Kel. Perlakuan 3	Bermakna
Kel. Perlakuan 1 - Kel. Perlakuan 2	Bermakna
Kel. Perlakuan 1 - Kel. Perlakuan 3	Bermakna
Kel. Perlakuan 2 - Kel. Perlakuan 3	Bermakna

**Keterangan :**

- kelompok kontrol = pemberian larutan NaCl 0,9% 5 mL/hr peroral.
- kelompok perlakuan 1 = pemberian kafein 35,5 mg/kgBB/hr peroral
- kelompok perlakuan 2 = pemberian kafein 71 mg/kgBB/hr peroral
- kelompok perlakuan 3 = pemberian kafein 117 mg/kgBB/hr peroral

Dari hasil uji LSD tebal epitel tubulus seminiferus pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan diketahui bahwa pada semua pasangan kelompok terdapat perbedaan tebal epitel tubulus seminiferus yang bermakna.

## **BAB 6**

### **PEMBAHASAN**

Sarno (2000) mengatakan bila oleh karena pemberian obat atau zat tertentu yang dapat mempengaruhi spermatogenesis maka akan terjadi perubahan pada saat pembelahan atau perkembangan dari sel epitel germinal sampai menjadi spermatozoa. Perubahan proses spermatogenesis secara mikroskopis atau secara histologi dapat dilihat dari ukuran dan jumlah sel-sel penyusun tubulus seminiferus. Perubahan ini akan mempengaruhi diameter dan tebal epitel tubulus seminiferus. Sedangkan secara makroskopis hal ini dapat juga diketahui dengan adanya perubahan pada berat testis.

#### **6.1 Berat Testis**

Testis merupakan organ genital yang dapat memproduksi spermatozoa dan hormon seks. Di dalam testis terdapat tubulus seminiferus, jaringan ikat dan pembuluh darah. Tubulus seminiferus merupakan bagian penyusun testis yang terbesar. Keadaan ini yang menentukan berat testis, sehingga bila ada kerusakan atau atropi pada sel-sel dalam tubulus seminiferus akan mempengaruhi berat testisnya (Hayati, 1998).

Dari hasil penimbangan berat testis, diperoleh data terjadi penurunan rata-rata berat testis pada kelompok perlakuan jika dibandingkan dengan kelompok kontrol. Penurunan ini sesuai dengan peningkatan pemberian dosis kafein. Semakin besar dosis kafein yang diberikan maka rata-rata berat testis semakin menurun (tabel 5.1 dan gambar 5.1).

Selanjutnya dengan analisis varian satu arah untuk data berat testis diketahui  $p = 0,001$  berarti  $p < 0,05$ , jadi terdapat perbedaan berat testis yang bermakna antara kelompok perlakuan dan kelompok kontrol (tabel 5.4). Ini berarti pemberian kafein secara oral berpengaruh terhadap penurunan berat testis jika dibandingkan dengan kelompok kontrol.

Untuk mengetahui pada pasangan kelompok mana adanya perbedaan berat testis yang bermakna maka dilanjutkan dengan uji LSD. Hasil uji LSD berat testis (lampiran 5 dan tabel 5.5) diketahui pasangan kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan 1, hasilnya tidak bermakna karena  $p = 0,808$  berarti  $p > 0,05$ . Ini menunjukkan bahwa pemberian kafein dengan dosis  $35,5 \text{ mg/kgBB/hr}$  peroral tidak memberikan pengaruh yang bermakna terhadap penurunan berat testis jika dibandingkan dengan kelompok kontrol. Demikian juga pada pasangan kelompok perlakuan 2 dengan kelompok perlakuan 3, hasilnya tidak bermakna karena  $p = 0,236$  berarti  $p > 0,05$ . Ini menunjukkan bahwa pemberian dosis kafein  $117 \text{ mg/kgBB/hr}$  peroral tidak memberikan pengaruh yang bermakna terhadap penurunan berat testis jika dibandingkan dengan pemberian dosis kafein  $71 \text{ mg/kgBB/hr}$  peroral.

Pada pasangan kelompok lainnya, hasil uji LSD berat testis memberikan hasil yang bermakna karena  $p < 0,05$ . Ini berarti pemberian dosis kafein  $71 \text{ mg/kgBB/hr}$  peroral dan  $117 \text{ mg/kgBB/hr}$  peroral memberikan pengaruh yang bermakna terhadap penurunan berat testis jika dibandingkan dengan kelompok kontrol.



## 6.2 Diameter Tubulus Seminiferus

Hasil pengukuran diameter tubulus seminiferus, diperoleh data terjadi penurunan rata-rata diameter tubulus seminiferus pada kelompok perlakuan jika dibandingkan dengan kelompok kontrol. Penurunan ini sesuai dengan peningkatan pemberian dosis kafein. Semakin besar dosis kafein yang diberikan maka rata-rata diameter tubulus seminiferus semakin menurun (tabel 5.2 dan gambar 5.2).

Selanjutnya dengan analisis varian satu arah untuk data diameter tubulus seminiferus diketahui  $p = 0,000$  berarti  $p < 0,05$ , jadi terdapat perbedaan diameter tubulus seminiferus yang bermakna antara kelompok perlakuan dan kelompok kontrol (tabel 5.6). Ini berarti pemberian kafein secara oral berpengaruh terhadap penurunan diameter tubulus seminiferus jika dibandingkan dengan kelompok kontrol.

Untuk mengetahui pada pasangan kelompok mana adanya perbedaan diameter tubulus seminiferus yang bermakna maka dilanjutkan dengan uji LSD. Hasil uji LSD diameter tubulus seminiferus (lampiran 7 dan tabel 5.7) diketahui pasangan kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan 1, hasilnya tidak bermakna karena  $p = 0,074$  berarti  $p > 0,05$ . Ini menunjukkan bahwa pemberian kafein dengan dosis 35,5 mg/kgBB/hr peroral tidak memberikan pengaruh yang bermakna terhadap penurunan diameter tubulus seminiferus jika dibandingkan dengan kelompok kontrol. Demikian juga pada pasangan kelompok perlakuan 2 dengan kelompok perlakuan 3, hasilnya tidak bermakna karena  $p = 0,424$  berarti  $p > 0,05$ . Ini menunjukkan bahwa pemberian dosis kafein 117 mg/kgBB/hr peroral tidak memberikan pengaruh yang bermakna terhadap penurunan diameter tubulus

seminiferus jika dibandingkan dengan pemberian dosis kafein 71 mg/kgBB/hr peroral.

Pada pasangan kelompok lainnya, hasil uji LSD diameter tubulus seminiferus memberikan hasil yang bermakna karena  $p < 0,05$ . Ini berarti pemberian dosis kafein 71 mg/kgBB/hr peroral dan 117 mg/kgBB/hr peroral memberikan pengaruh yang bermakna terhadap penurunan diameter tubulus seminiferus jika dibandingkan dengan kelompok kontrol.

### 6.3 Tebal Epitel Tubulus Seminiferus

Hasil pengukuran tebal epitel tubulus seminiferus, diperoleh data terjadi penurunan rata-rata tebal epitel tubulus seminiferus pada kelompok perlakuan jika dibandingkan dengan kelompok kontrol. Penurunan ini sesuai dengan peningkatan pemberian dosis kafein. Semakin besar dosis kafein yang diberikan maka rata-rata tebal epitel tubulus seminiferus semakin menurun (Tabel 5.3 dan gambar 5.3).

Selanjutnya dengan analisis varian satu arah untuk data tebal epitel tubulus seminiferus diketahui  $p = 0,000$  berarti  $p < 0,05$ , jadi terdapat perbedaan tebal epitel tubulus seminiferus yang bermakna antara kelompok perlakuan dan kelompok kontrol (tabel 5.8). Ini berarti pemberian kafein secara oral berpengaruh terhadap penurunan tebal epitel tubulus seminiferus jika dibandingkan dengan kelompok kontrol.

Untuk mengetahui pada pasangan kelompok mana adanya perbedaan tebal epitel tubulus seminiferus yang bermakna maka dilanjutkan dengan uji LSD. Hasil uji LSD tebal epitel tubulus seminiferus (lampiran 9 dan tabel 5.9) diketahui

semua pasangan kelompok perlakuan memberikan hasil yang bermakna karena  $p < 0,05$ . Ini berarti pemberian dosis kafein 35,5 mg/kgBB/hr peroral, 71 mg/kgBB/hr peroral dan 117 mg/kgBB/hr peroral memberikan pengaruh yang bermakna terhadap penurunan tebal epitel tubulus seminiferus jika dibandingkan dengan kelompok kontrol.

Berdasarkan laporan penelitian diketahui bahwa kafein mempunyai efek mutagenik. Efek ini berhubungan dengan penghambatan proses penyusunan DNA tetapi ini hanya dapat diamati pada penggunaan kafein yang lebih banyak pada makanan dan obat-obatan (Goodman, 1985). Karena itu dapat diasumsikan bahwa kafein mempunyai efek mutagenik yang dapat menghambat penyusunan DNA sehingga mengakibatkan terganggunya pertumbuhan dan perkembangan sel epitel germinal di dalam tubulus seminiferus testis. Akibatnya terjadi kerusakan sel-sel spermatogenik yang menyebabkan kelainan morfologi spermatozoa mencit jantan (Panghiyangan, 2001).

Berpatokan dari penelitian Panghiyangan (2001), ternyata pemberian kafein secara oral tidak hanya menyebabkan kelainan morfologi spermatozoa mencit jantan tetapi dapat juga menyebabkan penurunan berat testis, diameter dan tebal epitel tubulus seminiferus testis tikus putih (*Rattus norvegicus strain Wistar*).

Namun untuk mengetahui apakah benar-benar pemberian kafein menyebabkan terganggunya pertumbuhan dan perkembangan sel epitel germinal di dalam tubulus seminiferus maka diperlukan penelitian lebih lanjut berupa perhitungan jumlah sel-sel spermatogenik yang ada dalam tubulus seminiferus.

Karena untuk mengetahui adanya gangguan dan kerusakan proses spermatogenesis secara histologik dapat diketahui dari diameter dan tebal epitel tubulus seminiferus serta jumlah sel-sel penyusun tubulus seminiferus yang menurun atau berkurang.

## BAB 7

### PENUTUP

#### 7.1 Kesimpulan :

Berdasarkan hasil penelitian ini maka hipotesis penelitian yang diajukan terbukti kebenarannya yaitu :

1. Pemberian kafein secara oral dapat menurunkan berat testis tikus putih (*Rattus norvegicus strain Wistar*), ini terjadi pada dosis 71 mg/kgBB/hr peroral dan 117 mg/kgBB/hr peroral.
2. Pemberian kafein secara oral dapat menurunkan diameter tubulus seminiferus testis tikus putih (*Rattus norvegicus strain Wistar*), ini terjadi pada dosis 71 mg/kgBB/hr peroral dan 117 mg/kgBB/hr peroral.
3. Pemberian kafein secara oral dapat menurunkan tebal epitel tubulus seminiferus testis tikus putih (*Rattus norvegicus strain Wistar*), ini terjadi pada dosis 35,5 mg/kgBB/hr peroral, 71 mg/kgBB/hr peroral dan 117 mg/kgBB/hr peroral.

#### 7.2 Saran :

Guna mendukung keakuratan penelitian ini maka diperlukan penelitian lebih lanjut untuk menghitung jumlah sel-sel spermatogenik dalam tubulus seminiferus testis tikus putih (*Rattus norvegicus strain Wistar*).

## DAFTAR PUSTAKA

- Bloom and Fawcett, 2002. Buku Ajar Histologi. Edisi ke-12. Alih bahasa: Jan Tambayong, Jakarta: EGC, hal 687-730.
- Brooks GA, Fahey TD, 1984. Exercise Physiology: Human Bioenergetics and Its Applications. New York: Macmillan Publishing Company, pp 626-627.
- Craig CR, Stitzel RE, 1986. Modern Pharmacology, 3th ed. Boston : Little Brown and Company, pp 457-460.
- Denadai BS, 1994. Effect of Caffeine on the Metabolism of the Rats Exercising by Swimming. Braz J. Med. Biol. Res, 27(10): 2481-2485.
- Fox EL, Bowers RW, Foss ML, 1993. The Physiological Basis for Exercise and Sport. 15<sup>th</sup> ed. USA: WCB-Brown & Benchmark Publishers, pp 620-621.
- Fox JG, Cohen BJ, Loew FM, 1984. Laboratory Animal Medicine. San Diego: Academic Press Inc, pp 31-44.
- Fox SI, 1999. Human Physiology. 6<sup>th</sup> ed. USA: WCB-McGraw-Hill Company, pp 650-660.
- Ganiswarna SG, 1995. Farmakologi dan Terapi. Edisi ke-4. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia: hal 226-233.
- Ganong WF, 2001. Review of Medical Physiology. 12<sup>th</sup> ed. USA: Mc Graw-Hill Companies Inc, pp 410-419.
- Geneser F, 1994. Buku Teks Histologi. Jilid 2. Alih bahasa : Arifin Wijaya dkk. Jakarta . Binarupa Aksara : hal 310-332.

- Goldberg I, 1994. **Functional Foods: Designer Foods, Pharmafoods, Nutraceuticals.** New York: Macmillan Publishing: Chapman and Hall, pp 131-137.
- Goodman LS dan Gilman A, 1985 **The Pharmacological Basic of Therapeutics.** 7<sup>th</sup> ed. New York : Macmillan Publishing Co.inc, pp 589-601.
- Goodman LS dan Gilman A, 1996 **The Pharmacological. Basic of Therapeutics.** 9<sup>th</sup> ed. New York : McGraw-Hill, pp 571-572, 672-678.
- Gray H, 2002. **Gray's Anatomi: Descriptive and Surgical.** London: Constable and Robinson Ltd, pp 686-696.
- Gridley MF, 1960. **Manual of Histologic and Special Staining Technics,** 2<sup>nd</sup> ed. USA: McGraw-Hill Book Company Inc, pp 132-133.
- Gunawan A, Soelaiman K, 1979. **Spermatozoa Normal.** Dalam (Suhadi K, eds) **Spermatologi.** Surabaya : Perkumpulan Andrologi Indonesia, hal 107-117.
- Guyton AC, Hall JE, 1997. **Buku Ajar Fisiologi Kedokteran.** Edisi ke-9. Alih bahasa: Irawati setiawan dkk. Jakarta :EGC, hal 1265-1282.
- Halim J, 1995. **Atlas Praktikum Histologi.** Cetakan ke-4. Jakarta: EGC, hal 56-61.
- Hamilton EMN, Whitney EN, Sizer FS, 1988. **Nutrition: Concepts and Controversies.** 4<sup>th</sup> ed. St Paul: West Publishing Company, pp 517-519.
- Hayati A, 1998. **Pengaruh Amfetamin terhadap Spermatogenesis dan Fertilitas Tikus Jantan (Rattus norvegicus L.).** Tesis, Program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya.

- Iserson KV, 1990. Caffeine and Nicotine. In (Haddad IM, Winchester JF, eds) Clinical Management of Poisoning and Drug Overdose. 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia : WB Saunders Company, pp 867-871.
- Junqueira LC, Carneiro J dan Kelley RO, 1997. Histologi Dasar. Edisi ke-8. Alih bahasa: Jan Tambayong. Jakarta:EGC, hal 418-433.
- Katzung BC, 1995. Farmakologi Dasar dan Klinik. Edisi 3. Alih bahasa : Binawati HK. Jakarta : EGC, hal 268-270.
- Kusumawati D, 2003. Buku Ajar tentang Hewan Coba. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Surabaya.
- Leeson CR, Leeson TS dan Paparo AA, 1996. Buku Ajar Histologi. Edisi ke-5. Alih bahasa: S. Koesparto Siswojo. Jakarta: EGC, hal 511-530.
- Liben P, 1992. Pengetahuan Teknik Laboratorium. Program Pascasarjana Universitas Airlangga, Surabaya.
- Mocloek N, 1979. Sperma Manusia. Dalam (Subadi K, eds) Spermatologi, Surabaya: Perkumpulan Andrologi Indonesia, hal 118-125.
- Moore KL, Agur AML, 2002. Anatomi Klinis Dasar, Alih bahasa : Hendra Laksman, Jakarta : Hipokrates, hal 90-94.
- Mountcastle VB, 1980. Medical Physiology. 14<sup>th</sup> ed. St Louis: The CV Mosby Company, pp 1624-1633.
- Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW, 2000. Harper's Biochemistry. 25<sup>th</sup> ed. New York: McGraw-Hill, p 378.



- Mutschler E, 1999. *Dinamika Obat*. Edisi ke-5. Penerjemah: Mathilda BW dan Anna SR. Bandung: Penerbit ITB, hal 158-159.
- Nowak TJ, Handford AG, 1999. *Essentials of Pathophysiology: Concepts and Applications for Health Care Professionals*, 2<sup>nd</sup> ed. USA: WCB McGraw-Hill, pp 488-512.
- Panghiyngani R, 2001. Kualitas Spermatozoa Mencit Jantan (*Mus musculus*) Setelah Perlakuan Kafein. *Berkala Kedokteran*, 1(1):31-38.
- Pinger RR, Payne WA, Hahn DB dan Hahn EJ, 1998. *Drugs Issues for Today*. 3<sup>rd</sup> ed. USA: WCB. McGraw-Hill, pp 224-231.
- Rosida L, 2002. *Gambaran Histologis Sel Spermatogenik, Sel Sertoli dan Sel Leydig Setelah Pemberian Ekstrak Akar Pasak Bumi (Eurycoma longifolia jack) Peroral pada Mencit (Mus musculus) Jantan strain Swiss*. Usulan Penelitian, Program Pascasarjana Unair-Surabaya.
- Sarno R, 2000. *Peran Ekstrak Phyllanthus niruri L terhadap Proses Spermatogenesis Mencit (Mus musculus)*. Tesis, Program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya.
- Satmoko, Soeradi, 1995. Studi Kafein terhadap Kualitas Spermatozoa Manusia In-vitro, *Jurnal Kedokteran Yarsi*, 3(1): 46-58.
- Silverthorn DV, Ober WC, Garrison CW, Silverthorn AC, 2001. *Human Physiology on Integrated Approach*. 2<sup>nd</sup> ed. New Jersey : Prentice-Hall, Inc. pp 731-745.

Smith JB, Mangkoewidjojo S, 1988. *Pemeliharaan, Pembiakan dan Penggunaan Hewan Percobaan di Daerah Tropis*. Jakarta : UI-Press, hal. 37-57.

Snell RS, 1997. *Anatomi Klinik untuk Mahasiswa Kedokteran, Bagian I*, edisi ke-3, Alih bahasa : Adji Dharma. Jakarta : EGC, hal 186.

Soeparto P, 2002. *Etik Penelitian*. Universitas Airlangga, Surabaya.

Soeradi O, 1979. *Spermatogenesis dan Pengendalian Hormon*. Dalam (Suhadi K, eds) *Spermatologi*, Surabaya: Perkumpulan Andrologi Indonesia, hal 126-135.

Spiller GA, 1998. *Caffeine*. Boca Raton: CRC Press, pp 1-9, 79-93, 199-203, 213-219, 225-230, 251-283, 357-363.

Strauss RH, 1979. *Sports Medicine and Physiology*. Philadelphia : WB Saunder Company, p 396.

Sudiana IK. *Teknik Praktis untuk Jaringan Sel*. Bali: CV Dharma Shandi, hal 44-56.

Thibodeau GA, Patton KT, 1991. *Structure and Function of the Body*. 9<sup>th</sup> ed. St Louis : Mosby-Year Book Inc, pp 378-386.

Thibodeau GA, Patton KT, 1995. *Anthony's Text Book of Anatomy and Physiology*, 15<sup>th</sup> ed. St Louis : Mosby-Year Book Inc, pp 999-1011.

Thompson M, 20 Juli 1993, 08:13:30 GMT. LD50's for Various Substances. [Marsthom@qedbbs.com](mailto:Marsthom@qedbbs.com)

Tirthaningsih NW, 2002. *Situs Pelvicus, Laboratorium Anatomi-Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Surabaya.*

Vander A, Sherman J, Luciano D, 2001. *Human Physiology: The Mechanism of Body Function, New York: McGraw-Hill, pp 639-649.*

Witono RP, 1998. *Pengaruh Bahan Sterol dalam Biji Lamtoro gung (Leucaena leucocephala) terhadap Sel-sel Spermatogenik Testis Tikus Putih (Rattus norvegicus strain Wistar). Proposal, Program Pascasarjana Unair.*

Wonodirekso S, 2003. *Penuntun Praktikum Histologi. Bagian Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta: Dian Rakyat.*

Zainuddin M, 2000. *Metodologi Penelitian. Universitas Airlangga, Surabaya.*

## Lampiran 1

**Berat Testis Tikus Putih (gram)**

Kelompok Sampel	Kontrol NaCl 0,9% 5 ml/hr peroral	Kafein 35,5 mg/kgBB/ hr peroral	Kafein 71 mg/kgBB/ hr peroral	Kafein 117 mg/kgBB/ hr peroral
A	1,526	1,298	1,240	1,107
B	1,281	1,368	1,324	1,137
C	1,220	1,264	1,270	1,128
D	1,336	1,334	1,310	1,000
E	1,338	1,426	1,211	1,055
F	1,354	1,327	1,286	1,112
G	1,433	1,248	1,075	1,182
H	1,277	1,386	0,747	1,180

## Lampiran 2

**Diameter Tubulus Seminiferus (micron) untuk Kelompok Kontrol**  
**(larutan NaCl 0,9 % 5 ml/hr peroral)**

S a m p e l	Lapang Pandang										Rata - rata
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
A	279	253	299	293	293	293	299	293	299	299	290
B	313	293	293	279	313	319	313	313	313	326	308
C	299	273	293	279	266	273	259	266	273	273	275
D	266	273	306	306	299	286	299	279	293	273	288
E	259	279	253	286	253	273	273	273	279	279	271
F	273	293	266	259	259	293	273	279	299	286	278
G	293	293	293	273	273	246	266	273	306	306	282
H	286	279	279	266	293	299	293	319	299	293	291

## Lanjutan lampiran 2

**Diameter Tubulus Seminiferus (micron) untuk Kelompok Perlakuan****Dosis Kafein 35,5 mg/kgBB/hr peroral**

S a m p e l	Lapang Pandang										Rata - rata
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
A	259	273	266	279	273	293	286	293	279	286	279
B	293	279	273	299	299	273	273	279	273	266	281
C	286	273	259	279	266	293	279	279	273	273	276
D	293	273	266	286	273	293	286	273	259	299	280
E	299	279	286	279	299	286	266	273	266	306	284
F	273	253	279	273	259	286	286	293	266	286	273
G	273	279	279	259	279	273	266	279	253	246	269
H	279	279	266	279	273	266	293	279	286	273	277

## Lanjutan lampiran 2

**Diameter Tubulus Seminiferus (micron) untuk Kelompok Perlakuan****Dosis Kafein 71 mg/kgBB/hr peroral**

S a m p e l	Lapang Pandang										Rata - rata
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
A	253	253	233	239	226	233	220	233	246	246	238
B	253	253	259	253	239	259	279	253	259	253	256
C	273	279	253	266	253	239	253	246	239	226	253
D	253	259	253	246	239	233	253	259	259	239	249
E	253	279	266	286	286	273	273	266	273	266	272
F	246	246	239	253	259	266	259	246	239	259	251
G	246	239	233	259	259	266	246	239	253	259	250
H	266	239	253	253	239	239	253	253	266	253	251

## Lanjutan lampiran 2

**Diameter Tubulus Seminiferus (micron) untuk Kelompok Pertakuan****Dosis Kafein 117 mg/kgBB/hr peroral**

S a m p e l	Lapang Pandang										Rata - rata
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
A	239	246	246	233	266	266	266	246	246	226	248
B	233	239	253	239	239	239	253	253	266	266	248
C	246	246	253	246	246	266	233	246	259	239	248
D	266	253	266	259	246	239	246	226	239	246	249
E	220	253	246	213	246	220	226	253	233	239	235
F	266	259	266	266	259	259	266	266	246	246	260
G	253	253	246	259	239	246	253	246	246	259	250
H	266	266	233	246	259	266	253	253	239	259	254



## Lampiran 3

**Tebal Epitel Tubulus Seminiferus (micron) untuk Kelompok Kontrol**  
**(larutan NaCl 0,9 % 5 ml/hr peroral)**

S a m p e l	Lapang Pandang										Rata - rata
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
A	100	80	103	103	83	90	90	83	100	100	93
B	77	80	80	90	87	93	83	73	90	80	83
C	70	73	87	83	87	80	83	87	93	96	84
D	83	96	77	83	83	96	83	90	93	93	88
E	93	85	90	100	103	83	73	85	80	96	89
F	90	100	96	90	80	103	93	103	106	93	95
G	93	80	93	103	90	80	96	103	90	96	92
H	103	103	80	100	96	83	100	80	103	96	94

## Lanjutan lampiran 3

**Tebal Epitel Tubulus Seminiferus (micron) untuk Kelompok Perlakuan****Dosis Kafein 35,5 mg/kgBB/hr peroral**

S a m p e l	Lapang Pandang										Rata - rata
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
A	90	87	77	90	93	100	87	83	90	80	88
B	103	77	83	90	83	73	77	77	83	96	84
C	100	90	90	85	93	90	90	73	96	90	90
D	77	83	80	103	80	73	90	80	80	100	85
E	77	80	85	85	96	80	83	77	83	85	83
F	77	80	83	83	85	90	80	80	100	85	84
G	70	85	70	80	70	73	67	83	80	77	76
H	80	83	93	80	80	73	80	80	83	77	81

## Lanjutan lampiran 3

**Tebal Epitel Tubulus Seminiferus (micron) untuk Kelompok Perlakuan****Dosis Kafein 71 mg/kgBB/hr peroral**

S a m p e l	Lapang Pandang										Rata - rata
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
A	60	63	63	70	70	67	60	67	57	67	64
B	70	73	80	77	73	70	77	77	70	73	74
C	77	67	70	77	80	80	63	70	73	73	73
D	77	77	77	73	73	70	67	70	67	70	72
E	73	83	73	96	83	80	80	80	70	80	80
F	77	70	73	77	70	67	77	67	70	70	72
G	80	77	70	77	77	77	80	77	80	80	78
H	73	63	77	80	67	67	80	80	73	80	74

## Lanjutan lampiran 3

**Tebal Epitel Tubulus Seminiferus (micron) untuk Kelompok Perlakuan****Dosis Kafein 117 mg/kgBB/hr peroral**

S a m p e l	Lapang Pandang										Rata - rata
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
A	73	67	80	70	67	80	77	73	70	63	72
B	63	77	67	67	73	70	67	67	70	70	69
C	67	63	73	63	67	67	70	63	70	63	67
D	60	67	67	67	70	63	70	67	63	67	66
E	67	73	67	63	70	63	67	80	63	73	69
F	67	70	67	67	70	70	70	73	70	70	69
G	70	80	80	67	63	70	70	73	63	67	70
H	67	63	73	70	67	67	60	60	60	67	65

## Lampiran 4

## Analisis Berat Testis

## Descriptives

## Berat Testis

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Kontrol (NaCl 0,9% 5 ml/hr per oral)	8	1.34562	9.641E-02	3.41E-02	1.26503	1.42622	1.220	1.526
Kafein 35,5 mg/kgBB/hr per oral	8	1.33138	6.084E-02	2.15E-02	1.28051	1.38224	1.248	1.428
Kafein 71 mg/kgBB/hr per oral	8	1.18287	.19272	6.81E-02	1.02176	1.34399	.747	1.324
Kafein 117 mg/kgBB/hr per oral	8	1.11283	6.120E-02	2.16E-02	1.06146	1.16379	1.000	1.182
Total	32	1.24313	.14906	2.64E-02	1.18938	1.29687	.747	1.526

## Test of Homogeneity of Variances

## Berat Testis

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.590	3	28	.073

## ANOVA

## Berat Testis

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.312	3	.104	7.712	.001
Within Groups	.377	28	1.347E-02		
Total	.689	31			

## Lampiran 5

## Uji LSD Berat Testis

## Post Hoc Tests

## Multiple Comparisons

Dependent Variable: Berat Testis  
LSD

(I) Kelompok Perlakuan	(J) Kelompok Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol (NaCl 0,9% 5 ml/hr per oral)	Kafein 35,5 mg/kgBB/hr per oral	1.4250E-02	5.80E-02	.808	-.10462	.13312
	Kafein 71 mg/kgBB/hr per oral	.16275*	5.80E-02	.009	4.39E-02	.28162
	Kafein 117 mg/kgBB/hr per oral	.23300*	5.80E-02	.000	.11413	.35187
Kafein 35,5 mg/kgBB/hr per oral	Kontrol (NaCl 0,9% 5 ml/hr per oral)	-1.425E-02	5.80E-02	.808	-.13312	.10462
	Kafein 71 mg/kgBB/hr per oral	.14850*	5.80E-02	.016	2.96E-02	.26737
	Kafein 117 mg/kgBB/hr per oral	.21875*	5.80E-02	.001	9.99E-02	.33762
Kafein 71 mg/kgBB/hr per oral	Kontrol (NaCl 0,9% 5 ml/hr per oral)	-.16275*	5.80E-02	.009	-.28162	-.439E-02
	Kafein 35,5 mg/kgBB/hr per oral	-.14850*	5.80E-02	.016	-.26737	-.296E-02
	Kafein 117 mg/kgBB/hr per oral	7.0250E-02	5.80E-02	.236	-.49E-02	.18912
Kafein 117 mg/kgBB/hr per oral	Kontrol (NaCl 0,9% 5 ml/hr per oral)	-.23300*	5.80E-02	.000	-.35187	-.11413
	Kafein 35,5 mg/kgBB/hr per oral	-.21875*	5.80E-02	.001	-.33762	-.999E-02
	Kafein 71 mg/kgBB/hr per oral	-7.025E-02	5.80E-02	.236	-.18912	4.862E-02

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

## Lampiran 6

## Analisis Diameter Tubulus Seminiferus

## Oneway

## Descriptives

Diameter Tubulus Seminiferus (mikron)

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Kontrol (NaCl 0,9% 5 ml/hr per oral)	8	285.38	11.66	4.12	275.63	295.12	271	308
Kafein 35,5 mg/kgBB/hr per oral	8	277.38	4.75	1.68	273.40	281.35	269	284
Kafein 71 mg/kgBB/hr per oral	8	252.50	9.46	3.34	244.59	260.41	238	272
Kafein 117 mg/kgBB/hr per oral	8	249.00	7.03	2.49	243.12	254.88	235	260
Total	32	266.06	17.86	3.16	259.62	272.50	235	308

## Test of Homogeneity of Variances

Diameter Tubulus Seminiferus (mikron)

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.332	3	28	.284

## ANOVA

Diameter Tubulus Seminiferus (mikron)

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	7808.125	3	2602.708	35.007	.000
Within Groups	2081.750	28	74.348		
Total	9889.675	31			

## Lampiran 7

## Uji LSD Diameter Tubulus Seminiferus

## Post Hoc Tests

## Multiple Comparisons

Dependent Variable: Diameter Tubulus Seminiferus (mikron)

LSD

(I) Kelompok Perlakuan	(J) Kelompok Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol (NaCl 0,9% 5 ml/hr per oral)	Kafein 35,5 mg/kgBB/hr per oral	8.00	4.31	.074	-.83	16.83
	Kafein 71 mg/kgBB/hr per oral	32.88*	4.31	.000	24.04	41.71
	Kafein 117 mg/kgBB/hr per oral	36.38*	4.31	.000	27.54	45.21
Kafein 35,5 mg/kgBB/hr per oral	Kontrol (NaCl 0,9% 5 ml/hr per oral)	-8.00	4.31	.074	-16.83	83
	Kafein 71 mg/kgBB/hr per oral	24.88*	4.31	.000	16.04	33.71
	Kafein 117 mg/kgBB/hr per oral	28.38*	4.31	.000	19.54	37.21
Kafein 71 mg/kgBB/hr per oral	Kontrol (NaCl 0,9% 5 ml/hr per oral)	-32.88*	4.31	.000	-41.71	-24.04
	Kafein 35,5 mg/kgBB/hr per oral	-24.88*	4.31	.000	-33.71	-16.04
	Kafein 117 mg/kgBB/hr per oral	3.50	4.31	.424	-5.33	12.33
Kafein 117 mg/kgBB/hr per oral	Kontrol (NaCl 0,9% 5 ml/hr per oral)	-36.38*	4.31	.000	-45.21	-27.54
	Kafein 35,5 mg/kgBB/hr per oral	-28.38*	4.31	.000	-37.21	-19.54
	Kafein 71 mg/kgBB/hr per oral	-3.50	4.31	.424	-12.33	5.33

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



## Lampiran 8

**Analisis Tebal Epitel Tubulus Seminiferus****Oneway****Descriptives**

Tebal Epitel Tubulus Seminiferus (mikron)

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Kontrol (NaCl 0,9% 5 ml/hr per oral)	8	89.75	4.53	1.60	85.96	93.54	83	95
Kafein 35,5 mg/kgBB/hr per oral	8	83.88	4.26	1.51	80.32	87.43	78	90
Kafein 71 mg/kgBB/hr per oral	8	73.38	4.75	1.68	69.40	77.35	64	80
Kafein 117 mg/kgBB/hr per oral	8	68.38	2.26	.80	66.48	70.27	65	72
Total	32	78.84	9.39	1.66	75.46	82.23	64	95

**Test of Homogeneity of Variances**

Tebal Epitel Tubulus Seminiferus (mikron)

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.837	3	28	.485

**ANOVA**

Tebal Epitel Tubulus Seminiferus (mikron)

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2270.094	3	756.698	45.651	.000
Within Groups	464.125	28	16.576		
Total	2734.219	31			

## Lampiran 9

## Uji LSD Tebal Epitel Tubulus Seminiferus

## Post Hoc Tests

## Multiple Comparisons

Dependent Variable: Tebal Epitel Tubulus Seminiferus (mikron)

LSD

(I) Kelompok Perlakuan	(J) Kelompok Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol (NaCl 0,9% 5 ml/hr per oral)	Kafein 35,5 mg/kgBB/hr per oral	5.88*	2.04	.007	1.71	10.04
	Kafein 71 mg/kgBB/hr per oral	16.38*	2.04	.000	12.21	20.54
	Kafein 117 mg/kgBB/hr per oral	21.38*	2.04	.000	17.21	25.54
Kafein 35,5 mg/kgBB/hr per oral	Kontrol (NaCl 0,9% 5 ml/hr per oral)	-5.88*	2.04	.007	-10.04	-1.71
	Kafein 71 mg/kgBB/hr per oral	10.50*	2.04	.000	6.33	14.67
	Kafein 117 mg/kgBB/hr per oral	15.50*	2.04	.000	11.33	19.67
Kafein 71 mg/kgBB/hr per oral	Kontrol (NaCl 0,9% 5 ml/hr per oral)	-16.38*	2.04	.000	-20.54	-12.21
	Kafein 35,5 mg/kgBB/hr per oral	-10.50*	2.04	.000	-14.67	-6.33
	Kafein 117 mg/kgBB/hr per oral	5.00*	2.04	.021	.83	9.17
Kafein 117 mg/kgBB/hr per oral	Kontrol (NaCl 0,9% 5 ml/hr per oral)	-21.38*	2.04	.000	-25.54	-17.21
	Kafein 35,5 mg/kgBB/hr per oral	-15.50*	2.04	.000	-19.67	-11.33
	Kafein 71 mg/kgBB/hr per oral	-5.00*	2.04	.021	-9.17	-.83

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

## Lampiran 10

**Foto Kelompok Kontrol (larutan NaCl 0,9 % 5 ml/hr peroral)**

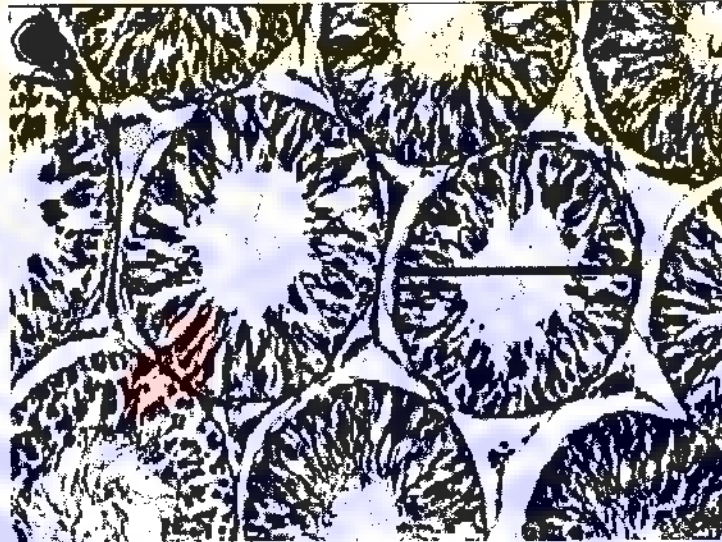
Gambar penampang lintang tubulus seminiferus kelompok kontrol  
(larutan NaCl 0,9 % 5 ml/hr peroral),  
pewarnaan PAS pada pembesaran 100X

Keterangan :

- : Diameter tubulus seminiferus
- : Tebal epitel tubulus seminiferus

## Lampiran 11

**Foto Kelompok Perlakuan  
Dosis Kafein 35,5 mg/kgBB/hr peroral**



Gambar penampang lintang tubulus seminiferus kelompok perlakuan dosis kafein 35,5 mg/kgBB/hr peroral, pewarnaan PAS pada pembesaran 100X

Keterangan :

- : Diameter tubulus seminiferus
- : Tebal epitel tubulus seminiferus

## Lampiran 12

**Foto Kelompok Perlakuan  
Dosis Kafein 71 mg/kgBB/hr peroral**



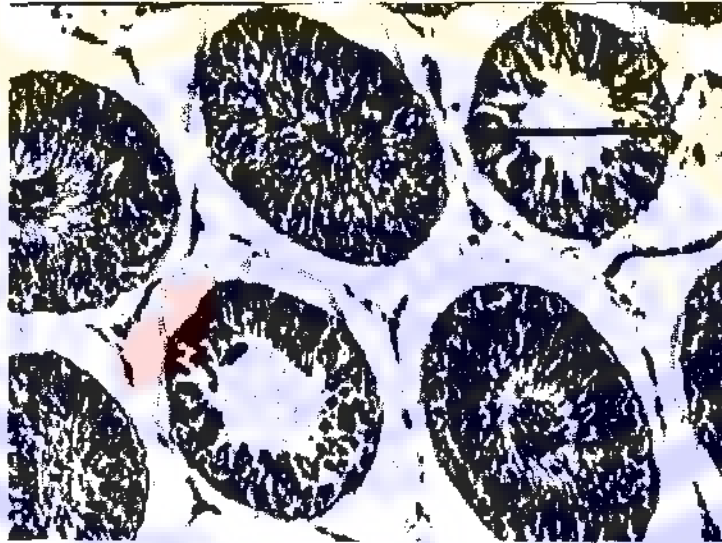
Gambar penampang lintang tubulus seminiferus kelompok perlakuan dosis kafein 71 mg/kgBB/hr peroral, pewarnaan PAS pada pembesaran 100X

Keterangan :

- : Diameter tubulus seminiferus
- : Tebal epitel tubulus seminiferus

## Lampiran 13

**Foto Kelompok Perlakuan  
Dosis Kafein 117 mg/kgBB/hr peroral**



Gambar penampang lintang tubulus seminiferus kelompok perlakuan dosis kafein 117 mg/kgBB/hr peroral, pewarnaan PAS pada pembesaran 100X

Keterangan :

- : Diameter tubulus seminiferus
- : Tebal epitel tubulus seminiferus