

Pengaruh Vitamin C terhadap Perbaikan Spermatogenesis dan Kualitas Spermatozoa Mencit (*Mus musculus* L.) Setelah Pemberian Ekstrak Tembakau (*Nicotiana tabacum* L.)

The effect of vitamin C toward the improvement of spermatogenesis and spermatozoa quality on mice (*Mus musculus* L.) after the addition of tobacco extract (*Nicotiana tabacum* L.)

TITISARI NUGRAHANI, OKID PARAMA ASTIRIN, TETRI WIDIYANI *

Jurusan Biologi FMIPA UNS Surakarta 57126.

* Korespondensi: tetri_w@yahoo.com. Tel./Faks. +6271-663375.

Diterima: 13 Pebruari 2003. Disetujui: 28 Pebruari 2003.

Abstract. The aim of this research was to describe the ability of vitamin C in improving the spermatogenesis and spermatozoa quality of mice after the treatment of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) extract. The framework of the research was that it was already known that vitamin C was one of the anti-oxidant, which was able to counter free radical of the nicotine obtained in tobacco extract in improving the spermatogenesis. The research would be conducted by grouping the mice into 6 groups, and each group consists of 4 repetitions in 35 days. The first group was as control, the second group was treated with C vitamin in the dosage of 0.024 mg/g of body weight, the third group was treated with tobacco extract in the dosage of 0,121 mg/g of body weight, the fourth group was treated with tobacco extract in the dosage of 0,121 mg/g of body weight and C vitamin of 0,012 mg/g of body weight, the fifth group was treated with tobacco extract in the dosage of 0,121 mg/g of body weight and C vitamin of 0,024 mg/g of body weight, and the sixth group was treated with tobacco extract in the dosage of 0,121 mg/g of body weight and C vitamin of 0,036 mg/g of body weight. Based on the data analysis, it can be concluded that tobacco extract treatment could decrease spermatogenesis quality and spermatozoa quality of mice (*Mus musculus* L.). C Vitamin could improve spermatogenesis and spermatozoa quality of mice after tobacco extract treatment. The optimal dosage of C vitamin treatment to improve the spermatogenesis and the quality of spermatozoa after the addition of tobacco extract treatment was 0,024 mg/g of weight.

Keywords: vitamin C, tobacco extract, spermatogenesis, spermatozoa.

PENDAHULUAN

Panati (1989) menyatakan bahwa dua dari setiap sepuluh pasangan suami istri infertil, sedangkan Aesoph (1998) menjelaskan bahwa 10-15% pasangan suami istri infertil. Menurut Aesoph (1998) angka itu akan meningkat karena bertambahnya abortus, meningkatnya penyakit-penyakit kelamin, dan penggunaan IUD yang dapat menyebabkan kerusakan dan infeksi rahim, sehingga mempersulit pembuahan, serta bertambahnya wanita yang menunda kehamilan dan menurunnya kemampuan reproduksi wanita pada pertengahan usia 20-an tahun.

Harapan dan penyembuhan baru bagi pasangan-pasangan yang tidak mempunyai anak merupakan perhatian utama dalam kemajuan-kemajuan medis di bidang seksologi selama tahun 1980-an. Menurut Panati (1989) perawatan ini ditujukan tidak hanya untuk para wanita, tetapi juga para pria, karena diketahui bahwa para suami menyebabkan hampir sepertiga masalah infertilitas. Hal ini disebabkan antara lain sperma terlalu sedikit, sperma tidak dapat mencapai sel telur, dan sperma dengan kepala abnormal, sehingga tidak mampu menembus membran sel telur. Salah satu penyebab infertilitas

tersebut adalah rokok. Pada saat ini ditemukan banyak perokok aktif yang mengabaikan efek negatif dari rokok tersebut. Vicizian (1968) dalam Crenshaw dan Goldberg (1996), menjelaskan bahwa motilitas sperma menurun dari 69% pada non perokok menjadi 57% pada perokok yang mengkonsumsi 10 batang rokok per hari.

Vitamin C dipercaya sebagai salah satu vitamin untuk mencegah penyakit manusia, antara lain asma, penderita alergi, diabetes, dan kolesterol tinggi (Anonim, 1996). Mayes (1997) menjelaskan bahwa konsumsi harian sejumlah 1 gram atau lebih besar telah digunakan oleh beberapa orang sebagai pencegahan terhadap pilek. Argumen utama yang digunakan oleh pelopor vitamin C, yaitu Linus Pauling adalah bahwa 10 mg/hari mencegah scorbut (Amstrong, 1995). Freeman (dalam Amstrong, 1995) menjelaskan bahwa para ahli patologi Inggris menemukan pemakaian 400 mg vitamin C pada 30 pria dan wanita sehat selama 6 minggu dapat melindungi DNA dari kerusakan. Selain itu menurut Aesoph (1998) vitamin C dipercaya dapat meningkatkan kualitas sperma pada perokok. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian yang lebih mendalam untuk mengetahui sejauh mana vitamin C dapat memperbaiki kualitas sperma.

BAHAN DAN METODE

Bahan penelitian

Hewan percobaan. Mencit jantan (*Mus musculus* L.) umur 60-90 hari dengan berat 33,5-43,2 gram sebanyak 24 ekor diperoleh dari Unit Pelayanan Hewan Percobaan (UPHP) UGM Yogyakarta.

Vitamin C. Asam askorbat murni merek Merck dengan berbagai variasi dosis

Ekstraksi tembakau. Daun tembakau (*Nicotiana tabacum* L.) urutan ke 3-5 dari bawah varietas Vorstenlanden umur 4 bulan yang diperoleh dari PTP XIX Klaten, aseton, alkohol, asam asetat, NH_4OH , dan akuades.

Uji kualitas spermatozoa dan pembuatan preparat histologi testis. Kloroform teknis untuk pembuasan, larutan fiksatif bouin, alkohol 70%, alkohol absolut 96%, akuades, pewarna Hematoxylin-Eosin, toluol, xylol, Meyers albumin, Canada Balsem, larutan NaCl 0,9%, pewarna supravital neutral red, dan parafin.

Cara kerja

Persiapan. Sebelum diteliti, mencit diaklimatisasi di laboratorium selama satu minggu untuk menyesuaikan diri dengan lingkungannya.

Preparasi tembakau. Ekstraksi tembakau merujuk metode Harborne (1987) yaitu dengan cara: daun tembakau kering angin yang telah dibuat serbuk diekstraksi dengan asam asetat 10% dalam etanol, kemudian dibiarkan sampai sekurang-kurangnya 24 jam. Lalu ekstrak dipisahkan sampai seperempat volume asal dan alkaloid diendapkan dengan meneteskan NH_4OH pekat. Kemudian endapan dikumpulkan dengan pemusingan, dicuci dengan NH_4OH 1%. Ekstrak dapat dilarutkan dalam akuades.

Tahap perlakuan. Penelitian dilakukan dengan menggunakan mencit jantan umur 60-90 hari sebanyak 24 ekor. Penelitian dibagi dalam 5 kelompok dan kontrol. Setiap kelompok terdiri dari 4 ekor mencit yang diperlakukan secara oral selama 35 hari dengan *canule* masing-masing 1ml per hari.

- I Mencit tanpa perlakuan sebagai kelompok kontrol (0 mg/g bb)
- II Mencit dengan perlakuan vitamin C dosis 0,024 mg/g bb dilarutkan dalam akuades
- III Mencit dengan perlakuan ekstrak tembakau 0,121 mg/g bb dilarutkan dalam akuades
- IV Mencit dengan perlakuan ekstrak tembakau dosis 0,121 mg/g bb dan vitamin C dosis 0,012 mg/g bb dilarutkan dalam akuades
- V Mencit dengan perlakuan ekstrak tembakau dosis 0,121 mg/g bb dan vitamin C dosis 0,024 mg/g bb dilarutkan dalam akuades
- VI Mencit dengan perlakuan ekstrak tembakau dosis 0,121 mg/g bb dan vitamin C dosis 0,036 mg/g bb dilarutkan dalam akuades

Pembuatan preparat histologis testis.

Sebelum pembuatan preparat histologis, testis diambil dengan cara mengambil potongan testis kemudian ditimbang dan dari potongan

tersebut dibuat preparat irisan dengan metode parafin menggunakan pewarna HE menurut Suntoro (1980) dan diamati di bawah mikroskop meliputi penghitungan jumlah sel spermatogonia, spermatosit, spermatid, jumlah lapisan sel epitel serta mengamati morfologi susunan sel-sel spermatogenik tiap tubulus seminiferus.

Pengambilan epididimis. Setelah diperlakukan selama 35 hari, mencit dibedah dan diambil epididimisnya untuk analisis kualitas spermatozoa. Pengambilan epididimis dilakukan dengan mengangkat cauda epididimis, dipotong-potong dan direndam dalam larutan NaCl 0,9% pada suhu 37-40°C untuk memperoleh suspensi sperma.

Pemeriksaan kualitas spermatozoa

Kecepatan gerak spermatozoa. Penentuan kecepatan gerak spermatozoa dengan menggunakan metode Partodihardjo (1982), yaitu dengan alat bantu bilik hitung Haemositometer Neubauer. Ditentukan spermatozoa yang memiliki pergerakan normal (gerak progresif). Dengan menggunakan *stop watch*, ditentukan lama waktu yang diperlukan oleh spermatozoa tersebut untuk bergerak secara lurus menempuh jarak antara 2 sisi bujursangkar kecil. Waktu yang digunakan spermatozoa untuk menempuh jarak tertentu dikonversikan ke dalam mikrometer/detik.

Motilitas spermatozoa. Pemeriksaan motilitas sperma dilakukan dengan cara meneteskan 1 tetes suspensi sperma pada gelas benda, kemudian diperiksa di bawah mikroskop dengan perbesaran 400X. Pada setiap bidang pandang diamati pola pergerakan individual tiap-tiap spermatozoa. Dengan alat bantu hitung (*handcounter*), dari 100 ekor spermatozoa, dihitung persentasenya berdasarkan pola pergerakan masing-masing, terutama gerak progresif.

Viabilitas dan morfologi spermatozoa. Pengamatan dilakukan dengan meneteskan 1 tetes suspensi sperma pada gelas benda lalu ditetesi dengan pewarna *Neutral red* kemudian ditutup dengan gelas penutup, diamati di bawah mikroskop cahaya dalam perbesaran kuat (400X). Dengan alat bantu hitung pada setiap bidang pandang diamati spermatozoa yang hidup dan yang mati, lalu dihitung persentase masing-masing. Untuk mengetahui bentuk-bentuk morfologi spermatozoa yang normal dan abnormal dipergunakan sediaan apus spermatozoa yang sebelumnya dipergunakan dalam pengamatan viabilitas.

Pengamatan morfologi meliputi 2 variabel yaitu: morfologi spermatozoa normal dan abnormal, serta persentasenya. Perhitungan spermatozoa dilakukan dengan mikroskop cahaya perbesaran kuat (400X), diamati bentuk spermatozoa normal, dan bentuk-bentuk abnormalitasnya berdasarkan kategori Hafez (1987), meliputi: abnormalitas primer, sekunder dan aglutinasi spermatozoa.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Spermatogenesis

Pengamatan pengaruh vitamin C terhadap spermatogenesis dengan pemberian ekstrak tembakau

ini dilakukan secara kualitatif dan kuantitatif dengan cara membuat sediaan awetan histologi testis terlebih dahulu. Pengamatan kualitatif yaitu membandingkan struktur histologi tubulus seminiferus testis pada semua perlakuan. Pengamatan kuantitatif dilakukan dengan menghitung jumlah sel spermatogonia, spermatosit primer, spermatid dan lapisan sel.

Tabel 2. Jumlah rata-rata sel spermatogenik mencit per tubulus seminiferus setelah pemberian ekstrak tembakau dan vitamin C selama 35 hari.

Kelompok	Rerata sel			
	Spermatogonia	Spermatosit primer	Spermatid	Lapisan sel
I	42,25 ± 2,16 ^b	31,25 ± 1,48 ^b	75,25 ± 3,56 ^b	5,75 ± 0,43 ^b
II	41,50 ± 2,69 ^b	32,75 ± 1,92 ^b	77,50 ± 2,50 ^b	6,00 ± 0,77 ^b
III	35,75 ± 1,09 ^a	26,50 ± 1,80 ^a	63,50 ± 4,27 ^a	4,50 ± 0,50 ^a
IV	39,25 ± 2,16 ^{ab}	31,25 ± 1,30 ^b	72,75 ± 3,34 ^b	5,50 ± 0,50 ^{ab}
V	41,00 ± 2,00 ^b	32,75 ± 2,86 ^b	75,00 ± 3,08 ^b	6,25 ± 0,86 ^b
VI	41,25 ± 1,48 ^b	32,50 ± 2,29 ^b	74,25 ± 3,56 ^b	6,25 ± 0,86 ^b

Keterangan: huruf yang berbeda di belakang angka menunjukkan beda nyata.

Berat testis

Berat testis dianalisis dengan menimbang testis kanan. Parameter berat organ merupakan indikator yang baik untuk menunjukkan aktivitas pertumbuhan sel dan aktivitas sekresi endokrin. Testis merupakan tempat pembentukan spermatozoa dari sel-sel germinativum primitif (spermatogenesis) dan terdapat sel-sel interstitium Leydig yang mensekresikan testosteron ke dalam darah.

Rata-rata berat testis mencit pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan ditunjukkan pada Tabel 1. Dari Tabel 1 dapat diketahui bahwa terdapat kecenderungan penurunan berat testis setelah perlakuan ekstrak tembakau akan tetapi setelah dilakukan analisis statistik dapat diketahui bahwa penurunan tersebut tidak signifikan. Hal ini berarti ekstrak tembakau mengakibatkan terjadinya atrofi testis meskipun tidak berbeda nyata. Pada kelompok III teramati bahwa perlakuan ekstrak tembakau dosis 0,121 mg/g bb menyebabkan penurunan berat testis sebesar 0,09 gram dibandingkan kelompok kontrol. Penambahan vitamin C tidak mempengaruhi berat testis secara nyata, tetapi terjadi peningkatan berat pada kelompok IV dan V dibanding kelompok III walaupun peningkatannya tidak sebesar kelompok kontrol. Analisis data penelitian diduga bahwa vitamin C berfungsi untuk melindungi testis dari kerusakan, bahkan juga meningkatkan berat testis walaupun tidak nyata seperti yang terlihat pada kelompok II terjadi peningkatan berat dibandingkan kelompok I (kontrol). Defisiensi vitamin atau malnutrisi akan mengakibatkan terganggunya fungsi testis (Turner dan Bagnara, 1988).

Tabel 1. Berat rata-rata testis kanan setelah pemberian ekstrak tembakau dan vitamin C selama 35 hari.

Kelompok	Berat rata-rata testis (gram) + SD
I	0,1546 + 0,015 ^a
II	0,1580 + 0,024 ^a
III	0,1321 + 0,014 ^a
IV	0,1309 + 0,015 ^a
V	0,1457 + 0,063 ^a
VI	0,1370 + 0,012 ^a

Keterangan: huruf yang sama di belakang angka menunjukkan tidak berbeda nyata.

Jumlah lapisan sel

Tabel 2 menunjukkan bahwa kelompok III yaitu perlakuan ekstrak tembakau 0,121 mg/g bb jumlah

lapisan sel mengalami penurunan dibanding kelompok kontrol, sedangkan kelompok perlakuan II, IV, V dan VI tidak mengalami penurunan ataupun peningkatan yang berarti dibandingkan kelompok kontrol, akan tetapi mengalami peningkatan dibandingkan kelompok III. Analisis jumlah lapisan sel diketahui bahwa terdapat perbedaan yang nyata pada taraf 5%. Hal ini berarti bahwa ekstrak tembakau mempengaruhi spermatogenesis mencit khususnya jumlah lapisan sel, sedangkan vitamin C memperbaiki spermatogenesis dengan meningkatkan dan mempertahankan jumlah lapisan sel.

Jumlah spermatogonia

Tabel 2 menunjukkan bahwa kelompok I sebagai kontrol mempunyai rata-rata jumlah spermatogonia terbesar yaitu 42,25, sedangkan kelompok II, IV, V dan VI tidak menunjukkan perbedaan yang berarti, tetapi pada kelompok III mempunyai jumlah sel spermatogonia terkecil yaitu 35,75. Hal ini berarti ekstrak tembakau menurunkan jumlah sel spermatogonia, sedangkan pemberian vitamin C dapat meningkatkan jumlah spermatogonia. Analisis spermatogonia dapat diketahui bahwa terdapat perbedaan yang sangat nyata.

Jumlah spermatosit primer

Pengamatan spermatosit ini dipilih spermatosit primer karena pada tubulus seminiferus spermatosit primer tampak paling besar, dengan sitoplasma banyak, inti besar, dan mengandung benang-benang tipis atau kumpulan kromatin yang kasar, sedangkan spermatosit sekunder sulit dilihat karena umur selnya sangat pendek dan pembelahannya menjadi spermatid berlangsung sangat singkat (Junquiera dkk., 1995).

Tabel 2 menunjukkan bahwa terjadi penurunan jumlah spermatosit primer pada kelompok III dibandingkan kelompok kontrol, kemudian meningkat kembali pada kelompok IV, V dan VI. Uji Anava didapatkan hasil yang berbeda nyata pada taraf 5 %, kemudian dilanjutkan dengan uji BNT dan dapat diketahui bahwa antara kelompok I, II, IV, V, dan VI tidak berbeda nyata. Kelompok III mempunyai jumlah rata-rata spermatosit primer terkecil sebesar 26,5. Hal ini berarti penambahan vitamin C dalam berbagai tingkatan dosis tidak mempengaruhi jumlah sel spermatosit primer secara nyata, tetapi nikotin yang terkandung dalam

ekstrak tembakau berpengaruh terhadap jumlah spermatosit primer.

Jumlah spermatid

Analisis jumlah spermatid dapat diketahui terdapat perbedaan yang sangat nyata antara kelompok perlakuan. Tabel 2 menunjukkan bahwa kelompok II cenderung mengalami peningkatan daripada kelompok I, tetapi pada kelompok III terjadi penurunan yang besar dibanding kelompok I, sedangkan kelompok IV, V, dan VI mempunyai jumlah spermatid yang hampir sama dengan kelompok I.

Analisis data Tabel 2. menunjukkan bahwa nikotin yang terkandung dalam ekstrak tembakau diduga mempengaruhi pembentukan spermatid yaitu cenderung menurunkan jumlah spermatid, dengan cara menghambat pembentukan spermatid, sedangkan dengan adanya penambahan vitamin C 0,024 mg/g bb tanpa ekstrak tembakau akan meningkatkan jumlah spermatid tetapi pada penampakan histologi tubulus seminiferus testis terbentuk spermatozoa yang tidak utuh strukturnya.

Secara keseluruhan hasil analisis spermatogenesis secara kuantitatif yang meliputi jumlah spermatogonia, spermatosit primer dan spermatid membuktikan bahwa pemberian vitamin C dalam beberapa dosis setelah pemberian ekstrak tembakau akan meningkatkan jumlah sel spermatogenik dan mempertahankan nilainya. Apabila tanpa pemberian vitamin C sama sekali seperti pada kelompok III yaitu perlakuan ekstrak tembakau dosis 0,121 mg/g bb mempunyai kualitas spermatogenesis yang terburuk. Menurut Sagi (1994) secara garis besar aktifitas testis dalam kaitannya dengan spermatogenesis dipengaruhi oleh faktor internal dan faktor eksternal. Faktor internal antara lain temperatur tubuh, lokasi testis dan kontrol hipofisis. Faktor eksternal yang mempengaruhi adalah rangsang psikis, dan perubahan-perubahan lingkungan seperti temperatur lingkungan, makanan, zat-zat kimia tertentu, dan kontak-kontak sosial. Dalam hal ini zat kimia yang mempengaruhinya yaitu nikotin yang terkandung dalam ekstrak tembakau. Nikotin tersebut akan mempengaruhi kerja sistem saraf pusat dengan cara menghambat kerja *GnRH* sehingga pembentukan FSH dan LH terhambat. Sementara itu FSH bekerja memacu sel Sertoli untuk menghasilkan *Androgen Binding Protein (ABP)*. FSH tampaknya mengawali proses proliferasi spermatogenesis dan testosteron yang berdifusi dari sel interstitial diperlukan untuk pematang akhir spermatozoa (Guyton, 1991). Dengan terhambatnya pembentukan FSH dan LH maka spermatogenesis berjalan tidak normal. Sedangkan vitamin C sebagai antioksidan akan memperbaiki spermatogenesis mencit setelah pemberian ekstrak tembakau dengan cara melindungi otak dan cairan otak melawan radikal bebas (Spector, 1978, dalam Briggs, 1981) yang mungkin ditimbulkan oleh nikotin sehingga reaksi berantai akan terhenti sehingga sistem saraf pusat akan terlindungi dari

kerusakan dan kelenjar hipofisis akan memproduksi hormon-hormon seperti FSH dan LH dengan normal.

Dari pengamatan secara kualitatif yaitu dengan cara membandingkan struktur histologi tubulus seminiferus testis dapat diketahui bahwa pada kelompok I yaitu kelompok kontrol membrana basalis dan tahapan perkembangan serta susunan sel spermatogeniknya ke arah lumen tubulus tampak jelas, dan padat. Lumennya penuh dengan spermatozoa. Hal ini berarti spermiogenesis berjalan normal.

Pada kelompok II lamina basalis dipenuhi dengan spermatogonia yang tampak jelas, susunan sel spermatogeniknya tampak padat, rapat dan kompak berjajar menuju ke lumen, lapisan selnya tersusun panjang, lumennya sempit dengan spermatozoa yang belum terlihat jelas strukturnya, hal ini kemungkinan karena pembentukan spermatozoa terhambat, walaupun spermatid yang terbentuk sangat banyak.

Kelompok III terjadi kerusakan walaupun spermatogonia tampak jelas berderet di lamina basalis tetapi susunan antar sel-sel spermatogeniknya renggang, tidak rapat, jumlah lapisan sel menuju lumen pendek. Lumen tampak lebar walaupun di dalamnya terdapat sel-sel spermatozoa yang berjumlah sedikit tetapi ekor tampak terpisah dengan kepala, antar tubulus seminiferus saling berlekatan. Hal ini kemungkinan nikotin yang terkandung dalam ekstrak tembakau mempengaruhi spermatogenesis dengan cara nikotin akan merangsang susunan saraf pusat yang memproduksi FSH, sehingga keseimbangan FSH akan terganggu dan mengakibatkan terhambatnya spermatogenesis. Jika proses spermatogenesis terganggu maka spermatozoa yang dihasilkan menjadi tidak sempurna baik jumlah spermatozoa yang dihasilkan, morfologi normal spermatozoa ataupun gangguan fungsi fisiologis spermatozoa yang mengakibatkan terjadinya penurunan kualitas spermatozoa.

Kelompok IV tubulus seminiferus dengan susunan sel spermatogenik yang tampak lebih jelas daripada kelompok III, yaitu mempunyai struktur sel spermatogenik yang rapat, padat dan kompak dengan lumen yang lebih sempit berisi spermatozoa dengan struktur yang terlihat jelas berderet menuju lumen. Sel spermatogonia terlihat berderet di lamina basalis, lapisan selnya lebih tinggi. Terlihat pula sel Leydig yang nampak besar dan jelas kemungkinan terjadi peningkatan aktivitas sel Leydig, maka testosteron yang terbentuk pun semakin besar yang menyebabkan kapasitas spermatozoa dapat berjalan normal akan tetapi tidak diketahui besarnya peningkatan testosteron karena tidak dapat ditentukan aktivitas fungsional sel Leydig secara akurat (Turner dan Bagnara, 1988), sedangkan penelitian yang dilakukan oleh Dawbroski dalam Azwar (2001) mengamati ikan trout bahwa kadar testosteron serum pada perlakuan vitamin C di atas dosis *NRC (National Research Council)* lebih tinggi dibandingkan induk yang menerima pakan dengan dosis vitamin C di bawah rekomendasi *NRC*. Hal ini diduga

penambahan vitamin C dosis 0,012 mg/g bb pada mencit yang diberi perlakuan ekstrak tembakau berfungsi sebagai antioksidan yaitu memperbaiki spermatogenesis

Kelompok V dan VI tubulus seminiferus terlihat hampir sama dengan kelompok IV dan kontrol, susunan sel-sel spermatogeniknya tersusun padat, rapat dan kompak, dengan lumen yang sempit penuh sel spermatozoa. Sel spermatogoninya tampak rapat, spermatisit primernya tampak jelas, sel Leydig tampak berkelompok memadat dan besar begitu pula sel sertoli tampak jelas. Pada kelompok VI lumen terlihat mampat dengan spermatozoa yang tampak jelas struktur kepala dan ekor yang mengarah ke lumen, hal ini berarti semakin tinggi penambahan vitamin C akan meningkatkan aktivitas spermiogenesis.

Kualitas spermatozoa

Kualitas spermatozoa mencit setelah pemberian vitamin C dengan pemberian ekstrak tembakau dapat diketahui dari kecepatan gerak, morfologi, motilitas baik, buruk dan immotil serta viabilitas.

Kecepatan gerak spermatozoa

Analisis kecepatan gerak spermatozoa diperoleh data yang berbeda nyata pada tiap kelompok yang kemudian dilanjutkan dengan uji BNT. Tabel 3 menunjukkan bahwa mulai dari kelompok II sampai dengan kelompok VI terjadi penurunan kecepatan gerak spermatozoa yang signifikan dibanding kelompok I (kontrol), penurunan terbesar pada kelompok III yaitu perlakuan ekstrak tembakau dosis 0,121 mg/g bb. Sedangkan penambahan vitamin C setelah pemberian ekstrak tembakau mengakibatkan peningkatan kecepatan gerak spermatozoa, meskipun peningkatan yang terjadi belum mencapai kelompok kontrol. Hal ini berarti ekstrak tembakau menurunkan kecepatan gerak spermatozoa sebesar 29,8%, sedangkan pemberian vitamin C cenderung meningkatkan kecepatan gerak spermatozoa. Adapun penurunan kecepatan gerak spermatozoa kemungkinan disebabkan oleh nikotin yang terkandung dalam ekstrak tembakau yang akan mengganggu kontraksi fibril-fibril yang berada dalam ekor spermatozoa sehingga gerakan ekor spermatozoa menjadi berkurang maka gerakannya menjadi lebih lambat, sedangkan dengan adanya penambahan vitamin C sebesar 0,024 mg/grbb akan mencegah kerusakan kontraksi fibril-fibril sehingga gerakan ekor spermatozoa tetap normal.

Tabel 3. Rata-rata kecepatan gerak spermatozoa mencit setelah pemberian ekstrak tembakau dan vitamin C selama 35 hari.

Kelompok	Kecepatan gerak ($\mu\text{m}/\text{dt}$) \pm SD
I	188,25 \pm 30,76 ^c
II	176,25 \pm 23,73 ^b
III	132,00 \pm 12,73 ^a
IV	136,00 \pm 13,19 ^a
V	158,50 \pm 24,12 ^{ab}
VI	137,25 \pm 9,96 ^a

Motilitas spermatozoa

Analisis spermatozoa dengan motilitas baik dapat diketahui bahwa tidak terdapat perbedaan nyata antar kelompok perlakuan. Tabel 4 menunjukkan terjadinya penurunan persentase motilitas baik yang terbesar adalah pada kelompok III dibandingkan kelompok kontrol, hal ini diduga disebabkan karena ekstrak tembakau mengandung nikotin yang akan merusak membran tipis sitoplasma di kepala sehingga gerakan spermatozoa menjadi buruk, sedangkan penambahan vitamin C pada mencit dengan perlakuan ekstrak tembakau akan berfungsi sebagai antioksidan dengan cara melindungi membran sitoplasma di kepala sehingga mempertahankan gerakan spermatozoa tetap progresif seperti kelompok kontrol, yang diketahui dari peningkatan persentase motilitas baik pada kelompok IV dan V dibanding kelompok III. Keadaan ini secara otomatis akan meningkatkan atau mempertahankan potensial fertilitas karena adanya perbaikan kualitas spermatozoa.

Tabel 4. Persentase rata-rata motilitas spermatozoa setelah pemberian ekstrak tembakau dan vitamin C selama 35 hari.

Motilitas (%)	Baik \pm SD	Buruk \pm SD	Immotil + SD
I	44,25 \pm 4,01 ^c	28,00 \pm 4,18 ^a	27,75 \pm 3,34 ^a
II	35,75 \pm 3,77 ^{ab}	37,25 \pm 3,27 ^b	27,00 \pm 4,95 ^a
III	34,25 \pm 4,32 ^a	31,50 \pm 4,39 ^{ab}	35,00 \pm 7,28 ^a
IV	38,75 \pm 3,03 ^{abc}	28,75 \pm 3,27 ^a	32,00 \pm 5,00 ^a
V	42,50 \pm 4,39 ^{bc}	29,25 \pm 4,14 ^a	28,25 \pm 2,86 ^a
VI	37,50 \pm 5,89 ^{abc}	34,00 \pm 4,06 ^{ab}	28,50 \pm 3,20 ^a

Keterangan: huruf yang berbeda di belakang angka menunjukkan berbeda nyata, huruf yang sama di belakang angka menunjukkan tidak beda nyata.

Viabilitas spermatozoa

Analisis viabilitas diperoleh data persentase jumlah spermatozoa hidup dan mati, yang dapat dilihat dengan cara membuat preparat apus spermatozoa yang diwarnai *Neutral red*. Persentase spermatozoa yang mati yaitu yang menyerap zat warna ditentukan dengan menghitung dari 100 spermatozoa. Setelah dilakukan pewarnaan dapat dihitung spermatozoa yang hidup dan mati seperti terlihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Persentase rata-rata viabilitas sperma-tozoa setelah pemberian ekstrak tembakau dan vitamin C selama 35 hari.

Viabilitas	Spermatozoa	
	hidup (%)	mati (%)
I	76,75 \pm 2,16 ^c	23,25 \pm 2,16
II	73,25 \pm 2,49 ^{bc}	26,75 \pm 2,38
III	59,50 \pm 5,50 ^a	40,50 \pm 5,50
IV	66,00 \pm 4,18 ^{ab}	34,00 \pm 4,18
V	66,50 \pm 3,64 ^{abc}	33,50 \pm 3,64
VI	72,00 \pm 4,12 ^{bc}	28,00 \pm 4,12

Keterangan: Huruf yang beda di belakang angka menunjukkan berbeda nyata. Huruf yang sama di belakang angka menunjukkan tidak beda nyata.

Persentase jumlah spermatozoa hidup antar perlakuan terdapat perbedaan yang sangat nyata, kelompok kontrol mempunyai jumlah tertinggi, diikuti dengan kelompok II, VI. Kelompok V dan IV tidak berbeda nyata, dibandingkan kelompok kontrol kelompok III mempunyai jumlah spermatozoa hidup terkecil, mungkin disebabkan kepala spermatozoa tidak terlindungi oleh membran sitoplasma yang telah rusak akibat radikal bebas yang mungkin ditimbulkan oleh nikotin yang terkandung dalam ekstrak tembakau, sehingga akan menghisap zat warna.

Morfologi spermatozoa

Morfologi spermatozoa merupakan salah satu faktor penentu fertilitas spermatozoa. Bentuk-bentuk abnormalitas primer spermatozoa di dalam testis karena kesalahan spermatogenesis atau kesalahan spermiogenesis yang disebabkan karena keturunan, penyakit, defisiensi makanan, dan pengaruh-pengaruh lingkungan yang buruk. Spermatozoa yang memiliki abnormalitas morfologik kemungkinannya tidak subur (Salisbury dan Vandemark, 1985).

Morfologi spermatozoa dianalisis secara kualitatif dan kuantitatif, secara kuantitatif yaitu dengan cara dari 100 spermatozoa dihitung morfologi spermatozoa normal dan abnormal, sedangkan secara kualitatif yaitu dengan mengamati spermatozoa abnormal dari masing-masing kelompok perlakuan.

Tabel 6 menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang sangat nyata antar kelompok perlakuan, kelompok III mempunyai persentase morfologi abnormal terbesar yaitu sebesar 78,25 sedangkan kelompok IV, V dan VI mengalami penurunan persentase abnormalitas spermatozoa dibanding kelompok III. Dari Tabel 6 dapat dilihat bahwa semakin besar pemberian vitamin C setelah pemberian ekstrak tembakau akan memperkecil abnormalitas spermatozoa.

Tabel 6. Persentase rata-rata abnormalitas spermatozoa setelah pemberian ekstrak tembakau dan vitamin C selama 35 hari.

Abnor- malitas	Spermatozoa	
	normal (%) + SD	abnormal (%) + SD
I	54,50 ± 2,87 ^c	45,50 ± 2,87 ^a
II	33,25 ± 3,02 ^b	66,75 ± 3,03 ^c
III	21,75 ± 2,38 ^a	78,25 ± 2,38 ^d
IV	30,75 ± 2,48 ^b	69,25 ± 2,48 ^c
V	37,50 ± 4,33 ^b	62,50 ± 3,84 ^b
VI	39,25 ± 3,11 ^b	60,75 ± 3,11 ^b

Keterangan: huruf yang beda di belakang angka menunjukkan berbeda nyata. Huruf yang sama di belakang angka menunjukkan tidak beda nyata.

Spermatozoa normal memiliki kepala, leher, badan dan ekor. Kepala spermatozoa menciit berbentuk kait dan mempunyai panjang ± 0,008 mm, adapun panjang keseluruhannya adalah ± 0,1226 mm (Rugh, 1968). Abnormalitas dapat terjadi pada kepala, leher, badan, ekor atau

kombinasi pada bagian-bagian tersebut. Abnormalitas pada kepala meliputi kepala kembar, pipih, atau berbentuk buah "pear" bulat, mengerut, membesar, menyempit, memanjang, dan kepala kecil, pada leher terdiri atas leher patah dan bengkok, pada badan antara lain bengkok, patah, pendek membesar, filiform ganda, dan seperti benang, sedang pada ekor meliputi melingkar ganda, patah, menggelung, dan keriting (Salisbury dan Vandemark, 1985). Abnormalitas pada kelompok perlakuan vitamin C dan ekstrak tembakau dapat diketahui dari Tabel 7.

Analisis kualitas spermatozoa yang meliputi motilitas, viabilitas, dan kecepatan gerak menunjukkan bahwa kelompok III dengan perlakuan ekstrak tembakau dosis 0,121 mg/g bb merupakan spermatozoa dengan kualitas terburuk. Hal ini disebabkan karena tembakau mengandung nikotin, yang akan membentuk radikal bebas sehingga akan merusak membran sel spermatozoa dan menyebabkan gangguan gerak sperma sehingga lebih sulit untuk membuahi sel telur. Sedangkan pada kelompok V dan VI kualitas spermatozoa mendekati kelompok kontrol, jadi seiring dengan peningkatan penambahan vitamin C, maka abnormalitas spermatozoa menciit dapat dikurangi. Hal ini mungkin karena vitamin C sebagai antioksidan berfungsi untuk menanggulangi radikal bebas, sehingga membran sel spermatozoa akan tetap terlindungi.

Tabel 7. Abnormalitas spermatozoa menciit setelah pemberian ekstrak tembakau dan vitamin C selama 35 hari.

Bagian	Jenis abnormalitas	Kelompok
KEPALA	Macrocephalic	II, VI
	Microcephalic	III
	Kepala bulat	II, III, V
	Kepala salah bentuk	II, III, IV, V, VI
LEHER	Leher melekok	II, III, V
	Leher dan badan melekok	II, III, IV
	Penebalan leher	III
BADAN	Badan melipat	IV, V
	Badan melekok	III, V, VI
	Badan dan ekor melengkung	II, IV, V, VI
EKOR	Ekor keriting	II, III, IV, VI
	Ekor berganda	IV
	Ekor melipat	III, IV, VI

Secara keseluruhan dapat dikatakan bahwa penambahan vitamin C memperbaiki spermatogenesis dan kualitas spermatozoa. Hal ini menunjukkan bahwa vitamin C sebagai antioksidan berpengaruh positif dalam memelihara struktur dan perkembangan, serta fungsi sel-sel spermatogenesis, sehingga dengan adanya zat aktif tersebut maka jumlah sel-sel benih yang mengalami kegagalan perkembangan, degenerasi, kematian akibat radikal bebas dapat ditekan atau dikurangi.

KESIMPULAN

Ekstrak tembakau (*Nicotiana tabacum* L.) menurunkan kualitas spermatogenesis mencit (*Mus musculus* L.) yang meliputi jumlah sel spermatogonia, spermatosit primer, spermatid, dan lapisan sel serta menurunkan kualitas spermatozoa yang meliputi viabilitas dan kecepatan gerak. Penambahan vitamin C dapat memperbaiki spermatogenesis dan kualitas spermatozoa mencit setelah pemberian ekstrak tembakau. Dosis optimal vitamin C untuk memperbaiki spermatogenesis dan kualitas spermatozoa mencit adalah sebesar 0,024 mg/g bb.

DAFTAR PUSTAKA

- Aesoph, ND. 1998. *Coping with Male Infertility*. www.Health World Online.com. [26 Januari 2002].
- Amstrong, Fb. 1995. *Buku Ajar Biokimia*. Penerjemah: R.F. Maulany. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Anonim. 1996. *Natural Testosteron Enhancers*. www.smookersvitamins.com/sperm.htm. [4 Januari 2003].
- Azwar, Z.I. 2001. Pengaruh suplementasi askorbil-2-fosfat magnesium sebagai sumber vitamin C dalam ransum terhadap perkembangan gonad dan mutu telur ikan bandeng (**Chanos chanos** F.). *Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia* 7 (2): 40-47.
- Briggs, M. 1981. *Vitamins in Human Biology and Medicine*. Florida: CRC Press.
- Crenshaw, TL and Goldberg, JP. 1996. *Sexual Pharmacology Drug That Affect Sexual Function*. New York: W.W. Norton & Company Inc.
- Guyton, A.C. 1991. *Fisiologi Kedokteran*. Penerjemah: A. Dharma. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Hafez, E.S.E. 1980. *Human Reproduction, Conception, and Contraception*. 2nd edition. Maryland: Harper and Row Publishers, Inc.
- Harborne, J.B. 1987. *Metode Fitokimia*. Bandung: Penerbit ITB.
- Junquiera, L.C., J. Carneiro, and R.O. Kelley, 1995. *Histologi Dasar*. Penerjemah: Tambayong, J. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Mayes, P.A. 1997. *Struktur dan Fungsi Vitamin Larut Air dalam Biokimia Harper*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Panati, C. 1989. *Terobosan dalam Bidang Pengobatan*. Bandung: Penerbit CV. Remadja Karya.
- Partodihardjo, S. 1982. *Ilmu Reproduksi Hewan*. Jakarta: Penerbit Mutiara.
- Rugh, R. 1968. *The Mouse, Its Reproduction and Development*. New York: Burgess Publishing Company.
- Sagi, M. 1994. *Embriologi Vertebrata*. Yogyakarta: UGM Press.
- Salisbury, G.W. dan N.L. Vandemark. 1988. *Fisiologi Reproduksi dan Inseminasi Buatan pada Sapi*. Penerjemah: Djanuar, R.. Yogyakarta: UGM Press.
- Suntoro, H.S. 1980. *Metode Pewarnaan*. Jakarta: Penerbit Bhratara Karya Aksara
- Turner, J. dan M. Bagnara. 1988. *Endokrinologi Umum*. Surabaya: Penerbit Universitas Airlangga.