

PENGARUH NIKOTIN TERHADAP JUMLAH SEL LEYDIG PADA MENCIT (*Mus musculus*)

Iis Rahmawati

Departemen Keperawatan Maternitas dan Anak Program Studi Ilmu Keperawatan Universitas Jember

ABSTRACT

Nicotine which is one of toxic component in cigarette smoke had been reported to inhibit androgen biosynthesis and Leydig cell growth. Cigarette smoking alters plasma testosterone concentrations in men. The effect of cigarette smoke can spoil sperm viability and spermatogenesis. It can cause hormonal condition and trigger the emergence of toxic substance on sperm that it can harm male fertility. The research design employed in this study was Post Test Only Control Group Design. The samples were adult male *Mus musculus*. There were six groups of research subject chosen randomly after homogenization. Three groups were the control group and the other three were the experimental group. The subjects in the experimental group were injected with nicotine subcutaneously for one week, two weeks and three weeks with the same dosage namely 5 mg/kg bodyweight/day. The final observation was aimed at calculating the number of Leydig cell. The result of the one way Anova showed that the cell Leydig had a statistically significant difference on some experimental groups ($p < 0.05$). LSD test showed that there was significant difference between Leydig cells of P3 and K3; P2 and K3; P1 and K3. The conclusion of this research was that nicotine caused a decrease in the number of Leydig cell.

Keywords : nicotine, Leydig cell.

Korespondensi (Correspondence): Jl. Kalimantan No. 37 Kampus Tegal Boto Jember 68111 Jawa Timur

Infertilitas merupakan masalah global yang mempengaruhi lebih dari 80 juta orang di dunia, terjadi sekitar 15% pada pasangan suami-istri. Insiden infertilitas meningkat sejak 40 tahun terakhir.¹ 50% kasus infertil terjadi pada pria baik sebagai problem primer atau kombinasi dengan pasangan wanitanya.² Penyebab kejadian infertil sebesar 40% pada pihak pria dan 40% terdapat pada wanita.³ Menurut Panati (1989) menyatakan bahwa, pihak suami menyebabkan hampir sepertiga masalah infertilitas, hal ini didukung dengan *royal college of obstetricians and gynaecologist (RCOG)* sebagai hasil ESHRE Capri Workshop tahun 2000 yang menyatakan bahwa, analisa sperma merupakan penentu utama diagnosa infertilitas disamping potensi tuba, diagnosis ovulasi, sehingga faktor pembentukan sperma atau spermatogenesis sangat penting dalam mengatasi kasus infertilitas karena keberhasilan proses fertilisasi salah satunya dipengaruhi oleh proses spermatogenesis yang dihasilkan di testis.⁴

Faktor yang menyebabkan infertilitas antara lain hormon, infeksi, radiasi, obat dan bahan kimia baik alami maupun sintetis, yang dapat berinteraksi dengan sistem endokrin, salah satu bahan toksik yang dapat menyebabkan infertilitas adalah rokok. Risiko pria yang merokok mengalami infertilitas 2 kali lebih besar daripada pria yang tidak merokok, disebabkan karena dampak dari asap rokok dapat menyebabkan terganggunya spermatogenesis dalam tubulus seminiferus, merusak viabilitas sperma, menimbulkan gangguan hormonal serta munculnya bahan toksik pada sperma.² Nikotin merupakan komponen utama dari rokok sebesar 50% dan cepat diabsorpsi

melalui saluran pernafasan, mukosa mulut dan kulit.⁵

Sel Leydig terdapat di jaringan interstisial di antara tubulus seminiferus. Fungsinya menghasilkan hormon testosteron. Nikotin terhadap reproduksi pria dapat menyebabkan rendahnya hormon testosteron intratestikular sehingga dapat menginduksi ekspresi protein fas pada sel germinal, seperti yang dinyatakan oleh Nair, R and Chandrima bahwa, penurunan hormon testikular dapat menimbulkan peningkatan ekspresi protein fas, sehingga *deoksiribonuklease (caspase - activated deoxyribonuclease, CAD)* teraktivasi ipada nukleus yang akhirnya menginduksi apoptosis sel germinal yaitu terjadi pada sel-sel spermatogenik dan dapat menyebabkan produksi spermatozoa menjadi menurun. Aktivasi kaspase 3 merupakan jalur eksekutor sebelum terjadi apoptosis, aktivitas kaspase 3 yang lama secara tidak langsung dapat menyebabkan azoospermia dan dapat menimbulkan infertil.^{6,7}

Hasil penelitian menyebutkan nikotin dapat menyebabkan degenerasi sel testikular dan jaringan.^{8,9} Nikotin memiliki efek terhadap hubungan antara jaringan testis dan radikal bebas, radikal bebas menyebabkan sel *injury*¹⁰ dan juga nikotin menyebabkan stres oksidatif di sel germinal,¹¹ nikotin dapat menghambat sel Leydig, sehingga menghambat testosteron. Penelitian Susana et al (2003) bahwa, nikotin yang terdapat dalam asap rokok arus samping 4-6 kali lebih dari asap rokok arus utama, hampir 40% anak dibawah 5 tahun terpapar asap tembakau.¹²

Penelitian terdahulu telah menggambarkan bahwa, pajanan asap rokok dapat menurunkan kualitas dan kuantitas sperma, walaupun berbagai usaha telah dilakukan oleh pihak-pihak yang peduli

terhadap kesehatan lingkungan dari asap rokok, seperti larangan merokok di tempat-tempat umum, instalasi khusus dan lain-lain, bahkan peringatan pemerintah pada kemasan rokok yang menyatakan bahwa, merokok dapat merugikan kesehatan tidak mendapat tanggapan baik dari masyarakat yaitu masih banyaknya jumlah perokok yang dari tahun ke tahun mengalami peningkatan.¹³ Penelitian ini dilakukan untuk mengkaji lebih lanjut tentang pengaruh nikotin yang terdapat dalam asap rokok terhadap jumlah sel Leydig. Penelitian ini merupakan penelitian terapan yang dikerjakan secara eksperimental laboratorik dengan menggunakan hewan coba mencit sebagai model.

BAHAN DAN METODE

Rancangan penelitian ini bersifat eksperimental dengan *Post Test Only Control Group Design*.¹⁴ Subjek penelitian terdiri dari 6 kelompok yang dipilih secara acak dan telah dihomogenkan. Tiga kelompok diberikan placebo sebagai kontrol dan kelompok sisanya diberikan nikotin dengan waktu yang berbeda. Populasi penelitian ini adalah mencit jantan, umur 4 bulan, berat sekitar 20 gram. populasi tersebut dipilih beberapa ekor secara random sebagai sampel penelitian.

Sampel akan ditambahkan sebesar 10% tiap kelompok untuk menghindari kematian sehingga menjadi 7 ekor tiap kelompok, sehingga jumlah hewan coba yang diperlukan secara keseluruhan adalah 42 ekor sampel. Penelitian ini menggunakan preparat histologik testis mencit jantan dengan pengamatan secara mikroskopik, menggunakan mikroskop cahaya, mula-mula digunakan pembesaran 100 X kemudian dilanjutkan dengan pembesaran 200 X. Setiap preparat testis mencit jantan diamati dan dihitung jumlah sel Leydignya.

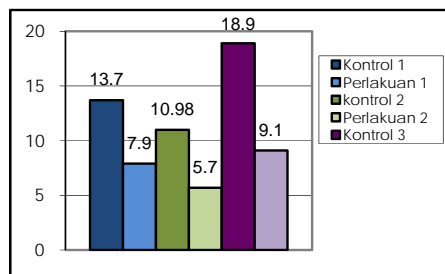
Bahan yang digunakan untuk penelitian ini adalah larutan nikotin dengan kemurnian 97% (*Wako Pure Chemical Industries, Ltd Jepang*). Pemeliharaan mencit dilakukan di Laboratorium *In Vitro* FKH Unair Surabaya. Pemeriksaan sel-sel spermatogenik mencit dan sel Leydig dilakukan di Laboratorium Histopatologi FKH Unair Surabaya. Tahapan yang dilakukan pada penelitian ini diawali dengan persiapan hewan coba, seluruh mencit ditimbang sebelum digunakan sebagai subjek penelitian dan mencit strain BALB/C sebanyak 30 ekor diadaptasikan/ aklimatisasi lebih dahulu selama 1 minggu agar terbiasa hidup dalam lingkungan yang baru, jika terdapat mencit yang sakit, maka dikeluarkan dari kandang, kemudian dipilih secara random menjadi 6 kelompok, masing-masing kelompok beranggotakan 6 ekor diberikan makanan berupa pellet CP 511 diberikan sebanyak 10 g/ekor/hari dan minuman mencit adalah aqua yang diberikan secara *ad libitum*. Perlakuan berupa pemberian nikotin kepada

mencit mulai saat berusia 4 bulan selama 7 hari, 14 hari dan 21 hari. Larutan yang diberikan sebanyak 5 mg/ kg berat badan /hari saat pagi hari melalui injeksi sub kutan sesuai dosis masing-masing perlakuan. Pada usia minggu ke-1, ke-2 dan ke-3, berat badan ditimbang lalu mencit dikorbkan dengan cara dislokasi pada leher mencit, mencit yang telah mati ditandai dengan mata redup, reflek pupil negatif. Mencit yang telah mati diambil testisnya. Jaringan segar dapat disimpan untuk dibuat sediaan histologik. Metode pembuatan preparat menggunakan metode parafin dengan teknik pewarnaan menggunakan HE. Preparat yang telah siap dilakukan pemeriksaan dibawah mikroskop dan hasilnya difoto dengan alat fotografi. Pemeriksaan preparat dilakukan oleh 2 orang dan dihitung reratanya

Analisis data untuk mengetahui beda nilai rata-rata jumlah sel Leydig pada masing-masing kelompok perlakuan dengan uji Anova satu arah dengan tingkat kesalahan sebesar 5% dan dilanjutkan uji LSD.^{15,16}

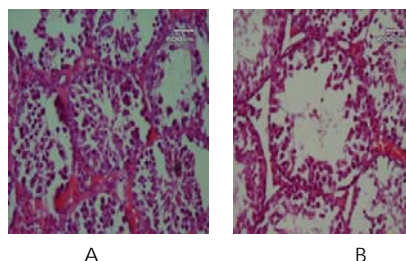
HASIL

Rata-rata jumlah sel-sel Leydig setelah pemberian injeksi nikotin pada tiap kelompok perlakuan 1, 2 dan 3 minggu, mengalami penurunan, dapat dilihat dengan cara membandingkan dengan kelompok kontrol. Penurunan jumlah sel Leydig dapat digambarkan pada gambar 1.

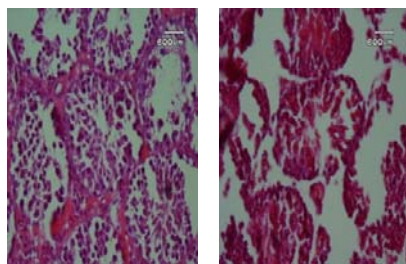


Gambar 1. Diagram batang jumlah sel leydig setelah pemberian injeksi nikotin selama 1, 2 dan 3 minggu

Gambaran Histologi Tubulus Seminiferus

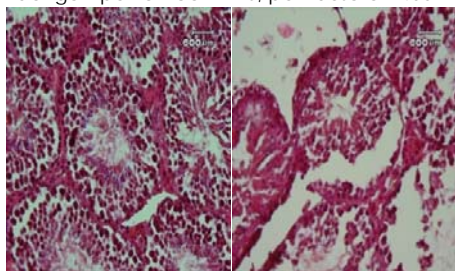


Gambar 2. Penampang melintang tubulus seminiferus testis pada kelompok kontrol (A) dan kelompok perlakuan (B) selama 1 minggu dengan pewarnaan PAS, pembesaran 400 x



A B

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



A B

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

Gambaran histologi kelompok kontrol selama 1, 2 dan 3 minggu dapat dilihat pada gambar 1(A), 2(A), dan 3 (A), terlihat adanya asosiasi Leydig tersusun berkelompok memadat, sel besar, sitoplasma sering tampak bervakuola, inti mengandung butir kromatin kasar, anak inti jelas, ditemui sel dengan 2 inti. Sitoplasma kaya *bends inclusi* seperti titik lipid. sel besar, sitoplasma bervakuola, butir-butir kromatin kasar, retikulum endoplasma agranuler terletak di interstitial sel.

Gambaran histologi kelompok kontrol selama 1, 2 dan 3 minggu dapat dilihat pada gambar 1(A), 2(A), dan 3 (A), terlihat adanya asosiasi Leydig tersusun berkelompok memadat, sel besar, sitoplasma sering tampak bervakuola, inti mengandung butir kromatin kasar, anak inti jelas, ditemui sel dengan 2 inti. Sitoplasma kaya *bends inclusi* seperti titik lipid. sel besar, sitoplasma bervakuola, butir-butir kromatin kasar, retikulum endoplasma agranuler terletak di interstitial sel.

Hasil uji anova menunjukkan terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok, kemudian dari hasil tersebut dilakukan uji LSD untuk mengetahui antar kelompok mana saja yang berbeda bermakna. Uji LSD untuk pasangan kelompok berbeda secara bermakna dari pasangan kelompok dari hasil sel-sel Leydig adalah P1 dan K1, K3; P2 and K1, K2, K3 ; P3 and K3.

Sangat bermakna adalah pasangan kelompok P2 dan K3 ; P3 dan K3; P1 dan K3.

DISKUSI

Perlakuan nikotin selama 1, 2 dan 3 minggu dengan dosis 5 mg/kg BB/hr terhadap jumlah sel Leydig menunjukkan penurunan jumlah sel-sel Leydig yang bermakna ($p < 0,05$) dibandingkan dengan kelompok kontrol. Jumlah sel Leydig mengalami penurunan pada lama perlakuan 1 minggu dan 2 minggu dengan dosis yang sama yaitu 5 mg/kg BB/hr, kemudian jumlahnya meningkat pada perlakuan minggu ketiga dengan dosis yang sama yaitu 5 mg/kg BB/hr disebabkan oleh nikotin dapat meningkatkan kadar FSH sebagai mekanisme pertahanan tubuh terhadap gangguan spermatogenesis yang ditimbulkannya. Pengaturan poros hipotalamus - hipofisis - testis, terdapat hubungan timbal balik sekresi LH dan FSH hipofisis anterior oleh testis. LH berfungsi mengatur produksi hormon testosteron oleh sel-sel interstitial Leydig didalam testis. Sel Leydig ditempatkan di dekat tubulus seminiferus. Testosteron yang dihasilkan oleh testis mempunyai efek timbal balik dengan cara meningkatkan sekresi LH oleh hipofisis anterior apabila jumlah sel Leydignya menurun, sehingga jumlah sel Leydig bertambah pada lama perlakuan 3 minggu.

Mekanisme kompensasi tersebut hanya terjadi pada perlakuan yang telama yaitu selama 3 minggu, sedangkan pada perlakuan 1 dan 2 minggu pada penelitian ini tidak terjadi kompensasi, akibatnya adalah jumlah sel-sel Leydig jumlahnya lebih sedikit pada lama perlakuan 1 dan 2 minggu tapi kemudian jumlahnya meningkat lagi pada lama perlakuan 3 minggu. Peningkatan jumlah sel-sel Leydig pada lama perlakuan 3 minggu ini masih tetap lebih rendah bila dibandingkan dengan jumlah sel-sel Leydig pada kelompok kontrol atau mencit yang tidak di beri perlakuan nikotin. Penurunan sel Leydig ini disebabkan karena pengaruh dari menurunnya hormon-hormon gonadotropin yang diproduksi oleh hipofisis anterior terutama LH yang berfungsi sebagai pemelihara sel Leydig, baik dalam pertumbuhan maupun dalam fungsinya untuk mensekresi testosteron.

Perbedaan yang bermakna antara jumlah sel-sel Leydig dilanjutkan dengan uji BNT. Hasilnya adalah perbedaan yang bermakna mayoritas terjadi antara kelompok control dan perlakuan. Jumlah sel-sel Leydig tidak semua berbeda secara bermakna disebabkan oleh perbedaan lama perlakuan yang diberikan memberikan efek yang hampir sama untuk perkembangan jumlah sel-sel Leydig. Lama perlakuan nikotin selama 1, 2 dan 3 minggu belum dapat memberikan efek yang berbeda secara bermakna, walaupun secara deskriptif terlihat penurunan jumlah sel Leydig.

Hasil penelitian untuk kelompok kontrol atau kelompok yang tidak diberikan

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

KESIMPULAN

- Pemberian injeksi nikotin subkutan selama 1, 2 dan 3 minggu dapat menurunkan jumlah sel Leydig pada mencit jantan (*Mus musculus*).
- Waktu pemberian minimal (1 minggu) sudah menunjukkan penurunan dari jumlah sel Leydig pada mencit jantan (*Mus musculus*).
- Perbedaan pengaruh yang sangat bermakna untuk sel Leydig adalah pasangan kelompok perlakuan 3 minggu terhadap kontrol 3 minggu dan perlakuan 2 minggu terhadap kontrol 3 minggu serta perlakuan 1 minggu terhadap kontrol 3 minggu.

DAFTAR PUSTAKA

- Rayburn DS and Carey., *Obstetric and gynecology*. Alih bahasa oleh Kalik TMA. Jakarta : EGC., 2004 ; 313-332.
- Pascualoto SS, Luxon AN, Supreyto SP, Pascualoto EB, and Arat S, *Efek of medical therapy alcohol smoking and endocrine disturbs on meal infertility*. Edisi 59., 2004 ; 375-382
- Speroff L and Fritz MA., *Clinical gynecologic endocrinology and infertility*. Seventh edition book 1 and 2. Philadelphia : Lippincott Williams and Wilkins., 2005 ; 575-600.
- RCOG Guidelines., *The first category the basic routine infertility, investigation*

grade B recommendation in ESHRE Capri workshop. National Guidelines Clearinghouse., 2000.

- Hukkanen J, Jacob P and Benowitz NL., *Metabolism and disposition kinetics of nicotine*. *Pharmacological Reviews.*, 2005 ; 57(1) : 79-115.
- Kim, J.M, et al, *Caspase 3 and caspase activated deoxyribonuclease are associated with testicular germ cell apoptosis resulting from reduced intratesticular testosterone*. *Endocrinology*, 2001 ; 142; 3809-3916.
- Said, T.M, Uwe P, Hans, J.G, and Ashok, A, *Role of caspases in male infertility*. *Human Reproduction Update*. Vol.10, No.1, 2004 ; pp: 39-51.
- Latha, M.S, Vijayammal, P.L. & Kurup, P.A, 1993. *Effect of nicotine administration on lipid metabolism in rats*. *Indian Journal of Medical Research.*, 1993 ;98: 44-49.
- Ashakumary, L. and Vijayammal, P.L., *Additive effect of alcohol and nicotine on LPO and antioxidant defence mechanism in rats*. *Journal of Application Toxicology*. 1997;16:305 - 308.
- Bui L.M, Keen C.I, Dubick M.A., *Comparative effect of 6 week nicotine treatment on blood pressure and components of the antioxidant system in male spontaneously hypertensive and normotensive wistar Kyoto rats*. *Toxicology*, 1995 ; 98: 57-65
- Yildiz. D., Ercal, N. & Armstrong, D.W, 1998. *Nicotine enantiomers and oxidative stress*. *Toxicology.*, 1998 ;130: 155-165.
- Susanna D, Hartono B, Fauzan H. *Penentuan kadar nikotin dalam asap rokok*. *Makara Kesehatan.*, 2003 ; 7-12
- Joewana S, 2004. *Gangguan mental dan perilaku akibat penggunaan zat psikoaktif*, Edisi 2. Jakarta:EGC. hlm:154-179.
- Sugiyono, 2008. *Metode penelitian kuantitatif*. Bandung :Penerbit Alfabeta., 2008 ; 10-25
- Kemas A.S., *Rancangan percobaan*. Universitas Sriwijaya Palembang. Jakarta: Rajawali Press, 1991 ; 19-52
- Riduwan, 2009. *Dasar-dasar statistika*. Bandung. Penerbit Alfabeta., 2009 ; 217-222, 238-243.