

Penurunan Angka Fertilitas Spermatozoa dan Gambaran Histopatologis Tubulus Seminiferus Mencit (*Mus Musculus*) Kondisi Malnutrisi

Decrease Of Spermatozoa Fertility Rate And Overview Histopathologic Seminiferous Tubules Of Mice (*Mus Musculus*) With Malnutrition Conditions

Tatik Hernawati, Erma Safitri, Suzanita Utama, Sri Mulyati

Fakultas Kedokteran Hewan Unair

Kampus C Unair, Jl. Mulyorejo Surabaya-60115.

Telp. 031-5992785, Fax. 031-5993015

Email : rma_fispro@yahoo.com

Abstract

The research was conducted in addition aims to scientifically prove the decrease in fertility of sperm cells of male mice *Mus musculus* experiencing malnutrition conditions, as well as to demonstrate the histopathologic picture of the seminiferous tubules were damaged in mice *Mus musculus* male from malnutrition. The methods used are: *Mus musculus* male is experiencing malnutri ie fasted for 3 days only given to drink ad libitum compared with controls fed a normal fixed 300-400 grams per day per mice and drinking water ad libitum. We then test the fertility of sperm cells, sperm fertility rates obtained by bringing sperm and ovum cells in vitro is calculated based on the number of zygotes produced divided by the number of ova multiplied by 100%. The histopathologic examination of the seminiferous tubules of the testis is done by surgery and fabrication of histological preparations, and then observed microscopically at the damage occurs at 100 and 400 times. The results showed a significant difference between male mice created malnourished compared with controls, whereas in the treated mice showed a decrease in fertility malnutrition. Similarly, histopathologic observation of seminiferous tubules damage than the control. At the microscopic condition of malnutrition occurs in the seminiferous tubules swelling, bleeding and adhesin with the surrounding tissue and even degenerated tissue.

Keywords : spermatozoa fertility rate, histopathologic seminiferous tubules, malnutrition

Pendahuluan

Kesuburan atau Fertilitas pada hewan jantan dapat diukur dari kemampuan sperma pejantan tersebut untuk melakukan proses fertilisasi atau pembuahan ketika bertemu dengan sel ovum. Fertilisasi dapat terjadi baik secara in vivo di dalam saluran reproduksi betina maupun secara in vitro di luar saluran reproduksi betina. Proses fertilisasi dipengaruhi oleh banyak faktor, diantaranya adalah kemampuan organ dan hormon yang mempengaruhi proses reproduksi untuk bekerja secara optimal baik dari hewan betina maupun jantan. Pengoptimalan fungsi dari organ dan hormon rerproduksi pejantan selain dipengaruhi oleh unsur genetik juga dipengaruhi oleh faktor lingkungan, seperti kualitas dan kuantitas dari sel spermatozoa. Kualitas dan

kuantitas dari sel spermatozoa salah satunya dipengaruhi oleh kualitas dan kuantitas dari asupan pakan yang masuk dalam tubuh. Menurut Hardjopranyoto (1995), pakan dengan kuantitas dan kualitas yang rendah dapat menjadi penyebab terjadinya malnutrisi pada hewan jantan. Kejadian malnutrisi sangat berpengaruh baik terhadap kualitas maupun kuantitas dari sperma yang dihasilkan.

Menurut Abbas (2000), kondisi malnutri akan menyebabkan terjadinya defisiensi imun sehingga menjadi penyebab lebih rentannya terhadap kejadian berbagai infeksi. Gejala klinik yang sangat menonjol pada kondisi defisiensi imun adalah terjadinya infeksi berulang atau berkepanjangan dan infeksi oportunistik yang tidak memberikan respons yang adekuat terhadap terapi

antimikroba (Ammann, 1991; Kresno, 2003). Di negara berkembang diare merupakan komplikasi yang terjadi pada sekitar 90% penderita defisiensi imun (Lew, 1997; Satheesh, 2002), belum lagi banyaknya kasus infertilitas bahkan terjadinya kasus sterilitas yang mengarah pada terjadinya degenerasi pada testis yang terjadi akibat kasus malnutrisi pada manusia.

Oleh karena itulah penelitian ini perlu dilakukan dengan lebih insentif untuk mengetahui efek malnutrisi terhadap fungsi reproduksi. Pada penelitian ini dilakukan pada hewan jantan *Mus musculus* sebagai hewan coba, yang ditujukan untuk mengetahui efek malnutrisi terhadap penurunan angka fertilitas dan gambaran histopatologis dari tubulus seminiferus.

Materi dan Metode Penelitian

Penurunan angka fertilitas dari sel spermatozoa mencit jantan yang dibuat mengalami malnutrisi diukur berdasarkan kemampuannya membuahi sel ovum secara in vitro dibandingkan dengan mencit kontrol yang tidak mengalami malnutrisi. Adapun gambaran histopatologis dari organ reproduksi diamati secara mikroskopis pada jaringan tubulus seminiferus dari mencit jantan yang mengalami malnutrisi dibandingkan dengan kontrol.

Uji Fertilitas

Uji fertilitas spermatozoa didapatkan dengan cara mempertemukan sel spermatozoa dan sel ovum secara in vitro kemudian dihitung berdasarkan banyaknya zigot yang dihasilkan dibagi jumlah ovum dikali 100%.

Kelompok pertama *Mus musculus* jantan dibuat mengalami malnutrisi dengan cara dipuasakan selama 3 hari (Prasetyo, 2009) dan hanya diberi air minum *ad libitum*, pada hari ke-4 mencit dikorbankan kemudian dibedah dan dilakukan aspirasi pada saluran reproduksi jantan sehingga di dapatkn sel spermatozoa, kemudian dilakukan fertilisasi dengan cara dipertemukan dengan sel ovum secara in vitro, hasil dibandingkan dengan kontrol yang tidak dibuat malnutrisi (tidak dipuasakan).

Persiapan Medium

Medium M16 dan PBS dibuat sesuai dengan prosedur pembuatan kedua medium. Sebelum digunakan untuk fertilisasi in vitro,

dibuat terlebih dahulu medium tetes dalam cawan petri dengan volume 50 mikroliter sebagai medium pencuci dan 25 mikroliter sebagai medium kultur in vitro. Medium tetes kemudian diinkubasikan selama 3 jam di dalam inkubator CO₂ 5% pada suhu 37°C sebelum digunakan untuk fertilisasi in vitro.

Pengambilan Sperma

Pada mencit jantan yang akan diambil spermanya dimatikan dengan cara dislokasio vertebrae cervicalis ke empat dan didesinfeksi dengan alkohol 70%. Dibuat sayatan menyerupai huruf Y pada bagian abdomen, isi perut dikeluarkan, dan testis sebelah kiri ditarik, dipisahkan lemaknya dan diambil bagian kauda epididimisnya yang merupakan tempat penampungan sperma yang telah masak. Kauda epididimis yang telah didapatkan dicuci dengan PBS sebanyak 2 kali dan dipotong kecil-kecil untuk membebaskan spermatozoa lalu ditaruh pada M16 dan diinkubasi dalam inkubator CO₂ 5% pada suhu 37°C

Koleksi Sel Telur

Pada mencit betina tanpa mendapat perlakuan, pakan diberikan secara standard berupa pellet BRIC 511 produksi Charoen Pokphand dan dilakukan koleksi sel telur melalui tahapan-tahapan berikut :

1. Dilakukan penyuntikan hormon PMSG dan hCG secara intra sub cutan untuk merangsang terjadinya superovulasi dengan urutan penyuntikkan sebagai berikut : pada hari pertama jam ke-0 mencit betina disuntik PMSG 5 IU 0,1 cc untuk merangsang proses folikulogenesis dan dibiarkan selama 48 jam. Setelah itu pada hari ke-2 dan 48 jam setelah penyuntikan PMSG, mencit betina disuntik dengan hCG 5 IU 0,1 cc dan dikawinkan secara single mating langsung dengan pejantan vasektomi untuk menggetak ovulasi
2. Tujuh belas jam kemudian dilakukan pemeriksaan sumbat vagina untuk mengetahui betina yang positif kawin dan dilakukan flushing sel telur
3. Mencit betina dimatikan dengan cara dislokasio vertebrae cervicalis ke empat kemudian dibuat sayatan Y pada abdomen, diambil uterus dan dipisahkan bagian tuba

falopii, setelah itu dilakukan pembilasan dengan menggunakan medium M16

4. Dilakukan flushing sel telur pada ampula tuba falopii di bawah mikroskop inverted.

Flushing Sel Telur

Flushing sel telur mencit dilakukan dengan cara sebagai berikut :

1. Mencit betina dimatikan dengan cara dislokasio vertebrae cervikalis ke empat kemudian diambil bagian ampula tuba falopii dan mencucinya dengan PBS sebanyak tiga kali dilanjutkan dengan pencucian dengan M16 sebanyak tiga kali juga
2. Dilanjutkan dengan melepaskan massa kumulus dalam medium M16+BSA dengan cara menyobek dinding kantung fertilisasi dengan menggunakan spuit yang berisi PBS dengan jarum G18.
3. Memindahkan medium sebanyak mungkin tanpa memindahkan sel telur. Alat yang digunakan pada proses ini adalah pipet pasteur yang telah dimodifikasi pada ujungnya dan pada ujung yang lain dihubungkan dengan slang plastik sebagai alat hisap.
4. Setelah sel telur tampak pada dasar cawan petri, tambahkan kembali media M16 secukupnya. Koleksi sel telur menggunakan pipet pasteur yang dimodifikasi dan cuci sel telur yang diperoleh dengan PBS sebanyak 3 kali dilanjutkan dengan pencucian menggunakan M16 sebanyak 3 kali agar sel telur terbebas dari sel-sel kumulus
5. Selanjutnya sel telur dipindahkan pada cawan petri yang telah berisi medium M16 yang baru, untuk diinkubasi di dalam inkubator CO₂ 5% pada suhu 37°C

Fertilisasi In Vitro

Sel telur dan spermatozoa yang telah diinkubasi dengan menggunakan pipet pasteur yang dimodifikasi dipindahkan pada cawan petri yang berisi drop M16 yang telah difiksasi dengan mineral oil dan diinkubasi kembali dalam inkubator CO₂ 5% pada suhu 37°C selama 5 jam untuk terjadinya fertilisasi in Vitro.

Data fertilitas spermatozoa mencit jantan didapatkan dengan cara mengambil sperma dari bagian kauda epididimis, karena disini merupakan tempat sperma yang masak dan siap diejakulasikan

apabila jumlah sperma telah cukup banyak (Hardjopranyoto, 1995). Sperma yang telah diperoleh ditempatkan pada cawan falcon berisi ovum mencit betina yang telah disuntik PMSG dan hCG, kemudian diinkubasi selama 5 jam dalam inkubator CO₂ 5% pada suhu 37°C. Angka fertilitas dihitung berdasarkan banyak zigot yang diperoleh dibagi jumlah ovum dikalikan 100% (Monk, 1987)

Pemeriksaan Histopatologi Testis

Kelompok pertama *Mus musculus* jantan dibuat mengalami malnutrisi dengan cara dipuaskan selama 3 hari (Prasetyo, 2009) dan hanya diberi air minum *ad libitum*. Adapun kelompok yang lain diberi pakan dan minum standard (sebagai kontrol). Pada hari ke 4 mencit-mencit dari semua perlakuan dikorbankan dengan cara memasukkan mencit ke dalam toples kaca berisi kapas yang telah dibasahi kloroform. Segera setelah mencit tersebut mati, maka dilaksanakan pembedahan untuk mengambil testis. Masing-masing testis dimasukkan ke dalam pot obat yang berisi larutan Bouin selama tidak lebih dari empat hari. Larutan Bouin digunakan untuk fiksasi sediaan testis karena hasilnya lebih baik dibanding dengan larutan lain (Hariani, 1996). Setelah itu dilakukan pembuatan sediaan histopatologis.

Tahap pengamatan

Pemeriksaan dilakukan di bawah mikroskop dengan menggunakan pembesaran 100 X, kemudian dilanjutkan dengan pembesaran 400 X. Cara penilaiannya dengan melakukan penghitungan pada tiga potongan testis yang berbeda untuk setiap ulangan pada masing-masing perlakuan. Tiap potongan dilakukan pengamatan pada dua tubulus seminiferus yang besarnya kurang lebih sama.

Hasil dan Pembahasan

Angka fertilitas dari sel spermatozoa diamati secara in vitro, kelompok pertama 10 ekor *Mus musculus* jantan dibuat mengalami malnutrisi dengan cara dipuaskan selama 3 hari dan hanya diberi air minum *ad libitum*. Adapun 10 ekor kelompok yang lain diberi pakan dan minum standard (sebagai kontrol). Pada hari ke 4 semua mencit dimatikan dengan cara dislokasio vertebrae cervikalis ke empat. Data fertilitas spermatozoa

Tabel 1. Data Fertilitas Spermatozoa Mencit (*Mus musculus*) Jantan

Kontrol (Tidak dipuasakan)			Malnutrisi (Dipuasakan 3 hari)		
Mencit Nomor	Σ Zygot/ Σ Ovum	Σ Zygot/ Σ Ovum x 100%	Mencit Nomor	Σ Zygot/ Σ Ovum	Σ Zygot/ Σ Ovum x 100%
1	7/7	100%	1	1/7	0,14%
2	8/8	100%	2	1/7	0,14%
3	7/7	100%	3	1/8	0,125%
4	7/7	100%	4	1/8	0,125%
5	6/7	86%	5	1/7	0,14%
6	8/8	100%	6	2/7	0,29%
7	8/8	100%	7	2/7	0,29%
8	7/8	87%	8	1/7	0,14%
9	7/7	100%	9	1/8	0,125%
10	7/7	100%	10	1/7	0,14%

Tabel 2. Rata-rata Nilai Fertilitas Spermatozoa Mencit Jantan $\pm$ Standard Deviasi

Perlakuan	X $\pm$ SD (%)
Kontrol (Tidak dipuasakan)	97,2 ^a $\pm$ 0,124
Malnutrisi (Dipuasakan 3 hari)	0,1655 ^b $\pm$ 0,134

mencit jantan didapatkan dengan cara mengambil sperma dari bagian kauda epididimis. Sperma yang didapat ditempatkan pada cawan falcon berisi ovum mencit betina yang telah disuntik PMSG dan hCG, kemudian diinkubasi selama 5 jam dalam inkubator CO₂ 5%. Angka fertilitas dihitung berdasarkan banyak zigot yang diperoleh dibagi jumlah ovum dikalikan 100%. Data nilai fertilitas mencit dapat dilihat pada tabel 1.

Berdasarkan analisa one way Anova, didapatkan data rata-rata nilai fertilitas spermatozoa mencit jantan $\pm$ standard deviasi dapat dilihat seperti Tabel 2.

Tahapan kedua, berdasarkan gambaran histopatologis tubulus seminiferus dari testis mencit (*Mus musculus*) jantan. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada gambar di bawah ini.

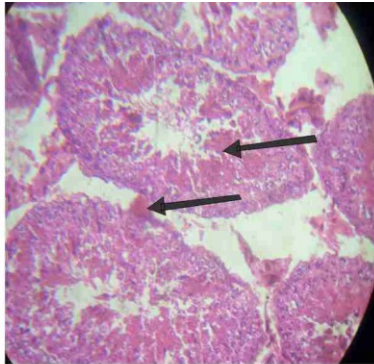
Berdasarkan dari hasil analisa statistik, didapatkan rata-rata jumlah zigot pada mencit yang dibuat malnutrisi (dipuasakan selama 3 hari) adalah sebesar 0,1655 $\pm$ 0,134. Hasil ini berbeda nyata dengan kontrol (tanpa dipuasakan) yaitu sebesar 97,2 $\pm$ 0,124.

Hasil yang berbeda nyata ($P < 0,05$) pada penelitian ini disebabkan karena kejadian kekurangan pakan yang ekstrem, dimana mencit tidak diberi makan sama sekali selama 3 hari berturut-turut, bahkan kotorannya sendiri juga

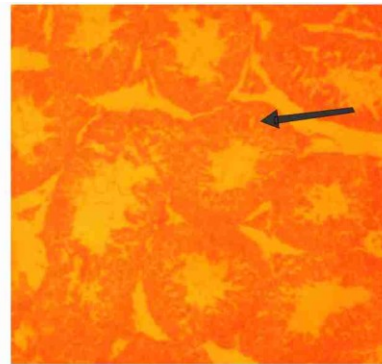
dikeluarkan dari kandang, selanjutnya kandang mencit juga tidak diberi sekam. Hal ini sesuai dengan pendapat Hardjopranyoto (1995), yang menyatakan bahwa infertilitas dapat terjadi pada pejanan yang kekurangan nutrisi secara ekstrem.

Selama berada di tempat penampungan di dalam epididimis, spermatozoa mendapatkan sumber energi utama berupa fruktosa yang berasal dari makanan. Selanjutnya fruktosa akan diserap oleh sel epitel usus halus kemudian melalui peredaran darah akan didistribusikan menuju ke jaringan yang memiliki enzim Aldose B dan fructokinase. Lebih lanjut akan diabsorpsi oleh sel melalui transport pasif yang dibantu oleh protein spesifik GLUT 5 (*Glucosa Transportation 5*). Lewat proses ini pula fruktosa dapat mencapai jaringan testis dan sel spermatozoa yang selanjutnya menjadi sumber energi utama kehidupan dan motilitas sel sperma (Marks *et al.*, 2000). Lebih lanjut di dalam sel, fruktosa akan mengalami metabolisme menjadi senyawa antara proses glikolisis yaitu gliseraldehida 3-P yang selanjutnya akan mengalami proses glikolisis yang juga sama dengan glukosa yang menghasilkan 2 ATP dan asam piruvat.

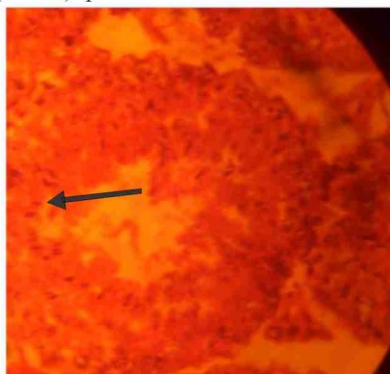
Malnutrisi yang terjadi akan menyebabkan tidak adanya sumber energi bagi spermatozoa. Hal ini dikarenakan tidak adanya fruktosa yang



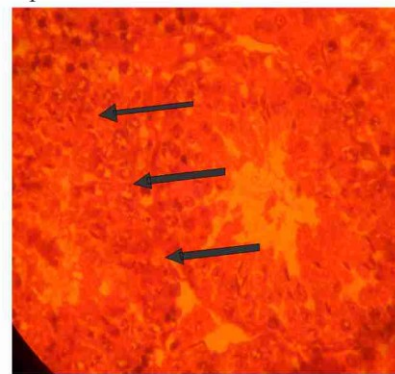
Gbr 1 . Hemoraghi didlm & sekitar Tub. S eminferus (400 X) pada mencit malnutrisi



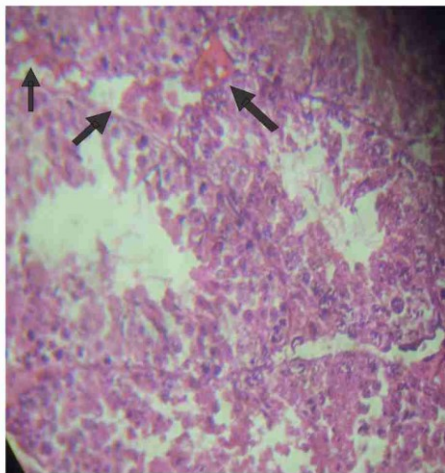
Gbr 2. Tubulus Seminiferus Normal (400 X) pada mencit kontrol



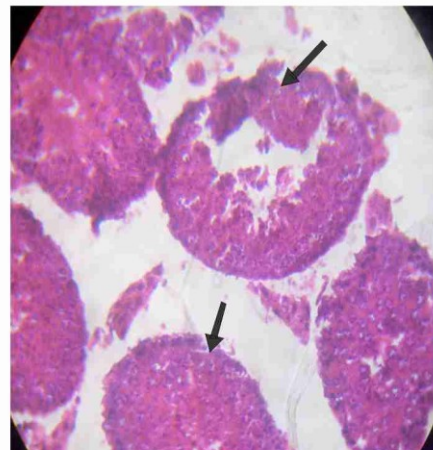
Gbr 3. Tubulus Seminiferus Odem (400 X) Dan mulai terjadi degenerasi pada mencit malnu trisi



Gbr 4. Tubulus Seminiferus Odem (400 X) perlengketan & mulai mengalami degenerasi pada mencit malnutrisi



Gbr 5. Hemorahi disekitar Tubulus Seminiferus (400 X) pada mencit malnutrisi



Gbr 6. Degeneasi Tubulus Seminiferus (400 X) pada mencit malnutrisi

berasal dari makanan yang akan masuk ke dalam jaringan testis. Seperti terjadinya kasus azospermia pada mencit jantan akibat terjadinya defisiensi vitamin B5 (Yin *et al.*, 2004)

Menurut Hardjopranyoto (1995), mekanisme kurang pakan dapat menyebabkan penurunan aktivitas testis dan kelenjar ascesorius yang berakibat pada peningkatan jumlah spermatozoa abnormal apabila terjadi dalam jangka waktu yang

lama. Pada penelitian ini kurang pakan dibuat ekstrim yaitu tanpa diberi makan sama sekali, sehingga terjadi proses malnutrisi. Manifestasi secara histopatologis pada tubulus seminiferus dari testis akibat malnutrisi pada penelitian ini adalah terjadinya pembengkakan, perdarahan dan adhesi dengan jaringan sekitarnya bahkan mengalami degenerasi jaringan.

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat diambil kesimpulan bahwa malnutrisi pada mencit *Mus musculus* jantan dapat menyebabkan terjadinya penurunan angka fertilitas dari spermatozoa dan bahkan terjadinya degenerasi pada jaringan tubulus seminiferus dari testis.

Daftar Pustaka

- Abbas A.K., A.H.Lichtman and J.S. Pober. 2000. Congenital and acquired immuno-deficiency disorder. In: Cellular and Molecular Immunology, 4th Ed, W.B Saunders.Co, 445-67.
- Alan R. and M.D.Gaby. 2000. Dehydroepiandrosterone. Biological Effects and Clinical Significance. (Abstr) <http://www.healnotes.com/dhea.html-33k>
- Canale D. and S. Postoi. 2000. Libido and Hormones. CNS Spectrum. East Melbourne. pp. 21-23
- Guyton A and J.E. Hall. 1997. Buku ajar fisiologi kedokteran book. Edisi. Editor Irawati Setiawan EG. Jakarta. Hal. 1283-1288.
- Hardjopranyoto S. 1995. Ilmu Kemajiran Pada Ternak, Penerbit Lab. Ilmu Kemajiran. Dep. Reproduksi dan Kebidanan. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya. Hal. 61-72, 177-179, 299-300.
- Heckbert L., and J.R.Heian. 2002. Acute the dehydroepiandrosteron (DHEA) effect on sexual arousal in postmenopausal woman. in : Women Health Gend Based Med. 2: 155-162.
- Kresno S.B. 2001. Imunologi: Diagnosis dan Prosedur Laboratorium, 4th Ed, FKUI, Jakarta.
- Lehningger A.L. 1995. Dasar-dasar Biokimia. Jilid 2. Alih Bahasa Maggy Thenawidjaja. Penerbit Airlangga. Jakarta. Hal: 73-93, 149-154.
- Lew EA Poles MA, Dieterich DT, 1997. Diarrheal Diseases Associated with HIV Infection. Gastroenterology Clinica of North America, Vol 26, Issue 2, pp 259-290.
- Marks D.B., D.M. Allan and M.S. Collen. 2000. Biokimia Kedokteran Dasar. Sebuah Pendekatan Klinis. Edisi I. Alih Bahasa: Braun UP. Penerbit Buku Kedokteran ECG. Jakarta. Hal 165.
- Sakka M.D. and F.L. Tom. 2002. Physiology of Penile Erection. Departement of Urology. <http://www.duj.com/Article/Lue.html.29>.
- Satheesh K.S. and A.S. Lakshmi. 2005. Intestinal Parasitic Infection in HIV Infected Patients with Diarrhoea in Chennai. Indian Journal of Medical Microbiology, Vol.20, Issue 2 : 88-91.