

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

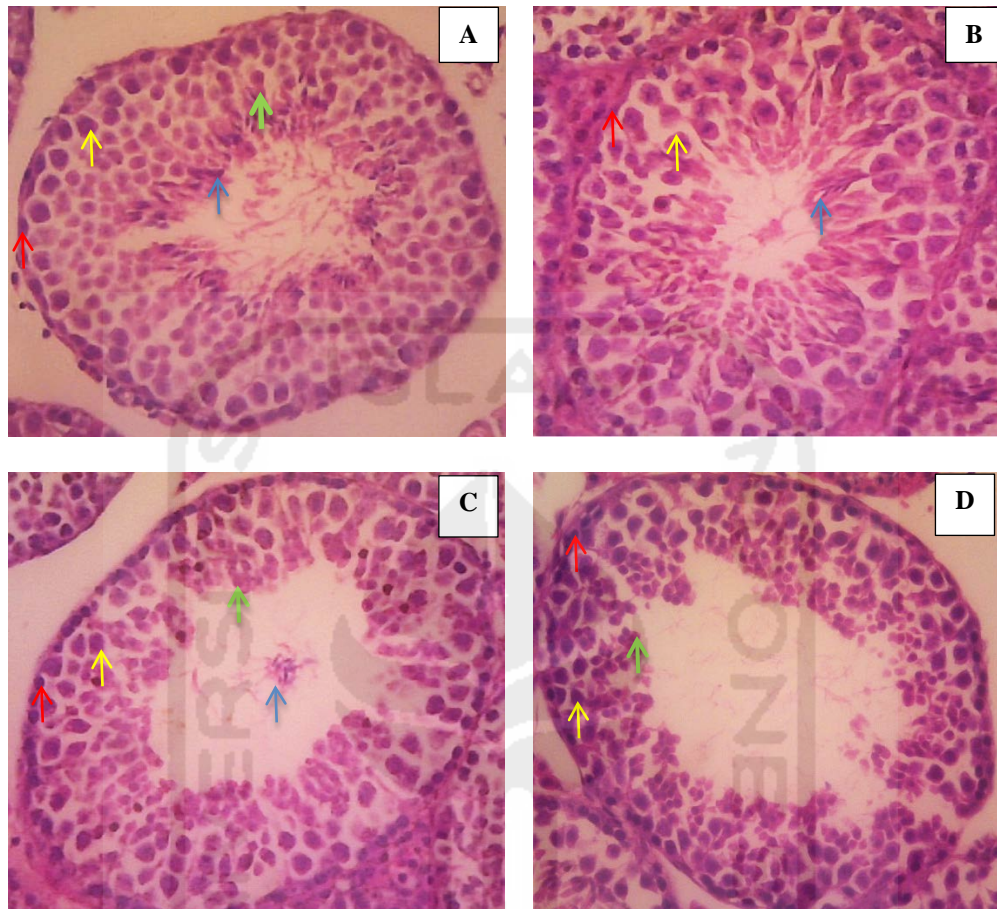
4.1. Hasil Penelitian

Penelitian ini telah mendapat persetujuan Komite Etik Penelitian Kedokteran dan Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia dengan nomor 32/Ka.Kom.Et/70/KE/I/2016 (lampiran 3). Pengamatan tubulus seminiferus pada preparat bahan biologi tersimpan organ testis *Mus Musculus Balb/C* menggunakan mikroskop Olympus CX21 dengan perbesaran 100x dan 400x. Semua sampel yang diikuti dalam penelitian tidak mengalami kerusakan secara makroskopis. Analisis dilakukan pada semua kelompok, yaitu kelompok tanpa perlakuan (K1), kelompok dengan induksi D-galaktosa (K2), kelompok dengan induksi ekstrak air daun kersen dengan dosis 35 mg/ kgbb (P1), kelompok dengan induksi pemberian ekstra air daun kersen dengan dosis 70 mg/kgbb, serta kelompok dengan induksi vitamin C dengan dosis 28 mg/kgbb (P3). Parameter penuaan diukur melalui pengukuran kadar Malondealdehyde (MDA) pada akhir induksi D-galaktosa sebelum pemberian perlakuan.

Tabel 3. Karakteristik hewan coba sebelum perlakuan

Kelompok	N	Berat badan (gram)	MDA plasma (mg/dl)
K1	4	26,10±3,47	1,75±0,11
K2	4	27,50±1,58	6,47±0,09*
P1	4	26,77±2,04	6,33±0,09*
P2	4	27,73±6,80	6,29±0,10*
P3	4	29,45±2,77	6,32±0,19*

Keterangan *): Berbeda bermakna dengan kelompok K1 (hasil uji statistik ANOVA dilanjutkan *Post hoc LSD* K1=kelompok sehat, K2=kelompok penuaan, P1=kelompok induksi ekstrak air daun kersen dosis 35 kg/kgbb, P2=kelompok induksi ekstrak air daun kersen dosis 70 kg/kgbb, P3=kelompok induksi vitamin C 28 mg/kgbb.



Gambar 5. Penilaian skor spermatogenesis berdasarkan kriteria *Johnsen's score spermatogenesis*. A=skor spermatogenesis 10, B=skor spermatogenesis 9, C=skor spermatogenesis 8, D=skor spermatogenesis 7. Panah merah=spermatogonium, kuning=spermatosit, hijau=spermatid, biru=spermatozoa.

4.1.2. Jumlah Skor Spermatogenesis

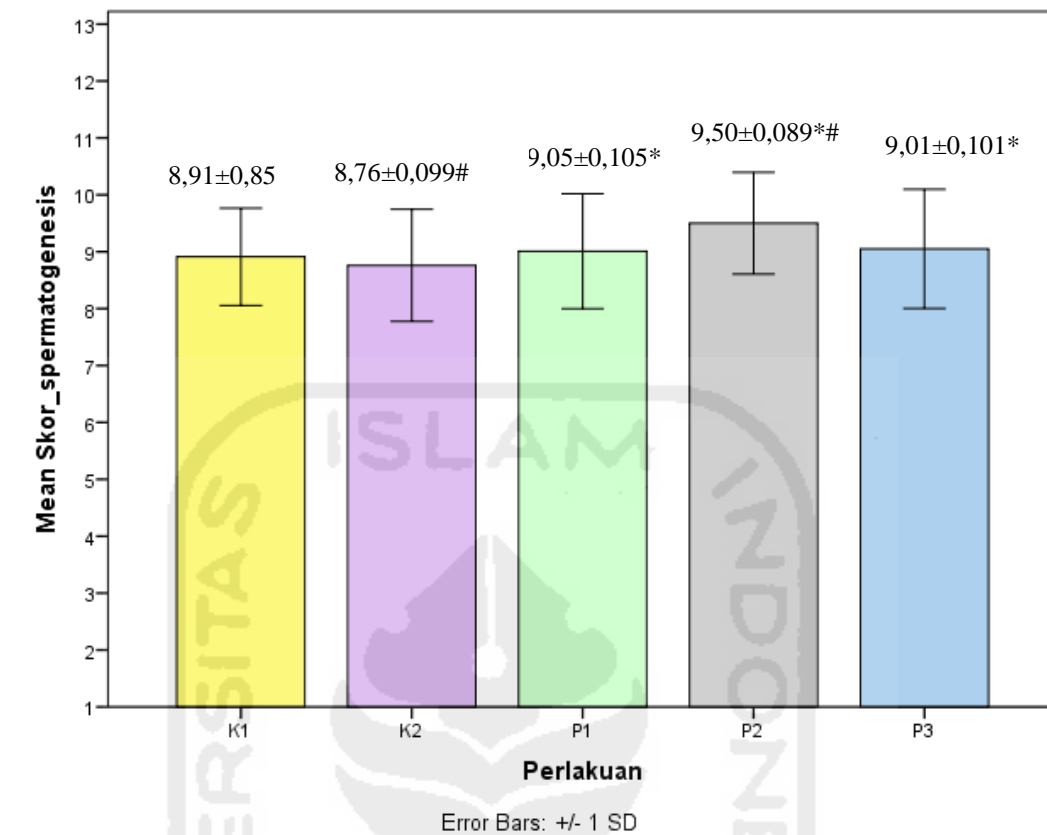
Penghitungan skor spermatogenesis setiap kelompok hewan coba dilakukan diakhir penelitian berdasarkan kriteria *Johnsen's Score Spermatogenesis*. Pada minggu ke-12, hewan coba didekapitasi untuk diambil organ testis kanannya untuk selanjutnya dibuat preparat. Proses pembuatan preparat dimulai dari fikasasi, dehidrasi, pembenangan, infiltrasi, pengeblokan, dan pemotongan jaringan kemudian dilakukan pewarnaan dengan Hematoksin-Eosin. Skor spermatogenesis dihitung dari lima tubulus seminiferus pada lima lapang pandang berbeda yang diambil secara acak pada preparat, sehingga dalam satu preparat testis terdapat 25 tubulus seminiferus. Pengamatan preparat

dilakukan di Departemen Histologi Laboratorium Terpadu Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia menggunakan mikroskop Olympus CX 21 pada perbesaran 100x dan 400x dengan *software* OptiLab.

Tubulus seminiferus yang diamati adalah tubulus seminiferus yang bulat dan utuh. Selanjutnya dilakukan pengamatan oleh peneliti dan interobserver. Hasil pengamatan dari keduanya kemudian dilakukan uji analisis *paired sample t test* untuk melihat tingkat signifikansi antara peneliti utama dan interobserver. Hasil yang diperoleh adalah $p > 0,05$ ($p = 0,123$) sehingga dapat disimpulkan bahwa tidak ada perbedaan yang signifikan antara peneliti utama dan interobserver (lampiran 5). Data tersebut kemudian dianalisis dengan uji *Saphiro-Wilk Test* untuk mengetahui apakah terdistribusi normal. Hasil uji normalitas tersebut didapatkan $p < 0,05$ ($p = 0,000$), sehingga dapat disimpulkan bahwa data terdistribusi tidak normal (lampiran 6).

Selanjutnya dilakukan Uji *Kruskal Wallis* untuk menguji hipotesis pada penelitian ini. Didapatkan hasil $p < 0,05$ ($p = 0,00$) yang berarti terdapat perbedaan signifikan rerata skor spermatogenesis pada minimal dua kelompok perlakuan. Analisis *Mann Whitney Test* dilakukan untuk mengetahui kelompok mana yang memiliki hasil perbedaan signifikan, yang dinyatakan dengan nilai $p < 0,05$ (lampiran 7). Rerata jumlah skor spermatogenesis pada setiap kelompok disajikan dalam gambar 6.

Berdasarkan hasil analisis tersebut, dapat dilihat bahwa kelompok yang memiliki rerata yang paling rendah adalah kelompok K2 (kelompok kontrol penuaan), dengan hasil perbedaan yang signifikan jika dibanding dengan kelompok P1 (kelompok induksi penuaan dan pemberian ekstrak dengan dosis 35 mg/kgbb), P2 (kelompok induksi penuaan dan pemberian ekstrak dengan dosis 70 mg/kgbb), dan P3 (kelompok induksi penuaan dan pemberian vitamin C dengan dosis 28 mg.kgbb). Kelompok P3 memiliki rerata skor spermatogenesis yang paling rendah jika dibandingkan dengan kelompok P1 dan P2. Semua uji analisis dilakukan dengan taraf kepercayaan 95%.



Gambar 6. Perbandingan rerata skor spermatogenesis pada masing-masing kelompok perlakuan.

Keterangan : *) perbedaan bermakna dengan kelompok kontrol penuaan (K2).

#) perbedaan bermakna dengan kelompok induksi penuaan dan vitamin C (P3)

K1=kelompok kontrol sehat, yang diberikan sondase aquades; K2=kelompok kontrol penuaan yang diberikan induksi sondase D-galaktosa; P1=mendapat induksi ekstrak air daun kersen dengan dosis 35 mg/kgbb; P2=kelompok yang mendapat perlakuan induksi ekstrak air daun kersen dengan dosis 70 mg/kgbb, P3= mendapat induksi vitamin C 28mg/kgbb.

4.2. Pembahasan

Penelitian eksperimental ini menggunakan *Mus musculus Balb/C* yang telah diinduksi D-galaktosa selama 6 minggu. Berdasarkan analisis data dapat dilihat bahwa rerata skor spermatogenesis pada hewan coba *Mus musculus Balb/C* kelompok kontrol penuaan (K2) lebih kecil dibandingkan dengan kelompok sehat (K1), kelompok yang mendapatkan ekstrak air daun kersen *Muntingia calabura* 35 mg/kgbb (P1) serta 70 mg/kgbb (P2), dan kelompok perlakuan vitamin C 28 mg/kgbb (P3). Hal tersebut sesuai dengan penelitian Shaikh *et al.*, 2014 yang

membuktikan bahwa pemberian D-galaktosa dapat meningkatkan produksi *advance glycation end products* (AGEs) yang apabila berikatan dengan reseptornya (RAGE), dapat menyebabkan tingginya kadar ROS. Apabila terakumulasi terus-menerus ROS tersebut dapat menginduksi terjadinya reaksi peroksidasi lipid pada testis (Patil *et al.*, 2009) serta mempengaruhi proses spermatogenesis, sehingga dapat menyebabkan berkurangnya skor spermatogenesis (Shaikh *et al.*, 2014). Penelitian oleh Ahangarpour *et al.*, 2014 juga dilaporkan bahwa pemberian D-galaktosa selama 6 minggu berturut-turut terbukti mampu menyebabkan peningkatan kadar galaktosa, meningkatkan kadar ROS (*Reactive Oxygen Species*) serta penurunan kadar antioksidan dalam testis yang dapat mempengaruhi kualitas maupun kuantitas spermatogenesis. Pada penelitian ini, pengukuran parameter penuaan dilakukan dengan mengukur kadar MDA serum sebelum pemberian perlakuan. Hal tersebut sejalan dengan penelitian bahwa pemberian D-galaktosa dapat meningkatkan kadar MDA plasma pada *Rattus norvegicus*. MDA merupakan produk hasil akhir dari reaksi peroksidasi lipid akibat stres oksidatif (Banji *et al.*, 2014).

Kelompok P3 mendapatkan induksi vitamin C mg/kgbb selama 4 minggu. Rerata skor spermatogenesis kelompok P3 lebih tinggi jika dibandingkan dengan kelompok K2 (signifikasi $p < 0,05$). Hal ini sejalan dengan penelitian sebelumnya oleh Vijayprasad *et al.*, 2014 bahwa vitamin C merupakan antioksidan yang poten dalam meningkatkan kualitas dan kuantitas sperma pada *Rattus norvegicus* yang diinduksi stres dengan metode *forced swimming*. Metode tersebut terbukti mampu meningkatkan radikal bebas, karena pada kondisi stres spermatozoa memproduksi sedikit ROS. Apabila terakumulasi, ROS nantinya akan menginduksi reaksi peroksidasi lipid dan menyebabkan infertilitas. Ayinde *et al.*, 2012 juga menyebutkan bahwa vitamin C memiliki efektifitas sebagai antioksidan yang diyakini dapat memperbaiki kualitas maupun kuantitas spermatogenesis. Vitamin C juga mampu memberikan efek antioksidan melalui berbagai macam cara, beberapa diantaranya yaitu dengan meningkatkan antioksidan endogen (seperti glutathione peroxidase dan superoxide dismutase), mengurangi produksi nitrit oksida, meningkatkan kadar FSH dan testosteron, meningkatkan kuantitas dan

motilitas sperma, serta menurunkan abnormalitas sperma. Dilaporkan pada penelitian sebelumnya, bahwa pemberian vitamin C pada mencit yang telah diinduksi stres oksidatif terbukti meningkatkan kualitas sperma, mulai dari jumlah, viabilitas, dan motilitas sperma.

Kelompok P1 merupakan kelompok hewan coba yang mendapatkan perlakuan induksi ekstrak air daun kersen dengan dosis 35 mg/kgbb selama 4 minggu. Pemberian dosis 35 mg/kgbb terbukti mampu meningkatkan skor spermatogenesis pada hewan coba yang diinduksi penuaan dengan D-galaktosa, meskipun jika dibandingkan dengan kelompok P2, rerata skor spermatogenesis kelompok P1 lebih rendah. Ekstrak air daun kersen (*Muntingia calabura*) terbukti memberikan efek protektif terhadap proses spermatogenesis, hal tersebut karena beberapa senyawa fitokimia daun kersen dilaporkan dapat meningkatkan antioksidan serta menurunkan kadar radikal bebas. Beberapa diantara senyawa fitokimia tersebut adalah flavanoid, tannin, triterpene, saponin, serta polifenol (Zakaria *et al.*, 2014). Senyawa fitokimia lainnya, seperti asam askorbat, alfa-tokoferol serta polifenol yang dilaporkan juga dapat memiliki efek sebagai antioksidan juga terdapat dalam ekstrak *Muntingia calabura* (Ramadas *et al.*, 2015). Flavanoid merupakan antioksidan poten yang dapat menangkal radikal bebas melalui kemampuannya sebagai *scavenger* berbagai macam radikal bebas (van Dam *et al.*, 2013). Flavanoid juga dilaporkan dapat menginaktifkan berbagai enzim yang dapat mencetuskan reaksi peroksidasi lipid serta mengaktifkan berbagai enzim yang dapat meningkatkan stimulasi antioksidan (Calado *et al.*, 2015). Senyawa fenol dilaporkan juga memiliki kemampuan untuk menghambat peroksidasi lipid oleh radikal bebas dengan menyumbangkan proton dari kelompok hidroksil yang dimilikinya (Narayanaswamy *et al.*, 2011).

Hal tersebut konsisten dengan penelitian sebelumnya, oleh Iftikhar *et al.*, 2014 yang melaporkan bahwa pemberian suplemen ekstrak kurma yang banyak mengandung antoksidan dapat meningkatkan skor spermatogenesis pada tikus albino prepubertal (rerata skor $6,28 \pm 0,21$) dibandingkan dengan yang tidak mendapatkan ekstrak kurma (rerata skor spermatogenesis $8,06 \pm 1,21$) dengan $p < 0,001$. Penelitian oleh Khaki *et al.*, 2011 juga dilaporkan bahwa pemberian

ekstrak jeruk limau (*Citrus sinensis*) pada yang banyak memiliki kandungan fitokimia flavanoid hesperidin, sebanyak 400 mg/kgbb dan 600 mg/kgbb selama 30 hari mampu meningkatkan motilitas dan viabilitas sperma sebanyak $73 \pm 4.35\%$ dan $95.80 \pm 1.68\%$ pada kelompok yang diberikan ekstrak sebanyak 400mg/kgbb selama 30 hari serta $81 \pm 5.33\%$ dan $98.80 \pm 80\%$ pada kelompok yang diberikan ekstrak 600mg/kgbb selama 30 hari, dibanding dengan kelompok kontrol yang menerima perlakuan induksi dengan aquades 4 ml/hari. Selain meningkatkan viabilitas dan motilitas, dilaporkan bahwa pemberian *Citrus sinensis* juga dapat meningkatkan jumlah TAC (*Total Antioxidant Capacity*) serta menurunkan kadar MDA (*Malondealdehyde*) dalam testis. Pemberian antioksidan dapat disimpulkan mampu memperbaiki kualitas dan kuantitas sperma serta proses spermatogenesis.

Rerata skor spermatogenesis pada kelompok P1 dan P2 lebih tinggi jika dibandingkan dengan kelompok P3. Hal ini dapat disebabkan karena dalam ekstrak air daun kersen (*Muntingia calabura*), selain terkandung berbagai senyawa fitokimia antioksidan yang poten, juga terkandung asam askorbat atau vitamin C sebesar 21,11 mg/gram (Ramadas *et al.*, 2015). Hal tersebut juga sejalan dengan penelitian oleh Jirasatid *et al.*, 2015 bahwa, dalam ekstrak *Muntingia calabura* selain mengandung berbagai macam senyawa aktif antioksidan, juga mengandung vitamin C sebanyak 33,6 mg/gram ekstrak dan vitamin E sebanyak 14,7 mg/gram ekstrak. *Muntingia calabura* juga diketahui memiliki senyawa polifenol yang dapat berperan sebagai antioksidan melalui mekanisme DPPH (1-1 diphenyl 2-picrylhydrazyl) radikal *scavenging*.

Kelompok yang mendapat induksi penuaan dan vitamin C memiliki rerata skor spermatogenesis paling rendah dibandingkan kelompok induksi penuaan dan induksi ekstrak, juga dapat disebabkan karena vitamin C memiliki susunan senyawa kimia tidak stabil yang memungkinkan mudah terdegradasi menjadi senyawa lain. Proses degradasi ini dapat terjadi secara *aerobic* maupun *non-aerobic*. Vitamin C dalam keadaan *aerobic* dapat teroksidasi menjadi *L-dehydroascorbic acid* (DHA). Aktivitas antioksidan yang dimiliki DHA, lima kali lipat lebih rendah jika dibandingkan dengan vitamin C itu sendiri. Aktivitas antioksidan tersebut bahkan akan hilang apabila DHA terdegradasi lagi menjadi

beberapa senyawa seperti *2,3-diketogulonic acid* (DKG), *2-furoic acid*, and *3-hydroxy-2-pyron* (Jirasatid *et al.*, 2015).

Penelitian ini memiliki beberapa keterbatasan, salah satunya dari jumlah lapang pandang serta jumlah tubulus seminiferus yang diamati. Hasil penelitian akan lebih baik lagi jika pengamatan jumlah lapang pandang dan jumlah tubulus seminiferus ditambah lagi.

