

ASTAXANTHIN MENGHAMBAT PENURUNAN JUMLAH SEL LEYDIG DAN KADAR TESTOSTERON PADA TIKUS WISTAR JANTAN YANG DIPAPAR DENGAN ASAP ROKOK

Andrew Lie¹, Wimpie Pangkahila², L.P. Iin Indrayani Maker³

¹Program Studi Magister Biomedis, Anti-aging Medicine, Fakultas Kedokteran Universitas Udayana, Bali, Indonesia. e-mail : dktrandrewl89@gmail.com

²Departemen Andrologi dan Seksologi, Fakultas Kedokteran Universitas Udayana, Bali, Indonesia. e-mail : wimpie.pangkahila@gmail.com

³Departemen Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran Universitas Udayana/Rumah Sakit Umum Pusat Sanglah, Bali, Indonesia. e-mail : iinindrayani1975@gmail.com

Abstrak

Latar belakang. Astaxanthin diketahui dapat menetralkan radikal bebas dari paparan asap rokok yang dapat berdampak negatif pada jumlah sel Leydig dan kadar testosteron.

Tujuan penelitian. Mengetahui efek astaxanthin dalam menghambat penurunan jumlah sel Leydig dan kadar testosteron pada tikus Wistar jantan yang dipapar asap rokok.

Metodologi. Rancangan penelitian *post test only control group* dilakukan pada 36 ekor tikus Wistar jantan umur 12-16 minggu dengan berat badan 200-210 gram. Sampel dibagi secara acak menjadi dua kelompok, yaitu kelompok kontrol yang diberi paparan asap rokok dan 0,5 ml aquadest serta kelompok studi yang diberi paparan asap rokok dan 0,1 mg astaxanthin /200 gr BB setiap hari selama 30 hari. Pada hari ke 31, sampel darah diambil untuk mengukur kadar testosteron. Kedua testis diambil untuk penilaian jumlah sel Leydig. Analisis komparatif dilakukan untuk melihat perbedaan yang signifikan antara kelompok studi dan kelompok kontrol.

Hasil penelitian. Rata-rata jumlah sel Leydig dan kadar testosteron pada kelompok studi secara signifikan lebih tinggi daripada kelompok kontrol ($p < 0,01$).

Kesimpulan. Pemberian astaxanthin oral menghambat penurunan jumlah sel Leydig dan kadar testosteron pada tikus Wistar jantan yang terpapar asap rokok.

Kata kunci : astaxanthin, testosteron, sel leydig, andropause

Abstract

Background. The exposure of cigarette smoke impacts negatively on Leydig cell count and testosterone level. Astaxanthin is known for its ability to neutralize free radicals far more potent than any other kind of antioxidant.

Research objectives. This research aims to prove the effect of Astaxanthin in inhibiting decrease of Leydig cell count and testosterone level in male Wistar rats exposed with cigarette smoke.

Methodology. The posttest only control group study design was conducted on 36 male Wistar rats, 12-16 weeks in age, with 200-210 grams body weight. Samples were randomly divided into two groups, consisting of a control group exposed with cigarette smoke and 0.5 ml of aquadest and a study group exposed with cigarette smoke and 0.1 mg of astaxanthin/200 gr BW daily for 30 days. On day 31, blood samples were taken to measure the testosterone level. Both testes were taken for Leydig cells count assessment. Comparative analysis was done to see any significant difference between the study and control group.

Research results. The results show that the mean number of Leydig cells and testosterone levels in the study group was significantly higher than the control group ($p < 0.01$).

Conclusion. Oral astaxanthin administration inhibited the decrease of Leydig cell count and testosterone level in male Wistar rats exposed with cigarette smoke.

Key words: astaxanthin, testosterone, leydig cell, andropause

Pendahuluan

Merokok telah diketahui berdampak buruk pada penyakit tidak menular, diantaranya menyebabkan penurunan kadar testosteron. Paparan zat beracun dari asap rokok akan merusak jaringan testis. Nikotin, kotinin, dan benzo(a) pyrene yang terkandung dalam rokok sangat beracun dan mutagenik. Nikotin adalah komponen aktif alkaloid dari rokok yang menyebabkan toksisitas pada testis, sehingga menghambat sintesis testosteron, dan telah terbukti menyebabkan apoptosis sel Leydig. Selain itu, nikotin juga meningkatkan kerusakan peroksidatif yang akan menghambat pelepasan *Follicle-Stimulating Hormone* (FSH) dan *Luteinizing Hormone* (LH), sehingga stimulasi sel Leydig berkurang.¹ Studi yang dilakukan oleh He (2016), Kanwal (2016), dan He (2017) menyatakan bahwa nikotin dapat menyebabkan penurunan jumlah sel Leydig dan memicu apoptosis jaringan testis.²⁻⁴ Dalam penelitian yang dilakukan oleh Widhiantara (2010), ditemukan bahwa tikus yang terpapar asap rokok mengalami penurunan yang signifikan dalam jumlah sel Leydig.⁵ Kandungan logam cadmium (Cd) dan nikel (Ni) dalam asap rokok juga akan menyebabkan gangguan pada enzim

adenylyl cyclase yang berperan dalam steroidogenesis.⁶

Radikal bebas adalah spesies molekul dengan elektron yang tidak berpasangan pada orbital atom terluarnya dan sangat reaktif terhadap molekul lain yang ada di sekitarnya. Jumlah radikal bebas yang terlalu banyak di dalam tubuh akan menyebabkan kondisi stres oksidatif yang dapat merusak struktur dan fungsi sel.⁷ Beberapa contoh radikal bebas eksogen adalah asap rokok, polusi udara, obat-obatan, bahan tambahan makanan dan sinar ultraviolet.⁸ Menurunnya sel Leydig dan kadar testosteron akibat paparan kronis asap rokok akan menyebabkan defisiensi testosteron pada pria, yang membuat pria masuk ke fase andropause. Kondisi ini akan bermanifestasi dalam berbagai gejala seperti perubahan komposisi tubuh, kehilangan minat hidup, penurunan kognitif dan disfungsi seksual yang berakibat pada rendahnya produktivitas dan kualitas hidup. Diperkirakan terdapat 24,7 juta kasus andropause di Indonesia pada tahun 2020.

Antioksidan adalah modalitas yang dapat digunakan untuk melawan efek berbahaya dari radikal bebas pada tubuh manusia.^{10,11} Astaxanthin merupakan antioksidan super dari golongan karotenoid dengan struktur unik dan potensi tinggi. Astaxanthin memiliki kapasitas antioksidan

10 kali lipat dibandingkan dengan β -karoten. Efektivitasnya 100-500 kali lebih baik daripada vitamin E. Dalam penelitian Somoyani (2011), Astaxanthin terbukti dapat mencegah gangguan spermatogenesis pada mencit yang diinduksi oleh *overtraining* dan juga memiliki keunggulan tidak menjadi pro-oksidan seperti beberapa antioksidan lainnya.¹³

Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan efek Astaxanthin oral dalam menghambat penurunan jumlah sel Leydig dan kadar testosteron pada tikus Wistar jantan (*Rattus norvegicus*) yang terpapar asap rokok sebagai sumber radikal bebas. Dengan penelitian ini diharapkan dapat menjadi dasar untuk merekomendasikan Astaxanthin oral sebagai antioksidan pilihan dalam menangkal efek buruk radikal bebas. Secara khusus, Astaxanthin oral diharapkan dapat menghambat defisiensi testosteron pada pria yang merupakan salah satu faktor penuaan dini yang akan menurunkan kualitas hidup dan produktivitas seseorang.

Bahan dan Metode

Penelitian eksperimental dengan desain *post test only control group* dilakukan pada populasi tikus Wistar jantan usia 12-16 minggu dengan berat badan 200-210 gram. Dari kriteria populasi yang sesuai, 36 ekor tikus diambil berdasarkan

perhitungan rumus Federer. Sampel dipisahkan secara acak menjadi dua kelompok yaitu kelompok studi dan kelompok kontrol yang masing-masing terdiri dari 18 ekor tikus. Komite Etik Kelembagaan menyetujui semua protokol percobaan di Universitas Udayana, Bali, Indonesia (NO: 1599/UN14.2.2. VII. 14/LT/2020).

Kelompok studi diberi Astaxanthin dengan dosis 0,1 mg/200g BB/hari dilarutkan dengan *tween* 3% dan akuades dengan volume 0,5 cc. Kelompok kontrol diberi plasebo dalam akuades sebanyak 0,5 cc/200 gr BB/hari. Astaxanthin dan plasebo diberikan melalui sonde oral satu jam sebelum dipapar asap rokok selama 3 jam/hari, selama 30 hari. Pada hari ke 31, subjek dibius, dan darah diambil (1cc) menggunakan mikropipiler dari kantung medial sinus orbital untuk mengukur kadar testosteron. Kemudian subjek dieutanasia dengan dekapitasi, kedua testis dibedah dan diolah menjadi slide dengan pewarnaan hematoksilin-eosin untuk menghitung jumlah sel Leydig.

Interxanthin 4 mg dalam bentuk licaps mengandung Astaxanthin murni 4 mg diproduksi oleh PT. Interbat. Dosis yang diberikan pada mencit diperoleh dari konversi dosis anjuran untuk manusia yaitu 0,1 mg/kgBB/hari. Dosis tersebut dikalikan

dengan faktor konversi 6.2 yang diperoleh dari tabel konversi Nair dan Jacob (2016) sehingga diperoleh: 0.62 mg/kg berat badan tikus/hari. Jumlah tersebut dibagi lima sehingga dosis untuk tikus dengan 200 gr BB adalah 0,1 mg/hari untuk kelompok penelitian. Paparan asap rokok adalah pemberian asap rokok di kandang tikus untuk mengekspos tikus dengan asap rokok. Satu batang rokok akan habis dalam waktu 15 menit, kemudian dibiarkan di dalam kandang selama 3 jam/hari selama 30 hari. Setelah 3 jam, asap rokok akan dipompa keluar dengan alat agar udara di dalam kandang bersih dari asap. Rokok yang digunakan dalam penelitian ini adalah rokok Sampoerna Hijau yang mengandung 38 mg TAR dan 2,3 mg nikotin per batang.

Kadar testosteron (nmol/mL) diukur dengan metode ELISA menggunakan spektrofotometer 450 nm. Jumlah sel Leydig (sel) diperoleh dengan mengamati preparat histopatologi jaringan testis kanan dan kiri yang diwarnai dengan metode pewarnaan Hematoksin-Eosin (HE). Kemudian sel Leydig dihitung menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400X pada lima bidang pandang acak di setiap testis, kemudian dirata-ratakan. Analisis data menggunakan uji komparatif dilakukan untuk membandingkan kadar testosteron dan jumlah sel Leydig pada kelompok studi dan

kontrol. Analisis data dilakukan dengan SPSS ver 23 (IBM, Statistics).

Hasil Penelitian

Pada akhir penelitian, satu ekor tikus pada kelompok kontrol mati, sehingga hanya 17 ekor tikus pada kelompok kontrol sedangkan 18 ekor tikus tetap dalam kondisi baik pada kelompok studi. Hasil deskriptif menunjukkan bahwa rata-rata jumlah sel Leydig dan kadar testosteron pada kelompok studi lebih tinggi daripada kelompok kontrol (Tabel 1). Analisis komparatif dengan uji-t independen menunjukkan bahwa perbedaan jumlah sel Leydig dan kadar testosteron signifikan antara kelompok studi dan kontrol.

Gambar 1 menunjukkan gambaran histologis sel Leydig pada penelitian dan kelompok kontrol. Pembesaran 400x digunakan pada pencitraan. Gambar menunjukkan bahwa jumlah sel Leydig pada kelompok studi ditemukan lebih tinggi daripada kelompok kontrol.

Pembahasan

Menurut penelitian Isdadiyanto dan Tana (2019), jumlah normal sel Leydig pada tikus Wistar berkisar antara $13,70 \pm 2,65$ sel. Sedangkan pada penelitian ini rata-rata jumlah sel Leydig pada kelompok kontrol yang terpapar asap rokok selama 30 hari adalah $2,72 \pm 0,529$ sel. Kadar testosteron

normal tikus Wistar jantan dalam studi oleh Akmal et al. (2015) sebesar $11,66 \pm 4,825$ nmol/mL, sedangkan kadar testosteron serum tikus kontrol pada penelitian ini adalah $4,74 \pm 0,408$ nmol/mL.¹⁴ Hal ini menunjukkan bahwa paparan asap rokok selama 30 hari menurunkan jumlah sel Leydig dan serum testosteron pada tikus Wistar jantan.

Hasil uji komparatif menunjukkan perbedaan yang signifikan dalam jumlah sel Leydig dan kadar testosteron antara kelompok studi dan kontrol. Rerata jumlah sel Leydig dan kadar testosteron pada kelompok penelitian lebih tinggi daripada kelompok kontrol, yang dapat diartikan bahwa Astaxanthin oral dapat menghambat penurunan kadar sel Leydig dan testosteron pada tikus Wistar jantan yang terpapar asap rokok selama 30 hari.

Kandungan racun dalam asap rokok menyebabkan stres oksidatif, yang terjadi karena adanya ketidakseimbangan antara *Reactive Oxygen System* (ROS) dan sistem antioksidan tubuh. Kondisi stres oksidatif ini akan mengaktifkan kaskade *mitogen-activated protein kinase* (MAPKs), terutama jalur p38 MAPK, yang berperan penting dalam mengaktifkan nuclear factor kappa B (NF- κ B) dan ekspresi pro-inflamasi. NF- κ B dikenal sebagai salah satu faktor utama yang memperkuat respon inflamasi dan

meningkatkan ekspresi sitokin pro-inflamasi, seperti TNF- α dan IL-6.¹⁵ Astaxanthin sebagai antioksidan poten dapat melindungi testis tikus dari kerusakan stres oksidatif yang ditimbulkan oleh paparan asap rokok. Astaxanthin bertindak sebagai penetral ROS, mengurangi stres oksidatif, dan memulihkan steroidogenesis dalam sel Leydig dengan mencegah penurunan steroidogenic acute regulatory protein (StAR). Protein StAR memainkan peran penting dalam mengangkut kolesterol ke dalam mitokondria sel Leydig. Astaxanthin juga dapat mengembalikan ekspresi protein P450_{scc} dan 3 β -HSD, yang berperan penting dalam steroidogenesis.¹⁶

Penelitian yang dilakukan oleh Leisegang dan Henkel (2018) menyatakan bahwa sitokin proinflamasi seperti TNF α dan IL-6 menyebabkan penurunan steroidogenesis pada sel Leydig.¹⁷ Astaxanthin diketahui dapat menurunkan kadar IL-6 dan menurunkan ekspresi NF- κ B untuk melindungi proses steroidogenesis dari kerusakan asap rokok.¹⁸ Astaxanthin bekerja dengan memblokir translokasi nuclear factor NF- κ B subunit p65 dan degradasi I κ B α , yang berkorelasi dengan penghambatan aktivitas I κ B kinase (IKK). IKK adalah enzim kompleks yang terlibat dalam menanggapi berbagai rangsangan stres eksternal.

Selain sebagai antioksidan eksogen, Astaxanthin juga dapat meningkatkan antioksidan endogen seperti *glutathione*. Beberapa mekanisme dapat menyebabkan peningkatan kadar *glutathione*. Salah satunya adalah aktivasi *Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor (NRF2)*, sebuah regulator yang berperan dalam memodulasi sistem antioksidan tubuh terhadap radikal bebas dan sebagai pemulung ROS.²⁰ Peningkatan kadar *glutathione* akan membantu tubuh melawan kelebihan radikal bebas dan menurunkan stres oksidatif sehingga kerusakan sel Leydig dapat dihambat dan tingkat testosteron dapat dipulihkan.

Kesimpulan dan Saran

Astaxanthin adalah pigmen xantofil karotenoid alami yang banyak ditemukan di alam. Astaxanthin merupakan *super-antioxidant* yang dapat membersihkan radikal bebas, memutus reaksi berantai, memodulasi sistem antioksidan tubuh, memiliki sifat anti inflamasi, dan tidak menjadi pro-oksidan. Astaxanthin memiliki keistimewaan dibandingkan dengan antioksidan lain seperti β -karoten, zeaxanthin, vitamin C, vitamin E. Dengan kemampuannya yang begitu mumpuni, Astaxanthin dapat digunakan sebagai modalitas dalam bidang pengobatan anti

penuaan, yaitu dengan mencegah bahkan membantu memperbaiki keadaan penyakit ke kondisi normal. Hal ini bertujuan agar manusia dapat semakin tua dengan tetap menjaga produktivitas dan kualitas hidup yang baik.

Dalam penelitian ini, terdapat perbedaan yang signifikan pada variabel pemeriksaan antara kelompok kontrol dan kelompok studi. Jumlah sel Leydig dan kadar testosteron pada kelompok studi lebih tinggi daripada kelompok kontrol. Astaxanthin telah terbukti menghambat efek negatif radikal bebas dalam mengurangi jumlah sel Leydig dan kadar testosteron. Hal ini dapat menjadi dasar untuk melakukan uji klinis pada pria untuk mengetahui manfaat pemberian astaxanthin oral dalam menghambat penurunan jumlah sel Leydig dan kadar testosteron yang disebabkan oleh paparan asap rokok.

Ucapan Terima Kasih

Penulis ingin menyampaikan terima kasih khususnya kepada dr. IGKN Arijana, M.Si yang telah banyak membantu dalam proses pembuatan dan menginterpretasikan preparat histopatologi dalam penelitian ini.

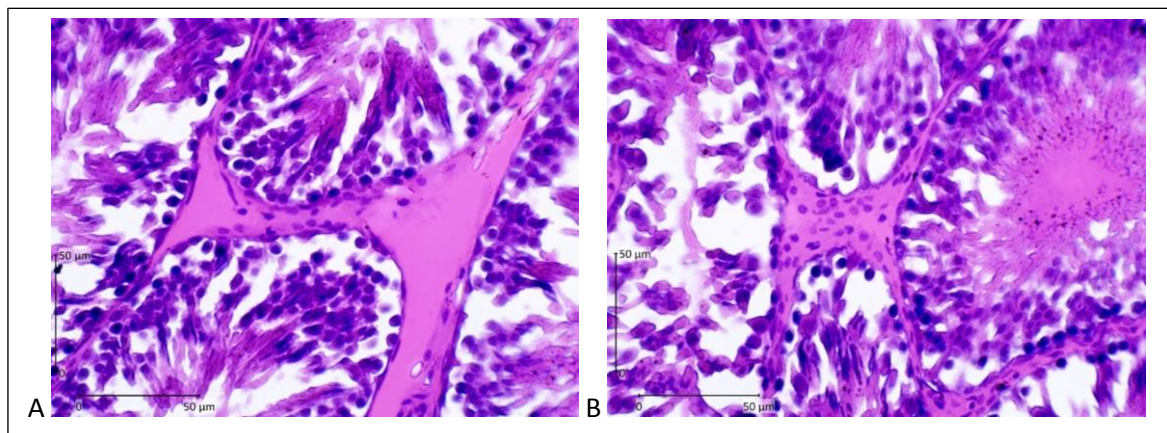
Daftar Pustaka

1. Sobhani B, Roomiani S, Ahmadi Z, et al. Histopathological analysis of testis: effects of astaxanthin treatment against

- nicotine toxicity. *Iran J Toxicol* 2019; 13: 41–44.
2. He L, Gong H, Zhang J, et al. Interaction of exposure concentration and duration in determining the apoptosis of testis in rats after cigarette smoke inhalation. *Saudi J Biol Sci* 2016; 23: 531–541.
 3. He L, You S, Gong H, et al. Cigarette smoke induces rat testicular injury via mitochondrial apoptotic pathway. *Mol Reprod Dev* 2017; 84: 1053–1065.
 4. Kanwal S, Ameer MK, Mehboob F. Toxic effect of nicotine on leydig cell count & testosterone levels in adult albino mice & its protection by date palm pit powder. *Pak J Med Heal Sci* 2016; 10: 1356–9.
 5. Widhiantara IG, Rosiana IW. Terapi testosteron dan LH (Luteinizing Hormone) meningkatkan jumlah sel Leydig mencit (*Mus musculus*) yang menurun akibat paparan asap rokok. *VIRGIN J Ilm Kesehat Dan Sains* 2016; 1 (1).
 6. Anita N. Perubahan sebaran stadia epitel seminiferus, penurunan jumlah sel-sel spermatogenik dan kadar hormon testosteron total mencit (*Mus musculus* L) Galur DDY yang diberi asap rokok kretek. *Journal Universitas Indonesia* 2004; 9-10.
 7. Soewondo, P. 2006. Menopause, Andropause, dan Somatopause: Perubahan Hormonal Pada Proses Menua. In: Sudoyo, A.W. (eds). *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam Jilid III Edisi IV*. Jakarta: FKUI, hal:1989-1992.
 8. Myke-Mbata BK, Meludu SC, Dioka CE. Antioxidant Supplementation and Free Radicals Quelling; the Pros and Cons. *J Adv Med Med Res* 2018; 1–13.
 9. Keshari AK, Srivastava A, Upadhayaya SR, et al. Antioxidant and free radicals scavenging activity of medicinal plants. *J Pharmacogn Phytochem* 2018; 7: 1499–1504.
 10. Yuan J-P, Peng J, Yin K, et al. Potential health-promoting effects of astaxanthin: A high-value carotenoid mostly from microalgae. *Mol Nutr Food Res* 2011; 55: 150–165.
 11. Somoyani NK. Astaxanthin oral mempertahankan jumlah sel spermatogenik mencit yang mengalami aktivitas fisik maksimal. *J Skala Husada* 2012; 16.
 12. Akmal M, Adam M, Toras M, et al. Pengaruh pemberian ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica* (L.) urban) terhadap konsentrasi testosteron pada tikus putih jantan (*rattus norvegicus*). *J Med Vet*; 9.
 13. Yang X, Guo A-L, Pang Y-P, et al. Astaxanthin attenuates environmental tobacco smoke-induced cognitive deficits: a critical role of p38 MAPK. *Mar Drugs* 2019; 17: 24.
 14. Wang J-Y, Lee Y-J, Chou M-C, et al. Astaxanthin protects steroidogenesis from hydrogen peroxide-induced oxidative stress in mouse Leydig cells. *Mar Drugs* 2015; 13: 1375–1388.
 15. Leisegang K, Henkel R. The in vitro modulation of steroidogenesis by inflammatory cytokines and insulin in TM3 Leydig cells. *Reprod Biol Endocrinol* 2018; 16: 1–11.
 16. Chen Z, Xiao J, Liu H, et al. Astaxanthin attenuates oxidative stress and immune impairment in D-galactose-induced aging in rats by activating the Nrf2/Keap1 pathway and suppressing the NF-κB pathway. *Food Funct* 2020; 11: 8099–8111.
 17. Priyadarshini L, Aggarwal A. Astaxanthin inhibits cytokines production and inflammatory gene expression by suppressing IκB kinase-dependent nuclear factor κB activation in pre and postpartum Murrah buffaloes during different seasons. *Vet World* 2018; 11: 782.



18. Halim A, Handini M, Armyanti I, et al. The Effect of Astaxanthin on Glutathione Levels in Damaged Liver Tissues of Male Wistar Rats Induced By Oral Formaldehyde. *KnE Life Sci* 2019; 147–154.



Gambar 1 (A) Gambaran jumlah sel Leydig pada Kelompok Kontrol. (B) Gambaran jumlah sel Leydig pada Kelompok Studi. (Objektif 400X)

Tabel 1, Analisis Perbandingan Jumlah Sel Leydig dan Kadar Testosteron Antar Kelompok

Variabel	Kelompok (Rerata±SB)		p-value
	Kontrol (n=17)	Studi (n= 18)	
Sel Leydig (sel)	2,72 ± 0,529	3,52 ± 1,01	0.006
Kadar Testosteron (nmol/mL)	4,74 ± 0,408	9,73 ± 0,444	<0.001