

TESIS

**POTENSI VITAMIN E TERHADAP JUMLAH SEL
SPERMATOGENIK, DIAMETER TUBULUS
SEMINIFERUS DAN KADAR TESTOSTERON
PADA MENCIT YANG TERPAPAR
2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)
PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS**



Oleh

WAODE KARMILA WATI
061141005

**PROGRAM MAGISTER ILMU BIOLOGI REPRODUKSI
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2013**

**POTENSI VITAMIN E TERHADAP JUMLAH SEL
SPERMATOGENIK, DIAMETER TUBULUS
SEMINIFERUS DAN KADAR TESTOSTERON
PADA MENCIT YANG TERPAPAR
2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)
PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS**

TESIS
Untuk Memperoleh Gelar Magister
Dalam Program Studi Ilmu Biologi Reproduksi
Pada Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Airlangga
Suarabaya

Oleh

WAODE KARMILA WATI
061141005

PROGRAM MAGISTER ILMU BIOLOGI REPRODUKSI
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2013

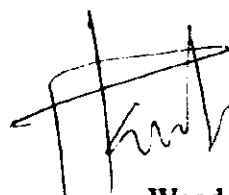

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam Tesis yang berjudul:

**Potensi Vitamin E terhadap Jumlah Sel Spermatogenik, Diameter Tubulus
Seminiferus dan Kadar Testosteron pada Mencit yang Terpapar
*2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)***

tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar Magister di suatu perguruan tinggi dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Surabaya, 22 Juli 2013

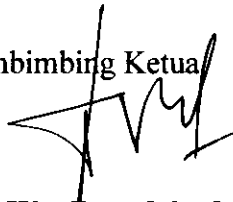

**METERAI
TEMPEL**
PALANG NEGARA RI 20
0003AABF435281304
6000 
Waode Karmila wati
NIM . 061141005

Lembar Pengesahan

TESIS INI TELAH DISETUJUI
Tanggal 22 Juli 2013

Oleh:

Pembimbing Ketua



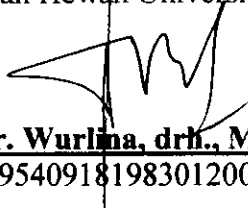
(Prof. Dr. Wurlina, drh., M.S.)
NIP. 195409181983012001

Pembimbing



(Prof. Dr. H. Sarmanu, M.S., drh)
NIP. 195204071979011001

Mengetahui,
Ketua Program Studi Ilmu Biologi Reproduksi
Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga



(Prof. Dr. Wurlina, drh., M.S.)
NIP. 195409181983012001

Usulan Penelitian Tesis ini telah diuji dan dinilai pada:

Tanggal : 16 Juli 2013

PANITIA PENGUJI TESIS

Ketua	: Dr. Suherni Susilowati, drh., M.Kes.
Sekretaris	: Dr. Widjiati, drh., M.Si.
Anggota	: Dr. Eduardus Bimo Aksono, drh., M.Kes.
	: Prof. Dr. Wurlina, drh., MS.
	: Prof. Dr. Sarmanu, drh., MS.

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur kehadirat Allah SWT atas segala karunia dan rahmatNya yang telah dilimpahkan sehingga penulis dapat melaksanakan dan menyelesaikan penelitian dengan judul **Potensi Vitamin E terhadap Jumlah Sel Spermatogenik, Diameter Tubulus Seminiferus dan Kadar Testosteron pada Mencit yang Terpapar 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)**

Pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan terima kasih kepada:

Papa Drs. Kaomu Ode Aesa dan Mama Wa Ode Ilawa yang telah memberikan segalanya, bantuan doa, dorongan dan semangat.

Prof. Dr. Wurlina, drh., MS. selaku pembimbing utama dan Prof. Dr. Sarmanu, drh., MS. sebagai pembimbing, yang telah memberikan banyak saran dan masukan, serta membimbing dan memberi semangat selama masa penelitian sampai dengan selesainya tesis ini.

Dr. Widjiati, drh., M.Si. sebagai sekretaris penguji, yang telah memberikan saran dan masukan, serta kesempatan dan fasilitas penelitian di Laboratorium Embriologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Dr. Suherni Susilowati, drh., M.Kes. sebagai ketua penguji dan Dr. Eduardus Bimo Aksono, drh., M.Kes. sebagai anggota penguji yang telah bersedia meluangkan waktu untuk membimbing, menguji dan menilai, serta memberikan saran dan kritik pada penulisan tesis ini.

Semua dosen pengajar di program Magister Ilmu Biologi Reproduksi atas masukan dan wawasan ilmu kepada penulis.

Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Prof. Hj. Romziah Sidik, drh., Ph.D. atas kesempatan mengikuti pendidikan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga

Seluruh keluarga besar, staf pengajar dan laboratorium Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga atas wawasan keilmuan kepada penulis.

Adik-adik: Wa Ode Nining Kartini, SE., La Ode Hardin Wijaya dan La Ode Mahadir Muhammad atas semangat yang diberikan untuk terselesainya penelitian dan penulisan tesis ini.

Tim dan Sahabat selama penelitian: Drh. Rosida Achlis dan Drh. Ajeng Erika yang telah memberikan dukungan dan semangat serta kerjasama sampai terselesainya penelitian dan penulisan tesis ini.

Sahabat program studi Magister Ilmu Biologi Reproduksi angkatan 2011, Drh. Yayuk, Drh. Yudit, Drh. Intan, Drh Rahmalia, Drh. Muharti, Drh Indra, Drh. Novia, Drh. Kartika, Drh. Trendy dan Drh Kamal, atas dukungan, semangat dan suasana kebersamaan selama masa tesis, mulai penelitian sampai terselesainya penulisan tesis ini.

Semua pihak yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan tesis ini masih terdapat banyak kekurangan. Oleh karena itu, saran dan kritik sangat diharapkan demi kesempurnaan proses penulisan tesis ini. Semoga tesis ini dapat memberikan manfaat bagi penulis dan pembaca sekalian.

Surabaya, 22 Juli 2013

Penulis

Potential of Vitamin E on Spermatogenic Cell Number, Tubulus Seminiferus Diameter and Testosterone Level in mice treated with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)

Waode Karmila Wati

ABSTRACT

The purpose of this study was to investigate the effects of vitamin E on spermatogenic cell number, tubulus seminiferus diameter and testosterone level in mice treated with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). Five experimental groups of a combination of TCDD and vitamin E were designed as follows: 0 ng/kg/d and 0 mg/kg/d (control negative group P0), 100 ng/kg/d and 0 mg/kg/d (control positive group, P1), 100 ng/kg/d and 11 mg/kg/d (Group P2), 100 ng/kg/d and 20 mg/kg/d (Group P3), and 100 ng/kg/d and 37 mg/kg/d (Group P4) respectively. Vitamin E and TCDD were given by oral gavage for 5 weeks. The results demonstrated that TCDD increased the levels of serum testosterone and decreased spermatogenic cell number and tubulus seminiferus diameter. Vitamin E at 11 mg/kg/d and 37 mg/kg/d alleviated the increase of serum testosterone; vitamin E at 37 mg/kg antagonized the decline of spermatogenic cell number; vitamin E at 37 mg/kg reversed the decrease of tubulus seminiferus diameter. The results indicate that vitamin E antagonizes the reproductive endocrine toxicity and alleviates the changes in spermatogenesis caused by TCDD.

Keywords: Vitamin E, mice, reproductive hormone, spermatogenic cell number, tubulus seminiferus, 2,3,7, 8-tetrachlorodibenzo-p-Dioxin

DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL DALAM.....	ii
PRASYARAT GELAR	iii
PERNYATAAN.....	iv
PERSETUJUAN	v
PENETAPAN PANITIA PENGUJI	vi
UCAPAN TERIMAKASIH.....	vii
ABSTRAK	ix
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR TABEL.....	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG	xviii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Permasalahan.....	4
1.3. Tujuan.....	4
1.4 Manfaat	5
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1 Dioksin	7
2.2 Aktivitas Dioksin pada Sistem Reproduksi.....	11
2.3 Vitamin E	21
2.4 Aktivitas Vitamin E pada Sistem Reproduksi.....	29
2.5 Mencit.....	33
2.5.1 Klasifikasi mencit.....	34
2.5.2 Deskripsi Fisik Spesies <i>Mus musculus</i>	34
2.5.3 Reproduksi mencit jantan.....	34
2.6 Spermatogenesis.....	41
2.5.1 Tahap Spermatogenesis.....	42
2.5.2 Mitosis	47
2.5.3 Meiosis	47
2.5.4 Spermiogenesis	48
2.5.5 Siklus dan Gelombang Spermatogenesis	49
2.6 Regulasi Hormonal dalam Spermatogenesis.....	52
2.6.1 Kendali Androgen terhadap Perkembangan Sel Germinal.....	56
2.6.2 Mediator Reseptor Androgen	58
2.7 Testosteron	59
2.7.1 Struktur Kimia Testosteron	59
2.7.2 Biosintesis Testosteron.....	59
2.7.3 Mekanisme Testosteron Pada Spermatogenesis.....	62
2.8 Sistem Antioksidan dan Stres Oksidatif pada Testis.....	63

BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS	68
3.1 Kerangka Konseptual	68
3.2 Hipotesis	71
BAB 4 MATERI DAN METODE	73
4. 1 Jenis dan Rancangan Penelitian	73
4.2 Populasi, Besar Sampel dan Teknik Pengambilan Sampel	75
4.3 Variabel Penelitian	76
4.3.1 Klasifikasi Variabel	76
4.3.2 Definisi Operasional	77
4.4 Bahan Penelitian	79
4.5 Instrumen Penelitian	80
4.6 Lokasi dan Waktu Penelitian	81
4.7 Prosedur Pengambilan dan Pengumpulan Data	81
4.7.1 Penentuan Dosis Vitamin E	81
4.7.2 Penentuan Dosis TCDD	83
4.7.3 Pembuatan Larutan Uji	83
4.7.4 Tahap Persiapan Hewan Coba	84
4.7.5 Tahap Perlakuan	84
4.7.6 Teknik Pengambilan Darah dan Jaringan Testis	85
4.7.7 Metode Pengukuran Testosteron Serum	86
4.7.8 Pembuatan Sediaan Histopatologi Hematoksilin – Eosin (HE)	86
4.7.9 Kuantifikasi Diameter Tubulus Seminiferus Sediaan Histopatologi HE	88
4.7.10 Kuantifikasi Jumlah Sel Spermatogenik Sediaan Histopatologi HE	88
4.8 Analisis Data	89
4.9 Bagan Kerangka Operasional	90
BAB 5 ANALISIS HASIL PENELITIAN	91
5.1 Kadar Hormon Testosteron	91
5.2 Diameter Tubulus Seminiferus	94
5.3 Jumlah Sel Spermatogenik	96
5.3.1 Jumlah Spermatogonium	98
5.3.2 Jumlah Spermatisit I dan II	100
5.3.3 Jumlah Spermatisid	102
5.3.4 Jumlah Spermatozoa	103
BAB 6 PEMBAHASAN	107
6.1 Potensi Vitamin E terhadap Kadar Testosteron pada Mencit yang Terpapar 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)	108
6.2 Potensi Vitamin E terhadap Diameter Tubulus Seminiferus pada Mencit yang Terpapar 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin	113
6.3 Potensi Vitamin E terhadap Jumlah sel spermatogenik pada Testis Mencit yang Terpapar 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin	115

BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN.....	127
7.1 Kesimpulan.....	127
7.2 Saran.....	127
DAFTAR PUSTAKA	129
LAMPIRAN	143

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
Tabel 5.1 Rerata kadar hormon testosteron mencit pada kelompok kontrol negatif (P0), positif (P1) dan kombinasi TCDD dengan Vitamin E dosis 11, 20 dan 37 mg/kg/hari (P2, P3, P4)	92
Tabel 5.2 Rerata diameter tubulus seminiferus mencit kelompok kontrol negatif (P0), kontrol positif (P1) dan perlakuan kombinasi TCDD dengan Vitamin E dosis 11, 20 dan 37 mg/kg/hari (P2, P3, P4)	95
Tabel 5.3 Rerata jumlah sel spermatogonium pada mencit kelompok kontrol negatif (P0), kontrol positif (P1) dan perlakuan kombinasi TCDD dengan Vitamin E dosis 11, 20 dan 37 mg/kg/hari (P2, P3, P4)	98
Tabel 5.4 Rerata jumlah sel spermatosit I dan II pada mencit kelompok kontrol negatif (P0), kontrol positif (P1) dan perlakuan kombinasi TCDD dengan Vitamin E dosis 11, 20 dan 37 mg/kg/hari (P2, P3, P4)	100
Tabel 5.5 Rerata jumlah sel spermatid pada mencit kelompok kontrol negatif (P0), kontrol positif (P1) dan perlakuan kombinasi TCDD dengan Vitamin E dosis 11, 20 dan 37 mg/kg/hari (P2, P3, P4).....	102
Tabel 5.6 Rerata jumlah spermatozoa bulat pada mencit kelompok kontrol negatif (P0), kontrol positif (P1) dan perlakuan kombinasi TCDD dengan Vitamin E dosis 11, 20 dan 37 mg/kg/hari (P2, P3, P4).....	104

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
Gambar 2.1 Sumber emisi dioksin	8
Gambar 2.2 Struktur kimia dari <i>2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin</i>	9
Gambar 2.3 Mekanisme aksi toksistas dioksin	15
Gambar 2.4 Mekanisme aksi TCDD mengarah pada reaksi oksigen spesies (ROS)	18
Gambar 2.5 Model ROS yang disebabkan oleh kontaminan lingkungan terhadap reproduksi jantan.....	20
Gambar 2.6 Perbedaan struktur keluarga vitamin E senyawa <i>tochopherol</i> dan <i>tocotrienol</i>	22
Gambar 2.7 Struktur kimia <i>alpha tocopherol</i>	23
Gambar 2.8 Mekanisme antioksidan <i>Alpha-tocopherol</i> terhadap radikal bebas pada membran sel	24
Gambar 2.9 Keberadaan tokoferol pada membran sel.....	25
Gambar 2.10 Aktivitas antioksidan <i>Alpha-tocopherol</i> selama proses peroksidasi lipid	28
Gambar 2.11 Gambaran histologi tubulus seminiferus menunjukkan berbagai tipe sel spermatogenik.	40
Gambar 2.12 Potongan melintang tubulus seminiferus pada spesies mamalia.	43
Gambar 2.13 Spermatogenesis pada epitel seminiferus tikus (tadium I-XII)	44
Gambar 2.14 Spermatogenesis secara umum pada mamalia.	52
Gambar 2.15 Diagram kontrol hormonal pada spermatogenesis.....	55
Gambar 2.16 Struktur formula dari testosteron	59
Gambr 2.17 Komponen utama steroidogenesis pada mencit	61
Gambar 2.18 Jalur utama generasi spesies oksigen reaktif	65
Gambar 3.1 Bagan kerangka konseptual	72

Gambr 4.1 Rancangan Penelitian.....	74
Gambar 4.3 Bagan kerangka operasional efek pemberian vitamin E terhadap jumlah sel spermatogenik, diameter tubulus seminiferus dan kadar testosteron serum pada mencit yang terpapar TCDD.....	90
Gambra 5.1 Grafik rerata kadar hormon testosteron serum mencit kelompok kontrol negatif <i>corn oil</i> (P0), kontrol positif TCDD (P1) dan kombinasi TCDD dengan Vitamin E dosis 11, 20 dan 37 mg/kg/hari (P2, P3, P4).....	93
Gambar 5.2 Grafik rerata diameter tubulus seminiferus pada mencit kelompok kontrol negatif <i>corn oil</i> (P0), kontrol positif TCDD (P1) dan kelompok perlakuan kombinasi TCDD dengan Vitamin E dosis 11, 20 dan 37 mg/kg/hari (P2, P3, P4)	96
Gambar 5.3 Grafik rerata jumlah sel spermatogonium pada mencit kelompok kontrol negatif (P0), kontrol positif (P1) dan kelompok perlakuan kombinasi TCDD dengan Vitamin E dosis 11, 20 dan 37 mg/kg/hari (P2, P3, P4).....	99
Gambar 5.4 Grafik rerata jumlah sel spermatosit I dan II pada mencit kelompok kontrol negatif (P0), kontrol positif (P1) dan kelompok perlakuan kombinasi TCDD dengan Vitamin E dosis 11, 20 dan 37 mg/kg/hari (P2, P3, P4).....	101
Gambar 5.5 Grafik jumlah sel spermatid pada mencit kelompok kontrol negatif (P0), kontrol positif (P1) dan kelompok perlakuan kombinasi TCDD dengan Vitamin E dosis 11, 20 dan 37 mg/kg/hari (P2, P3, P4).....	103
Gambar 5.6 Grafik jumlah spermatozoa pada mencit kelompok kontrol negatif (P0), kontrol positif (P1) dan kelompok perlakuan kombinasi TCDD dengan Vitamin E dosis 11, 20 dan 37 mg/kg/hari (P2, P3, P4).....	105
Gambar 5.7 Potensi vitamin E terhadap jumlah sel spermatogenik dan diameter tubulus seminiferus pada mencit (<i>Mus musculus</i>) yang terpapar 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). Preparat histopatologi pewarnaan HE, pembesaran 400x.....	106

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
Lampiran 1. Data pengamatan kadar testosteron, diameter tubulus seminiferus, jumlah spermatogonium, spermatisit I dan II, spermatid dan spermatozoa.....	144
Lampiran 2. Data penghitungan rerata diameter tubulus seminiferus, jumlah spermatogonium, spermatisit I dan II, spermatid dan spermatozoa	146
Lampiran 3. Data penghitungan transformasi jumlah spermatogonium, spermatisit I dan II, spermatid dan spermatozoa	150
Lampiran 4. Data hasil pemeriksaan laboratorium uji kadar hormon testosteron.....	152
Lampiran 5. Analisis uji statistik terhadap kadar hormon testosteron pada mencit kelompok kontrol, perlakuan TCDD dan Vitamin E (<i>α-tocopherol</i>).....	154
Lampiran 6. Analisis uji statistik terhadap diameter tubulus seminiferus mencit kelompok kontrol, perlakuan TCDD dan Vitamin E (<i>α-tocopherol</i>).....	155
Lampiran 7. Analisis uji statistik terhadap jumlah spermatogonium pada mencit kelompok kontrol, perlakuan TCDD dan Vitamin E (<i>α-tocopherol</i>).....	156
Lampiran 8. Analisis uji statistik terhadap jumlah spermatisit I dan II pada mencit kelompok kontrol, perlakuan TCDD dan Vitamin E (<i>α-tocopherol</i>)	157
Lampiran 9. Analisis uji statistik terhadap jumlah spermatid pada mencit kelompok kontrol, perlakuan TCDD dan Vitamin E (<i>α-tocopherol</i>).....	158
Lampiran 10. Analisis uji statistik terhadap jumlah spermatozoa pada mencit kelompok kontrol, perlakuan TCDD dan Vitamin E (<i>α-tocopherol</i>).....	159
Lampiran 11. Gambaran histopatologi organ testis mencit pada kelompok kontrol, perlakuan TCDD dan Vitamin E (<i>α-tocopherol</i>). Pewarnaan HE, pembesaran 100x	160

Lampiran 12. Gambaran makroskopis organ testis mencit pada kelompok kontrol, perlakuan TCDD dan Vitamin E (<i>α-tocopherol</i>). Pewarnaan HE, pembesaran 100x	161
Lampiran 13. Foto dokumentasi penelitian	162
Lampiran 14. Pemeriksaan kadar hormon testosteron menggunakan sistem <i>Immulite® 1000 Total Testosteron (Siemens Immulite systems)</i>	163
Lampiran 15. Foto dokumentasi proses pengujian kadar hormon testosteron	165
Lampiran 16. Pengukuran diameter tubulus seminiferus menggunakan optilab viewer (skala μm).....	167
Lampiran 17. Pengenceran larutan uji dan perhitungan dosis berdasarkan berat badan mencit.....	168
Lampiran 18. Sertifikat kelaikan etik / <i>ethical clearance</i> penelitian	173

SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG

μm	: mikro meter
ABP	: androgen binding protein
AhR	: aromatic hydrocarbon receptor
AR	: androgen receptor
ARNT	: aromatic hydrocarbon nuclear translocator
BTB	: blood testis barrier
cAMP	: cyclic adenosine monophosphate
CYP450	: cytochrome-P450
DRE	: dioxin-responsive enhancer elements
FSH	: follicle stimulating hormone
g	: gram
GnRH	: gonadotropin releasing hormone
HIF1-alpha	: hypoxia-inducible factor 1 alpha
HIF-1 α	: hypoxia-inducible 1 α
LH	: luteinizing hormone
mg/kg/hari	: miligram per kilogram berat badan berat badan perhari
ng/dL	: nano gram per desi liter
pg	: piko gram
POPs	: persistent organic pollutants
PUFA	: polyunsaturated fatty acids (PUFA)
ROS	: reaksi oksidatif spesies
SPSS	: Statistical Product and Service Solutions
SSP	: susunan saraf pusat
TCDD	: 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin
TEFs	: derivation of toxic equivalency factors
TEQ	: Toxic Equivalent
XRE	: xenobiotic responsive enhancer



BAB 1
PENDAHULUAN

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang Penelitian

Senyawa organik persisten (*Persisten organik polutan* (POPs)) beberapa dekade terakhir ini menarik sejumlah perhatian karena menyebabkan pencemaran lingkungan serta masalah kesehatan baik pada manusia maupun hewan (Dobrzyński *et al.*, 2009). Pencemaran yang berasal dari senyawa kimia relatif bersifat resisten atau tahan terhadap degradasi secara fisik dan metabolik, sehingga disebut sebagai senyawa kimia persisten. Salah satu senyawa persisten ini adalah dioksin yang dikeluarkan sebagai hasil samping industri, pembakaran ataupun sumber lainnya. Sumber dioksin tidak saja terjadi dari industri atau insenerator, tetapi dapat terjadi melalui pembakaran bahan yang mengandung klor seperti limbah bahan organik dan produk kertas (Warlina dkk., 2008).

Estimasi total emisi dioksin/furan di Indonesia pada tahun 2000 mencapai 21.126g TEQ (*Toxic Equivalent*). Sumber pencemaran ini berasal dari pembangkit tenaga listrik dan pemanasan (66%), industri pulp dan kertas (21%), pembakaran tak terkendali (7,7%), industri logam besi dan non besi (4,5%), sisanya merupakan hasil pembakaran dari industri mineral, transportasi dan tempat pembuangan sampah. Sebesar 71,4% dari total pencemaran yang berasal dari dioksin terbang ke udara. Emisi dioksin di Indonesia bila dihitung paparan perorang perhari, maka telah mencapai 4.686 pg TEQ (Warlina dkk., 2008). Hasil penelitian Universitas Kiel dan *Environmental Protection Agency* (EPA) menunjukkan bahwa secara normal tubuh manusia dewasa dapat menerima dioksin sekitar 1 sampai 10 pg per kilogram berat badan per hari tanpa

membahayakan kesehatan (EPA, 2003). Dioksin dapat melakukan perjalanan dari sumber emisi sehingga dapat terjadi bioakumulasi dalam rantai makanan (WHO, 2010). Badan kesehatan dunia pada tahun 2010 mengungkapkan bahwa paparan dioksin terjadi terutama melalui konsumsi makanan yang terkontaminasi dioksin.

Berdasarkan *derivation of toxic equivalency factors* (TEFs) yang ditetapkan oleh WHO (2010), *2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin* (TCDD) merupakan jenis dioksin yang paling toksik. Selain itu, TCDD adalah standar acuan toksisitas yang digunakan untuk pengukuran toksisitas dioksin lain (Dobrzyński *et al.*, 2009).

TCDD bersifat persisten dan merupakan salah satu kontaminan lingkungan yang tergolong sangat toksik. TCDD bersifat lipofilik, memiliki tingkat metabolisme dan ekskresi yang rendah, sehingga cenderung terakumulasi dalam tubuh (Yin *et al.*, 2012). TCDD memiliki efek toksik multi organ, meliputi gangguan fungsional dan morfologi baik pada manusia maupun hewan. Paparan TCDD dikaitkan dengan berbagai efek toksik, seperti imunotoksik, gangguan saraf, perkembangan, perubahan kelenjar tiroid, hormon steroid dan gangguan fungsi reproduksi (WHO, 2010).

Efek toksik TCDD terhadap sistem reproduksi telah diteliti oleh Latchoumycandane *et al.* (2002) pada model *rat* membuktikan bahwa TCDD dapat menurunkan kadar testosteron serum, mengurangi fertilitas, menekan pertumbuhan dan maturasi spermatozoa. Selain itu, TCDD dapat menghancurkan pertahanan antioksidan pada sistem *chondrosomes* dan *cytomicrosomes* testis, menyebabkan stres oksidatif dan mempengaruhi kemampuan reproduksi hewan

jantan (Latchoumycandane dan Mathur 2002). TCDD memiliki efek antiandrogenik baik pada manusia maupun hewan jantan, dapat mempengaruhi struktur dan fungsi dari testis. TCDD menghambat pertumbuhan dan diferensiasi dari *seminal vesicle epihelium* selama perkembangan postnatal (Hamm *et al.*, 2000), diikuti atropi dan penurunan diameter dari tubulus seminiferus (el-Sabeawy *et al.*, 1998). TCDD juga dapat menyebabkan feminisasi pada mencit jantan dan disfungsi organ reproduksi jantan (Gray *et al.*, 1997).

Studi epidemiologikal menemukan bahwa kadar testosteron serum memiliki korelasi negatif dengan TCDD, jumlah spermatozoa menjadi setengah dari jumlah normal pada pria yang terpapar TCDD secara kronis (Egeland *et al.*, 1994.). Penelitian terbaru yang dilakukan oleh Yin *et al.* (2012) membuktikan bahwa TCDD menyebabkan penurunan jumlah sel spermatozoa dan merusak struktur testis mencit.

Vitamin E adalah vitamin yang larut dalam lemak dan secara fisiologi berperan penting dalam tubuh. Vitamin E tidak hanya efektif sebagai antioksidan dan imunomodulator, tetapi dapat memerangi efek neurotoksik yang disebabkan oleh TCDD (Kim dan Yang, 2005). Penelitian yang dilakukan oleh Yin *et al.* (2012) menyatakan bahwa vitamin E memiliki efek antagonis pada toksisitas endokrin reproduksi dan meminimalkan perubahan struktur testikular akibat TCDD.

Efek vitamin E terhadap reproduksi jantan telah banyak diselidiki pada berbagai spesies. Namun belum banyak yang meneliti efek vitamin E pada reproduksi jantan dan masih sedikit informasi yang tersedia tentang efek vitamin

E pada endokrin reproduksi seperti testosteron, fungsi spermatogenesis dan struktur testis pada hewan yang terpapar TCDD. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk membuktikan efek berbagai dosis vitamin E terhadap mekanisme reproduksi mencit jantan yang terpapar TCDD. Diharapkan vitamin E memberikan efek pendekatan untuk mencegah atau mengurangi toksisitas yang ditimbulkan oleh TCDD.

1.2. Rumusan Permasalahan

1. Apakah pemberian vitamin E dalam berbagai dosis dapat mempertahankan jumlah sel spermatogenik tubulus seminiferus pada mencit yang terpapar 2,3,7,8 *tetrachlorodibenzo-p-dioxin* (TCDD)?
2. Apakah pemberian vitamin E dalam berbagai dosis dapat mempertahankan diameter tubulus seminiferus pada mencit yang terpapar 2,3,7,8 *tetrachlorodibenzo-p-dioxin* (TCDD)?
3. Apakah pemberian vitamin E dalam berbagai dosis dapat mempertahankan kadar testosteron serum pada mencit yang terpapar 2,3,7,8 *tetrachlorodibenzo-p-dioxin* (TCDD)?

1.3. Tujuan

1.3.1. Tujuan Umum

Membuktikan bahwa vitamin E memiliki efek antagonis pada toksisitas endokrin reproduksi, fungsi spermatogenesis dan struktur testis yang disebabkan oleh TCDD pada reproduksi jantan.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Membuktikan bahwa pemberian vitamin E dalam berbagai dosis dapat mempertahankan jumlah sel spermatogenik tubulus seminiferus pada mencit yang terpapar *2,3,7,8 tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)*.
2. Membuktikan bahwa pemberian vitamin E dalam berbagai dosis dapat mempertahankan diameter tubulus seminiferus pada mencit yang terpapar *2,3,7,8 tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)*.
3. Membuktikan bahwa pemberian vitamin E dalam berbagai dosis dapat mempertahankan kadar testosteron serum pada mencit yang terpapar *2,3,7,8 tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)*.

1.4 Manfaat

1.4.1 Manfaat Teoritis

1. Memberikan informasi ilmiah bahwa pemberian vitamin E dapat mempertahankan jumlah sel spermatogenik tubulus seminiferus pada mencit yang terpapar *2,3,7,8 tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)*.
2. Memberikan informasi ilmiah bahwa pemberian vitamin E dapat mempertahankan diameter tubulus seminiferus pada mencit yang terpapar *2,3,7,8 tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)*.
3. Memberikan informasi ilmiah bahwa pemberian vitamin E dapat mempertahankan kadar testosteron serum pada mencit yang terpapar *2,3,7,8 tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)*.

1.4.2 Manfaat Aplikatif

Memberikan informasi tentang khasiat dari vitamin E sebagai antagonis terhadap toksisitas reproduksi yang disebabkan oleh TCDD pada reproduksi jantan.



BAB 2
TINJAUAN PUSTAKA

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

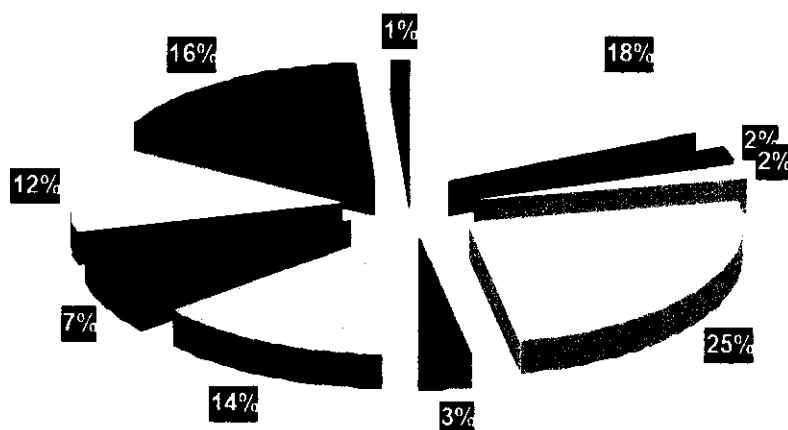
2.1 Dioksin

Produksi ribuan bahan kimia memberikan kontribusi terhadap pengembangan industri dan ekonomi di berbagai belahan dunia. Tren ini dikaitkan dengan bahan kimia dan zat beracun pada lingkungan dan rantai makanan serta memberikan dampak negatif terhadap kesehatan dan banyak hal. Polisiklik aromatik hidrokarbon dalam beberapa penelitian menunjukkan pengaruh pada kemampuan kekebalan dan status fisiologi tubuh (Laupeze *et al.*, 2002). Bahan kimia ini relatif persisten dalam waktu yang lama di lingkungan, dengan demikian sangat mungkin tertransportasi ke daerah lain. Bahan kimia ini disebut *Persistent organic pollutants* (POPs), dikenal mempengaruhi kesehatan manusia, hewan dan keanekaragaman hayati (Ebtakar, 2004). Salah satu bahan kimia yang termasuk kelompok POPs dan merupakan senyawa polisiklik aromatik hidrokarbon adalah *dioxin* (dioksin) (Dobrzyński *et al.*, 2009).

Akumulasi dioksin di lingkungan dapat terjadi secara alami atau sebagai hasil samping pembakaran dan berbagai proses industri. Pembebasan dioksin ke lingkungan masih terjadi dari pembuangan skala besar oleh peralatan dan pembangkit listrik serta limbah. Dioksin berasal dari berbagai hasil samping industri, seperti pembuatan *chlorophenols*, herbisida fenoksi, klorin pemutihan bubuk kertas dan peleburan kertas. Selain itu, dioksin juga dapat dihasilkan oleh peristiwa alam, seperti letusan gunung berapi dan kebakaran hutan. Umumnya, dioksin di udara sangat rendah, kecuali di sekitar area insinerator dan area pembakaran ilegal. Konsentrasi dioksin dalam air minum dan air permukaan

sangat rendah, karena dioksin kurang larut dalam air (Dobrzyński *et al.*, 2009).

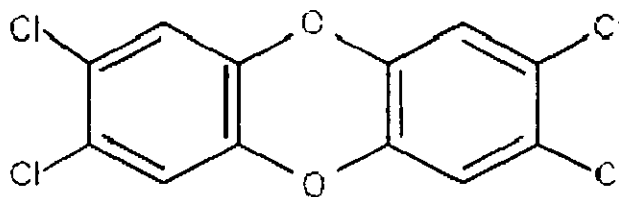
Sumber dioksin di tampilkan pada gambar 2.1.



Gambar 2.1 Sumber emisi dioksin (dalam persentasi). 18% pembakaran limbah industri legal, 2% pembakaran batubara pada kompor rumah tangga, 2% pembakaran batubara industri, 25% daur ulang, 3% transportasi jalan, 14% pembakaran limbah legal, 7% pembakaran limbah industri ilegal, 12% pembakaran limbah rumah sakit, 16% kebakaran, dan 1% lain-lain. (Dobrzyński *et al.*, 2009).

Dioksin yang berada pada limbah akan mencemari tanah dan sedimen perairan, menyebabkan bioakumulasi dan biokonsentrasi melalui rantai makanan. Dioksin memiliki kelarutan lemak tinggi, sehingga terkonsentrasi tinggi dalam makanan berlemak, seperti produk susu, ikan, daging dan kerang. Eksposur utama pada manusia maupun hewan adalah melalui konsumsi makanan yang terkontaminasi (WHO, 2010). Sekitar 90% dari akumulasi dioksin berasal dari makanan. Panjangnya rantai makanan pada hewan memainkan peran penting dalam tingkat dan akumulasi dioksin dalam asupan pakan ternak (Dobrzyński *et al.*, 2009).

Sumber bahan organik yang mengandung klorin akan menghasilkan dioksin misalnya pembakaran limbah, baik limbah domestik, industri dan limbah rumah sakit (WHO, 2010). Senyawa dengan posisi substitusi klorin tertentu, jauh lebih beracun daripada senyawa lain. Menurut *derivation of toxic equivalency factors* (TEFs) dengan membandingkan setiap jenis dioksin, senyawa yang paling toksik adalah *2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin* (TCDD) (WHO, 2010). Struktur kimia TCDD memiliki ikatan rantai klorin ditunjukkan pada gambar 2.2.



Gambar 2.2 Struktur kimia dari *2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin* (TCDD) (Dobrzyński *et al.*, 2009).

Dioksin terakumulasi dalam jaringan lemak tubuh, proses eliminasi dioksin tergantung pada tingkat metabolisme. Periode eliminasi dioksin pada manusia sekitar 9 tahun. Eliminasi senyawa dioksin dari dalam tubuh tergantung pada jumlah atom klorin dioksin. Jumlah dioksin secara signifikan dikeluarkan dari tubuh melalui air susu selama menyusui 50-70 kali lebih tinggi (Dobrzyński *et al.*, 2009).

Efek yang ditimbulkan dioksin meliputi gangguan endokrinologis (Calkosinski *et al.*, 2004) gangguan respon kekebalan tubuh khususnya faktor inflamasi (weisglas *et al.*, 2000), gangguan kardio-vaskular (Calkosinski *et al.*,

2005), yang disebabkan oleh stres oksidatif dan terjadi *cardiotoxicity* sampai hipertrofi jaringan ikat. Gangguan fungsi dan inflamasi paru (Calkosinski *et al.*, 2005). Dioksin juga dikenal karena menyebabkan involusi perkembangan timus, gangguan pertumbuhan, kerentanan infeksi, hiperpigmentasi dan gangguan fungsi seksual (Eskenazi *et al.*, 2004). Ten *et al.* (2003) menyatakan bahwa prevalensi sumbing dan gangguan neuromotorik pada anak-anak yang tinggal di daerah dengan kontaminasi dioksin yang tinggi sangat meningkat. Resiko lebih tinggi dari paparan dioksin dalam jangka panjang adalah terjadinya kanker (Dobrzyński *et al.*, 2009).

TCDD adalah kontaminan lingkungan yang telah terbukti menghasilkan berbagai efek beracun dan efek biokimia pada eksperimental hewan. Selain itu, TCDD memiliki kemampuan multilinear dalam jangka panjang pada sistem hemopoetik pada sel host yang terpapar, sehingga memiliki efek multiorgan. TCDD menyebabkan sel host hampir kehilangan daya pemulihan (*self recovery*) dalam jangka panjang (Sakai *et al.*, 2003). Dioksin bersifat persisten dalam lingkungan dan terakumulasi tinggi pada tingkat biologi, efek kronis dioksin telah menjadi fokus utama dari toksikologi beberapa studi (Ezdihar *et al.*, 2003).

Penelitian terdahulu membuktikan bahwa dioksin bertindak secara khusus pada sel dengan jalur induksi dan aktivasi ligan transkripsi melalui *Aryl Hydrocarbon Receptor* (AhR). Menurut Ebtakar, (2004) TCDD telah diakui sebagai pasangan yang tepat untuk AhR. Kompleks ikatan AhR dan dioksin mengalami konformasi perubahan dan tertranslokasi ke nukleus (Ebtakar, 2004). Kompleks ini kemudian mengikat elemen dioksin dari DNA, yang menghasilkan

stimulasi gen untuk sitokrom P450, sehingga meningkatkan produksi sitokrom ini. Sitokrom P450 terbentuk dan berpartisipasi dalam proses lanjut metabolisme dioksin (Dobrzyński *et al.*, 2009). Sitokrom merupakan respon yang diekspresikan sistem kekebalan tubuh yang sensitif terhadap TCDD (Doi *et al.*, 2003).

Menurut Doi *et al.* (2003), TCDD mengikat AhR dalam sitoplasma. Komplek ikatan TCDD-AhR setelah tertranslokasi ke inti, selanjutnya akan berheterodimer dengan faktor transkripsi lain, yaitu *arylhydrocarbon receptor nuclear translocator* (ARNT). Kompleks AhR-ARNT kemudian mengikat sekuen DNA spesifik pada urutan *xenobiotic responsive elements* (XRE) dan mengubah ekspresi gen yang paling sensitif yaitu sitokrom P450 1A1 (CYP1A1). Dalam penelitian Doi *et al.* (2003), juga menghitung waktu, dosis dan ketergantungan ekspresi gen CYP1A1 dalam sel limfoid setelah terpapar TCDD secara *in vivo*. TCDD menginduksi CYP1A1 dalam 2 jam setelah paparan TCDD dan induksi mencapai puncaknya pada 4jam. TCDD juga dilaporkan mulai menginduksi kegiatan CYP1A1 dalam 2 jam pada konsentrasi rendah yaitu 0,01 nM, dalam hepatoma mencit. TCDD dikenal secara cepat mengikat AhR tanpa mengubah reseptor pada tingkat mRNA, mekanisme ini mengakibatkan ekspresi CYP1A1 mencapai puncak pada 4 jam. Hepar mencit terdapat AhR 2,0 kali lebih banyak dan 2,3 kali lipat lebih banyak reseptor mRNA, yang diduga berkontribusi pada sensitivitas induksi CYP1A1 oleh TCDD (Williams *et al.*, 1996).

2.2 Aktivitas Dioksin pada Sistem Reproduksi

Sistem reproduksi relatif sensitif terhadap TCDD. Efek TCDD pada betina yaitu *endometriosis*, *fewer pregnancies* dan *teratogenesis* pada janin yang

terpapar melalui tubuh maternal. Efek yang ditimbulkan oleh TCDD sangat tergantung pada dosis paparan dan status pertumbuhan hewan, cara paparan dan strain hewan. (Uchida *et al.*, 2002). Studi farmakokinetik menunjukkan bahwa ada perbedaan yang jelas dalam disposisi TCDD dosis akut dan kronis. Dengan demikian, kemungkinan bahwa cara pemberian dapat menjadi penentu sensitivitas dari TCDD (Bell *et al.*, 2007).

Berikut ini penelitian paparan TCDD pada saluran reproduksi. Menginduksi disfungsi plasenta (Kawakami *et al.*, 2006); mempengaruhi kelangsungan hidup *new born* (Bell *et al.*, 2007); cacat pada palatum, jantung dan ginjal janin (Aragon *et al.*, 2008); gangguan saluran reproduksi jantan (Vezina *et al.*, 2008); betina (Wolf *et al.*, 1999); penurunan bobot organ reproduksi (Ohsako *et al.*, 2002); onset masa pubertas yang tertunda (Faqi dan Chahoud 1998); feminisasi keturunan jantan (Bjerke *et al.*, 1994); penurunan jumlah sperma, endokrin reproduksi dan kerusakan struktur testis (Yin *et al.*, 2012).

TCDD dapat menginduksi *lethality* dan keterlambatan dalam pemisahan *balano-preputial* pada janin yang terpapar melalui induk. Efek toksik TCDD pada janin selama masa perkembangan mengarah pada gangguan sistem reproduksi keturunan jantan, terutama penurunan jumlah sperma pada kauda epididimis, penurunan berat vesikula seminalis, prostat dan epididimis (Bell *et al.*, 2007).

Analisis konsentrasi TCDD pada jaringan dan tingkat mRNA mengkonfirmasi bahwa tidak ada bukti toksisitas induk secara langsung yang disebabkan oleh TCDD, meskipun terpapar dalam kelompok dosis tinggi. Namun pada penelitian yang dilakukan oleh Bell *et al.* (2007) paparan dosis tinggi TCDD

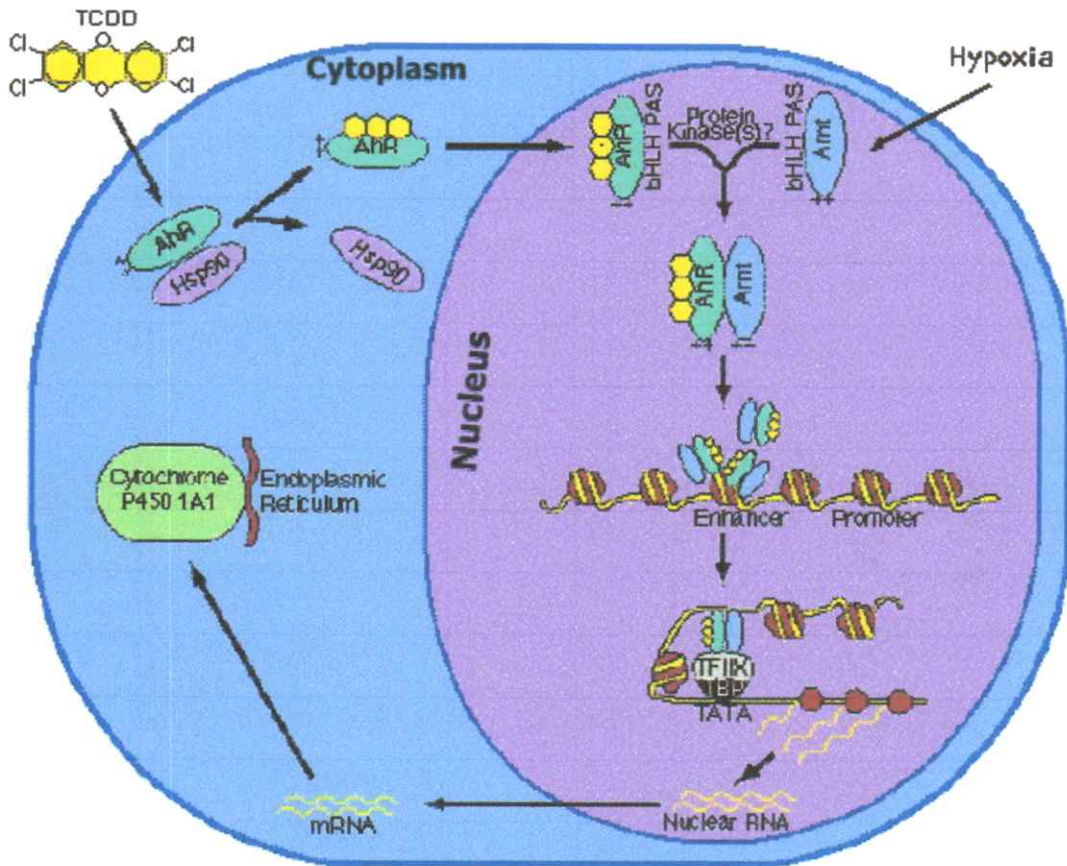
pada induk bunting menyebabkan penurunan 26% jumlah anak dan hanya 8% yang hidup pada hari pertama. Selain penurunan jumlah anak per kelahiran, paparan TCDD meningkatkan angka *lethality*. Konsentrasi TCDD pada uterus lebih tinggi ditemukan pada paparan akut peroral dibandingkan dengan dosis kronis. *Lethality postnatal* dan anak yang sekerat setelah dilahirkan menegaskan potensi yang luar biasa dari TCDD sebagai agen toksik pada masa perkembangan (Bell *et al.*, 2007). Paparan dioksin selama masa perkembangan jantan juga mengakibatkan keterlambatan pubertas dan efek ini merupakan efek samping yang paling sensitif dari TCDD (Bell *et al.*, 2007).

Pengaruh dioksin pada sistem reproduksi berhubungan dengan lingkungan xenobiotik sistem reproduksi melalui AhR. AhR menekan gen dan bertanggung jawab untuk sintesis reseptor berbagai hormon (Gregoraszczyk *et al.*, 2001). Sebagian besar individu yang terpapar dioksin menunjukkan gangguan reproduksi yang berhubungan dengan disfungsi gonad akibat gangguan hormonal (Calkosinski *et al.*, 200). Ikatan TCDD dan AhR merangsang terekspresinya faktor pro-inflamasi. Dioksin dapat mempengaruhi fase inflamasi yang berbeda dalam organisme. Respon inflamasi berlangsung cukup lama atau kronis dan memiliki karakteristik *multistage*. Ikatan ini juga akan membentuk garis demarkasi peradangan menyebabkan peningkatan resistensi pembuluh darah dan membuat diapedesis leukosit lebih mudah (misalnya monosit dan makrofag) (Calkosiński *et al.*, 2012).

Studi tentang immuno-endokrinologi pada testis, khususnya makrofag yang diturunkan mediator inflamasi mempengaruhi fungsi sel Leydig. Hubungan fisik

yang erat antara sel Leydig dan makrofag interstitial menunjukkan bahwa sel ini secara fungsional terkait. Makrofag memainkan peran penting dalam perkembangan sel Leydig dalam kondisi fisiologis dan non-inflamasi normal. Kondisi dimana makrofag absen dari interstitium testis, sel Leydig akan gagal untuk berkembang secara normal. Sebaliknya, ketika makrofag diaktifkan oleh mediator inflamasi, steroidogenesis pada sel Leydig akan terhambat. Makrofag juga menghasilkan spesies oksigen reaktif (ROS) seperti hidrogen peroksida, yang juga menghambat fungsi sel Leydig (Hales, 2002).

Dioksin mengubah pertumbuhan sel dan diferensiasi dengan mempengaruhi keseimbangan homeostasis dan hormonal melalui modulasi induksi enzim, faktor pertumbuhan, hormon dan reseptor (Yonemoto, 2000). Mekanisme dioksin yang paling terkenal adalah dioksin bertindak dengan mengubah transkripsi gen spesifik melalui mekanisme reseptor (Frueh and Johnston 1999). Mekanisme Aksi Dioksin dimediasi oleh pengikatan protein sitosol yang dikenal sebagai aril hidrokarbon reseptor (AhR). AhR dalam data biokimia dan biologi molekular bertindak sebagai faktor transkripsi yang mengendalikan jalur sinyal sejumlah hormon dan faktor pertumbuhan. AhR dalam keadaan normal mungkin diperlukan untuk perkembangan jaringan dan sistem neuroendokrin. AhR akan mengaktifkan faktor ligan transkripsi yang membentuk ikatan heterodimer dengan aril hidrokarbon nuklear reseptor translokator (ARNT). Heterodimer ini akan berinteraksi dengan *dioxin-responsive enhancer elements* (DRE) yang terletak pada permukaan gen target dan mengaktifkan berbagai faktor transkripsi pada inti sel (Yonemoto, 2000). Model skema aksi dioxin ditunjukkan pada Gambar 2.3.



Gambar 2.3 Mekanisme toksistas dioksin (Frueh and Johnston 1999)

Berdasarkan ilustrasi mekanisme aksi toksisitas dioksin pada gambar 2.3 dapat dijelaskan bahwa, setelah berdifusi kedalam sel, TCDD berikatan dengan protein sitoplasmik yang dikenal sebagai *aromatic hydrocarbon receptor* (AhR). Struktur AhR merupakan kelompok *basic helix-loop-helix / Per-Arnt-Sim* (bHLH/PAS) atau protein regulator transkripsional. AhR memiliki berbagai domain fungsional diantaranya yaitu mediasi pengikatan ligan, interaksi antara protein-protein, DNA *binding* dan transaktivasi. Reseptor ligan yang terbawa kedalam nukleus sel akan mengalami heterodimer dengan *second bHLH/PAS*

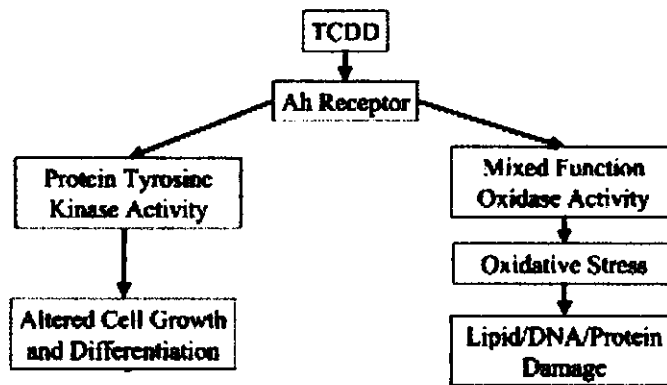
protein atau dikenal sebagai AhR *nuclear translocator* (Arnt). Arnt memiliki domain yang memediasi terjadinya heterodimerisasi antara AhR, DNA *binding*, dan transaktivasi heterodimer AhR/Arnt mampu mengikat sekuen DNA spesifik pada berbagai sisi didalam *xenobiotic responsive enhancer* (XRE) yang terletak pada permukaan target CYP1A1. Interaksi antara protein-DNA telah diasosiasikan dengan alterasi pada struktur kromatin dan pengikatan protein pada promotor CYP1A1. Transaktivasi AhR akan menginduksi sinyal dari *enhancer* untuk promotor melalui interaksi antara protein-protein, interaksi ini difasilitasi oleh pengikatan faktor transkripsi Arnt juga dapat berinteraksi dengan protein lain dari bHLH/PAS, interaksi ini menimbulkan respon tambahan terhadap lingkungan sekitarnya. Arnt akan berheterodimer dengan *hypoxia-inducible factor 1 alpha* (HIF1-*alpha*) sebagai respon tekanan oksigen yang rendah dilingkungan sekitar. Heterodimer HIF1-*alpha*-Arnt menimbulkan transkripsi dari faktor hipoksia. Mekanisme HIF ini berkaitan dengan efek dioxin dalam memicu sel kanker (Frueh and Johnston 1999).

Pengaruh TCDD terhadap penurunan jumlah sperma dianggap sebagai mekanisme yang paling sensitif. AhR dan Arnt diekspresikan pada spermatosit, dianggap memainkan peran dalam mengatur apoptosis spermatosit (Schultz *et al.*, 2003). Agen toksik lingkungan sebagian besar mengarah pada reaksi oksigen spesies (ROS), sehingga menyebabkan keadaan stres oksidatif dalam berbagai kompartemen dari testis. Testis mutlak membutuhkan energi tinggi untuk memenuhi fungsi spermatogenesis dan steroidogenesis. Spermatogenesis dan steroidogenesis merupakan dua kompartemen yang memiliki morfologi yang

berbeda tetapi secara fungsional saling berhubungan. Sel Germinal mengalami pembelahan dan berdiferensiasi untuk membentuk spermatozoa selama proses spermatogenesis. Sel Germinal dirawat oleh sel Sertoli. Proses spermatogenesis diatur oleh hormon dan mekanisme umpan balik negatif yang melibatkan hipotalamus, hipofisis dan testis (Mathur and D'Cruz, 2011).

ROS yang dihasilkan selama fungsi testis normal memainkan peran penting mengatur fungsi testis, meskipun ROS dikenal memiliki efek merusak, dalam jumlah rendah ROS menguntungkan testis. Peningkatan kadar ROS dapat merusak fungsi testis, untuk mengatasi hal ini testis dilengkapi dengan sistem antioksidan kuat yang melindungi diri dari kerusakan akibat ROS. Keluarga protein *glutathione*, superoksida dismutase, katalase dan beberapa non-enzimatik antioksidan seperti vitamin E dan C dapat membantu testis dengan menangkal setiap akibat buruk ROS (Mathur and D'Cruz, 2011).

Testis merupakan salah satu organ yang paling sensitif terhadap paparan TCDD (schultz *et al.*, 2003). Ekaposur jangka panjang TCDD dapat menginduksi stres oksidatif dan menurunkan kadar enzim antioksidan dalam testis dari golongan rat (Mathur and D'Cruz, 2011). Gambar 2.4 menunjukkan mekanisme TCDD yang mengarah pada reaksi oksigen spesies (ROS).



Gambar 2.4 Mekanisme TCDD mengarah pada reaksi oksigen spesies (ROS) (Mathur and D'Cruz, 2011).

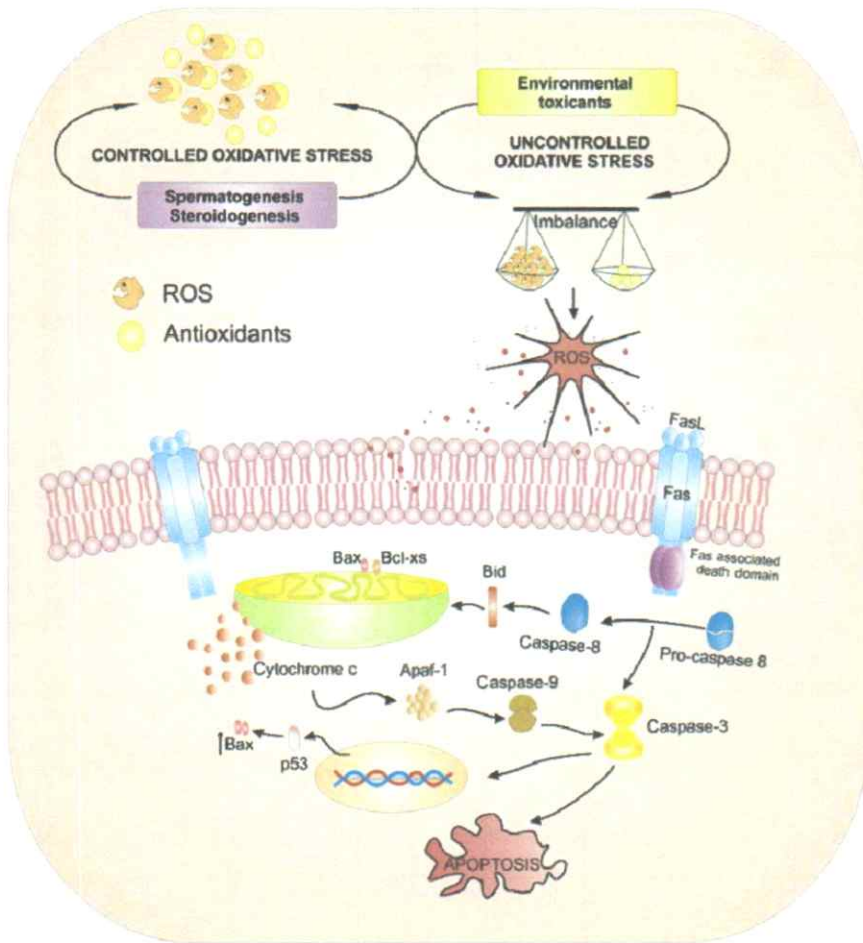
Dioxin merupakan senyawa yang larut dalam lemak dengan sifat semi-volatil (Lai *et al.*, 2005). Mekanisme toksisitas TCDD dimediasi oleh translokasi nuklear dari AhR-Arnt yang mengikat elemen responsif dioxin dan mengganggu molekul sinyal berbagai sel (Lai *et al.*, 2005). AhR dan Arnt dalam berbagai organ saluran reproduksi jantan dewasa terdeteksi di semua organ (testis, epididimis, vas deferens, prostat ventral, dorsolateral prostat, dan vesikula seminalis) (Suominen *et al.*, 2003). Penelitian yang dilakukan oleh schultz *et al.* (2003) menunjukkan distribusi kompleks AhR dan Arnt dalam protein mRNA testis golongan rat dan manusia. AhR dan Arnt memediasi efek langsung TCDD pada sel testis pada golongan rat dan manusia.

TCDD mempengaruhi steroidogenesis testis, menyebabkan pengurangan volume dan jumlah sel Leydig. Efek TCDD pada fungsi sel Leydig khususnya pada sintesis dan sekresi testosteron. Efek Merugikan lain adalah terganggunya interaksi antar sel dalam testis, gangguan perkembangan dari sel Germinal, gangguan spermatogenesis, penipisan enzim antioksidan dan peningkatan tingkat

peroksidasi lipid (Lai *et al.*, 2005). Penelitian lai *et al.* (2005), membuktikan efek seluler akut dari TCDD adalah pada 2 jam setelah paparan. Efek tersebut pada enzim steroidogenik melalui mediasi AhR.

Biosintesis Testosteron terjadi dalam sel Leydig di bawah pengaruh hormon luteinizing (LH). Pengikatan LH ke reseptornya dalam sel Leydig memulai serangkaian peristiwa yang mencakup peningkatan adenosin monofosfat intraseluler siklik (cAMP), translokasi kolesterol ke dalam mitokondria, konversi kolesterol ke pregnenolon, translokasi pregnenolon dalam endoplasma retikulum dan konversi pregnenolon ke testosteron melalui katalisis oleh sitokrom P450. Proses steroidogenesis itu sendiri dapat berfungsi sebagai sumber ROS. Produk yang terbentuk selama steroidogenesis normal dapat bertindak sebagai pseudosubstrat dan berinteraksi dengan enzim P450, sehingga terbentuk kompleks *pseudosubstrate-P450-O2*, yang merupakan sumber kerusakan karena ketidakmampuan pseudosubstrat untuk menangkal radikal bebas (Mathur and D'Cruz, 2011).

Studi telah menunjukkan bahwa TCDD menyebabkan ketidakseimbangan dalam status pro-oksidan dan antioksidan testis. Spermatogenesis testis dan steroidogenesis merupakan sumber ROS. Meskipun tingkat fisiologis ROS diperlukan untuk spermatogenesis, kelebihan ROS dihasilkan dari TCDD memiliki efek merusak, mekanisme yang diusulkan sebagai tindakan toksikan lingkungan dalam menginduksi ROS diilustrasikan pada Gambar 2.5. (Mathur and D'Cruz, 2011).



Gambar 2.5 Model ROS yang disebabkan oleh kontaminan lingkungan terhadap reproduksi jantan (Mathur and D’Cruz, 2011).

Dioksin mempengaruhi aktivitas endokrin dimediasi AhR. Dioksin masuk ke dalam sel dan mengikat AhR untuk membentuk heterodimer dengan Arnt, dan kemudian mengikat *xenobiotik responsif elemen* (XRE) untuk mengatur ekspresi berbagai gen CYP1A1. Sistem AhR memiliki beberapa karakter yang menarik. Pertama, AhR adalah salah satu *ligand dependent reseptor* yang mengaktifkan TCDD menginduksi ekspresi dari CYP1A1. Kedua, AhR dapat menunjukkan interaksi protein-protein dengan protein lain seperti sebagai *estrogen reseptor*, *androgen reseptor* atau faktor *hypoxia-inducible 1α* (HIF-1α) untuk mengubah

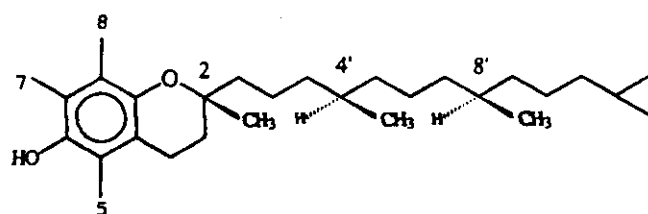
ekspresi gen (Kakeyama and Tohyama 2003). Aktivasi AhR menyebabkan degradasi protein reseptor seks steroid, dioksin telah dilaporkan memodulasi reseptor estrogen dan androgen melalui AhR. Transkripsi aktivitas reseptor androgen (AR) dimediasi oleh aktivasi AhR oleh TCDD (Kato *et al.*, 2007).

2.3 Vitamin E

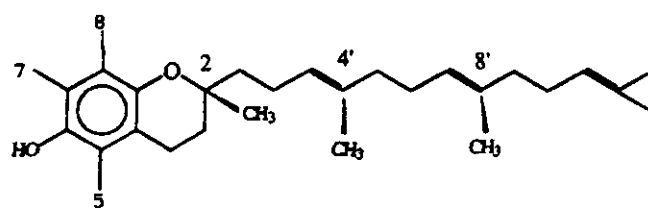
Vitamin E terdiri dari dua keluarga, senyawa *tocopherol* dan *tocotrienol* (gambar 2.6). Vitamin E memiliki ciri cincin *6-chromanol* dan rantai samping *isoprenoid*. Anggota senyawa *tocopherol* dan *tocotrienol* masing-masing terdiri dari alpha (α), beta (β), gamma (γ), dan delta (δ). Bentuk sintetis vitamin E yang tersedia luas dipasaran adalah *dl- α -tocopherol* atau dikenal sebagai *α -tocopherol*, terdiri dari *trimethylhydroquinone* dengan *isophytol*. Vitamin E disintesis hanya pada tanaman. Fungsi utama vitamin E tampaknya sebagai *chain-breaking* antioksidan nonspesifik yang mencegah penyebaran radikal bebas (WHO, 2005).

Vitamin E merupakan antioksidan utama yang larut lipid dan secara eksklusif diperoleh dari makanan. Senyawa *tocopherol* (α , β , γ , dan δ) memiliki rantai samping jenuh dengan *16-carbon phytol*, sedangkan *tocotrienol* (α , β , γ , dan δ) memiliki tiga ikatan rangkap pada rantai samping (WHO, 2005). Empat anggota dari *tocopherol* dan *tocotrienol* terjadi secara alami, berbeda dalam jumlah dan posisi metil pada cincin fenolik (Gambar 2.6). Selain isomer alami, terdapat beberapa jenis vitamin E sintetis terutama dalam bentuk ester (misalnya, *α -tocopheril* asetat dan suksinat *tocopheril*). Kelemahan dari vitamin E sintetis bentuk ester adalah kurang rentan terhadap oksidasi (Chow 2001). Vitamin E

memiliki toksisitas yang sangat rendah. Berdasarkan perspektif gizi, bentuk yang paling penting dari vitamin E adalah α -tocopherol (WHO, 2005).



Toco Structure



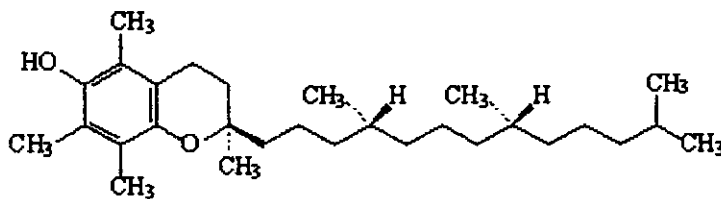
Tocotrienol Structure

Position of methyls	Toco structure	Tocotrienol structure
5, 7, 8	α -Tocopherol (α -T)	α -Tocotrienol (α -T-3)
5, 8	β -Tocopherol (β -T)	β -Tocotrienol (β -T-3)
7, 8	γ -Tocopherol (γ -T)	γ -Tocotrienol (γ -T-3)
8	δ -Tocopherol (δ -T)	δ -Tocotrienol (δ -T-3)

Gambar 2.6 Perbedaan struktur keluarga vitamin E senyawa *tochopherol* dan *tocotrienol* (Chow, 2001).

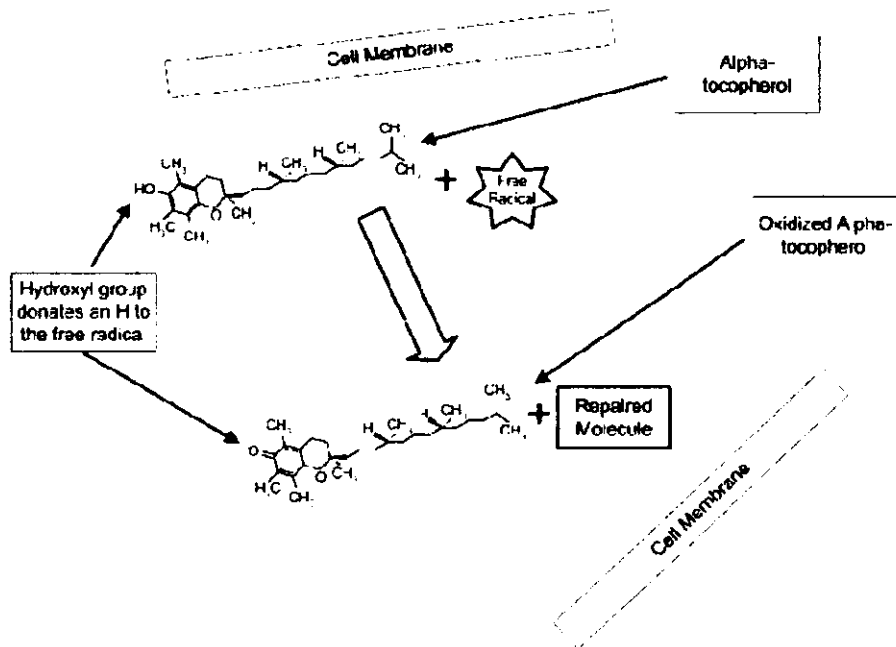
Alpha tocopherol memiliki nama lain atau sinonim *dl- α -tocopherol*, Vitamin E, *RRR-alpha-tocopherol*, *5,7,8-trimethyltocol* atau *(\pm)- α -tocopherol*. *α -tocopherol* memiliki struktur kimia seperti gambar 2.7. *Tocopherol* berupa cairan kental berwarna kuning atau kuning-coklat pada suhu kamar. Pada kemurnian tinggi hampir tidak berbau dan tidak berwarna. *Tocopherol* larut dalam minyak,

lemak, aseton, etanol, kloroform dan pelarut organik lainnya. *Tocopherol* dapat teroksidasi oleh oksigen atmosfer, dan oksidasi dipercepat oleh panas, cahaya, alkali, dan ion logam, *tocopherol* lebih stabil terhadap panas dan alkali ketika kondisi anaerob (Chow 2001).



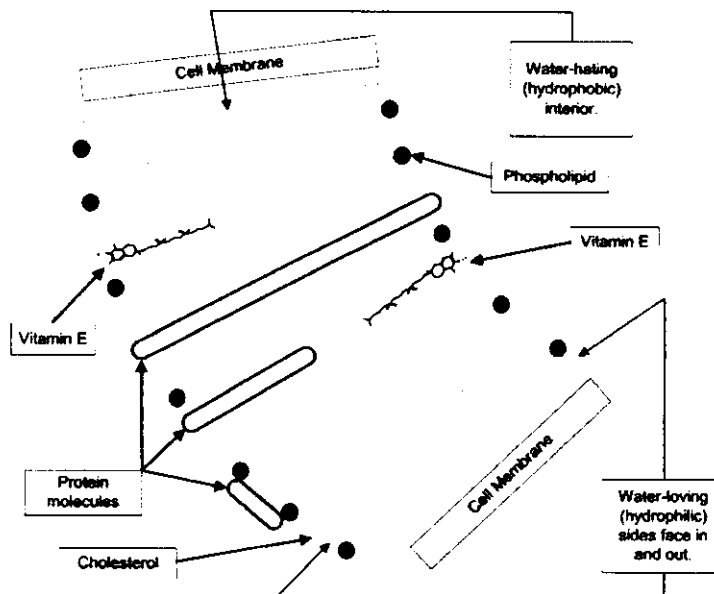
Gambar 2.7 Struktur kimia *alpha tocopherol* (WHO 2005)

Tocopherol memiliki aktivitas antioksidan dan aktivitas biologis terutama disebabkan oleh kemampuan mereka untuk menyumbangkan fenolik hidrogen ke radikal bebas lipid (Gambar 2. 8). *Tocopherol* dan *tocotrienol*, dapat bereaksi dengan radikal *peroxyl* lebih cepat daripada *polyunsaturated fatty acid* (PUFA), sehingga vitamin E sangat efektif sebagai pemecah rantai radikal bebas. Aktivitas antioksidan *tocopherol* ditentukan oleh reaktivitas kimia dengan molekul oksigen, radikal superoksida, radikal *peroxyl* dan radikal lainnya atau dengan kemampuan untuk menghambat autooksidasi lemak dan minyak. α -*tocopherol* secara struktural menjadi donor hidrogen lebih kuat dibandingkan β -, γ -, dan δ -*tocopherol* (Chow, 2001).



Gambar 2.8 Mekanisme antioksidan *Alpha-tocopherol* terhadap radikal bebas pada membran sel (Blake, 2008)

Senyawa antioksidan digunakan untuk melindungi sel dari berbagai kerusakan oksidatif. Fisiologis vitamin E (*α-tocopherol*) bekerja pada membran sel biologi dan memainkan peran penting dalam meminimalisir stres oksidatif pada membran selular. *α-tocopherol* merupakan antioksidan terhadap radikal bebas yang bersifat lipofilik, bereaksi dengan radikal *peroxyl* 10.000 kali lebih cepat pada PUFA atau asam lemak tak jenuh ganda (Chandra *et al.*, 2010). *α-tocopherol* menghambat pembentukan radikal bebas dan secara efektif dapat meminimalkan peroksidasi lipid dalam sistem biologi (Uzun *et al.*, 2009). Gambar 2.9 menunjukkan ilustrasi keberadaan tokoferol pada membran sel.



Gambar 2.9 Keberadaan tokoferol pada membran sel (Blake, 2008)

Vitamin E merupakan salah satu komponen utama dari sistem antioksidan dengan memotong radikal *peroxyl* dan *alkoxyl* yang dihasilkan selama konversi lipid hidroperoksida yang memiliki peranan penting dalam reaksi berantai *peroxidative* (Chandra *et al.*, 2010). Fungsi antioksidan vitamin E bisa meningkatkan kekebalan dengan mempertahankan fungsional dan struktural integritas sel kekebalan yang penting. Masalah kesehatan yang disebabkan oleh polusi lingkungan relatif meningkat, berbagai usaha telah dikeluarkan dalam mengevaluasi potensi relatif antioksidan dari vitamin E (Yousef, 2010).

Radikal bebas yang dihasilkan oleh sistem enzim dan nonenzim dapat menyerang asam lemak tak jenuh ganda atau *polyunsaturated fatty acid* (PUFA) dan menyebabkan peroksidasi lipid. Radikal bebas dan oksigen reaktif spesies (ROS) seperti superoksida, radikal hidroksil dan peroksida hidrogen dianggap berkontribusi pada peroksidasi lipid. Lipid peroksida dan produknya seperti

kelompok aldehid (*malondialdehyde*), keto, hidroksi dan sebagainya terbentuk selama proses oksidasi ini (Hong *et al.*, 2010).

SOD dan GSH-PX adalah dua enzim antioksidan utama. SOD dapat mengkatalisis proporsi O^{2-} ke H_2O_2 dan O_2 . Jadi aktivitas SOD mencerminkan kemampuan tubuh melawan radikal bebas dan merupakan enzim antioksidan penting. Pengurangan aktivitas SOD dapat meningkatkan peroksida, bentuk *lipofuscin*, menghancurkan struktur sel nuklir dan menyebabkan perubahan protein serta enzim. GSH-PX terutama ada di mitokondria dan dapat menghambat peroksida H_2O_2 dan lipid dapat dianggap sebagai sistem lain detoksifikasi dalam tubuh (Hong *et al.*, 2010). ROS dapat merusak sel melalui peroksidasi PUFA dan dekomposisi peroksida lipid. MDA sering digunakan sebagai indeks stres oksidatif jaringan yang dihasilkan dari kerusakan akibat radikal bebas untuk komponen membran sel (Hong *et al.*, 2010).

Eksposur radikal bebas melebihi kapasitas sistem pertahanan antioksidan, dikenal sebagai fenomena yang sering disebut stres oksidatif. Vitamin E merupakan peredam atau *scavenger* dari radikal peroxy dan terutama melindungi asam lemak tak jenuh ganda atau *polyunsaturated fatty acids* (PUFA) dalam membran fosfolipid dan lipoprotein plasma. Vitamin E diangkut darah oleh lipoprotein plasma dan eritrosit ke hati. Penyerapan vitamin E terjadi di usus. Vitamin E akan masuk ke sel parenkim sebagai sisa *chylomicron*. *Tocopherol* juga dapat ditransfer ke *high density lipoprotein* (HDL). *Tocopherol*-HDL dapat di transfer ke lipoprotein lainnya, seperti *low density lipoprotein* (LDL) dan *very*

low density lipoprotein (VLDL). Sebagian besar *tocopherol* memasuki sel jaringan perifer dalam lipoprotein utuh melalui jalur reseptor LDL (WHO, 2005).

Penyerapan vitamin E tergantung pada fungsi sekresi pankreas, empedu, pembentukan misel dan transportasi barrier membran usus. *Tocopherol* pertama kali diemulsikan dan dilarutkan dalam garam misel empedu dan diangkut seluruh lapisan air, sehingga bersentuhan dengan membran perbatasan penyerapan dari enterosit (Chow 2001). Dalam enterosit, *tocopherol* dikonversi ke bentuk *chylomicron* dan disekresi ke dalam ruang intraseluler dan limfatik, selanjutnya ke aliran darah. Vitamin E bersifat hidrofobisiti sehingga memerlukan mekanisme transportasi khusus dalam air dari plasma, cairan tubuh dan sel. Serupa dengan lipid, *tocopherol* diserap dalam usus kecil yang dikonversikan ke *chylomicron* trigliserida, disekresi ke getah bening usus dan kemudian dikirim ke hati (Chow, 2001).

Kosentrasi tertinggi α -*tocopherol* ditemukan pada mitokondria, sedangkan konsentrasi rendah pada sitosol. Selain itu, sebagian besar *tocopherol* terlokalisir pada membran. Kelebihan α -*tocopherol* dan bentuk *tocopheril* diekskresikan pertama ke empedu dan kemudian ke feses (Chow 2001).

Aktivitas antioksidan *tocopherol* diawali dengan konversi *tocopherol* ke radikal *tocopheril chromanoxy*. Radikal *chromanoxy* mudah dikembalikan ke *tocopherol*. Proses ini dapat difasilitasi oleh agen pereduksi seperti *glutathione*, askorbat dan / atau sistem *enzymic*. Radikal *tocopherol chromanoxy* dapat membentuk dimer atau trimer lebih lanjut teroksidasi ke bentuk *tocopheril*

quinone. Proses peroksidasi lipid (atau autoksidasi) dapat dibagi menjadi tiga tahap, yaitu inisiasi, propagasi, dan terminasi (Gambar 2.10) (Chow 2001).

Pada tahap inisiasi (reaksi 1), *carbon-centered lipid radicals* ($R\cdot$) dapat dihasilkan oleh abstraksi dari proton atau penambahan sebuah asam lemak tak jenuh ganda (RH) ketika terdapat faktor inisiasi radikal bebas (I^*). Reaksi inisiasi umumnya sangat lambat dan tergantung pada jenis inisiator yang digunakan. Selama fase propagasi, radikal lipid ($R\cdot$) bereaksi dengan molekul oksigen (O_2) yang tersedia untuk membentuk radikal *peroxyl* ($ROO\cdot$) pada tingkat yang sangat tinggi (reaksi 2). Radikal *peroxyl* terbentuk dan dapat bereaksi dengan asam lemak tak jenuh ganda yang lain ($R'H$). Pada tingkat lambat, membentuk hidroperoksida ($ROOH$) dan *carbon-centered lipid radical* baru (reaksi 3). Proses propagasi dapat terus berlangsung sampai semua lemak tak jenuh ganda yang dikonsumsi atau reaksi berantai rusak (fase terminasi) (Chow 2001).



Gambar 2.10 Aktivitas antioksidan *Alpha-tocopherol* selama proses peroksidasi lipid (Chow 2001).

Tocopherol merupakan inhibitor radikal bebas yang paling efektif dalam memutus rantai peroksidasi. Hal ini karena *tocopherol* dapat bereaksi lebih cepat dengan radikal *peroxyl* dibanding asam lemak tak jenuh ganda. Satu molekul

tocopherol dapat melindungi 103-108 molekul asam lemak tak jenuh ganda pada tingkat peroksida yang rendah atau 1 bagian dari *α-tocopherol* mampu melindungi 1000 bagian molekul lipid di membran biologis (Chow 2001).

2.4 Aktivitas Vitamin E pada Sistem Reproduksi

Estimasi generasi radikal bebas dan pertahanan antioksidan telah menjadi aspek penting dari penelitian pada mamalia. Studi telah mengevaluasi peran potensial dari antioksidan, seperti, vitamin C, vitamin E, b-karoten, isoflavon, asam folat, propolis, curcumin dan ekstrak biji anggur proantosianidin (*seed proanthocyanidin extract*) untuk perlindungan sel terhadap kerusakan agen toksik lingkungan dan toksisitas agen kemoterapi. Banyak antioksidan telah terbukti bermanfaat dalam terapi infertilitas jantan, seperti vitamin C, vitamin E, *glutathione* dan koenzim Q10 (Yousef, 2010).

Vitamin E (*α-tocopherol*) dikaitkan dengan tingkat kesuburuan pada hewan sejak Evans dan Bishop (1922) menemukan vitamin E sebagai nutrisi esensial pada reproduksi hewan. Suplementasi nutrisi yang kaya Vitamin E dapat meningkatkan total spermatozoa dan konsentrasi sperma pada babi (Brzezinska *et al.*, 1995); manusia (Akiyama, 1999); domba (Yue *et al.*, 2010); rat (Sönmez *et al.*, 2005); ayam (Cerolini *et al.*, 2006); dan kelinci (Yousef, 2010). Sebaliknya, kekurangan vitamin E dapat menyebabkan efek merugikan pada organ reproduksi, seperti degeneratif Spermatogonium, kerusakan testis dan degenerasi tubulus seminiferus (Wilson *et al.*, 2003).

Vitamin E adalah vitamin larut dalam lemak, meningkatkan spermatogenesis dengan menghambat peroksidasi lipid dan menurunkan kejadian

sperma yang abnormal (Alam *et al.*, 2009). Tingkat ROS dibatasi oleh mekanisme pertahanan antioksidan, seperti *alpha-tocopherol* (vitamin E) yang hadir dalam plasma semen dan membran plasma. Vitamin E larut dalam lipid dan merupakan *chain-breaking* antioksidan. Vitamin E sebagai *chain-breaking* antioksidan karena kemampuannya untuk menghentikan reaksi berantai radikal bebas. Vitamin E menghambat peroksidasi dari asam lemak tak jenuh ganda (PUFA) (Wen, 2006).

Alpha-tocopherol memiliki aktivitas biologis paling tinggi dan merupakan senyawa yang paling banyak tersedia dalam makanan. Dukungan untuk suplementasi vitamin E dalam pengobatan infertilitas jantan telah banyak diteliti. Sel hidup dalam kondisi aerobik membutuhkan oksigen untuk mendukung kehidupan, namun metabolit seperti ROS dapat memodifikasi fungsi sel dan membahayakan sel. Radikal bebas berkontribusi pada patogenesis infertilitas reproduksi jantan. Radikal bebas adalah kelompok molekul kimia yang sangat reaktif dengan satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan, dapat memodifikasi biomolekul yang mereka hadapi, bereaksi secara cepat dengan zat di sekitarnya dan memulai reaksi berantai yang mengarah pada kerusakan selular (Agrawal dan Sekhon, 2010).

Stres oksidatif muncul ketika radikal bebas berlebih dan membanjiri pertahanan antioksidan dari saluran reproduksi yang kemudian akan merusak sel, jaringan dan organ (Agrawal dan Sekhon, 2010). Hasil penelitian menunjukkan bahwa vitamin E memiliki efek perlindungan yang berperan dalam kerusakan oksidatif dari testis. Mekanisme perlindungan vitamin E mungkin melalui

kemampuannya dengan cepat dan efektif mengikat radikal *peroxyl* lipid sebelum serangan terjadi pada membran lipid testis. Selain itu, vitamin E juga merupakan sistem pertahanan non-enzimatik testis dalam mitokondria, spermatozoa, dan mampu menghambat peroksidasi kerusakan testis. Vitamin E memiliki peran penting dalam pemeliharaan dan kelangsungan hidup spermatid (Chandra *et al.*, 2010).

Testis kaya akan *polyunsaturated fatty acids* (PUFA) atau asam lemak ganda tak jenuh sehingga jauh lebih rentan terhadap paparan peroksidasi dari jaringan lainnya (Yue *et al.*, 2010). Vitamin E sebagai antioksidan alami dapat mengurangi kerusakan oksidatif dengan mekanisme antioksidan lipid yang larut dalam membran sel dan menekan produksi oksidan reaktif untuk mempertahankan integritas fungsional dan struktural kekebalan yang penting (Hong *et al.*, 2009).

Tingkat testosteron sangat penting untuk pertumbuhan aksesori organ seks. Radikal bebas berlebihan dikaitkan dengan kelainan spermatogenesis dan supresi gonadotropin. $\Delta^5\beta$ -HSD dan 17β -HSD adalah enzim regulasi kunci steroidogenesis testis. Penghambatan aktivitas enzim androgenik berhubungan dengan penurunan testosteron serum. Testosteron diperlukan untuk pemeliharaan proses spermatogenik dan inhibisi apoptosis sel Germinal. Vitamin E memiliki efek langsung pada kegiatan enzim tersebut (Chandra *et al.*, 2010).

Vitamin E memainkan peran yang bersifat memperbaiki atau melawan efek samping dari stres oksidatif pada steroidogenesis sel Leydig. Biosintesis testosteron terjadi pada sel Leydig. Substrat yang digunakan dalam proses steroidogenik dapat diperoleh pada proses sintesis *de novo* kolesterol dari asetat

pada sel Leydig atau diambil dari kolesterol plasma. Lima enzim yang terlibat dalam konversi kolesterol untuk testosteron adalah *20,22-desmolase*, *3 β -hydroxysteroid dehydrogenase*, *17 α -hydroxylase*, *17,20-desmolase* dan *17 β -hydroxysteroid dehydrogenase*. Selama terjadi pembelahan sisi rantai di mitokondria, konversi dari pregnenolon menjadi testosteron terjadi pada fraksi mikrosomal. Gonadotropin bersama dengan testosteron adalah hormon kunci yang mengatur spermatogenesis. Sekresi testosteron oleh sel Leydig tergantung pada sekresi LH oleh hipofisa (Uzun *et al.*, 2009).

Vitamin E menghambat peroksidasi lipid membran dengan peredaman radikal *lipid peroxy* melalui mekanisme konversi vitamin E menjadi radikal *α -tocopheroxy*. Jenis radikal ini akan didaur ulang ke bentuk *α -tocopherol* jika berinteraksi dengan antioksidan terlarut seperti asam askorbat atau secara ireversibel teroksidasi ke *α -tocopherylquinone*. *α -tocopherylquinone* dapat bertindak sebagai antikoagulan kuat dan sebagai antioksidan (Yousef, 2010).

Suplementasi vitamin E mengurangi generasi ROS dan melindungi spermatozoa dari hilangnya motilitas, juga telah dilaporkan bahwa suplementasi vitamin E lebih efektif dalam meningkatkan karakteristik sperma dan mengurangi produksi ROS dibanding vitamin C (Yousef, 2010). Keseimbangan antara produksi dan peredaman/penghapusan ROS dalam sistem reproduksi jantan sangat penting. ROS dalam jumlah kecil memainkan peran penting dalam fungsi sperma normal tetapi dapat menyebabkan efek patologis ketika jumlah oksida melebihi jumlah antioksidan. Vitamin E melindungi epididimis terhadap peroksidasi lipid, dengan meningkatkan enzim antioksidan dan penurunan ROS. Vitamin E juga

mengangkat aktivitas superoksida dismutase pada sperma sapi secara signifikan dapat melindungi testis terhadap kerusakan oksidatif (Hong *et al.*, 2010).

Penelitian oleh Hong *et al.* (2010), menunjukkan bahwa suplementasi Vitamin E dalam diet dapat meningkatkan kandungan vitamin E dalam serum, hati dan testis, sehingga akan meningkatkan kemampuan antioksidan dari testis, yang dimanifestasikan sebagai peningkatan aktivitas T-AOC, SOD dan penurunan MDA.

Fungsi mitokondria juga penting bagi sel Germinal selama spermatogenesis. ROS adalah mediator umum patologi yang mempengaruhi beberapa fungsi reproduksi sampai infertilitas. Rantai transpor elektron mitokondria adalah sumber utama ROS selama metabolisme normal. Tingkat produksi ROS dari mitokondria meningkat dalam berbagai kondisi patologis (Yue *et al.*, 2010).

2.5 Mencit

Mencit (*Mus musculus*) adalah anggota *Muridae* (tikus-tikusan) yang berukuran kecil. Mencit sangat mudah menyesuaikan diri dengan perubahan yang dibuat manusia. Mencit percobaan atau mencit laboratorium dikembangkan dari mencit liar melalui proses seleksi (Amori, 1996).

Mencit diberi makan pelet komersial yang bergizi dan tidak memerlukan suplemen tambahan. Asupan pakan sekitar 15g per 100g berat badan perhari. Asupan air sekitar 15ml per 100g berat badan perhari. Mencit membutuhkan pakan dengan tinggi lemak sekitar 11% untuk hasil terbaik (Amori, 1996). Mencit membutuhkan makanan yang memiliki kadar protein diatas 14% (Malole dan Pramono, 1989). Kebutuhan protein ini biasanya terpenuhi dengan memberikan

ransum ayam broiler komersial kepada mencit (Smith dan Mangkoewidjojo, 1988).

2.5.1 Klasifikasi Mencit:

Domain	: Eukaryota
Kingdom	: Animalia
Subkingdom	: Bilateria
Phylum	: Chordata
Subphylum	: Vertebrata
Superclass	: Tetrapoda
Class	: Mammalia
Subclass	: Theriiformes
Order	: Rodentia
Suborder	: Myomorpha
Superfamily	: Muroidea
Family	: Muridae
Subfamily	: Murinae
Genus	: Mus
Specific name	: musculus
Scientific name:	<i>Mus musculus</i>
Synonyms	: Mus abbotti • Mus domesticus • Mus musculus Linnaeus (Álvarez dan Medellín, 2005)

2.5.2 Deskripsi Fisik Spesies *Mus musculus*

Panjang ekor mencit adalah 60-105mm, kurang lebih sama dengan panjang tubuh mencit yaitu 65-95 mm. *Mus musculus* memiliki mata hitam besar yang menonjol, telinga bulat dan moncong runcing dengan kumis panjang. Berat badan mencit dewasa jantan maupun betina adalah 12-30 g (Lambert, 2007).

2.5.3 Reproduksi Mencit Jantan

Mencit dewasa secara seksual antara usia lima sampai delapan minggu. Mencit jantan biasanya matang secara seksual pada usia enam minggu (Lambert, 2007). Sistem reproduksi mencit jantan terdiri dari sepasang testis dengan saluran

reproduksi (epididimis dan vas deferens) dan kelenjar seks aksesori, yaitu vesikula seminalis, prostat dan kelenjar bulbourethral (Heffner dan Schustz, 2002)

a. Testis

Testis merupakan organ kelamin jantan yang berfungsi sebagai tempat sintesis hormon androgen (terutama testosteron) dan tempat berlangsungnya proses spermatogenesis. Kedua fungsi testis ini menempati lokasi yang terpisah di dalam testis. Biosintesis androgen berlangsung dalam sel Leydig di jaringan intertubuler, sedangkan proses spermatogenesis berlangsung dalam epitel tubulus seminiferus (Slomianka, 2009)

Mencit jantan dewasa mempunyai testis yang berbentuk bulat lonjong sebesar kacang tanah dengan ukuran rata-rata 0,9 x 0,5 x 0,5 cm. Di dalam testis terdapat tubulus seminiferus berupa saluran yang berlilit-lilit, dan di antaranya terdapat jaringan interstitial yang didalamnya mengandung sel Leydig (Moelock, 1994).

Setiap testis ditutupi dengan jaringan ikat fibrosa, tunika albuginea, bagian tipisnya atau septa akan memasuki organ untuk membelah menjadi lobus yang mengandung beberapa tubulus disebut tubulus seminiferus (gambar 2.9). Setiap lobulus berisi 1-4 tubulus seminiferus. Bagian tunika memasuki testis dan bagian arteri testikular yang masuk disebut sebagai hilus. Arteri memberi nutrisi setiap bagian testis dan mengadakan kontak dengan vena testikular yang menghasilkan hilus. (Slomianka, 2009).

b. Tubulus Seminiferus

Tubulus seminiferus terdiri atas suatu lapisan jaringan ikat fibrosa, lamina basalis yang berkembang baik, dan kompleks epitel Germinal atau seminiferus. Tunika propria fibrosa yang membungkus tubulus seminiferus terdiri atas beberapa lapis fibroblast. Lapisan paling dalam yang melekat pada lamina basalis terdiri dari sel mioid gepeng, yang memperlihatkan ciri otot polos. Sel otot polos tersebut dikenal sebagai sel myoid peritubular. Kontraksi dari sel myoid peritubular akan mempengaruhi ukuran tubulus seminiferus. Epitel tubulus seminiferus terdiri atas dua jenis sel yaitu sel Sertoli atau sel penyokong dan sel yang merupakan garis turunan spermatogenik (Junqueira, 2005).

Epitel tubulus seminiferus berada tepat di bawah membran basalis yang dikelilingi oleh jaringan ikat fibrosa yang tipis. Antara tubulus adalah stroma interstitial, terdiri atas sel Leydig, kaya akan pembuluh darah dan limfe. Sel interstitial testis mempunyai inti bulat yang besar dan mengandung granul yang kasar. Sitoplasmanya bersifat eosinofilik. Epitel seminiferus mempunyai nutrisi yang berasal dari sel Sertoli, yang tidak dijumpai di tubuh lain. Dasar sel Sertoli bersentuhan dengan membran basalis dan menuju lumen tubulus seminiferus (Rugh, 1976). Dua sel Sertoli yang berdekatan mempunyai hubungan *occludent / tight junction* yang bersama-sama dengan jaringan peritubular membentuk sawar darah testis (*blood testis barrier / BTB*), pada ujung lobulus memiliki lumen yang menyempit dan berlanjut ke ruas pendek yang dikenal sebagai tubulus rektus atau tubulus lurus yang menghubungkan tubulus seminiferus dengan labirin saluran berlapis yang berkesinambungan yaitu rete testis. Rete testis terdapat dalam

jaringan ikat mediastinum yang dihubungkan dengan bagian kepala epididimis oleh 10-20 duktulus eferentes (Janqueira, 2005).

Siklus epitel seminiferus pada mencit terdiri dari 12 stadium. Waktu yang diperlukan untuk satu siklus epitel seminiferus pada mencit antara 201-203 jam (8-9 hari). Dengan demikian seluruh waktu yang diperlukan untuk proses spermatogenesis yang terdiri dari empat siklus epitel seminiferus, adalah berkisar antara 34,5-35,5 hari. Proses spermatogenesis ini baru dimulai secara aktif pada hari ke-9 setelah lahir (Rugh, 1968).

c. Sel Spermatogenik

Spermatogonium merupakan sel pertama pada proses spermatogenesis, berhubungan dengan lamina basal tubulus. Sel Spermatogonium, bergaris tengah sekitar 12 μ m, dengan inti yang mengandung kromatin pucat. Pada hewan yang sudah dewasa kelamin, Spermatogonium mengalami sederetan mitosis sampai terbentuk Spermatogonium tipe A, berdiferensiasi secara progresif selama siklus mitosis menjadi Spermatogonium tipe B. Spermatogonium tipe A adalah sel induk untuk garis keturunan spermatogenik, sementara Spermatogonium tipe B merupakan sel progenitor yang berdiferensiasi menjadi spermatosit primer (Junqueira, 2005). Dua jenis Spermatogonium tersebut dapat dibedakan dalam epitel seminiferus. Spermatogonium A memiliki inti bulat dengan butiran kromatin yang sangat halus dengan satu atau dua nukleolus, membelah membentuk generasi baru, spermatogonia tipe A dan tipe B. Spermatogonium tipe B, memiliki inti bulat dengan ukuran butiran kromatin bervariasi, dan terdiri dari satu nukleolus, sering menempel pada membran nukleus (Slomianka, 2009)

Spermatosit primer ditandai adanya kromosom dalam inti (Junqueira, 2005). Spermatosit primer, terletak di lapisan sel luminal sampai Spermatogonium, terlihat lebih besar dari Spermatogonium. Spermatosit sekunder memiliki ukuran lebih kecil dari spermatosit primer. Spermatosit sekunder sulit diamati dalam sediaan testis karena merupakan sel berumur pendek yang berada pada fase interfase yang sangat singkat dan dengan cepat memasuki pembelahan kedua (Slomianka, 2009). Pembelahan spermatosit sekunder menghasilkan spermatid (Junqueira, 2005).

Spermatid, terletak di bagian luminal dari epitel seminiferus. Spermatid memiliki ukuran yang kecil garis tengahnya 7-8 μ m dengan ciri inti eksentrik. Selama pematangan spermatid menjadi spermatozoa, inti menjadi lebih kecil dan gelap (Slomianka, 2009). Karena tidak ada fase S (sintesis DNA) yang terjadi antara pembelahan meiosis pertama dan kedua dari spermatosit, maka jumlah DNA per sel dikurangi setengahnya selama pembelahan kedua ini menghasilkan sel haploid (1n) (Junqueira, 2005).

Fase akhir spermatogenesis disebut spermiogenesis dan terdiri dari diferensiasi spermatid yang baru dibentuk menjadi spermatozoa. Spermatozoa Terdiri dari kepala, leher dan ekor (Slomianka, 2009). Sel spermatogenik ini ditunjukkan pada gambar 2.11.

d. Sel Sertoli

Sel Sertoli adalah sel piramid memanjang pada garis keturunan spermatogenik. Sel Sertoli melekat pada lamina basalis, sedangkan ujung apeks meluas ke lumen tubulus seminiferus. Dengan mikroskop cahaya, bentuk sel Sertoli tidak jelas terlihat karena banyaknya juluran lateral yang mengelilingi sel spermatogenik. Kajian dengan mikroskop elektron mengungkapkan bahwa sel ini mengandung banyak retikulum endoplasma licin, sedikit retikulum endoplasma kasar, satu kompleks golgi yang berkembang baik, banyak mitokondria dan lisosom. Inti memanjang berbentuk segitiga, memiliki banyak lipatan dan sebuah anak inti yang mencolok, memiliki sedikit heterokromatin. (Junqueira, 2005).

Sel Sertoli memberikan dukungan mekanik dan nutrisi untuk sel spermatogenik. Sel Sertoli juga mensekresi dua hormon inhibin dan aktivin yang memberikan umpan balik positif dan negatif pada sekresi FSH dari hipofisis. Selain itu, sel Sertoli juga berfungsi untuk fagositosis kelebihan sitoplasma selama spermatogenesis dan produksi hormon antimullerian (Slomianka, 2009).

e. Jaringan Interstitial dan Sel Leydig

Antara tubulus seminiferus testis terdapat kumpulan jaringan ikat, saraf, pembuluh darah dan limfe. Kapiler memungkinkan perpindahan antarmolekul secara bebas seperti darah. Jaringan ikat terdiri atas berbagai jenis sel termasuk fibroblast, sel jaringan ikat pengembang, sel mast dan makrofag. Selama pubertas, muncul jenis sel tambahan yang berbentuk bulat atau poligonal, memiliki inti di pusat dan sitoplasma eosinofilik dengan banyak tetesan lipid. Sel tersebut adalah sel interstitial atau sel Leydig, yang memiliki ciri sebagai sel pensekresi steroid.

bervakuol pada pengamatan mikroskop cahaya. Inti sel Leydig mengandung butir kromatin kasar dan anak inti yang jelas (Leeson *et al.*, 1996).

2.6 Spermatogenesis

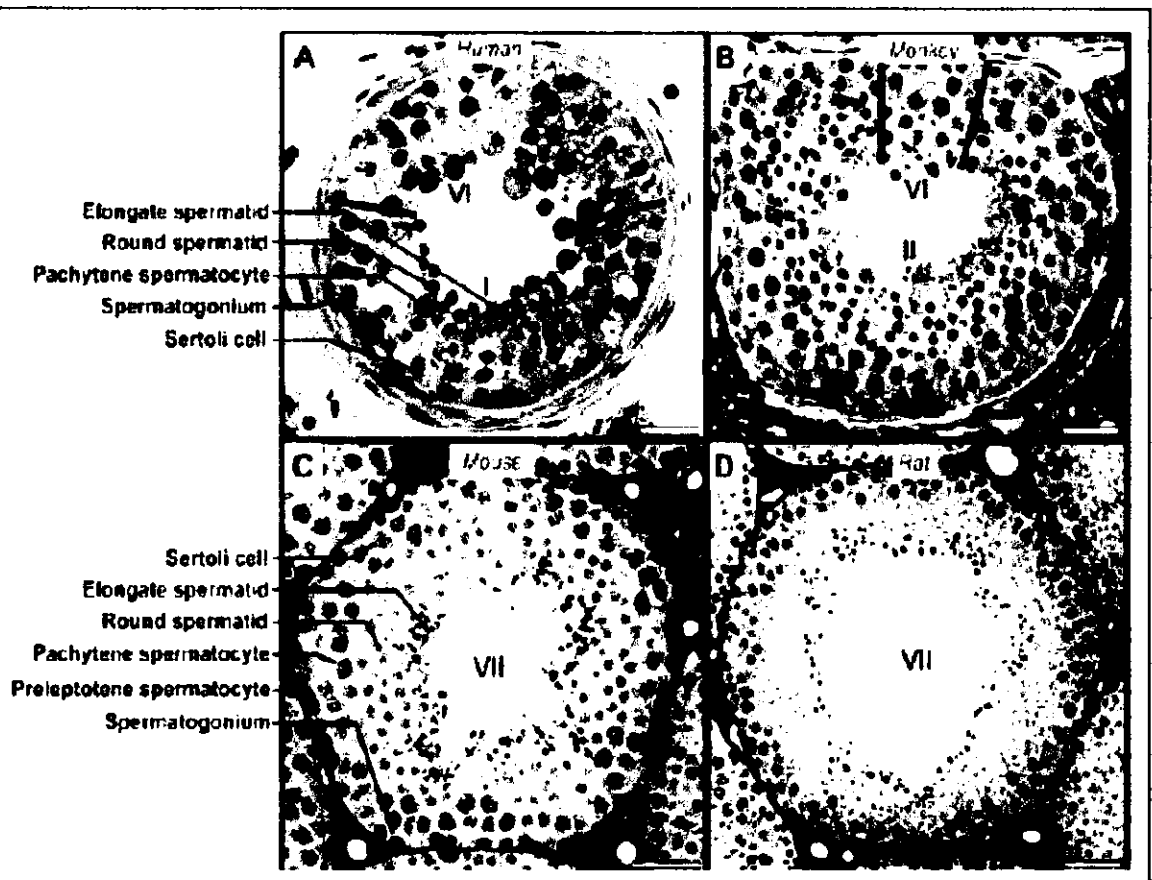
Spermatogenesis merupakan proses biologis yang kompleks dari transformasi seluler yang menghasilkan sel Germinal haploid jantan dari sel induk diploid Spermatogonium. Siklus spermatogenesis sangat penting untuk produksi sperma secara terus-menerus. Proses ini tergantung pada berbagai faktor, baik intrinsik (Sertoli dan sel Germinal) dan ekstrinsik (androgen, asam retinoik), serta spesifik pada setiap spesies (Hess dan Franca. 2008).

Rangkaian kegiatan spermatogenesis yaitu transformasi sel Spermatogonium menjadi spermatozoa, melalui proses yang panjang berlangsung dalam tubulus seminiferus testis. Epitel seminiferus (Gambar 2.12) terdiri dari sel Germinal yang membentuk lapisan konsentris. Sitoplasma Sertoli tersebar disekitar sel Germinal untuk memelihara dan mempertahankan seluler serta asosiasi seluruh proses spermatogenesis. Sel Germinal pertama kali mengalami pembelahan mitosis dan kemudian meiosis, yang melibatkan duplikasi kromosom, rekombinasi genetik, dan kemudian pengurangan kromosom melalui dua pembelahan sel untuk menghasilkan spermatid haploid bulat yang berdiferensiasi menjadi spermatozoa, selanjutnya dilepaskan ke dalam lumen tubulus (Hess dan Franca. 2008). Pada bagian ini, akan membahas tahapan dan siklus spermatogenesis secara umum, namun mencit atau tikus akan lebih ditekankan, karena merupakan spesies yang digunakan dalam penelitian.

Kelangsungan spermatogenesis tergantung pada sel induk yang didefinisikan oleh sebagai *self renewing*. Selama spermatogenesis pada mencit, aktivitas sel induk berada dalam satu pengaturan. Spermatogonium terdiri dari jenis A_{single} , A_{paired} , dan Spermatogonium A_{aligned} (Rooij, 2001). Selain memperbarui diri sebagai populasi, spermatogonia berdeferensiasi menjadi Spermatogonium A_1 sampai A_4 , menengah (dalam) dan Spermatogonium B, yang kemudian akan berdiferensiasi menjadi spermatosit, spermatid haploid dan spermatozoa. Pada tubulus seminiferus, semua jenis Spermatogonium (A_{single} sampai B) terletak pada membran basal perifer, dan selanjutnya jenis sel disusun dalam urutannya menuju lumen (Yoshida *et al.*, 2006).

2.5.1 Tahap Spermatogenesis

Spermatogenesis dibedakan menjadi tiga tahap yaitu tahap spermatositogenesis (tahap proliferasi), tahap meiosis dan tahap spermiogenesis. Waktu yang dibutuhkan untuk menyelesaikan setiap langkah perkembangan sel spermatogenik berbeda, oleh karena itu akan terjadi berbagai bentuk kombinasi sel dari berbagai jenis perkembangan sel Germinal di dalam tubulus seminiferus. Kombinasi ini terjadi pada setiap bagian tubulus seminiferus disebut sebagai asosiasi sel dan membentuk stadium epitel seminiferus. Epitel Germinal tubulus seminiferus dibagi menjadi 12 stadium yaitu stadium I – XII (Hess *et al.*, 2008).

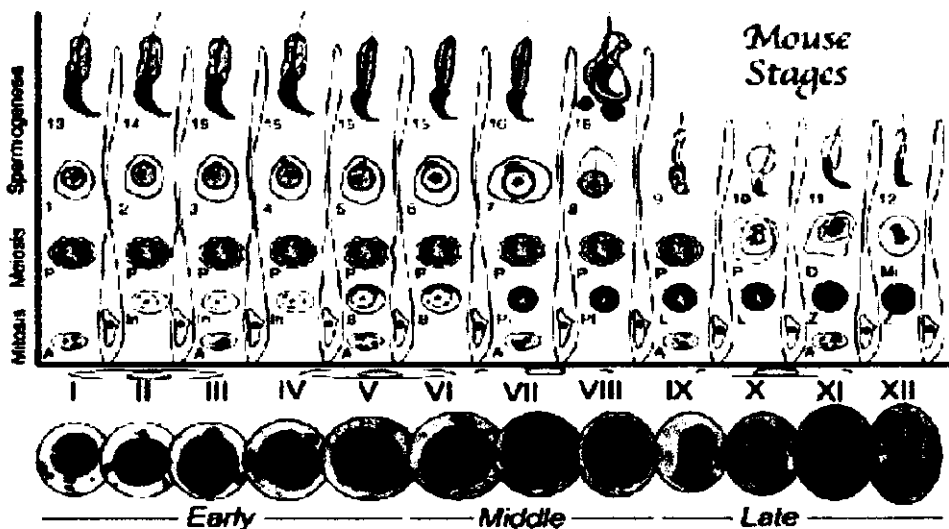


Gambar 2.12 Potongan melintang tubulus seminiferus pada spesies mamalia. Pada manusia (A) dan monyet kecil *Callithrix penicillata* (B), dua tahap siklus atau asosiasi dari sel Germinal (dibatasi oleh garis hitam). Pada tikus/mouse (C) dan rat (D) hanya di temukan satu tahap (Hess dan Franca. 2008).

Epitel seminiferus hanya terdiri dari satu jenis sel somatik, yaitu sel Sertoli, tetapi banyak djumpai jenis sel Germinal (Hess dan Franca. 2005). Mekanisme molekuler pada spermatogenesis didefinisikan menurut perubahan yang diamati di wilayah golgi dari spermatid, dimana sistem akrosomik membentuk visualisasi oleh reaksi *periodic acid schiff* (PAS). Pada mencit, stadium XII diperlihatkan pada gambar 2.13. Namun, spermatogenesis merupakan proses yang terus

berlanjut sehingga menghasilkan wilayah transisi yang teramati pada beberapa tahap (Hess, 1990).

PAS merupakan pewarnaan histologis dan resolusi yang lebih tinggi secara mikroskopis diperlukan untuk mengidentifikasi tahapan tertentu. Namun, untuk sebagian besar penelitian pengelompokan tahapan ke dalam tiga kategori dengan tujuan kesederhanaan untuk mengevaluasi pengamatan. Misalnya adalah stadium I - IV sebagai tahap awal; stadium VI-VIII sebagai tahap tengah, dan stadium IX-XII sebagai tahap akhir.



Gambar 2.13 Spermatogenesis pada epitel seminiferus tikus (stadium I-XII) (Hess dan Franca, 2008).

Pada gambar 2.13 diatas, setiap tingkat menggambarkan asosiasi seluler yang diambil dengan sel Sertoli untuk memisahkan setiap tahap. Inti spermatid tahap awal, tengah dan akhir diwarnai dengan reaksi PAS dan hematoksiin. Spermatogonia (A,B), spermatosit (Pl: preleptotene, L: leptotene, Z: zygotene, P:

pakiten, D: diakinesis, Mi: meiotic division), spermatid bulat (1-8); spermatid memanjang (9-16). **Stadium I**, dua generasi spermatid bulat dan memanjang ditemukan pada stadium I-VIII. Pada tahap ini, inti spermatid bulat kecil dibanding tahap berikutnya dan berisi *nucleolus* besar yang khas. Golgi juga kecil dan tidak memiliki materi dan granular. **Stadium II**, butiran kecil proakrosomal terlihat di tengah aparatus golgi yang melekat pada inti spermatid bulat. **Stadium III**, sebuah granula akrosomik terbentuk dengan baik dalam vesikel golgi bulat dan berukuran lebih besar yang membentuk lekukan inti spermatid bulat. **Stadium IV**, granula akrosomik mulai merata pada tahap ini. **Stadium V**, Sistem akrosomik terlihat secara jelas dan ada garis lurus yang dibentuk oleh granula akrosomik terletak di garis gelap yang membatasi inti spermatid bulat, dikelilingi oleh vesikel. Sepanjang basal membran, Spermatogonium B mulai menonjol. **Stadium VI**, sistem akrosomik mulai menyebar, tetapi tebal dan granula yang berbeda. Pada tahap ini, Spermatogonium B mengalami mitosis untuk membentuk spermatosit preleptotene. Pemanjangan spermatid mulai bermigrasi ke arah lumen. **Stadium VII**, sistem akrosomik menyebar, melintasi inti dan menjadi lebih tipis, yang memungkinkan pusat akrosomik granula sedikit menonjol di atas vesikel akrosomik. Spermatid memanjang terletak di tepi lumen tubulus dan sitoplasma mulai terlihat kepala sperma dan sekitar 1/2 ekor. **Awal stadium VII**, sitoplasma pada wilayah pertengahan spermatid memanjang dan tidak ada lobus sitoplasma yang telah terbentuk. Banyak preleptotene inti sel kecil yang ditemukan di dibasal membran. **Tengah stadium VII**, lobus sitoplasma mulai terbentuk dan sitoplasma spermatid memanjang tidak lagi terlihat pada daerah

tengah ekor. Butiran gelap besar di lobus sitoplasma belum ada. **Akhir stadium VII**, lobus sitoplasma terbentuk dengan baik dan banyak antara kepala sperma dan basal membran. Butiran gelap mulai muncul di dekat kepala sperma dan kadang di bawahnya. **Stadium VIII**, akrosom merata dan membentuk topi yang menutupi hampir setengah dari inti spermatid bulat. Banyak inti telah bermigrasi ke plasmalema sitoplasma dan sistem akrosomik dapat berorientasi terhadap membran basal. Spermatid memanjang dilepaskan ke lumen melalui proses yang disebut *spermiation*, sementara kelebihan sitoplasma spermatid membentuk lobus sitoplasma besar dengan tubuh gelap besar di bawah kepala spermatid langkah 16. **Stadium IX**, hanya satu generasi spermatid ditemukan dalam Tahapan IX-XII, transisi dari spermatid bulat menjadi memanjang. bagian dari langkah 9 inti spermatid yang lonjong, ketika mulai perpanjangan tersebut, sistem acrosomic dari pusat dan membentang dari puncak menuju ekor wilayah inti. Lobus sitoplasma fusi ke dalam residual body yang sangat besar dan akan terfagosit oleh sel Sertoli dan menghilang pada tahap tahap X-XI. **Stadium X**, kepala spermatid membentuk tonjolan yang berbeda dengan sudut yang tajam. Tonjolan ditutupi oleh akrosom di sisi ventral, sementara sisi dorsal ditutupi dengan permukaan inti ekor. Inti pakiten spermatosit mencapai diameter maksimum sebelum fase diplotene. **Stadium XI**, langkah 11 inti spermatid menjadi lebih tipis, lebih panjang dan spot lebih pekat, menunjukkan kondensasi kromatin. Inti spermatosit diplotene menjadi lebih besar dan mulai kehilangan amplop nuklear dan memasuki diakinesis meiosis I. **Stadium XII**, dalam tahap ini tampak adanya meiosis dan spermatosit sekunder. Langkah 12 inti spermatid menunjukkan warna

yang tipis dan nuklear yang pekat gelap kecuali untuk wilayah yang paling caudal. sistem akrosomik membentuk perut dan sirip punggung atas tonjolan apikal (Hess dan Franca. 2008).

2.5.2 Mitosis

Spermatogonia adalah sel Germinal diploid ($2n$) yang membelah oleh mitosis dan berada di dasar membran. Sel induk Spermatogonium tidak selalu teridentifikasi pada pengamatan mikroskop, tetapi berbagai jenis spermatogonia digolongkan menjadi tipe A, intermediat, dan tipe B. Pada spesies tikus, tahapan spermatogenesis dibedakan menurut ciri transmisi sesuai dengan siklus spermatogenesis dan siklus dari epitel seminiferus serta distribusi heterokromatin (Chiarini dan Russell, 2001)

2.5.3 Meiosis

Spermatogonium B mengalami pembelahan mitosis membentuk dua spermatosit. Spermatosit ditemukan di semua tahapan, karena meiosis terjadi sepanjang spermatogenesis selama 14 hari pada tikus atau mencit. Pembelahan meiosis terjadi pada tahap tunggal (stadium XII). Pada tikus, stadium XII ditemukan pada sekitar 10% dari tubulus seminiferus. Pembelahan meiosis selesai dalam waktu sekitar 1 hari (Hess, 2005). Pembelahan seluler terjadi dalam tiga kategori stadium XII: (a) meiosis I, pembagian sel $4n$, (b) pembentukan spermatosit sekunder ($2n$) (tapi spermatosit jarang ditemukan sebagai satu-satunya spermatosit dalam tubulus), dan (c) meiosis II, pembagian sekunder spermatosit $2n$ untuk membentuk spermatid bulat haploid ($1n$) (Franca *et al.*, 2005)

2.5.4 Spermiogenesis

Transformasi spermatid bulat haploid ($1n$) menjadi memanjang dan spermatozoa matang, kemudian dilepaskan ke lumen tubulus seminiferus disebut sebagai tahap spermiogenesis. Diferensiasi spermatid berlangsung melalui 4 fase yaitu: *Golgi*, *capping*, *acrosomal*, dan *maturation* (Hess dan Franca. 2008).

Golgi. Pembentukan akrosom tergantung pada kemampuan organel golgi untuk menghasilkan vesikula dan granul yang mengandung komponen enzimatik dari sistem akrosomik yang mencakup pembentukan inti sperma. Diferensiasi dari tiga langkah pertama pada pembentukan spermatid bulat, aparatus golgi dapat diidentifikasi dengan pewarnaan PAS. Tahapa pertama, spermatid memiliki golgi yang berukuran kecil, pada daerah perinuklear tanpa vesikel akrosomik atau granul. Setelah langkah kedua dan ketiga proakrosomal vesikel dan butiran dalam aparatus golgi sudah dapat ditemukan, dengan pembentukan granul akrosom yang lebih besar dalam vesikel yang akan membuat lekuk inti (Hess dan Franca. 2008).

Capping. Capping melibatkan fase 4-5 spermatid bulat, dimana granul akrosomik menyentuh amplop nuklear dan vesikel mulai merata sebagai tutup di atas permukaan nuklear. Pada fase 6-7, vesikel akrosomik menjadi sangat tipis dan granula merata. Fase 8 adalah yang terakhir, spermatid bulat dan akrosom merata sekitar $1/3$ dari permukaan nuklear. Pada tahap akhir stadium VIII, fase 8 memperlihatkan inti yang mulai berubah bentuk (Hess dan Franca. 2008).

Acrosomal. Fase akrosom 9-14 melibatkan migrasi sistem akrosom pada inti memanjang spermatid. Migrasi akrosom selesai maksimal pada fase spermatid 14 dan sulit untuk mengidentifikasi bagian histologis yang khas, karena berbeda

dari bagian sudut atau orientasi. Dengan demikian, tahap tertentu pada spermatogenesis akan tergantung pada sistem akrosom dalam spermatid bulat, bukan dalam sel memanjang. Langkah spermatid melibatkan kondensasi kromatin, sebagai kromosom yang tampak lebih erat dan spot pekat pada pewarnaan hematoksilin (Hess dan Franca. 2008).

Maturation. Pematangan fase 15-16 terlihat pada stadium III-VIII dan menunjukkan perubahan pada bentuk nuklear dan migrasi akrosom. Inti terus mengembun dan akrosom menonjol mencakup hampir semua inti, kecuali bagian yang terhubung ke ekor. Kelebihan sitoplasma tereliminasi pada stadium VII-VIII sebagai hasil dari pembentukan lobus sitoplasmik dan badan residual, mengandung mitokondria yang tidak digunakan, ribosom, lipid, vesikel dan komponen sitoplasmik lainnya (Franca *et al.*, 2005)

2.5.5 Siklus dan Gelombang Spermatogenesis

Sel Germinal dalam setiap lapisan epitel seminiferus mengalami perubahan sesuai dengan lapisan lainnya dari waktu ke waktu, menghasilkan urutan tahapan yang dijelaskan di pada gambar 2.13. Lekukan sel tidak bermigrasi ke lateral tubulus seminiferus, namun tidak semua tahapan dapat teramati, dimana tahapan secara berurutan terjadi dengan pengulangan pada tubulus dalam sebuah 'gelombang' dari epitel seminiferus. Pada hewan pengerat, stadium I diikuti oleh stadium II, kemudian stadium III, dan seterusnya kemudian berulang lagi mulai stadium I. Stadium ini ditemukan dalam urutan dari rete testis ke pusat tubulus seminiferus. Gelombang dihasilkan oleh sinkron pengembangan unit klonal sel Germinal melalui mekanisme sinyal biokimia (Russell *et al.*, 1990).

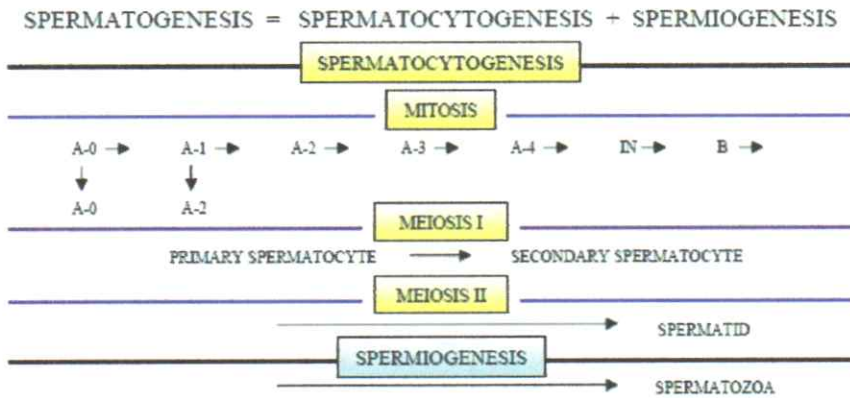
Mekanisme yang tepat di mana sel induk Spermatogonium A berproliferasi berubah menjadi spermatogonia tipe A dan B, dan sekaligus memperbaharui populasi Spermatogonium (Cooke *et al.*, 2006). Spermatogonium menghasilkan spermatisit setelah sejumlah pembelahan mitosis yang memiliki karakteristik pada masing-masing spesies. Dibandingkan dengan sel lainnya, spermatogenesis diperkirakan memiliki jumlah terbesar dari pembelahan sel selama ekspansi. Misalnya, pada tikus dan babi, sekitar sepuluh generasi Spermatogonium yang diperlukan untuk membentuk spermatisit preleptotene dari satu sel induk Spermatogonium ($A_s \rightarrow A_{pr} \rightarrow A_{a14} \rightarrow A_{a18-16} \rightarrow A_1 \rightarrow A_2 \rightarrow A_3 \rightarrow A_4 \rightarrow B$), sedangkan pada manusia angka ini jauh lebih rendah dan diperkirakan hanya 4 kali pembelahan mitosis (Cooke *et al.*, 2006).

Pengetahuan dari panjang siklus spermatogenik merupakan dasar untuk menentukan efisiensi spermatogenik dan melakukan studi banding antar spesies. Total durasi spermatogenesis berdasarkan siklus spermatogenik berkisar dari 30 sampai 78 hari pada mamalia. Meskipun perbedaan strain atau perkembangbiakan dapat ditemukan di antara anggota spesies yang sama, panjang siklus spermatogenik umumnya dianggap konstan untuk spesies tertentu dan tidak terbatas filogenetis. Namun, disarankan dalam literatur bahwa suhu dan beberapa obat mungkin mempengaruhi durasi spermatogenesis dan mungkin dapat mengubah siklus sel (Leal dan Franca 2006).

Apoptosis sel Germinal terjadi secara normal selama spermatogenesis pada semua mamalia dan memainkan peran penting dalam menentukan jumlah sperma. Namun, pengaruh terbesar pada produksi sel Germinal adalah kapasitas mitosis

dan jumlah generasi pembelahan Spermatogonium yang akan menentukan jumlah sel yang masuk pada tahap meiosis (Russell *et al.*, 2003). Dengan mempertimbangkan jumlah generasi Spermatogonium dan dua pembelahan meiosis sebelum pembentukan spermatid haploid, hanya 2-3 spermatozoa dari 10 yang dihasilkan dari setiap diferensiasi Spermatogonium (Franca *et al.*, 2005). Dengan demikian, sel Germinal secara signifikan berkurang pada fase spermatogonial yang disebut '*density-dependen regulation*' (kepadatan yang tergantung regulasi), terutama selama pembelahan mitosis dari spermatogonia tipe A₂ sampai A₄. Hal ini dimediasi oleh beberapa faktor misalnya p53, penekan protein, Bcl-2, Bax dan Fas. Salah satu kemungkinan, yang belum teruji, adalah degenerasi oleh mekanisme homeostatik yang membatasi jumlah sel Germinal sesuai dengan sel Sertoli yang tersedia (Johnson *et al.*, 1992).

Terlepas dari faktor-faktor lain, jumlah sel Sertoli merupakan salah satu penentu yang paling penting dalam produksi spermatozoa secara maksimal (Holsberger dan Cooke, 2005). Jumlah sel Sertoli per gram jaringan dikombinasikan dengan jumlah spermatid per sel Sertoli berkorelasi positif dengan produksi spermatozoa per gram testis (Franca *et al.*, 2005). Jumlah produksi spermatozoa perhari pergram perenkim testis adalah ukuran efisiensi spermatogenik pada hewan dewasa secara seksual. Pada spesies mamalia, 4-60juta spermatozoa yang dihasilkan setiap hari per gram jaringan testis (Hess dan Franca, 2008). Secara umum spermatogenesis doringkas pada gambar 2.14.



Gambar 2.14 Spermatogenesis secara umum pada mamalia. <http://www.uwyo.edu/>

2.6 Regulasi Hormonal dalam Spermatogenesis

Hormon dikenal mengatur fungsi sel di semua jaringan termasuk testis. Kelompok biomolekul tersebut mengarahkan spektrum yang luas berefek pada berbagai aspek spermatogenesis. Restrukturisasi dari sambungan sel sangat penting untuk memungkinkan migrasi sel Germinal sepanjang epitel seminiferus dari membran basal menuju lumen tubular (Lui dan Lee, 2009).

Sel Sertoli tidak hanya melindungi sel Germinal dari sistem kekebalan tubuh, tetapi juga kontrol terhadap humoral spesifik dan lingkungan nutrisi. Sel Sertoli berkomunikasi dengan sel Germinal yang berdekatan dengan persimpangan sel khusus (*gap junction, ectoplasmic spesialisasi (ES), kompleks tubulobulbar*) oleh faktor lingkungan (Mruk dan Cheng 2004). Sel Sertoli juga mempengaruhi perkembangan dan fungsi sel Leydig. Sel Sertoli berkontribusi terhadap kontraktilitas tubulus dan pergerakan spermatozoa. Sel Leydig, selain berperan dalam produksi androgen, dapat memberikan faktor penting lain untuk

perkembangan sel Germinal dan memelihara interaksi bilateral sel Sertoli melalui mekanisme sinyal sel (Verhoeven *et al.*, 2010).

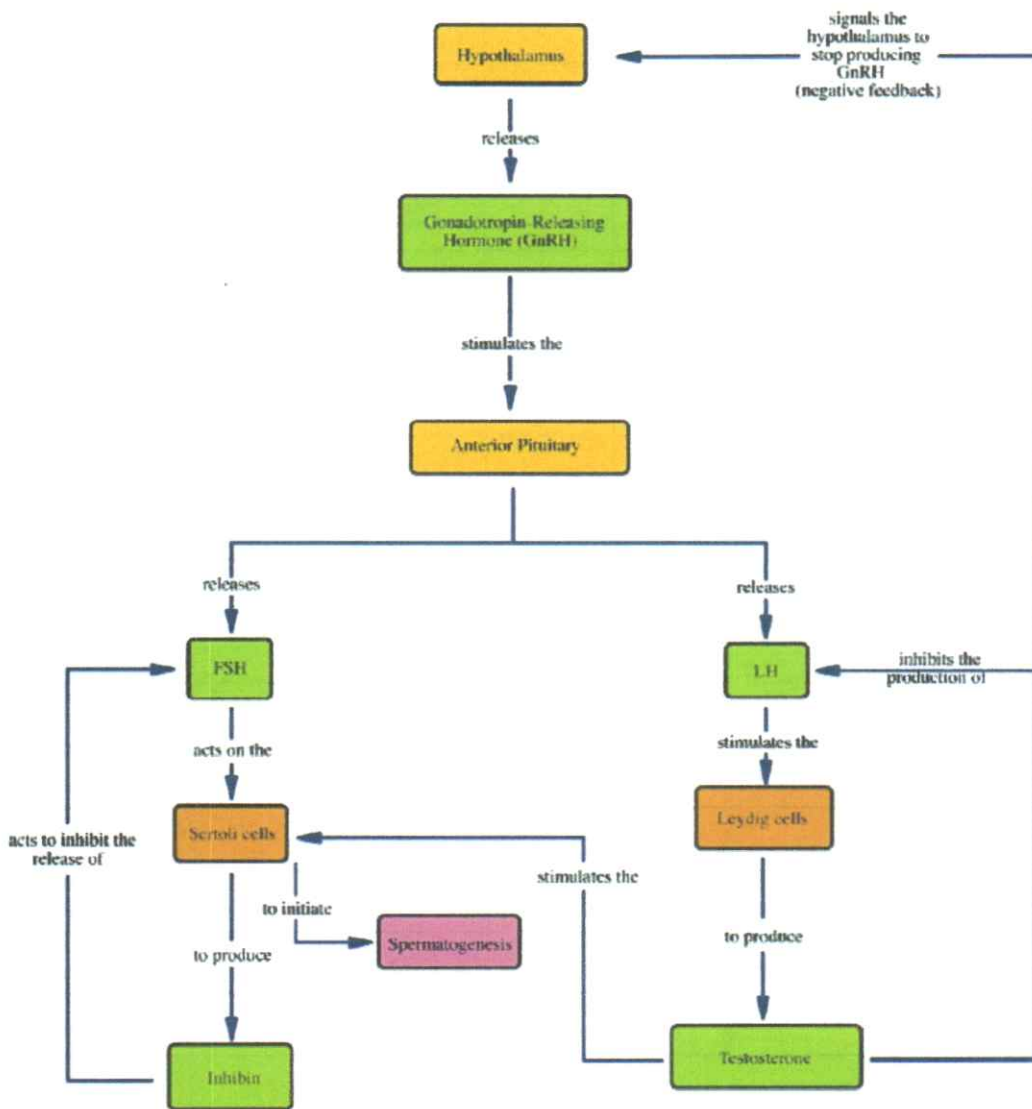
Sel Sertoli memiliki beberapa peran penting dalam spermatogenesis, yaitu: memberi dukungan dan nutrisi pada sel Germinal yang sedang berkembang; kompartementalisasi dari tubulus seminiferus untuk perkembangan sel Germinal, kendali pelepasan spermatid matang ke dalam lumen tubular (*spermiation*), sekresi cairan, protein dan beberapa faktor pertumbuhan, fagositosis dari sel Germinal yang terdegenerasi dan fagositosis dari kelebihan sitoplasma (*residual body*) pada saat pelepasan sperma. Sel Sertoli juga memfasilitasi aktivitas FSH dan LH untuk merangsang produksi testosteron di testis (Johnson *et al.*, 1992). Meskipun telah disarankan FSH memainkan peran utama dalam inisiasi, pertahanan dan pemulihan spermatogenesis pada primata, namun pada sebagian besar spesies mamalia, testosteron memiliki peran penting dalam menjaga kuantitatif spermatogenesis, sedangkan FSH memainkan peran kualitatif (Hess dan Franca. 2008).

Spermatogenesis terjadi akibat interaksi hipotalamus, hipofisis, dan sel Leydig. Hipotalamus menghasilkan GnRH, menyebabkan hipofisis anterior menghasilkan FSH dan LH. FSH meningkatkan aktivasi sel Sertoli, sementara LH mengakibatkan sel Leydig menghasilkan testosteron, keduanya memberikan stimulus positif terhadap proses spermatogenesis. Stimulus negatif untuk proses spermatogenesis diperankan oleh oleh testosteron dan inhibin. Inhibin dihasilkan Sertoli mengurangi produksi FSH hipofisis anterior. Testosteron, selain meningkatkan aktivitas spermatogenesis, juga memberikan stimulus negatif

dengan menurunkan LH hipofisa anterior dan mengurangi produksi GnRH hipotalamus (Brehm dan Steger, 2005). Rangkaian kontrol hormonal dalam spermatogenesis di tunjukan pada gambar 2.14.

Testosteron mengontrol sel Germinal yang sedang berkembang, khususnya pada tahap spermatid. Diferensiasi spermatid bulat ke spermatid memanjang pada stadium VII-VIII memerlukan aktivitas testosteron. Testosteron diproduksi dalam kompartemen interstisial dibawah bawah pengaruh LH, ekspresi reseptor androgen (AR) pada testis dewasa tertinggi pada tahap VII-VIII. Adanya penekanan hormon testosteron pada tikus menyebabkan spermatid bulat prematur terlepas dari epitel. Studi menunjukkan bahwa testosteron mempengaruhi fungsi perekat antara spermatid bulat dan sel Sertoli, yang mengarah ke perlepasan spermatid bulat dari epitel (Lui dan Lee, 2009).

Pada testis tikus, *androgen-binding protein* (ABP) mengatur bioavailabilitas testosteron dalam cairan ekstrasubular yang diproduksi oleh sel Sertoli dan ditemukan dalam kompartemen tubulus seminiferus. Testosteron memiliki peran kunci dalam modulasi dinamika testis. Hal ini jelas bahwa testosteron tidak hanya terlibat pada tahap spermatid, adhesi Sertoli pada apikal ES, tetapi juga sebagai regulator positif untuk mempertahankan integritas *blood testis barrier* (BTB) (Yan *et al.*, 2008).



The green boxes indicate hormones, the yellow indicate glands, the orange indicate cells and the purple indicate processes.

Gambar 2.15 Kontrol hormonal pada spermatogenesis. Spermatogenesis diatur sebagai rangkaian kontrol dengan umpan balik negatif yang melibatkan hipotalamus, kelenjar pituitari, dan testis. Spesifik neuron dari hipotalamus mensintesis *gonadotropin-releasing hormone* (GnRH), yang menginduksi produksi dua hormon yaitu LH dan FSH. Dalam testis, LH menyebabkan sintesis testosteron oleh sel Leydig intertubular, yang mempengaruhi pelepasan hormon di hipotalamus dan hipofisis. FSH bertindak pada intratubuler sel Sertoli dan juga menginduksi produksi *androgen-binding protein* (ABP) dan juga menginduksi produksi aktivin dan inhibin oleh sel Sertoli. Aktivin dan inhibin mempengaruhi rilis dalam hipotalamus dan hipofisis (Brehm dan Steger, 2005)

FSH sangat penting untuk spermatogenesis pada tikus. Ekspresi reseptor FSH pada sel Sertoli tikus dewasa tertinggi pada tahap IX dan X. Testosteron dan FSH bertindak sinergis untuk mendukung *spermiation*. Testosteron bersama dengan FSH mampu mengembalikan spermiogenesis. Selain spermiation, FSH mengatur integritas dan fungsi dari BTB melalui reorganisasi dan relokalisasi protein (Lui dan Lee, 2009).

2.6.1 Kendali Androgen terhadap Perkembangan Sel Germinal

Hormon utama yang mengendalikan pertumbuhan sel Germinal adalah FSH dan LH. Tindakan utama FSH adalah mempromosikan proliferasi sel Sertoli dalam yang belum matang. LH bekerja pada sel Leydig dan bertanggung jawab atas fisiologis kadar testosteron dalam sirkulasi hewan jantan. Dalam pengaturan fisiologis, baik FSH dan androgen diperlukan untuk memulai dan mempertahankan spermatogenesis yang optimal. Androgen dapat memulai, memelihara atau memulihkan spermatogenesis dengan keberadaan FSH. Administrasi agen eksogen yang dapat menurunkan kadar LH juga dapat menyebabkan penurunan Testosteron intratestikular dan penekanan terhadap spermatogenesis (McLachlan *et al.*, 2002).

Kontribusi khusus dari FSH dan androgen terhadap pengendalian sel Germinal sejauh ini pada tikus terlihat pada siklus yang sensitif yaitu VII dan VIII dari siklus spermatogenik. Studi imunohistokimia menunjukkan perubahan siklik dalam konsentrasi dari reseptor androgen (AR) sel Sertoli memuncak pada stadium VII. Perkembangan sel Germinal dikontrol oleh aksi androgen, meliputi

langkah adhesi spermatid, pengembangan spermatid, spermiation, perkembangan melalui meiosis dan diferensiasi Spermatogonium (Lui dan Lee, 2009).

Adhesi dan perkembangan spermatid. Konversi spermatid bulat terjadi antara stadium VII dan VIII dan merupakan titik utama aksi testosteron. Hilangnya tahap spermatid bulat dan disertai dengan akumulasi sejumlah besar spermatid bulat di kauda epididimis, menunjukkan adanya pelepasan spermatid bulat prematur. Hal ini disebabkan mungkin karena cacat dalam fungsi adhesi dari *ectoplasmic specializations* (ES) (Lee & Cheng 2004).

Spermiation. Rilis spermatid atau *spermiation* terjadi pada stadium VII-VIII dari siklus tikus dan sangat sensitif terhadap kadar testosteron dan/atau FSH (McLachlan *et al.*, 2002). Kegagalan *spermiation* dikarenakan penarikan androgen dan penekanan oleh FSH (Beardsley & O'Donnell 2003).

Progresif pembelahan meiosis. Dalam berbagai model eksperimental, telah ditunjukkan bahwa penekanan terhadap produksi androgen endogen atau tindakan terhadap testis dalam meiosis awal menyebabkan menurunnya penyelesaian tahap meiosis dan pembentukan spermatid (Verhoeven *et al.*, 2010).

Proliferasi dan diferensiasi Spermatogonium. FSH memainkan peran utama dalam kontrol proliferasi Spermatogonium (McLachlan *et al.*, 2002). Dalam beberapa kondisi, konsentrasi intratesticular testosteron sangat mempengaruhi tahap awal pengembangan sel Germinal (Meistrich *et al.*, 2003.).

Disfungsi spermatogenik dikaitkan dengan gangguan sel Leydig. Antara 12 sampai 15% dari jantan dengan spermatogenesis minimum, memiliki tingkat testosteron yang rendah (Andersson *et al.*, 2004). Disfungsi sel Leydig jelas

terkait dengan kerusakan spermatogenik pada model eksperimen tikus. Hal ini menunjukkan adanya hubungan yang jelas antara fungsi sel Leydig dan spermatogenesis (Renshan *et al.*, 2008).

2.6.2 Mediator Reseptor Androgen dalam Regulasi Spermatogenesis

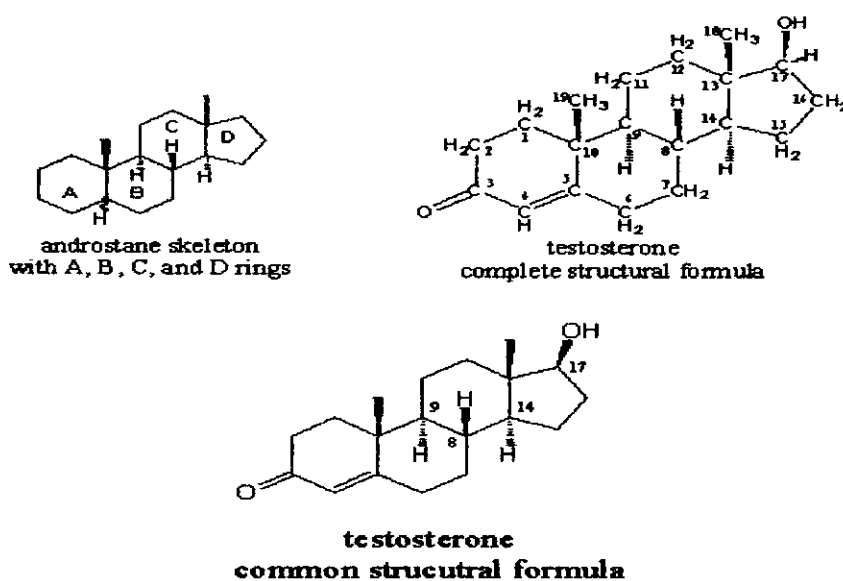
Androgen penting untuk pemeliharaan spermatogenesis normal. Penekanan terhadap biosintesis testosteron dapat menghambat spermatogenesis. Testosteron mengikat reseptor androgen sehingga memulai translokasi nuklear membentuk ligan-reseptor yang terikat pada kompleks dan fungsi regulasi dari reseptor androgen. Spermatogenesis tergantung pada tingkat reseptor androgen. Dalam testis, reseptor androgen ditemukan pada sel Leydig, myoid, Sertoli, dan spermatogonia (Zhou *et al.*, 2002).

Peran mediator reseptor androgen terlihat dalam sel Leydig yang mempromosikan pematangan jalur steroidogenik. Pengurangan tindakan androgen pada sel Leydig, menyebabkan produksi testosteron menurun drastis, menyebabkan tertekannya spermatogenesis. Sel Sertoli merupakan mediator utama reseptor androgen dalam regulasi spermatogenesis. Reseptor androgen ditemukan pada tahap tertentu dalam sel Sertoli sebagai fungsi dari siklus seminiferus yang dapat dipertahankan dalam ketiadaan stimulasi gonadotropin dengan pemberian eksogen androgen. Ekspresi reseptor androgen dalam sel Sertoli tertinggi pada stadium VII-VIII. Aktivitas reseptor androgen di Sertoli: (A) melalui perkembangan meiosis I; (B) transisi dari spermatid bulat ke spermatid memanjang, dan (C) dalam fase terminal spermatogenesis (spermiogenesis). Androgen tidak diperlukan untuk bagian dari sel Germinal melalui meiosis (Chang *et al.*, 2004).

2.7 Testosteron

2.7.1 Struktur Kimia Testosteron

Struktur kimia testosteron tersusun dari atom-C yang memiliki empat obligasi atom-C, atom-H, atau atom-O. 19 atom-C pada testosteron dan 17 atom-C merupakan karakteristik kerangka steroid yang terdiri dari empat cincin. Tiga cincin beranggota enam dan satu cincin beranggota lima, ditunjukkan dengan kapital A, B, C dan D (gambar 2.15). (Groot dan Koert, 2007).



Gambar 2.16 Struktur kimia testosteron (Groot dan Koert, 2007)

2.7.2 Biosintesis Testosteron

Konsentrasi testosteron dalam testis sangat jauh lebih besar dari kadar testosteron pada sistem sirkulasi. Kadar steroid dalam cairan interstisial testis bisa sampai 100 kali lipat lebih tinggi daripada dalam plasma. Oleh karena itu sampel plasma testosteron tidak memberikan ukuran tingkat testosteron testis. Testosteron

tidak disimpan dalam sel Leydig, testosteron dilepaskan ke dalam cairan interstitial dengan mekanisme: i) diambil oleh sel Sertoli dan terikat dalam reseptor androgen, yang kemudian disekresikan oleh sel Sertoli dan diangkut melalui epitel seminiferus ke dalam cairan tubulus seminiferus dan ke epididimis atau ii) berdifusi ke dalam kapiler interstitial, terikat cepat pada transportasi melalui tubuh, dan ia memiliki efek di semua tubuh (Ge *et al.*, 2008).

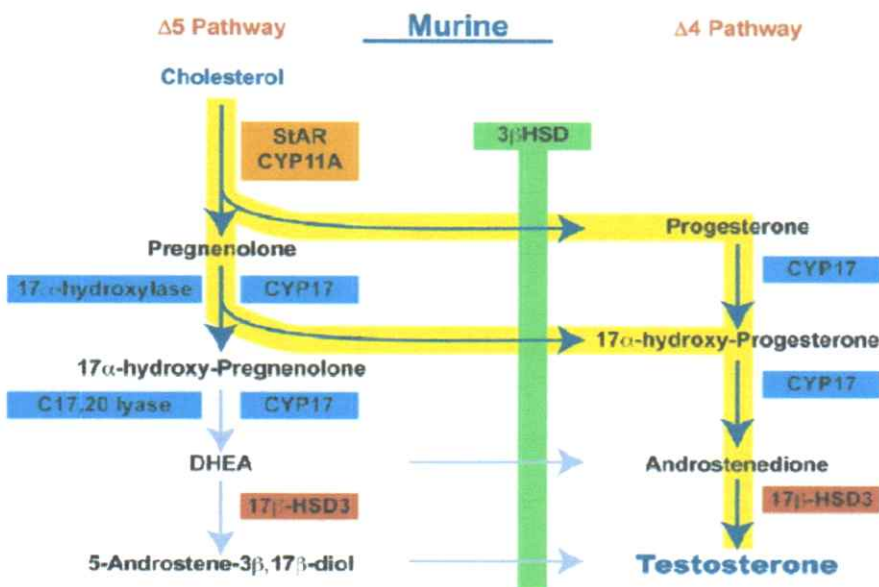
Stimulus utama untuk produksi testosteron berasal dari tingkat LH dalam darah yang disekresikan oleh hipofisis. Biosintesis testosteron langsung dari kolesterol hanya dapat terjadi dalam sel Leydig, kelenjar adrenal hanya mensintesis prekursor testosteron, *dehydroepiandrosterone* (DHEA) (sulfat) dan androstenedion. Estrogen yang diturunkan DHEA (sulfat) dikonversi menjadi androstenedion diikuti aromatase menghasilkan estrone (Scott *et al.*, 2009)

Kolesterol dapat diperoleh dari dalam membran sel, disintesis *de novo* dari asetat, atau diimpor dari sirkulasi dalam bentuk *high-density lipoprotein* (HDL) atau *low-density lipoprotein* (LDL). Langkah pertama dari steroidogenesis membutuhkan transportasi kolesterol bebas dari luar ke dalam membran mitokondria. Mitokondria adalah tempat pertama reaksi enzim "steroidogenik", dikatalisasi oleh CYP11A (Scott *et al.*, 2009).

Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) adalah molekul yang secara aktif mengangkut kolesterol dari luar ke membran mitokondria. Ekspresi StAR terutama diatur oleh LH dimediasi aktivasi cAMP yang akhirnya menyebabkan aktivasi transkripsi. Karena steroidogenesis sangat tergantung pada pergerakan

kolesterol di ruang *intramitochondrial*, mutasi pada StAR memiliki efek penurunan produksi testosteron (Scott *et al.*, 2009).

Setelah kolesterol telah diangkut ke mitokondria membran mitokondria. Pertama kali terjadi adalah reaksi enzimatik berlangsung. Enzim steroidogenik awal, CYP11A memotong rantai samping kolesterol menghasilkan pregnenolon. Pregnenolon kemudian melewati mitokondria ke endoplasma retikulum halus, di mana reaksi enzimatik yang tersisa dapat terjadi. Tindakan enzimatik gabungan dari 3 β -HSD dan CYP17 mengkatalisis konversi keseluruhan untuk pregnenolon ke bentuk androstenedion, yang merupakan cikal bakal testosteron. Konversi ini dapat terjadi pada salah satu dari dua jalur utama seperti pada gambar 2.16. Langkah terakhir dalam sintesis testosteron adalah reduktif 17 β -HSD, untuk mengurangi konversi androstenedion ke testosteron (Scott *et al.*, 2009).



Gambr 2.17 Komponen utama steroidogenesis pada mencit (Scott *et al.*, 2009).

2.7.3 Mekanisme Aksi Testosteron pada Spermatogenesis

Target utama testosteron di testis adalah sel Sertoli yang mengelilingi dan memelihara sel Germinal. Semakin tinggi tingkat testosteron yang diperlukan untuk mempertahankan spermatogenesis menunjukkan bahwa mekanisme non-klasik tindakan testosteron diperlukan untuk beberapa aspek spermatogenesis. Proses spermatogenik pertama memerlukan testosteron untuk pemeliharaan dan reformasi *blood testis barrier* (BTB), sebuah persimpangan antara sel Sertoli yang berdekatan, membagi kompartemen basal dan adluminal dari epitel seminiferus dan memisahkan sel Germinal paska meiosis dari lingkungan luar. BTB menyediakan lingkungan khusus untuk perkembangan sel Germinal dan mencegah imunogenik sel antigen Germinal dari sistem kekebalan tubuh. Selain mendukung BTB, testosteron juga diperlukan untuk adesi Sertoli-spermatid dan pelepasan sperma dewasa kedalam lumen tubulus seminiferus (Walker, 2009)

a. Mekanisme Klasik Tindakan Testosteron

Testosteron dikenal bertindak melalui *androgen receptor* (AR) untuk mengatur ekspresi gen. Stimulasi Testosteron menyebabkan pelepasan AR dari dalam sitoplasma setelah itu ligan AR akan tertranslokasi ke inti dan mengikat urutan DNA spesifik disebut elemen respons androgen (ARES). Mekanisme ini memerlukan setidaknya 30-40 menit untuk mengubah ekspresi gen dan skitar satu jam untuk menghasilkan protein baru. Mekanisme ini disebut jalur klasik tindakan testosteron (Walker, 2009).

b. Mekanisem Non-Klasik Tindakan Testosteron

Terdapat beberapa bukti kemungkinan bahwa regulasi testosteron dapat dikendalikan oleh mekanisme selain jalur klasik. Pertama, setidaknya 35% dari AR tidak terjadi ikatan pada transkripsi awal dalam inti. Kedua, ARES belum terbukti terikat dan diatur oleh AR. Ketiga, sel Sertoli yang dibutuhkan testosteron testis lebih besar dari 70nM untuk mendukung spermatogenesis dan akan jenuh pada 1nM. Pengamatan ini menunjukkan testosteron bertindak dalam sel Sertoli melalui jalur alternatif untuk mengatur spermatogenesis (Walker 2009).

Indikasi bahwa testosteron bertindak melalui aksi non-klasik pada sel Sertoli ditunjukkan oleh Fix *et al.* (2004). Dalam studi ini, sel Sertoli diisolasi dari testis tikus, dirangsang dengan tingkat testosteron yang mirip atau lebih rendah daripada yang ditemukan di testis (10-250 nM). Terjadi aktivasi fosforilasi MAP kinase dan ERK kinase pada jalur CREB, 2 sampai 5 kali lipat di atas tingkat basal. Induksi ini menjadi cepat dan berkelanjutan (1 menit sampai 12 jam). Aktivasi ini tidak mungkin terjadi melalui jalur klasik karena fosforilasi CREB dan ERK terjadi jauh lebih cepat dari 30-45 menit. Aktivasi CREB dalam sel Sertoli sangat penting untuk kelangsungan hidup dari meiosis sel Germinal (spermatosit) dan produksi sperma dewasa (Fix *et al.*, 2004).

2.8 Sistem Antioksidan dan Stres Oksidatif pada Testis

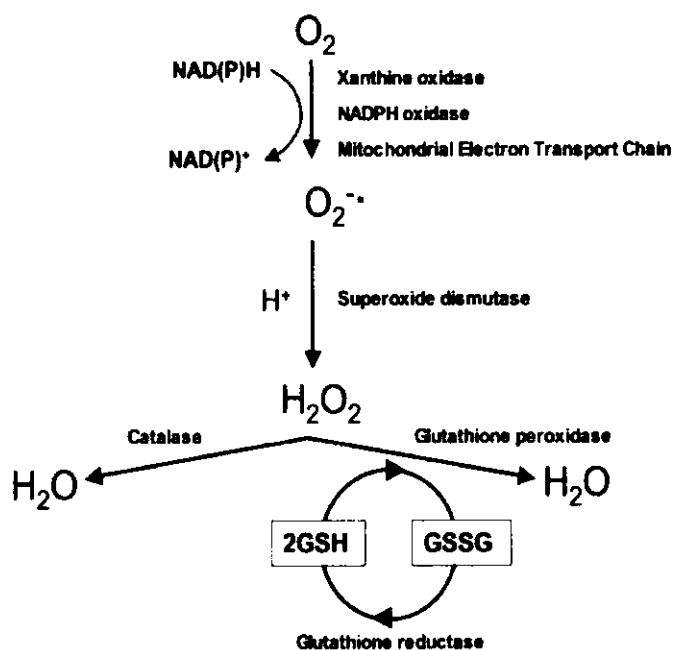
Spermatogenesis adalah proses replikatif yang sangat aktif mampu menghasilkan ± 1.000 sperma per detik. Tingginya tingkat pembelahan sel dalam proses ini juga sejalan dengan tingginya konsumsi oksigen mitokondria oleh epitel

Germinal. Namun, vaskularisasi testis cukup buruk, sehingga tekanan oksigen dalam jaringan rendah dan persaingan untuk elemen vital dalam testis sangat intens. Baik sel Leydig, spermatogenesis dan steroidogenesis rentan terhadap stres oksidatif, tekanan oksigen yang rendah pada jaringan ini merupakan komponen penting dari mekanisme dimana testis melindungi diri dari kerusakan oleh radikal bebas. Selain itu, testis memiliki enzim antioksidan dan peredam radikal bebas, dipastikan bahwa fungsi spermatogenik dan steroidogenik organ ini tidak berdampak oleh stres oksidatif (Aitken dan Roman, 2008).

Semua sel aktif menghasilkan ROS sebagai efek samping kebocoran elektron dari kegiatan redoks intraseluler, seperti rantai transpor elektron. Testis merupakan organ target induksi stres oksidatif karena tersusun dari kadar tinggi *polyunsaturated membrane lipids*. Peningkatan kadar ROS menyebabkan gangguan pada fungsi spermatogenesis (Chandra *et al.*, 2010). Dalam kondisi normal, aktivitas antioksidan keseluruhan sel mampu mengendalikan atau mencegah sebagian besar efek samping oksigen dan intermediet reaktif. Namun, ketika potensi antioksidan melemah atau stres oksidatif sangat meningkat, kerusakan permanen pada sel mungkin terjadi. Kerentanan sistem organ atau organ yang diberikan terhadap kerusakan oksidatif ditentukan oleh keseimbangan antara keseluruhan stres oksidatif dan kemampuan antioksidan (Chow 2001).

Tekanan oksigen yang rendah merupakan ciri lingkungan mikro-testis, jaringan ini tetap rentan terhadap stres oksidatif akibat banyaknya lemak tak jenuh dan adanya potensi spesies oksigen reaktif (ROS). Generasi ROS dapat berasal dari mitokondria dan berbagai enzim termasuk xanthine-, NADPH-oxidase, dan

P450 (Chen *et al.*, 2005). Sitokrom P450 merupakan enzim khusus dari generasi profesional ROS atau dihasilkan oleh metabolit toksik karena aktivitas biokimia mereka. Untuk mengatasi risiko ini, testis memiliki sistem antioksidan yang terdiri dari sistem enzimatik dan sistem non-enzimatik. Pertahanan enzimatik dalam induksi stres oksidatif testis, dicirikan oleh respon NF-KB sebagai mediasi induksi spesies mRNA untuk *superoxide dismutase* (SOD), *glutathione peroksidase* (GPX) dan *glutathione-S-transferase* (GST) (Kaur *et al.*, 2006).



Gambar 2.18 Jalur utama generasi spesies oksigen reaktif. Superoksida dapat dihasilkan oleh enzim khusus, seperti xanthine atau NADPH-oksidadase, atau sebagai produk sampingan metabolisme sel, terutama transportasi rantai elektron mitokondria. Superoksida dismutase kemudian mengubah superoksida ke hidrogen peroksida yang harus dengan cepat dihapus dari sistem ini. Hal ini umumnya dicapai dengan katalase peroksidase atau, seperti glutathione peroksidase yang menggunakan glutathione (GSH) sebagai donor elektron (Aitken dan Roman, 2008).

Biokimia dasar dari enzim antioksidan diringkas dalam gambar 2.18, melibatkan konversi yang cepat dari anion superoksida ($O_2^{\cdot-}$) ke hidrogen peroksida (H_2O_2) dengan adanya SOD untuk mencegah pembentukan radikal hidroksil yang sangat merusak. Penghapusan H_2O_2 dipengaruhi oleh katalase atau glutathione peroksidase pada testis. GST pada sisi lain melibatkan kompleks protein yang mengkatalisis dan mengurangi glutathione melalui kelompok sulfhidril ke pusat elektrofilik pada berbagai substrat dalam persiapan untuk ekskresi dari sel. Kegiatan ini sangat penting dalam detoksifikasi peroksidase lipid serta metabolisme xenobiotik (Aitken dan Roman, 2008).

Massa molekul kecil berperan sebagai antioksidan untuk perlindungan terhadap kerusakan oksidatif, faktor ini termasuk ion dan berbagai macam peredam radikal bebas. Misalnya zinc, vitamin C dan E, Melatonin dan Cytochrome C. Sejak tahun 1940-an vitamin E (*α -tocopherol*) adalah antioksidan lipofilik kuat yang penting untuk pemeliharaan spermatogenesis mamalia. Vitamin E hadir dalam jumlah yang sangat tinggi dalam sel Sertoli dan spermatosit pakiten, dan pada tingkat lebih rendah di spermatid bulat. Vitamin C (asam askorbat) juga memberikan kontribusi terhadap spermatogenesis setidaknya melalui kapasitasnya untuk mendukung *α -tocopherol* dan mempertahankan antioksidan dalam keadaan aktif. Vitamin E terbukti menekan peroksidasi lipid dalam mikrosom testis dan mitokondria dari paparan faktor seperti ozon, kelebihan zat besi, intensif atau paparan aflatoxin, PCB, siklofosamid dan formaldehyde (Zhou *et al.*, 2006).

Meskipun perlindungan antioksidan secara alami terdapat pada testis, berbagai faktor endogen dan eksogen diketahui dapat mengusik pertahanan ini dan menghasilkan keadaan stres oksidatif (Aitken dan Roman, 2008).



BAB 3
KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS

BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS

3.1 Kerangka Konseptual

Penelitian oleh Yin *et al.* (2012) pada model mencit (*mice*) telah membuktikan bahwa mekanisme TCDD dapat menurunkan testosteron serum dan berbagai hormon reproduksi lain yaitu GnRH, FSH, LH. TCDD menekan jumlah sel spermatozoa dan merusak struktur testis. Selain itu, TCDD dapat menghancurkan pertahanan antioksidan pada sistem testis, menyebabkan stres oksidatif, mengarah pada sterilitas reproduksi jantan (Latchoumycandane *et al.*, 2002).

Spermatogenesis diatur oleh rangkaian kontrol yang melibatkan hipotalamus, kelenjar pituitari dan testis. Neuron spesifik dari hipotalamus mensintesis *gonadotropin-releasing hormone* (GnRH) yang menginduksi produksi LH dan FSH. LH menginduksi sintesis testosteron oleh sel leydig, mempengaruhi pelepasan hormon pada hipotalamus dan hipofisis. FSH mempengaruhi sel sertoli, menginduksi produksi *androgen-binding protein* (ABP) dan menginduksi produksi aktivin dan inhibin oleh sel sertoli. Aktivin dan inhibin mempengaruhi rilis dalam hipotalamus dan hipofisis (Brehm dan Steger, 2005)

Cara utama dioxin menembus tubuh adalah konsumsi makanan yang terkontaminasi (Dobrzyński *et al.*, 2009). Oleh karena itu dalam penelitian ini dilakukan metode paparan dioksin secara peroral. Dalam sirkulasi darah TCDD terdistribusi secara sistemik, sehingga dapat mengganggu kontrol terhadap sekresi endokrin reproduksi dan pengaturan spermatogenesis (Hassoun *et al.*, 2003).

Biosintesis Testosteron terjadi dalam sel leydig di bawah pengaruh hormon luteinizing (LH). Penekanan terhadap biosintesis testosteron dapat menghambat spermatogenesis. Testosteron mengikat *androgen receptor* (AR) dan memulai translokasi nuklear dengan membentuk ligan-reseptor yang terikat pada kompleks dan fungsi regulasi AR. Efek dioksin mengganggu aktivitas endokrin dimediasi oleh AhR. AhR mengaktifkan TCDD menginduksi ekspresi CYP1A1 dan dapat berinteraksi dengan AR. Selain berinteraksi dengan AR dioksin juga dapat mengikat ABP dengan baik. Dalam testis, AR ditemukan pada sel leydig, myoid, sertoli, dan spermatogonia (Zhou *et al.*, 2002).

AhR memiliki penekan tindakan ke gen dan bertanggung jawab untuk sintesis reseptor berbagai hormon (Gregoraszcuk *et al.*, 2001). Setelah memasuki sel, TCDD mengikat AhR dalam sitoplasma. Kompleks ikatan AhR dan dioksin mengalami konformasi perubahan dan tertranslokasi ke nukleus (Ebtekar, 2004). Selanjutnya ikatan ini akan melakukan heterodimer dengan faktor transkripsi lain, yaitu Arnt. Heterodimer ini akan berinteraksi dengan *dioxin-responsive enhancer elements* (DRE) yang terletak pada permukaan gen target dan mengaktifkan berbagai faktor transkripsi pada inti sel (Yonemoto, 2000). Heterodimer AhR-Arnt menghasilkan stimulasi gen sitokrom P450 dan akibatnya meningkatkan produksi sitokrom ini. Sitokrom P450 merupakan enzim khusus dari generasi profesional ROS karena aktivitas biokimia agen toksik (Kaur *et al.*, 2006). Sitokrom ini terbentuk dan berpartisipasi dalam proses lanjut metabolisme dioksin (Dobrzyński *et al.*, 2009).

Ahr dan Arnt dalam saluran reproduksi jantan dewasa terdeteksi di semua organ (testis, epididimis, vas deferens, prostat ventral, dorsolateral prostat, dan vesikula seminalis) (Suominen *et al.*, 2003). AhR dan Arnt juga diekspresikan pada spermatisit (Schultz *et al.*, 2003). Pada sistem testis, TCDD menyebabkan keadaan stres oksidatif dalam berbagai kompartemen dari testis (Mathur and D'Cruz, 2011), salah satunya adalah peningkatan kadar ROS yang dapat merusak fungsi testis (Kato *et al.*, 2007).

TCDD mengubah proses steroidogenesis testis dan menyebabkan pengurangan volume dan jumlah sel leydig. Efek TCDD pada fungsi sel leydig khususnya untuk sintesis dan sekresi testosteron. Efek merugikan lain adalah terganggunya interaksi antar sel dalam testis, gangguan perkembangan dari sel-sel germinal, gangguan spermatogenesis, penipisan enzim antioksidan dan peningkatan tingkat peroksidasi lipid (Lai *et al.*, 2005).

TCDD mampu memberikan efek toksik selama aktivasi AhR dan *cytochrome* P450 (CYP450), sedangkan vitamin E dapat menghambat transkripsi dan ekspresi dari CYP450 dan gen steroid dehydrogenase melalui penghambatan induksi TCDD terhadap aktivasi AhR. Selain itu, vitamin E dapat menurunkan *competitive binding* dari TCDD terhadap AR dan ABP. Mekanisme penghambatan oleh vitamin E dikenal sebagai mekanisme antioksidan *chain breaking*, dengan demikian vitamin E memiliki efek antagonis terhadap toksisitas terhadap TCDD (Yin *et al.*, 2012).

TCDD secara cepat mengikat AhR tanpa mengubah reseptor pada tingkat mRNA, mekanisme ini mengakibatkan ekspresi CYP1A1 dalam waktu 2 jam dan

The background of the page is a solid yellow color with a repeating pattern of circular embossed logos. Each logo features a stylized figure, possibly a person or a deity, with arms outstretched, surrounded by a circular border containing text. The logos are arranged in a grid-like pattern across the entire page.

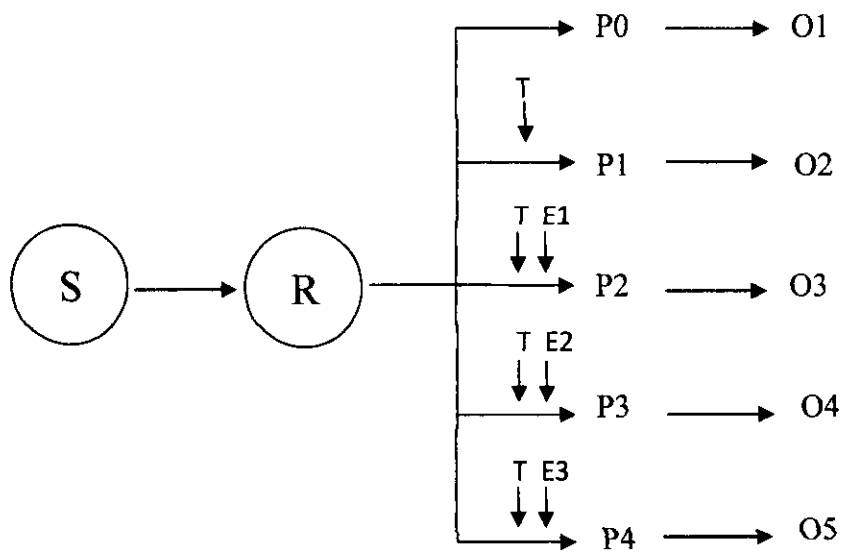
BAB 4
MATERI DAN METODE

BAB 4 MATERI DAN METODE

4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian eksperimental laboratorik (*true-experimental research*) dengan menggunakan variabel bebas untuk mempengaruhi dampak akibat pada variabel tergantung. Rancangan penelitian ini merupakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) terdiri dari lima perlakuan yaitu kontrol negatif (P0), kontrol positif sebagai kelompok perlakuan I (P1), kelompok perlakuan II (P2), kelompok perlakuan III (P3), dan kelompok perlakuan (P4). Masing-masing perlakuan tersebut terdiri dari 5 ulangan yang ditentukan menggunakan rumus $t(n-1) \geq 20$, dengan t merupakan banyaknya perlakuan sedangkan n merupakan banyaknya ulangan.

Rancangan penelitian pada eksperimental laboratorik ini untuk menyelidiki kemungkinan saling hubungan sebab-akibat dengan cara mengenakan satu atau lebih kelompok eksperimental, satu atau lebih kondisi perlakuan dan memperbandingkan hasilnya dengan satu atau lebih kelompok kontrol yang tidak dikenai kondisi perlakuan. Kelompok eksperimen dan kelompok kontrol dibentuk dengan prosedur random, sehingga keduanya dapat dianggap setara. Selanjutnya kelompok eksperimen diberikan perlakuan, dalam jangka waktu tertentu, setelah itu dilakukan pengukuran variabel terikat pada kedua kelompok tersebut.



Gambar 4.1 Rancangan Penelitian

Keterangan :

- S : Populasi seluruh mencit jantan
 R : 25 ekor mencit jantan setelah dipilih secara acak
 T : Dosis TCDD 100ng/kg/hari
 E1 : Dosis Vitamin E 11mg/kg/hari
 E2 : Dosis Vitamin E 20mg/kg/hari
 E3 : Dosis Vitamin E 37mg/kg/hari
 P0 : Kelompok kontrol negatif, pemberian peroral *corn oil* 0,1 ml
 P1 : Kelompok kontrol positif, pemberian TCDD dosis T selama 35 hari
 P2 : Kelompok dengan pemberian peroral TCDD dosis T, setelah empat jam diikuti pemberian peroral vitamin E dosis E1, selama 35 hari
 P3 : Kelompok dengan pemberian peroral TCDD dosis T, setelah empat jam diikuti pemberian peroral vitamin E dosis E2, selama 35 hari
 P4 : Kelompok dengan pemberian peroral TCDD dosis T, setelah empat jam diikuti pemberian peroral vitamin E dosis E3, selama 35 hari
 O1 : Data kelompok kontrol pelarut setelah 35 hari perlakuan
 O2 : Data kelompok perlakuan P1 setelah 35 hari perlakuan
 O3 : Data kelompok perlakuan P2 setelah 35 hari perlakuan
 O4 : Data kelompok perlakuan P3 setelah 35 hari perlakuan
 O5 : Data kelompok perlakuan P4 setelah 35 hari perlakuan

4.2 Populasi, Besar Sampel dan Teknik Pengambilan Sampel

4.2.1 Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah mencit jantan strain BALB/c sebagai hewan coba laboratorium. Adapun kriteria subyek penelitian yang digunakan adalah mencit jantan yang sehat, umur 10 minggu dengan berat badan berkisar antara 25-30 gram dengan ciri-ciri bulu halus, mata bersinar, tidak pincang, tidak didapatkan adanya bekas luka dan belum pernah digunakan untuk penelitian lain.

4.2.2 Besar Sampel

Sampel dihitung dengan menggunakan rumus : $t(n-1) \geq 20$. Dengan n adalah jumlah ulangan dan t adalah jumlah perlakuan. Dalam penelitian ini $t = 5$, maka didapatkan

$$t(n - 1) \geq 20$$

$$5(n - 1) \geq 20$$

$$5n - 5 \geq 20$$

$$5n \geq 25$$

$$n \geq 5$$

Berdasarkan hasil perhitungan didapatkan ulangan minimal yang dibutuhkan untuk lima perlakuan adalah lima. Penelitian ini menggunakan lima ulangan untuk tiap perlakuan, sehingga mencit yang digunakan dalam penelitian ini berjumlah 25 ekor.

Sampel penelitian dibagi menjadi lima kelompok, yaitu kontrol pelarut (P0), mendapatkan *corn oil* 0,1 ml peroral. Kelompok perlakuan I (P1), mendapat dosis peroral TCDD 100ng/kg/hari. Kelompok perlakuan II (P2), mendapat dosis

peroral TCDD 100ng/kg/hari diikuti pemberian peroral vitamin E dosis 11mg/kg/hari setelah empat jam. Kelompok perlakuan III (P3), mendapat dosis peroral TCDD 100ng/kg/hari diikuti pemberian peroral vitamin E dosis 20mg/kg/hari setelah empat jam. Terakhir kelompok perlakuan IV (P4), mendapat dosis peroral TCDD 100ng/kg/hari diikuti pemberian peroral vitamin E dosis 37mg/kg/hari setelah empat jam. Perlakuan diberikan selama 35 hari. Pada hari ke-36 dilakukan pengambilan sampel serum darah dan pembedahan untuk memperoleh jaringan testis.

4.2.3 Teknik Pengambilan Sampel

Teknik pengambilan sampel dilakukan dengan cara random. Karena populasi penelitian dianggap homogen maka cara random yang digunakan adalah *simple random sampling*

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Klasifikasi Variabel

a. Variabel bebas (independen) :Pemberian vitamin E berbagai tingkat dosis pada mencit jantan yang terpapar TCDD.

b. Variabel antara : Pemberian TCDD pada mencit jantan

c. Variabel tergantung (dependen) :

1. Kadar testosteron serum
2. Diameter tubulus seminiferus
3. Jumlah sel spermatogenik

d. variabel kendali :

1. Umur dan jenis kelamin hewan coba

2. Berat badan hewan coba
3. Jaringan testis yang di jadikan bahan pengamatan
4. Waktu perlakuan
5. Pemeliharaan dan perawatan hewan coba
6. Faktor lingkungan dan pakan

4.3.2 Definisi Operasional

Variabel yang digunakan dalam penelitian ini dapat didefinisikan sebagai berikut:

1. Jumlah sel spermatogenik adalah jumlah sel yang terlibat dalam spermatogenesis di tubulus seminiferus meliputi spermatogonia, spermatosit I dan II, spermatid bulat spermatozoa (Hong *et al.*, 2009)
2. Diameter tubulus seminiferus adalah pengukuran yang dilakukan mulai daerah tepi membran basalis sampai pada daerah tepi membran basalis yang bersebarangan sehingga membentuk garis silang tengah, kemudian dihitung rata-rata dalam satuan mikrometer (μm), tubulus seminiferus yang dipilih yaitu tubulus yang berbentuk bulat sesuai kriteria jenis sel penyusun tubulus seminiferus normal yang mengacu pada siklus epitel tahap VII (Gambar 2.12). Pengukuran diameter tubulus seminiferus menggunakan mikroskop cahaya pada pembesaran 400 kali yang dilengkapi dengan kamera dan program *optilab viewer*.
3. Kadar testosteron serum adalah kuantifikasi kadar hormon testosteron yang diukur menggunakan sampel serum darah dengan metode *solid phase competitive chemiluminescence enzyme immuno assay* (CLIA).

4. Jumlah sel spermatogonium adalah jumlah sel spermatogonium dengan karakteristik inti sel bulat dan terletak di tengah, letak sel berada pada lapisan basal dalam satu tubulus seminiferus bulat dengan kriteria jenis dan sel penyusun mengacu pada siklus epitel VII (Hess dan Franca, 2008), spermatogonium dihitung menggunakan mikroskop cahaya pembesaran 400 kali, pengulangan sebanyak tiga tubulus seminiferus dan lima kali ulangan mencit tiap kelompok.
5. Jumlah spermatisit I dan spermatisit II adalah jumlah spermatisit primer dan sekunder dengan ciri sel berbentuk bulat/bulat telur, inti terlihat besar dan jelas pada tengah sel, dalam satu tubulus seminiferus yang berbentuk bulat dengan kriteria jenis dan sel penyusun mengacu pada siklus epitel VII (Hess dan Franca, 2008), spermatisit I dan spermatisit II dihitung menggunakan mikroskop cahaya pembesaran 400 kali, pengulangan sebanyak tiga tubulus seminiferus dan lima kali ulangan mencit tiap kelompok.
6. Jumlah spermatid adalah jumlah spermatid dengan bentuk sel yang kecil, inti bulat dan daerah kromatin yang padat dimana terletak mendekati bagian tengah / lumen dalam satu tubulus seminiferus yang berbentuk bulat dengan kriteria jenis dan sel penyusun mengacu pada siklus epitel VII (Hess dan Franca, 2008), spermatid dihitung menggunakan mikroskop cahaya pembesaran 400 kali, pengulangan sebanyak tiga tubulus seminiferus dan lima kali ulangan mencit tiap kelompok.

7. Jumlah spermatozoa adalah jumlah spermatozoa dengan bentuk memanjang, ramping memiliki kepala yang lonjong, leher dan ekor dimana terletak pada bagian tengah/lumen tubulus seminiferus, dalam satu tubulus seminiferus yang berbentuk bulat dengan kriteria jenis dan sel penyusun mengacu pada siklus epitel VII (Hess dan Franca, 2008), spermatozoa dihitung menggunakan mikroskop cahaya pembesaran 400 kali, pengulangan sebanyak tiga tubulus seminiferus dan lima kali ulangan mencit tiap kelompok.
8. Berat badan mencit sebelum perlakuan adalah berat badan rata-rata pada mencit yang diukur sebelum perlakuan dengan timbangan satuan gram.
9. Jaringan testis yang digunakan pada penelitian ini adalah testis kiri. Hal ini digunakan untuk mengurangi bias penelitian.
10. Waktu perlakuan dimulai pada waktu yang sama setiap harinya.
11. Pemeliharaan dan perawatan hewan coba dilakukan pada tempat yang sama, dengan kondisi kandang individual, pemberian pakan dan air minum *ad libitum*

4.4 Bahan Penelitian

Penelitian ini menggunakan mencit jantan berumur 10 minggu, strain *BALB/c Mus musculus* dari Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Wijaya Kusuma, sebagai model paparan kronis TCDD. Mencit diberi pakan pelet komersil (pakan komplet ayam pedaging starter Br-1) dan air minum kemasan (*club*).

Antagonis toksikan yang digunakan yaitu Vitamin E (*α-tocopherol*, *Analytical standard*, *Sigma T3251*). Sebagai induktor toksik organ reproduksi digunakan *2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD, Analytical standard, Sigma 48599)*. Sebagai pelarut vitamin E dan TCDD digunakan minyak jagung (*Mazola Corn oil switzerland*)

Bahan kimia yang digunakan diantaranya *buffer* formalin 10% untuk mengawetkan jaringan testis yang akan dibuat sediaan histopatologi dengan pewarnaan HE. Bahan yang dibutuhkan pada pewarnaan HE meliputi: larutan alkohol dengan konsentrasi 70%, 80%, 90%,95% dan alkohol absolut, larutan xylol, parafin cair, larutan mayer hematoksilin dan eosin.

Pengukuran kadar hormon testosteron dengan metode *solid phase competitive-CLIA* menggunakan kit testosteron dari *seimens (immulite® 1000 total testosteron)*

4.5 Instrumen Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi serangkaian peralatan sebagai berikut. Alat yang digunakan untuk pemeliharaan hewan coba meliputi kandang plastik yang ditutup kawat kasa dilengkapi dengan botol minum menciit.

Alat yang digunakan untuk perhitungan dosis baik vitamin E dan TCDD adalah *micropipette* 100µl (*Socorex Swiss*). Penyimpanan larutan uji membutuhkan botol kaca steril, dan lemari pendingin. Peralatan untuk pemberian bahan uji secara oral meliputi sonde lambung yang berukuran kecil. Peralatan untuk pengorbanan hewan coba dan preparasi jaringan tesis: pinset, skalpel, dan

gunting (*Yamaco Stainless*). Peralatan untuk pengambilan darah: spuit 3cc (*terumo*), jarum nomor 23G. Pengambilan serum membutuhkan peralatan: tabung dan sentrifuge dingin serta mikrotube untuk penyimpanan serum dalam *frezeer* jika belum langsung digunakan.

Peralatan untuk pembuatan sediaan histologi meliputi *obyek glass*, pipet, *tissue processor automatic* (Sakura Finetek Japan Co., Ltd), *water bath* (Sakura Finetek Japan Co., Ltd), hot plate, *microtome* dan *blade*. Alat untuk pemeriksaan histopalogi yaitu mikroskop (Olympus ® CX-21).

4.6 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan selama 4 bulan, mulai bulan april 2013 sampai juli 2013 di Laboratorium Embriologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, sebagai tempat penyiapan bahan induksi dan bahan uji, perlakuan dan pengorbanan hewan coba serta koleksi testis dan darah untuk analisis selanjutnya.

Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga sebagai tempat pembuatan sediaan histologi pewarnaan HE (hematoksilin dan eosin), Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga sebagai tempat penghitungan jumlah sel spermatogenik dan diameter tubulus seminiferus testis. Terakhir Laboratorium Medis Klinika Surabaya sebagai tempat pengukuran kadar testosteron serum.

4.7 Prosedur Pengambilan dan Pengumpulan Data

4.7.1 Penentuan Dosis Vitamin E

Penentuan dosis vitamin E didasarkan pada penelitian sebelumnya oleh Yin *et al.*, (2012) dengan menggunakan dosis 20, 100 dan 500 mg/kg/hari, terdapat

fenomena bahwa penghambatan toksisitas TCDD terhadap jumlah sel spermatogenik dan kadar testosteron oleh vitamin E lebih tinggi ditemukan pada dosis vitamin E terkecil yaitu 20 mg/kg/hari. Sehingga perlu dilakukan penelitian dengan rentang dosis tengah 20 mg/kg/hari.

Dosis tertinggi ditentukan berdasarkan konversi dosis manusia. Bahan makanan yang dikonsumsi manusia setiap harinya mengandung 25 IU vitamin E. Untuk keuntungan maksimal dari vitamin E, manusia memerlukan konsumsi tambahan 100-400 IU/hari. Penelitian telah menunjukkan bahwa dosis tersebut merupakan dosis optimal untuk mengurangi resiko penyakit kronis (*Institute of medicine US*, 2000). Dosis tersebut bila dikonversi pada mencit adalah 37mg/kgBB/hari.

Konversi dosis vitamin E manusia – mencit:

Dosis manusia 425 IU

Konversi manusia- mencit 20g = 0,0026

Dosis untuk mencit 20g = 425 x 0,0026 = 1,105 IU

Dosis perkilogram mencit perhari = 55,25 IU/kg/hari

1 IU α -tocopherol setara dengan 2/3 mg

Maka dosis perkilogram mencit perhari adalah = 37 mg/kg/hari

Dengan demikian rentang dosis yang akan diteliti adalah 11, 20 dan 37mg/kgBB/hari

Dosis vitamin E ditentukan dengan menggunakan rumus :

$$F = \sqrt[n]{I}$$

Keterangan : F = Faktor Pengali, n = (jumlah dosis dalam rentang) – 1

$$I = \frac{\text{Dosis Terbesar}}{\text{Dosis Terkecil}}$$

$$F = \sqrt[3]{3-1 \frac{37}{11}} = \sqrt[2]{\frac{37}{11}} = 1/2 \times \log \frac{37}{11}$$

$$= \rightarrow \text{anti log} (1/2 \times \log \frac{37}{11}) = 1,83$$

$$\text{Dosis 1} = 11 \text{ mg/kg/hari}$$

$$\text{Dosis 2} = 11 \times 1,83 = 20 \text{ mg/kg/hari (pembulatan)}$$

$$\text{Dosis 3} = 20 \times 1,83 = 37 \text{ mg/kg/hari (pembulatan)}$$

4.7.2 Penentuan Dosis TCDD

Penelitian ini menggunakan dosis tunggal TCDD, yaitu 100ng/kg/hari. Dosis TCDD ditentukan berdasarkan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Fujimaki *et al.* (2002) dan Yin *et al.* (2012).

4.7.3 Pembuatan Larutan Uji

Sediaan Vitamin E dilarutkan dalam *corn oil*. Selanjutnya dibuat seri dosis dalam botol kaca steril. Dosis yang diberikan pada mencit terdiri dari 3 seri dosis yaitu 11, 20 dan 37 mg/kg/hari. Hal ini sama dengan pembuatan larutan uji TCDD. Sediaan TCDD dilarutkan dalam *corn oil*. Selanjutnya dimasukkan dalam botol kaca steril. Setiap botol yang berisi larutan uji diberi label. Pemberian setiap larutan uji baik *corn oil*, larutan vitamin E dan larutan TCDD sebesar 0,1ml peroral perekor mencit. Semua larutan uji diencerkan sebelum pemberian peroral pada hewan coba pada hari yang sama.

4.7.4 Tahap Persiapan Hewan Coba

Mencit dikandangkan secara individual pada kandang berukuran 20x15x15cm. Kandang bertemperatur dan kelembaban konstan dengan pencahayaan cukup. Mencit diberi pakan pelet komersial untuk starter broiler (Br-1) dan air minum kemasan (*club*) *ad libitum*. Perlakuan dimulai setelah mencit menyesuaikan diri terhadap kondisi pemeliharaan selama satu minggu.

4.7.5 Tahap Perlakuan

Seleksi 25 mencit jantan yang sehat dengan berat badan berkisar 25-30 gram. Secara random dikelompokkan dalam lima grup, setiap grup terdiri dari lima mencit jantan. TCDD dan vitamin E diberikan peroral selama 5 minggu atau 35 hari.

TCDD dilarutkan dalam minyak jagung (*corn oil*), dan diberikan secara peroral. Pemberian TCDD maksimal pada pukul 10.00 perharinya dan empat jam setelahnya diikuti pemberian vitamin E proral. Setelah 5 minggu dilakukan tritmen, semua mencit dibunuh melalui pembiusan pada pukul 10.00. Testis dan darah dikoleksi untuk dilakukan analisis.

Secara rinci berikut ini tahap perlakuan untuk setiap kelompok perlakuan:

Kelompok I : kelompok kontrol negatif (P0), pemberian *corn oil* 0,1ml peroral selama 35 hari.

Kelompok II : kelompok kontrol positif (P1), pemberian peroral TCDD dosis 100ng/kg/hari selama 35 hari

Kelompok III: kelompok perlakuan II (P2), pemberian peroral TCDD dosis 100ng/kg/hari. Setelah empat jam, diikuti pemberian peroral vitamin E dosis 11mg/kg/hari, selama 35 hari.

Kelompok IV: kelompok perlakuan III (P3), pemberian peroral TCDD dosis 100ng/kg/hari. Setelah empat jam, diikuti pemberian peroral vitamin E dosis 20mg/kg/hari, selama 35 hari.

Kelompok V : kelompok perlakuan (P4), pemberian peroral TCDD dosis 100ng/kg/hari. Setelah empat jam, diikuti pemberian peroral vitamin E dosis 37mg/kg/hari, selama 35 hari.

4.7.6 Teknik Pengambilan Darah dan Jaringan Testis

Langkah-langkah untuk pengambilan sampel darah adalah sebagai berikut : dari masing-masing mencit pada kontrol ataupun yang sudah mendapat perlakuan kemudian:

1. Dilakukan pembiusan menggunakan *ether*, mencit dimasukkan ke dalam toples kaca dan ditutup, kemudian larutan *ether* diteteskan kedalam toples tersebut, mencit di angkat dari toples jika sudah tidak bergerak lagi (sekitar 25-75 detik setelah ether diteteskan). Kemudian diletakan dipapan bedah untuk pengambilan darah.
2. Dilakukan laparotomi sub arkus kosta
3. Diafragma dibuka sehingga tampak jantung yang pulsatil
4. Jantung di pungsi dengan menggunakan spuit 3ml dengan jarum no 23G dan darah dihisap sebanyak 1-1,5 ml. Darah dari spuit dimasukkan kedalam

tabung *sentrifuge* secara perlahan melalui dinding tabung. Kemudian tabung diletakkan dalam kondisi miring selama 30 menit. Dilakukan sentrifuge 2000 rpm selama 15 menit pada suhu 20°C. Serum yang telah dipisahkan, dapat dilakukan segera pemeriksaan kadar testosteron atau sebelum di periksa disimpan dalam *freezer* hingga dilakukan pengujian terhadap testosteron.

5. Setelah pengambilan darah aorta langsung di putus, kemudian dilakukan pengambilan jaringan testis dengan cara andomen bawah dijepit dengan pinset kemudian diangkat sedikit. Kulit abdomen yang terangkat digunting pelan-pelan sampai abdomen terbuka. Testis diambil dengan mengangkat duktus deferens sampai testis keluar dari abdomen. Setelah testis dikeluarkan, testis dibersihkan dari jaringan ikat dan lemak, kemudian seluruhnya segera dimasukan ke dalam larutan fiksatif formalin 10% dan diberi label.

4.7.7 Metode Pengukuran Testosteron Serum

Pengukuran testosteron serum darah mencit dilakukan dengan menggunakan metode *solid phase competitive-CLIA* (Lampiran 14).

4.7.8 Pembuatan Sediaan Histopatologi Hematoksin – Eosin (HE)

Hewan coba di korbakan dengan memotong aorta setelah pengambilan darah langsung pada jantung. Hewan ditelantangkan diatas papan seksi dan keempat anggota gerak difiksasi, selanjutnya melakukan insisi dengan membuka abdomen, testis dikeluarkan. Fiksasi jaringan testis dalam larutan buffer formalin 10%.

Dehidrasi, dilakukan dengan larutan alkohol dengan konsentrasi makin tinggi, mulai 80%, 90% dan 95% masing-masing selama 2 jam, dilanjutkan dengan larutan alkohol absolut I dan II masing-masing selama 1 jam. *Clearing*, dilakukan dengan larutan xylol I dan II masing-masing selama 2 jam. Infiltrasi dengan parafin cair I dan parafin cair II masing-masing selama 3 jam. *Embedding*, dilakukan pencetakan dalam bentuk blok dan kemudian didinginkan selama 24 jam. *Sectioning*, dilakukan pengirisan dengan *microtome* setebal 4 μm kemudian dimasukkan air dengan suhu 50°C (dibawah titik cair parafin). Setelah itu ditempelkan ke *obyek glass* dan ditunggu sampai kering selama 7 menit kemudian dipanaskan dengan *hot plate* pada suhu 57-58°C selama 15 menit.

Tahap pewarnaan HE adalah sebagai berikut : Deparafinisasi, preparat dimasukan ke xylol I, II, III masing-masing selama 3 menit kemudian diusap memakai kain kasa. Rehidrasi, preparat dimasukan ke alkohol 100%, 95%, 80% dan 70% masing-masing selama 2 menit kemudian preparat dicuci dengan air mengalir selama 3 menit. Pengecatan inti, preparat dimasukan ke larutan mayer hematoksilin selama 7 menit lalu preparat dimasukan ke air mengalir selama 7 menit. *Counter stain*, preparat dimasukan ke dalam larutan eosin selama 0,5 menit. Preparat dimasukan ke air wadah I, II, III masing-masing sebanyak 3 celup. Dehidrasi, preparat dimasukan ke alkohol 70%, 80%, 95%, 100% masing-masing sebanyak 3 celup. *Clearing*, preparat dimasukan xylol I dan II masing-masing selama 2 menit. Tahap terakhir dari proses pewarnaan HE adalah *mounting*, preparat diberi 1 tetes entelan dan ditutup dengan *cover glass* lalu

dibiarkan kering dalam suhu ruang kemudian hasil preparasi dibiarkan selama semalam.

4.7.9 Kuantifikasi Diameter Tubulus Seminiferus Sediaan Histopatologi HE

Diameter tubulus seminiferus ditentukan melalui evaluasi preparat histopatologi, dihitung dengan memilih tiga tubulus seminiferus berbeda secara acak, kemudian diambil nilai reratanya. Pengukuran diameter tubulus seminiferus menggunakan program *Optilab viewer* dengan mengukur jarak antara dua titik yang bersebarangan pada garis tengah tubulus seminiferus. Dalam satu tubulus seminiferus ditarik 4 tengah (lampiran 16), kemudian dihitung rata-rata, data yang diperoleh sebagai diameter tubulus seminiferus dalam satuan μm .

Pengamatan dan penghitungan diameter tubulus seminiferus sesuai kriteria jenis sel penyusun tubulus seminiferus normal yang mengacu pada siklus epitel tahap VII (Gambar 2.12). Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop cahaya pembesaran 400x yang dilengkapi dengan kamera dan program *optilab viewer* yang di sambungkan pada komputer.

4.7.10 Kuantifikasi Jumlah Sel Spermatogenik Sediaan Histopatologi HE

Jumlah sel spermatogenik ditentukan melalui evaluasi preparat histopatologi, dihitung dengan memilih tiga tubulus seminiferus berbeda secara acak, kemudian sel spermatogenik dari tiga tubulus seminiferus tersebut dihitung nilai rata-rata. Selanjutnya diproses secara statistik (Kisker *et al.*, 2003).

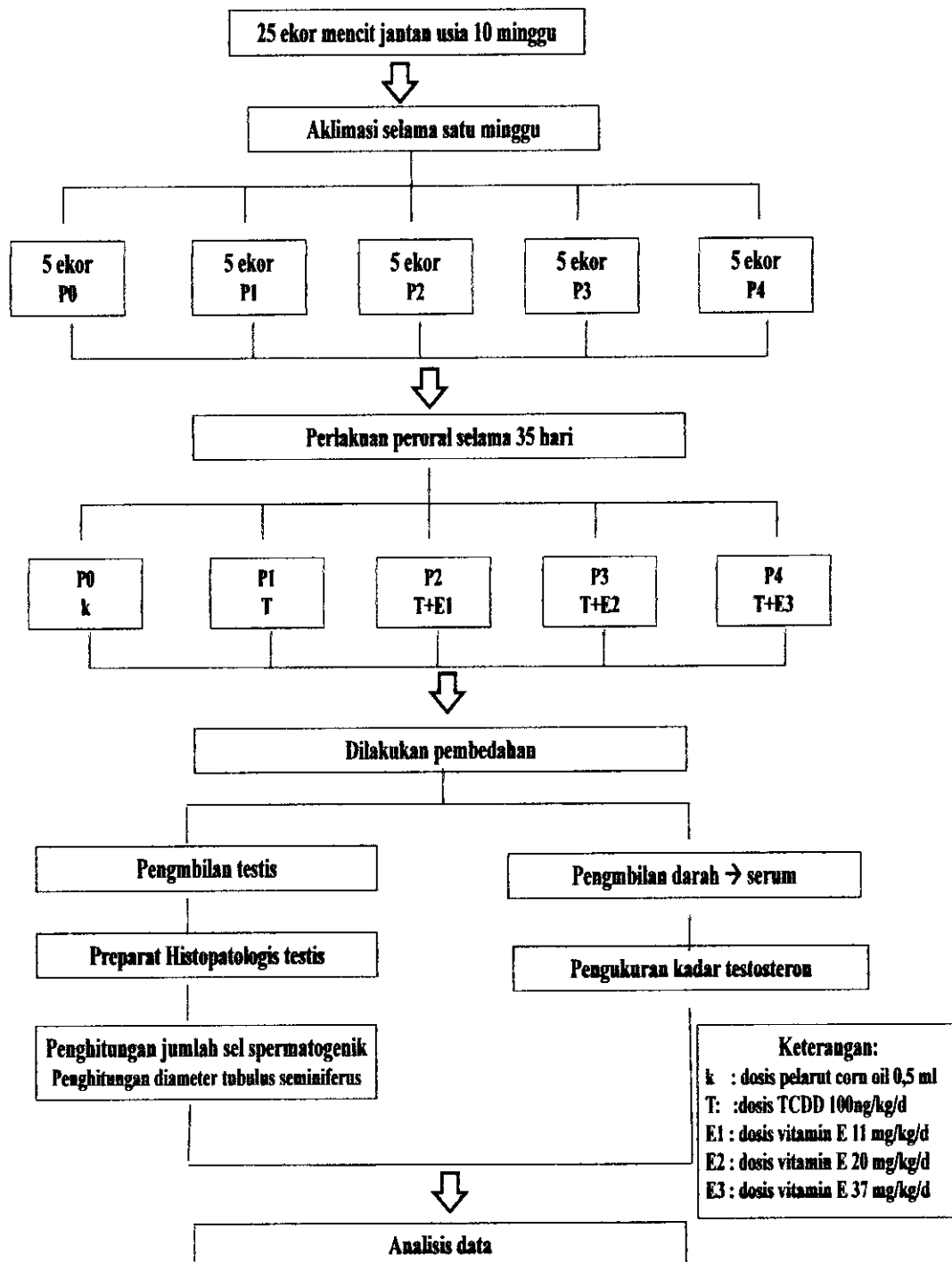
Pengamatan dan penghitungan jumlah sel spermatogenik dihitung pada setiap tubulus seminiferus. tubulus seminiferus yang dipilih yaitu tubulus yang

berbentuk bulat sesuai kriteria jenis sel penyusun tubulus seminiferus normal yang memngacu pada siklus epitel tahap VII (Gambar 2.12). Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop cahaya pembesaran 400x, kecuali kuantifikasi jumlah spermatozoa dilakukan pada pembesaran 1000x.

4.8 Analisis Data

Data yang diperoleh baik jumlah sel spermatogenik dan kadar serum testosteron dianalisis dengan Analisis Varian (Anava) uji *Fisher* (F) satu arah taraf kepercayaan 95% dan bila terjadi perbedaan signifikan ($p < 0.05$) dilanjutkan uji perbandingan rerata setiap kelompok perlakuan dengan uji Jarak Berganda *Duncan*. Perbandingan statistik dilakukan dengan menggunakan *Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 21 for windows*.

4.9 Bagan Kerangka Operasional



Gambar 4.3 Bagan kerangka operasional efek pemberian vitamin E terhadap jumlah sel spermatogenik, diameter tubulus seminiferus dan kadar testosteron serum pada mencit yang terpapar TCDD



BAB 5
ANALISIS HASIL PENELITIAN

BAB 5 ANALISIS HASIL PENELITIAN

Setelah melakukan penelitian mengenai potensi vitamin E terhadap sistem reproduksi pada mencit jantan yang terpapar *2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dixin* (TCDD), maka diperoleh hasil pengamatan berupa data kuantitatif. Data yang diperoleh adalah kadar hormon testosteron (ng/dL), diameter tubulus seminiferus (μm), dan jumlah sel spermatogenik (%). Data penelitian diperoleh dari 25 hewan coba mencit jantan, setelah mengalami masa perlakuan selama 35 hari. Hari ke-36 seluruh hewan coba dibedah untuk koleksi sampel. Pengujian kadar hormon testosteron menggunakan sampel serum darah dengan metode *solid phase competitive chemiluminescent enzyme immunoassay* (CLIA). Diameter tubulus seminiferus dan jumlah sel spermatogenik yang meliputi spermatogonia, seprmatosit I dan II, seprmatid dan spermatozoa, terlebih dahulu dibuat sediaan histopatologik organ testis dengan pewarnaan HE, selanjutnya dilakukan pengamatan pada mikroskop cahaya dengan pembesaran 400x yang dilengkapi dengan program kamera dan *optilab viewer* yang disambungkan pada sistem komputer. Berikut ini akan diuraikan analisis setiap hasil penelitian.

5.1 Kadar Hormon Testosteron

Hasil penelitian tentang pemeriksaan kadar hormon testosteron dilampirkan pada lampiran 4. Kadar hormon dalam satuan ng/dL dibuat rerata dari lima ulangan pada setiap kelompok perlakuan (P0 sampai P4). Data yang diperoleh kemudian dilanjutkan uji normalitas data (uji *Kolmogrov-Smirnov*), diperoleh data terdistribusi normal. Selanjutnya untuk mengetahui perbedaan

kadar hormon testosteron pada kelompok kontrol negatif (P0) dan kontrol positif (P1) dengan kelompok perlakuan TCDD yang menerima vitamin E dosis 11, 20 dan 37 mg/kg/hari (P2, P3 dan P4) dilakukan analisis varian (*Anova*) uji F satu arah dengan taraf kepercayaan 95%, memberikan hasil yang berbeda nyata ($p < 0,05$). Hal tersebut menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang nyata pada pemberian vitamin E dosis 11, 20 dan 37 mg/kg/hari terhadap kadar hormon testosteron. Hasil perbandingan rerata kadar hormon testosteron pada setiap perlakuan (P0 sampai P4) dijelaskan melalui uji lanjutan menggunakan uji jarak berganda *duncan*. Hasil perbandingan rerata setiap kelompok perlakuan ditampilkan pada tabel 5.2

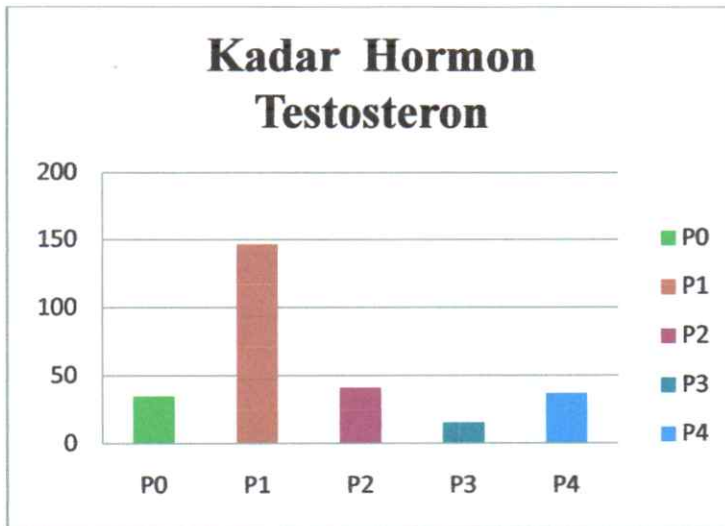
Tabel 5.1 Rerata kadar hormon testosteron mencit pada kelompok kontrol negatif (P0), positif (P1) dan kombinasi TCDD dengan Vitamin E dosis 11, 20 dan 37 mg/kg/hari (P2, P3, P4)

Perlakuan	Kadar testosteron (ng/dL) (rerata \pm SD)
P0	34,78 ^b \pm 3,73
P1	146,56 ^c \pm 0,57
P2	41,02 ^b \pm 0,24
P3	15,28 ^a \pm 3,30
P4	36,88 ^b \pm 21,24

Keterangan: superskrip (^{a,b,c}) yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata (signifikan) antara perlakuan ($p < 0,05$)

Pengujian kadar hormon testosteron pada kelompok kontrol negatif P0 menunjukkan perbedaan yang nyata ($p < 0,05$) terhadap kelompok perlakuan TCDD / kontrol positif P1. Pada perlakuan P1 kadar testosteron mengalami. Kadar testosteron pada semua kelompok perlakuan kombinasi TCDD dengan vitamin E

pada berbagai tingkat dosis (P2,P3,P4) juga memiliki perbedaan yang nyata ($p < 0,05$) terhadap kelompok perlakuan P1.



Gambra 5.1 Grafik rerata kadar hormon testosteron serum pada mencit kelompok kontrol negatif *corn oil* (P0), kontrol positif TCDD (P1) dan kombinasi TCDD dengan Vitamin E dosis 11, 20 dan 37 mg/kg/hari (P2, P3, P4)

Kadar testosteron pada kelompok perlakuan kombinasi TCDD dengan vitamin E dosis 11mg/kg/hari (P2) dan dosis 37 mg/kg/hari (P4) tidak memiliki perbedaan yang nyata ($p > 0,05$) atau setara dengan kelompok kontrol negatif (P0). Kadar testosteron pada kelompok perlakuan TCDD yang menerima vitamin E dosis 20 mg/kg/hari (P3) memiliki perbedaan yang nyata ($p < 0,05$) terhadap kelompok kontrol negatif (P0) dan kelompok kontrol positif (P1). Perlakuan P3 tersebut memiliki kadar testosteron yang mengalami penurunan. Perubahan kadar hormon testosteron pada setiap kelompok perlakuan diilustrasikan pada gambar 5.1.

5.2 Diameter Tubulus Seminiferus

Pengukuran diameter tubulus seminiferus dilakukan dengan mengukur garis silang tengah tubulus dari tepi membran basalis yang saling berseberangan. Garis silang tengah dibentuk sebanyak empat garis yang kemudian dirata-rata sebagai diameter satu tubulus seminiferus. Setiap sampel dilakukan pengukuran tiga tubulus seminiferus dan dirata-rata (Lampiran 2). Pengukuran diameter tubulus seminiferus menggunakan mikroskop cahaya yang dihubungkan dengan kamera *optilab viewer* dan disambung dengan program *optilab viewer* pada komputer. Dimana skala pengukuran serta pembesaran lensa obyektif sudah diatur secara otomatis pada program komputer. Data yang diperoleh berupa diameter tubulus seminiferus dengan satuan μm .

Data diameter tubulus seminiferus diproses secara statistik. Diameter tubulus seminiferus dibuat rerata dari lima ulangan pada setiap kelompok perlakuan (P0 sampai P4). Data yang diperoleh kemudian dilanjutkan uji normalitas data (uji *Kolmogrov-Smirnov*), diperoleh data terdistribusi normal. Selanjutnya untuk mengetahui perbedaan diameter tubulus seminiferus pada kelompok kontrol negatif (P0) dan kontrol positif (P1) dengan kelompok perlakuan kombinasi TCDD dan vitamin E dosis 11, 20 dan 37 mg/kg/hari (P2, P3 dan P4) dilakukan analisis varian (*Anova*) uji F satu arah dengan taraf kepercayaan 95%, memberikan hasil yang berbeda nyata ($p < 0,05$). Hal tersebut menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang nyata pada pemberian vitamin E berbagai dosis terhadap diameter tubulus seminiferus. Gambaran diameter tubulus

seminiferus pada preparat mikroskopis histopatologi pewarnaan HE pada setiap kelompok perlakuan (P0 sampai P4) dapat dilihat pada gambar 5.7.

Hasil perbandingan rerata diameter tubulus seminiferus pada setiap perlakuan (P0 sampai P4) dijelaskan melalui uji lanjutan menggunakan uji jarak berganda *duncan*. Hasil perbandingan rerata setiap kelompok perlakuan ditampilkan pada tabel 5.2

Tabel 5.2 Rerata diameter tubulus seminiferus mencit kelompok kontrol negatif (P0), kontrol positif (P1) dan perlakuan kombinasi TCDD dengan Vitamin E dosis 11, 20 dan 37 mg/kg/hari (P2, P3, P4)

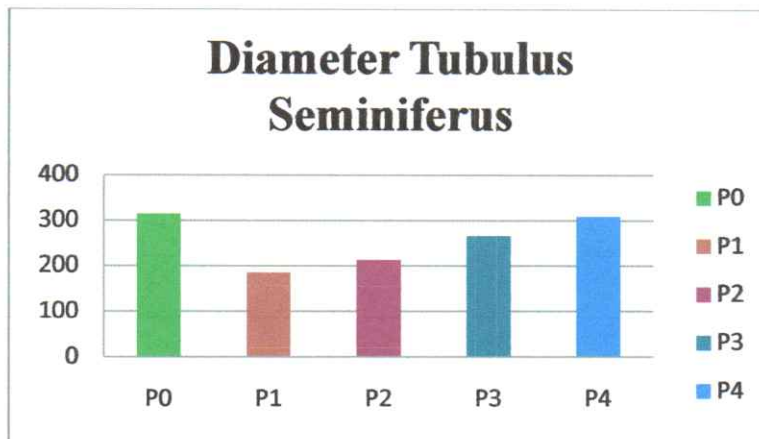
Perlakuan	Diameter tubulus seminiferus (μm) (rerata \pm SD)
P0	314,59 ^d \pm 5,49
P1	184,87 ^a \pm 10,15
P2	212,31 ^b \pm 4,63
P3	266,63 ^c \pm 4,00
P4	308,49 ^d \pm 15,98

Keterangan: superskrip (^{a,b,c,d}) yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata (signifikan) antara perlakuan ($p < 0,05$)

Pengukuran diameter tubulus seminiferus pada kelompok kontrol negatif (P0) menunjukkan perbedaan yang nyata ($p < 0,05$) terhadap kelompok kontrol positif (P1). Perlakuan P1 diameter tubulus seminiferus mengalami penurunan. Diameter tubulus seminiferus pada semua kelompok perlakuan kombinasi TCDD dan vitamin E dosis 11, 20 dan 37 mg/kg/hari (P2,P3,P4) juga memiliki perbedaan yang nyata ($p < 0,05$) terhadap kelompok P1.

Diameter tubulus seminiferus pada kelompok perlakuan kombinasi TCDD dan vitamin E dosis 37 mg/kg/hari (P4) tidak memiliki perbedaan yang

nyata ($p > 0,05$) atau setara dengan kelompok kontrol negatif (P0). Diameter tubulus seminiferus pada kelompok perlakuan kombinasi TCDD dan vitamin E dosis 11 mg/kg/hari (P2) dan dosis 20 mg/kg/hari (P3) memiliki perbedaan yang nyata ($p < 0,05$) terhadap kelompok kontrol negatif (P0) dan positif (P1). Perlakuan P2 dan P3 masing-masing mengalami penurunan diameter tubulus seminiferus. Perubahan diameter tubulus seminiferus pada setiap kelompok perlakuan diilustrasikan pada gambar 5.3 sebagai berikut.



Gambar 5.2 Grafik rerata diameter tubulus seminiferus pada mencit kelompok kontrol negatif *corn oil* (P0), kontrol positif TCDD (P1) dan kelompok perlakuan kombinasi TCDD dengan Vitamin E dosis 11, 20 dan 37 mg/kg/hari (P2, P3, P4)

5.3 Jumlah Sel Spermatogenik

Pengamatan terhadap jumlah sel spermatogenik meliputi jumlah sel spermatogonium, spermatosit I dan II, spermatid dan jumlah sel spermatozoa. Pengamatan jumlah sel spermatogenik dilakukan berdasarkan langkah yang telah dijelaskan pada bagian metode. Setiap sampel dilakukan pengamatan jumlah sel

spermatogenik dalam tiga tubulus seminiferus dan diambil nilai rata-rata (Lampiran 2). Data tersebut kemudian dilakukan transformasi data *arcsine* (lampiran 3). Data yang diperoleh berupa data dalam satuan %, kemudian data dianalisis secara statistik. Gambaran sel spermatogenik pada diameter tubulus seminiferus menggunakan preparat mikroskopis histopatologi pewarnaan HE pada setiap kelompok perlakuan (P0 sampai P4) dapat dilihat pada gambar 5.7.

Data pada setiap jenis sel spermatogenik, jumlah sel spermatogonium, spermatosit I dan II, spermatid dan jumlah sel spermatozoa yang diperoleh kemudian dilanjutkan uji normalitas data (uji *Kolmogrov-Smirnov*), semua data diperoleh terdistribusi normal. Selanjutnya untuk mengetahui perbedaan baik jumlah sel spermatogonium, spermatosit I dan II, spermatid dan jumlah sel spermatozoa pada kelompok kontrol negatif (P0) dan kontrol positif (P1) dengan kelompok perlakuan kombinasi TCDD dan vitamin E dosis 11, 20 dan 37 mg/kg/hari (P2, P3 dan P4) dilakukan analisis varian (*Anova*) uji F satu arah dengan taraf kepercayaan 95%, memberikan hasil yang berbeda nyata ($p < 0,05$). Hal tersebut menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang nyata pada pemberian vitamin E dosis 11, 20 dan 37 mg/kg/hari terhadap jumlah sel spermatogenik. Hasil perbandingan rerata jumlah sel spermatogenik pada setiap perlakuan (P0 sampai P4) dijelaskan melalui uji lanjutan menggunakan uji jarak berganda *duncan*. Untuk mempermudah pengamatan terhadap penurunan atau peningkatan jumlah sel spermatogenik pada setiap kelompok perlakuan (P0 sampai P4).

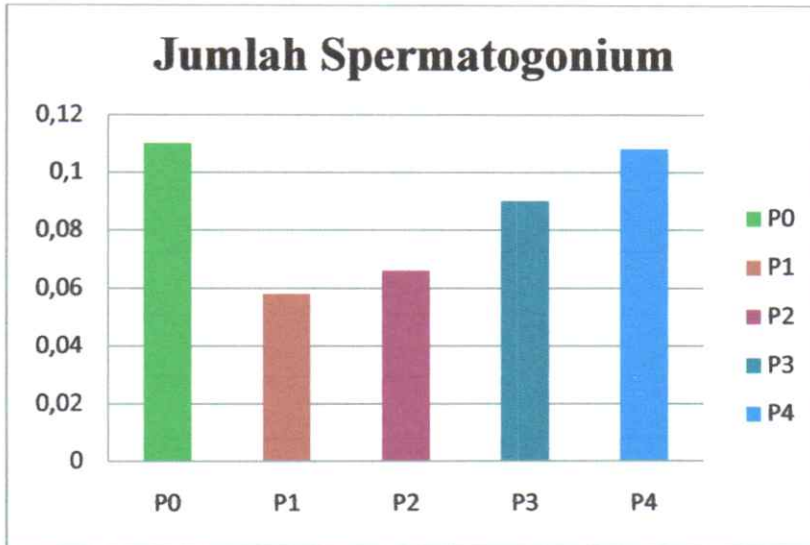
5.3.1 Jumlah Spermatogonium

Tabel 5.3 Rerata jumlah sel spermatogonium pada mencit kelompok kontrol negatif (P0), kontrol positif (P1) dan perlakuan kombinasi TCDD dengan Vitamin E dosis 11, 20 dan 37 mg/kg/hari (P2, P3, P4)

Perlakuan	Jumlah spermatogonium (%) (rerata \pm SD)
P0	0,11 ^c \pm 0,01
P1	0,06 ^a \pm 0,01
P2	0,07 ^a \pm 0,01
P3	0,09 ^b \pm 0,01
P4	0,11 ^c \pm 0,01

Keterangan: superskrip (^{a,b,c}) yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata (signifikan) antara perlakuan ($p < 0,05$)

Hasil analisis statistik terhadap pengamatan jumlah sel spermatogonium ditunjukkan pada tabel 5.3. Kelompok kontrol negatif (P0) menunjukkan perbedaan yang nyata ($p < 0,05$) terhadap kelompok kontrol positif (P1). Pada perlakuan P1 jumlah sel spermatogonium mengalami penurunan. Jumlah sel spermatogenik pada kelompok perlakuan kombinasi TCDD dan vitamin E dosis 20 dan 37 mg/kg/hari (P3 dan P4) memiliki perbedaan yang nyata ($p < 0,05$) terhadap kelompok kontrol positif (P1). Kecuali Jumlah sel spermatogenik pada kelompok perlakuan kombinasi TCDD dan vitamin E dosis 11 mg/kg/hari (P2) memiliki perbedaan yang tidak nyata ($p > 0,05$) terhadap kelompok kontrol positif (P1). Hal ini berarti penurunan jumlah sel spermatogonium pada kelompok perlakuan P2 dianggap setara dengan perlakuan P1.



Gambar 5.3 Grafik rerata jumlah sel spermatogonium pada mencit kelompok kontrol negatif (P0), kontrol positif (P1) dan kelompok perlakuan kombinasi TCDD dengan Vitamin E dosis 11, 20 dan 37 mg/kg/hari (P2, P3, P4).

Jumlah sel spermatogonium pada kelompok perlakuan kombinasi TCDD dan vitamin E dosis 20 mg/kg/hari (P3) memiliki perbedaan yang nyata ($p < 0,05$) baik terhadap kontrol negatif (P0) maupun kontrol positif (P1). Perlakuan P3 mengalami penurunan jumlah sel spermatogenik, sedangkan jumlah sel spermatogonium pada kelompok perlakuan kombinasi TCDD dan vitamin E dosis 37 mg/kg/hari (P4) tidak berbeda nyata ($p > 0,05$) terhadap kelompok kontrol negatif (P0). Hal ini berarti jumlah sel spermatogonium pada kelompok perlakuan P4 setara dengan kelompok kontrol negatif (P0). Perubahan jumlah sel spermatogonium pada setiap kelompok perlakuan diilustrasikan pada gambar 5.3.

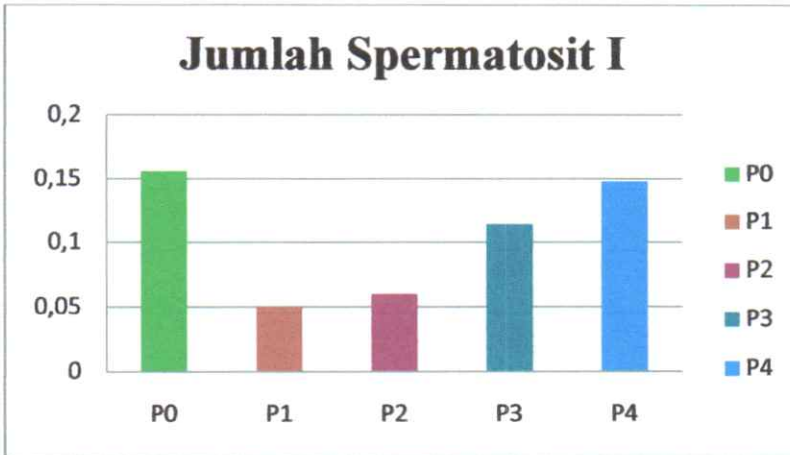
5.3.2 Jumlah Spermatisit I dan II

Tabel 5.4 Rerata jumlah sel spermatisit I dan II pada mencit kelompok kontrol negatif (P0), kontrol positif (P1) dan perlakuan kombinasi TCDD dengan Vitamin E dosis 11, 20 dan 37 mg/kg/hari (P2, P3, P4)

Perlakuan	Jumlah spermatisit I dan II (%) (rerata \pm SD)
P0	0,16 ^d \pm 0,01
P1	0,05 ^a \pm 0,01
P2	0,06 ^b \pm 0,00
P3	0,11 ^c \pm 0,01
P4	0,15 ^d \pm 0,01

Keterangan: superskrip (^{a,b,c,d}) yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata (signifikan) antara perlakuan ($p < 0,05$)

Hasil analisis statistik terhadap pengamatan jumlah sel spermatisit I dan II ditunjukkan pada tabel 5.4. Kelompok kontrol negatif (P0) menunjukkan perbedaan yang nyata ($p < 0,05$) terhadap kelompok perlakuan kontrol positif (P1). Pada perlakuan P1 jumlah sel spermatisit I dan II mengalami penurunan. Jumlah sel spermatisit I dan II pada kelompok perlakuan kombinasi TCDD dan vitamin E dosis 11, 20 dan 30 mg/kg/hari (P2, P3 dan P4) memiliki perbedaan yang nyata ($p < 0,05$) terhadap kelompok kontrol positif (P1). Hal ini perlakuan P2, P3 dan P4 memberikan jumlah sel spermatisit I dan II yang memiliki nilai signifikan terhadap perlakuan P1.



Gambar 5.4 Grafik rerata jumlah sel spermatisit I pada mencit kelompok kontrol negatif (P0), kontrol positif (P1) dan kelompok perlakuan kombinasi TCDD dengan Vitamin E dosis 11, 20 dan 37 mg/kg/hari (P2, P3, P4)

Jumlah sel spermatisit I dan II pada kelompok perlakuan kombinasi TCDD dan vitamin E dosis 11 dan 20 mg/kg/hari (P2 dan P3) memiliki perbedaan yang nyata ($p < 0,05$) baik terhadap kontrol negatif (P0) maupun kontrol positif (P1). Jumlah sel spermatisit I dan II pada kelompok perlakuan kombinasi TCDD dan vitamin E dosis 37 mg/kg/hari (P4) tidak berbeda nyata ($p > 0,05$) terhadap kelompok kontrol negatif (P0). Hal ini berarti jumlah sel spermatisit I dan II pada kelompok perlakuan P4 setara dengan kelompok kontrol negatif (P0). Perubahan jumlah sel spermatisit I pada setiap kelompok perlakuan diilustrasikan pada gambar 5.4.

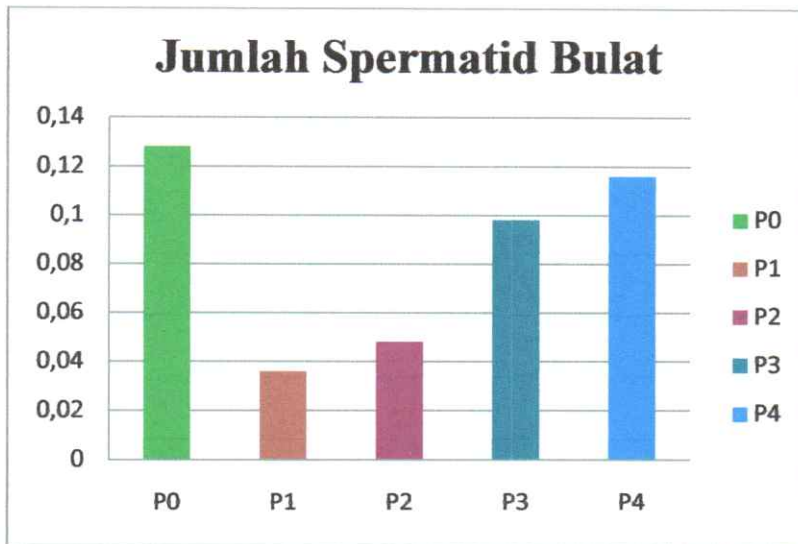
5.3.3 Jumlah Spermatid

Tabel 5.5 Rerata jumlah sel spermatid pada mencit kelompok kontrol negatif (P0), kontrol positif (P1) dan perlakuan kombinasi TCDD dengan Vitamin E dosis 11, 20 dan 37 mg/kg/hari (P2, P3, P4)

Perlakuan	Jumlah spermatid (%) (rerata \pm SD)
P0	0,13 ^c \pm 0,01
P1	0,04 ^a \pm 0,01
P2	0,05 ^b \pm 0,00
P3	0,10 ^c \pm 0,00
P4	0,12 ^d \pm 0,01

Keterangan: superskrip (^{a,b,c,d,e}) yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata (signifikan) antara perlakuan ($p < 0,05$)

Hasil analisis statistik terhadap pengamatan jumlah sel spermatid ditunjukkan pada tabel 5.5. Kelompok kontrol negatif (P0) menunjukkan perbedaan yang nyata ($p < 0,05$) terhadap kelompok perlakuan kontrol positif (P1). Perlakuan P1 jumlah sel spermatid mengalami penurunan. Jumlah sel spermatid pada kelompok perlakuan kombinasi TCDD dan vitamin E dosis 11, 20 dan 30 mg/kg/hari (P2, P3 dan P4) memiliki perbedaan yang nyata ($p < 0,05$) terhadap kelompok kontrol positif (P1). Hal ini perlakuan P2, P3 dan P4 memberikan jumlah spermatid yang memiliki nilai signifikan terhadap perlakuan P1.



Gambar 5.5 Grafik rerata jumlah sel spermatid pada mencit kelompok kontrol negatif (P0), kontrol positif (P1) dan kelompok perlakuan kombinasi TCDD dengan Vitamin E dosis 11, 20 dan 37 mg/kg/hari (P2, P3, P4)

Jumlah sel spermatid pada kelompok perlakuan kombinasi TCDD dan vitamin E dosis 11, 20 dan 37 mg/kg/hari (P2, P3, dan P4) memiliki perbedaan yang nyata ($p < 0,05$) baik terhadap kontrol negatif (P0) maupun kontrol positif (P1). Hal ini berarti jumlah sel spermatid pada kelompok perlakuan P2, P3 dan P4 tidak setara dengan kelompok kontrol negatif (P0). Perubahan jumlah sel spermatid pada setiap kelompok perlakuan diilustrasikan pada gambar 5.5.

5.3.4 Jumlah Spermatozoa

Hasil analisis statistik terhadap pengamatan jumlah sel spermatozoa ditunjukkan pada tabel 5.6. Kelompok kontrol negatif (P0) menunjukkan perbedaan yang nyata ($p < 0,05$) terhadap kelompok kontrol positif (P1). Perlakuan P1 jumlah sel spermatosit I mengalami. Jumlah sel spermatozoa pada kelompok perlakuan kombinasi TCDD dan vitamin E dosis 20 dan 30 mg/kg/hari (P3 dan P4) memiliki

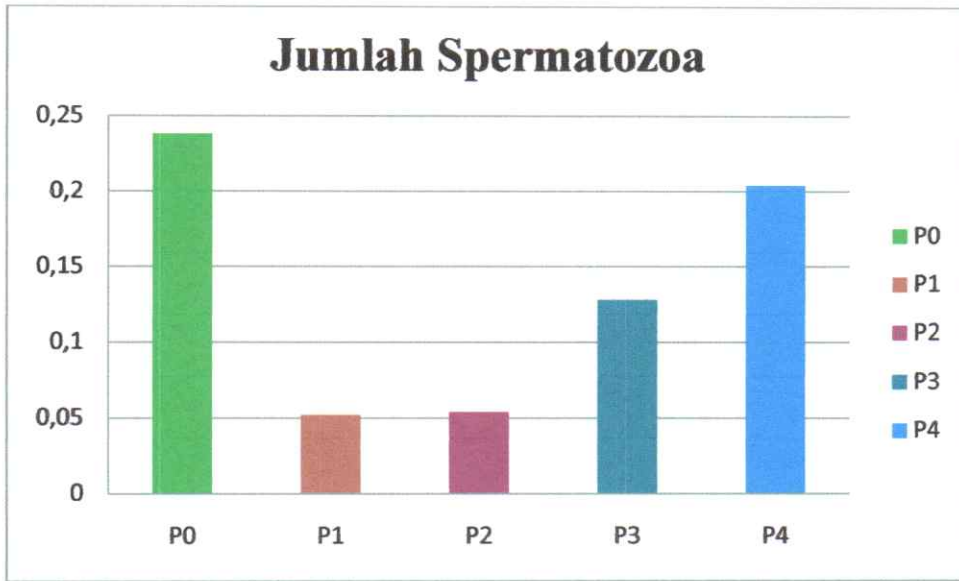
perbedaan yang nyata ($p < 0,05$) terhadap kelompok kontrol positif (P1). Kelompok perlakuan kombinasi TCDD dan vitamin E dosis 11 mg/kg/hari (P2) memiliki perbedaan yang tidak nyata ($p > 0,05$) terhadap kelompok kontrol positif (P1). Hal ini berarti kelompok perlakuan P2 masih memberikan hasil jumlah sel spermatozoa yang sama dengan kelompok P1

Tabel 5.6 Rerata jumlah sel spermatozoa pada mencit kelompok kontrol negatif (P0), kontrol positif (P1) dan perlakuan kombinasi TCDD dengan Vitamin E dosis 11, 20 dan 37 mg/kg/hari (P2, P3, P4)

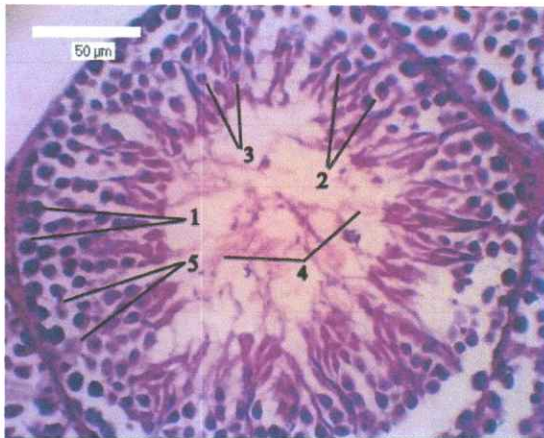
Perlakuan	Jumlah spermatozoa (%) (rerata \pm SD)
P0	0,24 ^d \pm 0,00
P1	0,05 ^a \pm 0,01
P2	0,05 ^a \pm 0,01
P3	0,13 ^b \pm 0,00
P4	0,2 ^c \pm 0,01

Keterangan: superskrip (^{a,b,c,d}) yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata (signifikan) antara perlakuan ($p < 0,05$)

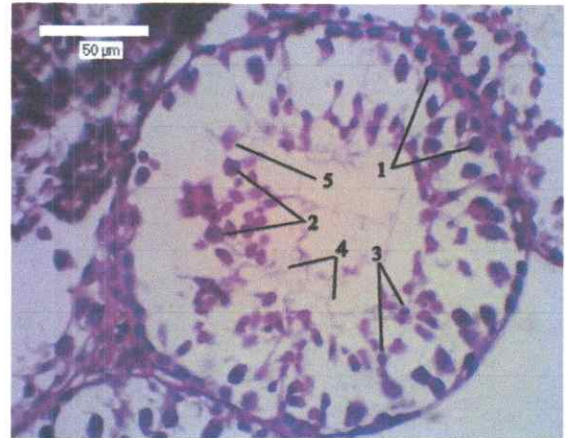
Jumlah sel spermatozoa pada kelompok perlakuan kombinasi TCDD dan vitamin E dosis 11, 20 dan 37mg/kg/hari (P2, P3 dan P4) memiliki perbedaan yang nyata ($p < 0,05$) terhadap kontrol negatif (P0). Hal ini berarti jumlah sel spermatozoa pada kelompok perlakuan P2, P3, dan P4 tidak dapat memulihkan hilangnya sel spermatozoa akibat paparan TCDD. Perubahan jumlah sel spermatozoa pada setiap kelompok perlakuan diilustrasikan pada gambar 5.6.



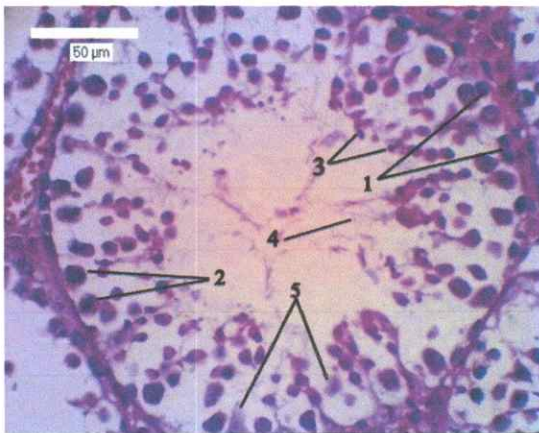
Gambar 5.6 Grafik jumlah sel spermatozoa pada mencit kelompok kontrol negatif (P0), kontrol positif (P1) dan kelompok perlakuan kombinasi TCDD dengan Vitamin E dosis 11, 20 dan 37 mg/kg/hari (P2, P3, P4)



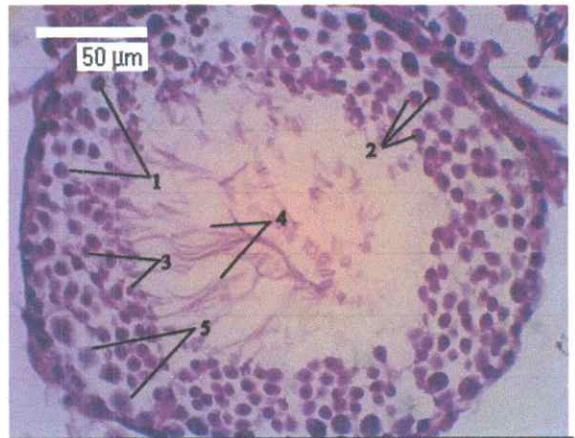
P0: Kontrol negatif: pelarut corn oil



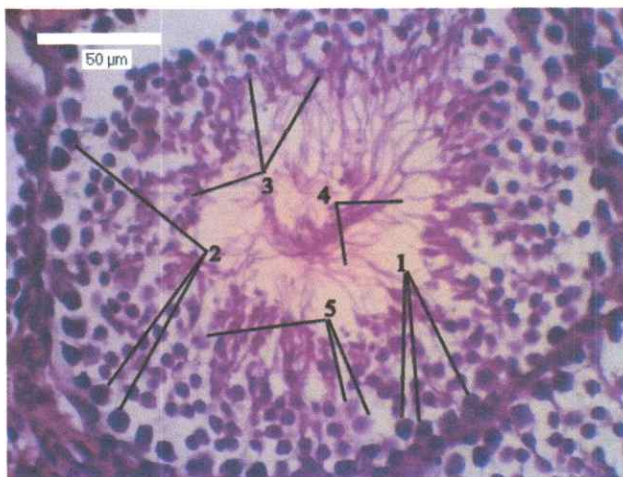
P1: Kontrol positif : Perlakuan TCDD



P2: Perlakuan TCDD + Vit E1



P3: Perlakuan TCDD + Vit E2

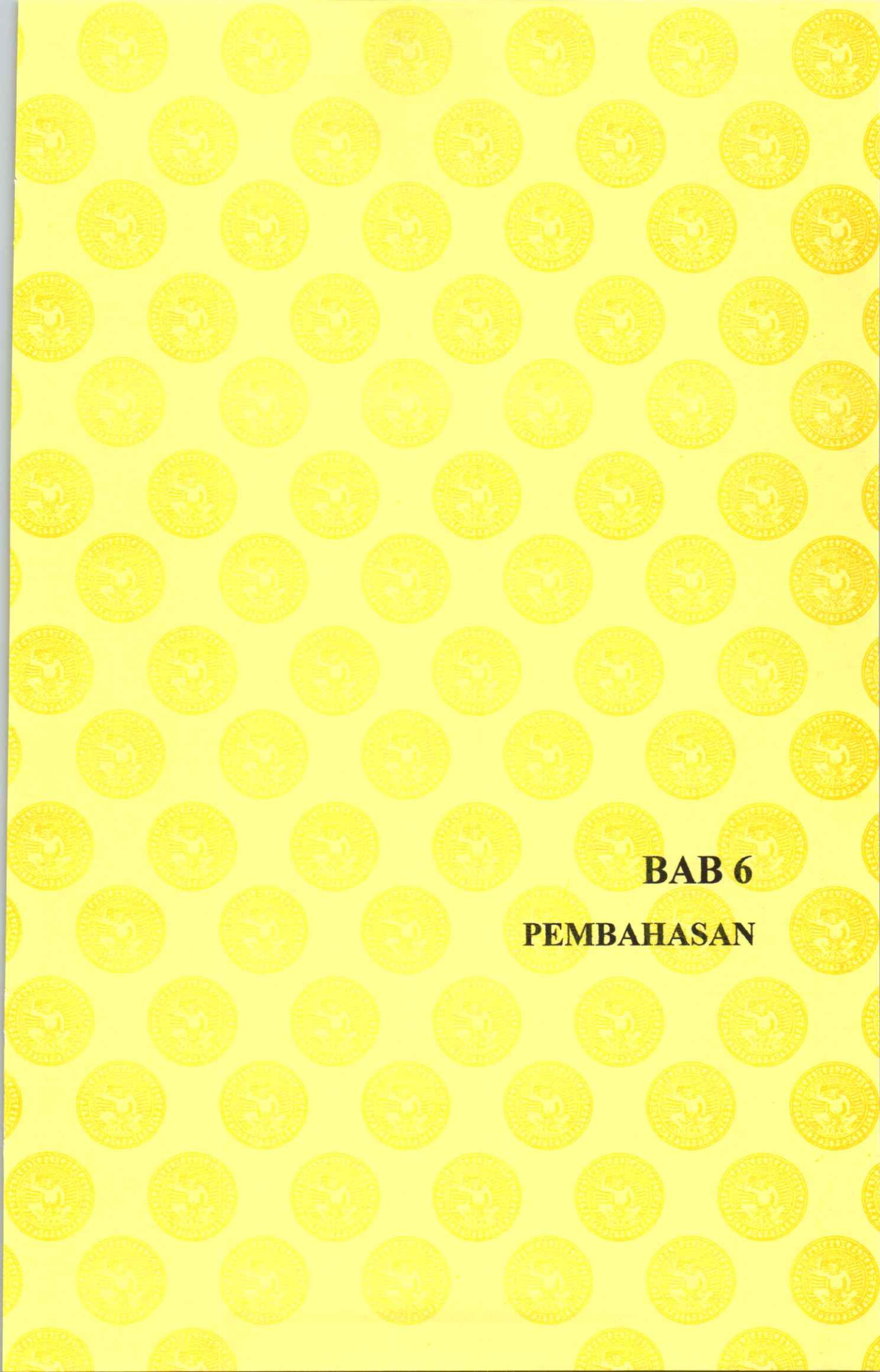


P4: Perlakuan TCDD + Vit E3

Keterangan:

1. Spermatogonium
2. Spermatosit I
3. Spermatid bulat
4. Spermatozoa
5. Sel sertoli

Gambar 5.7 Potensi vitamin E terhadap jumlah sel spermatogenik dan diameter tubulus seminiferus pada mencit (*Mus musculus*) yang terpapar 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD). Preparat histopatologi pewarnaan HE, pembesaran 400x.



BAB 6
PEMBAHASAN

BAB 6 PEMBAHASAN

TCDD dilepaskan oleh pembakaran senyawa organik yang mengandung klorin. TCDD menginduksi berbagai efek beracun, termasuk imunotoksisiti, gangguan reproduksi, hepatotoksisitas dan kanker. Reseptor aromatik hidrokarbon (AhR) merupakan protein regulator transkripsi kunci TCDD untuk menginduksi ekspresi gen dan toksisitas. Pengikatan TCDD dan AhR akan menginduksi ekspresi gen yang memiliki peran penting dalam mediasi berbagai efek toksik yang terkait dengan TCDD (Davies *et al.*, 2008).

Penelitian oleh Chang *et al.* (2009) membuktikan bahwa antioksidan termasuk *alpha-tocopherol* dapat mengurangi ekspresi CYP1A1 yang diinduksi oleh TCDD dan memiliki efek penghambatan pada aktivitas promotor CYP1A1. Terjadi penurunan aktivasi AhR yang terinduksi oleh TCDD, aktivitas CYP1A1 dan aktivitas Ecto-ATPase. Singkatnya, temuan ini menunjukkan bahwa penekan transkripsi CYP1A1 yang terinduksi oleh TCDD melalui penekanan aktivasi AhR fungsional. Penghambatan Ecto-ATPase dapat mengurangi produksi ATP yang diperlukan untuk translokasi elektron AhR. Ecto-ATPase adalah enzim utama yang bertanggung jawab untuk melepaskan energi dari ATP yang digunakan dalam translokasi AhR ke ligan elektron. Mekanisme lain yang potensial adalah memodulasi status fosforilasi kompleks AhR.

Mengingat bahwa vitamin E menurunkan aktivasi AhR yang terinduksi oleh TCDD, dapat dibayangkan bahwa vitamin E dapat digunakan untuk pencegahan dan pengobatan akut maupun kronis intoksikasi TCDD (Chang *et al.*, 2009). Penelitian mengenai efek vitamin E terhadap TCDD pada organ reproduksi

hewan jantan masih terbatas. Penelitian ini dilakukan untuk mengevaluasi pengaruh TCDD pada organ reproduksi jantan meliputi kadar testosteron serum, diameter tubulus seminiferus dan jumlah sel spermatogenik. Penelitian ini juga untuk menilai peran vitamin E yang bersifat memperbaiki kerusakan yang disebabkan oleh TCDD.

6.1 Potensi vitamin E terhadap Kadar Testosteron pada Mencit yang Terpapar 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)

Hasil pengujian kadar hormon testosteron pada kelompok kontrol negatif (P0) adalah $34,78 \pm 3,73$ ng/dL. TCDD yang diberikan pada mencit jantan menyebabkan peningkatan kadar hormon testosteron dengan nilai kadar hormon adalah $146,56 \pm 0,57$ ng/dL (tabel 5.1). Berdasarkan hasil tersebut, pemberian TCDD pada mencit jantan dalam penelitian ini meningkatkan kadar testosteron serum. Pengujian kadar hormon testosteron pada penelitian ini, bertolak belakang dengan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Yin *et al.* (2012), dalam penelitian sebelumnya tersebut pemberian TCDD mampu menurunkan kadar testosteron serum pada mencit. Kemungkinan yang terjadi adalah pemaparan dioxin pada penelitian Yin *et al.* (2012) menggunakan metode pemaparan kronis selama 49 hari, sedangkan pada penelitian ini menggunakan metode paparan subkronis selama 35 hari.

TCDD dapat menyebabkan penurunan testosteron melalui pengrusakan retikulum endoplasma atau mitokondria dari sel Leydig, kerusakan ini juga menyebabkan *interfering* pada enzim yang mempengaruhi sintesis androgen (Yin *et al.*, 2012). Diduga pada penelitian 35 hari dengan dosis 100 ng/kg/hari belum

mampu menembus kerusakan mendalam terhadap sel Leydig, sehingga proses sintesis testosteron tetap berlangsung. Perlu penelitian lanjutan untuk mengamati sel Leydig termasuk mengamati ultrastruktural sel Leydig (mitokondria dan retikulum endoplasma).

Stimulus utama untuk produksi testosteron berasal dari tingkat LH dalam darah yang disekresikan oleh hipofisis. Biosintesis testosteron langsung dari kolesterol hanya dapat terjadi dalam sel Leydig melalui jalur $\Delta 5$ pathway, sedangkan pada kelenjar adrenal mensintesis prekursor testosteron, *dehydroepiandrosterone* (DHEA) (sulfat) dan androstenedion melalui jalur $\Delta 4$ pathway (gambar 2.17) (Scott *et al.*, 2009). Testosteron tidak disimpan dalam sel Leydig, testosteron dilepaskan ke dalam cairan interstitial dengan mekanisme: i) diambil oleh sel Sertoli dan terikat dalam ABP yang kemudian disekresikan oleh sel Sertoli dan diangkut melalui epitel seminiferus ke dalam cairan tubulus seminiferus untuk memfasilitasi proses spermatogenesis atau ii) berdifusi ke dalam kapiler interstitial terikat cepat pada transportasi melalui tubuh dan memiliki efek di seluruh tubuh (Ge *et al.*, 2008).

Testosteron dikenal bertindak melalui *androgen receptor* (AR) untuk mengatur ekspresi gen. Stimulasi Testosteron menyebabkan pelepasan AR dari dalam sitoplasma setelah itu ligan AR akan tertranslokasi ke inti dan mengikat urutan DNA spesifik disebut elemen respons androgen (ARES). Mekanisme ini memerlukan setidaknya 30 sampai 40 menit untuk mengubah ekspresi gen dan sekitar 1 jam untuk menghasilkan protein baru. Mekanisme ini disebut jalur klasik tindakan testosteron (Walker, 2009).

TCDD terlihat dapat menurunkan jumlah sel dalam tubulus seminiferus, tetapi kadar hormon testosteron serum mengalami peningkatan yang sangat signifikan. Hal ini dapat dijelaskan bahwa efek dioksin mengganggu aktivitas endokrin dimediasi oleh reseptor aril hidrokarbon (AhR). Dioksin masuk ke dalam sel dan mengikat AhR untuk membentuk heterodimer dengan Arnt, dan kemudian mengikat *xenobiotik responsif elemen* (XRE) untuk mengatur ekspresi berbagai gen CYP1A1. Sistem AhR memiliki beberapa karakter yang menarik. Pertama, AhR adalah salah satu *ligand dependent reseptor* yang mengaktifkan TCDD menginduksi ekspresi dari CYP1A1. Kedua, AhR dapat menunjukkan interaksi protein-protein dengan protein lain seperti *estrogen receptor*, *androgen receptor* (AR), *androgen binding protein* (ABP) atau faktor *hypoxia-inducible 1 α* (HIF-1 α) untuk mengubah ekspresi gen (Kakeyama and Tohyama 2003).

Mekanisme meningkatnya hormon testosteron ini diduga disebabkan oleh aktivitas pengikatan AhR terhadap AR dan ABP, dimana bila terjadi pengikatan terhadap dua reseptor tersebut maka tidak akan ada mekanisme transportasi testosteron ke dalam tubulus seminiferus sebagai target utama. Secara normal, kadar testosteron dalam tubulus seminiferus 100 kali lebih tinggi dibanding kadar testosteron pada plasma darah atau 10 kali lebih tinggi dibanding kadar testosteron serum tikus (Walker, 2009). Mekanisme kompensasi testosteron tersebut akan berdifusi ke pembuluh kapiler yang selanjutnya akan beredar dalam sirkulasi, sehingga kadar testosteron dalam serum ditemukan lebih tinggi. Hal ini sejalan dengan penelitian endokrin toksisitas TCDD yang dilakukan oleh Yin *et*

al., 2012, dimana efek toksistas endokrin yang ditimbulkan oleh TCDD dapat melalui hilangnya responsif testicular untuk meregulasi hormon.

GnRH adalah kunci dari sinyal molekul dan merupakan salah satu kontrol hormon yang paling penting pada hormon reproduksi. GnRH disintesis dan disekresikan oleh nukleus arcuate dari hipotalamus dan biasanya terkait dengan area medial preoptik pada mencit. GnRH dapat meregulasi produksi dari hormon steroid gonad secara tidak langsung melalui peningkatan sintesis LH dan FSH (Kovacs and Schally, 2001). FSH dan LH disekresi oleh hipofisis anterior dapat mempengaruhi sel Sertoli dan sel Leydig, sehingga meningkatkan sekresi testosteron dari sel Leydig. Sekresi GnRH, FSH, dan LH diatur oleh hormon yang dikeluarkan dari testis, untuk memepertahankan keseimbangan sekresi hormon androgenik melalui mekanisme umpan balik (Yao, 2005).

Penelitian yang dilakukan oleh Hassoun *et al.* (2003) membuktikan bahwa TCDD dalam dosis rendah 20-46 ng/kg selama 13 minggu pada rat tidak mampu menembus secara baik susunan saraf pusat (SSP). Hassaoun *et al.* (2003) juga membuktikan bahwa pada dosis tersebut ternyata sudah mampu memberikan efek terhadap reproduksi, dengan demikian pada penelitian kami kemungkinan tidak ada efek toksik TCDD terhadap poros hipotalamus dan hipofisis dalam pengaturan sekresi endokrin reproduksi. Alasan untuk spesifisitas daerah induksi stres oksidatif oleh TCDD ini belum diketahui secara tuntas, diduga karena keberadaan reseptor TCDD pada organ-organ tertentu. Studi lebih lanjut perlu dilakukan untuk mengkonfirmasi garis pemikiran ini.

Vitamin E merupakan kebutuhan esensial pada reproduksi hewan. Vitamin E memberikan efek antioksidan terhadap sel mamalia. Vitamin E dapat menstimulasi rilis LH (Karanth *et al.*, 2003) dan FSH (Li *et al.*, 2006). Menurut Yousef *et al.* (2003), suplementasi *alpha-tocopherol* memiliki efek yang menguntungkan pada serum testosteron dan karakteristik semen. Vitamin E dapat dihubungkan dengan fakta bahwa vitamin E merupakan antioksidan yang sangat efisien terhadap berbagai produk samping proses metabolisme. Vitamin E sangat penting dalam mempertahankan integritas fisiologis kelenjar testis, epididimis, dan aksesori. Diet kekurangan vitamin E menyebabkan degenerasi sistem reproduksi.

Mekanisme efek antagonis yang ditimbulkan oleh vitamin E terhadap induksi toksisitas menggunakan TCDD dapat disebabkan oleh salah satu dari mekanisme berikut ini:

(1). Vitamin E menekan target *aryl hydrocarbon receptor* (AhR) yang memediasi ekspresi gen yang terinduksi oleh TCDD. Sudah diketahui dengan baik bahwa TCDD mampu memberikan efek toksik selama aktivasi AhR dan *cytochrome-P450* (CYP450). Vitamin E dapat menghambat transkripsi dan ekspresi dari CYP450 dan gen steroid dehydrogenase melalui penghambatan induksi TCDD terhadap aktivasi AhR, selain itu vitamin E dapat menurunkan *competitive binding* dari TCDD terhadap AR dan ABP, dengan demikian vitamin E memiliki efek antogonis toksisitas terhadap TCDD. Palaniappan *et al.* (2007) telah melakukan penelitian terhadap vitamin E, dimana vitamin ini dapat

mengurangi peningkatan CYP450 pada tingkat mRNA, 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase dan 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase.

(2). Vitamin E menghambat *Oxidative stress* yang disebabkan oleh TCDD. Vitamin E memiliki efek antagonis penurunan aktivitas stress oksidasi dan penurunan dari *hydrogen dioxide* yang ditimbulkan oleh TCDD (Latchoumycandane and Mathur, 2002). Selain itu, vitamin E meningkatkan malondialdehid (MDA) pada jaringan testis mencit dan penurunan lipid peroksidasi disebabkan oleh aflatoksin, serta penurunan oksidatif stress disebabkan oleh TCDD pada model tikus

Vitamin E memberikan efek pemulihan secara statistik pada tingkat testosteron serum. Pemulihan konsentrasi testosteron setelah pemberian vitamin E menunjukkan bahwa TCDD merusak komponen testis melalui kerusakan oksidatif dan bahwa vitamin E menunjukkan peran perlindungan terhadap komponen testis (Dirican dan Kalender, 2012). Efek pemulihan vitamin E terhadap kadar testosteron terlihat pada kelompok perlakuan kombinasi TCDD dan vitamin E dosis 11 dan 37 mg/kg/hari. Efek pemulihan vitamin E pada dosis tersebut tidak berbeda nyata ($p > 0,05$) atau setara dengan kadar testosteron pada kelompok kontrol *corn oil*.

6.2 Potensi vitamin E terhadap Diameter Tubulus Seminiferus pada Mencit yang Terpapar 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)

Pengamatan terhadap sediaan histopatologi testis pada kelompok kontrol negatif (P0) merupakan gambaran normal tubulus seminiferus. Penurunan diameter tubulus seminiferus yang sangat drastis terlihat pada kontrol positif

pemberian TCDD (P1). Rerata diameter tubulus seminiferus pada kelompok P0 dan P1 adalah $314,59 \pm 5,49$ dan $184,87 \pm 10,15$. Penurunan diameter tubulus tampaknya disebabkan oleh penurunan jumlah sel spermatogenik penyusun tubulus seminiferus. Hal ini karena TCDD terlihat menyebabkan hilangnya spermatogonium, spermatosit I dan II, spermatid dan spermatozoa berturut-turut yaitu 45,46%, 68,75%, 69,23% dan 79,17%. Gambar 5.7 terlihat bahwa kerusakan jaringan testis dan hilangnya sebagian sel spermatogenik akibat induksi TCDD mampu mengalami pemulihan karena pemberian vitamin E. Pemulihan tersebut sebanding dengan peningkatan dosis vitamin E yang diberikan. Diameter tubulus seminiferus pada testis mencit yang diberi vitamin E dosis tertinggi yaitu 37 mg/kg/hari (P4) selama 35 hari terjadi pemulihan yang signifikan ($p < 0,05$) bila dibanding dengan kelompok kontrol positif P1. Pemulihan ini mendekati diameter tubulus seminiferus pada kelompok kontrol negatif (P0). Jumlah sel spermatogenik seperti spermatogonium, spermatosit I dan II, spermatid dan spermatozoa yang diamati pada kelompok perlakuan vitamin E menunjukkan pemulihan yang bermakna. Pemulihan semakin meningkat sebanding dengan peningkatan dosis vitamin E yang diberikan, bahkan pada dosis tertinggi hampir mendekati jumlah sel spermatogenik pada kelompok kontrol negatif P0.

Pemulihan terhadap jumlah sel spermatogenik sebanding dengan pemulihan diameter tubulus seminiferus. Hal ini dapat dijelaskan karena tubulus seminiferus terdiri dari suatu lapisan jaringan ikat fibrosa, lamina basalis yang berkembang baik dan epitel germinal yang terdiri dari sel spermatogenik. Lapisan paling dalam tubulus seminiferus yang melekat pada lamina basalis terdiri dari sel gepeng yang

memperlihatkan ciri otot polos. Sel gepeng aktif berkontraksi yang dipengaruhi oleh kepadatan sel pada epitel germinalium dan lumen tubulus seminiferus (Junqueira, 2005).

Epitel germinalium terdiri dari sel spermatogonium, spermatosit, dan spermatid, sedangkan lumen tubulus seminiferus tersusun atas gelombang sel spermatozoa yang siap ditransfer ke dalam cauda epididimis, sehingga secara langsung jumlah sel spermatogonium, spermatosit, spermatid dan spermatozoa akan mempengaruhi ukuran tubulus seminiferus. Hasil pengamatan terhadap diameter tubulus seminiferus pada penelitian ini sebanding dengan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Hong *et al.* (2009) terhadap hubungan antara pemberian vitamin E terhadap indeks sel spermatogenik dan diameter tubulus seminiferus. Selain itu, hasil pengamatan ini juga sebanding dengan penelitian serupa yang dilakukan oleh Yin *et al.* (2012).

6.3 Potensi vitamin E terhadap Jumlah sel spermatogenik pada Testis Mencit yang Terpapar 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)

Tubulus seminiferus memproduksi spermatozoa sebagai hasil pembelahan dari sel epitel germinalis yang secara normal tersusun menurut urutan normal. Sel epitel germinalium akan berkembang membentuk sel baru dengan tipe perkembangan sel yang menuju lumen tubulus seminiferus, kemudian akan terbentuk spermatozoa yang bergerak bebas pada lumen tersebut. Semua proses ini akan berlangsung secara normal jika tidak ada gangguan. Keadaan tertentu misalnya pemberian obat atau zat toksik, dapat mempengaruhi spermatogenesis sehingga terjadi gangguan pada proses pembelahan atau perkembangan dari sel

epitel germinalis sampai menjadi spermatozoa. Abnormalitas spermatogenesis secara histologis dapat dilihat dari jumlah dan ukuran sel spermatogenik penyusun tubulus seminiferus yang berubah, berkurang atau mengalami perkembangan yang terhenti pada salah satu tahapan dan adanya kemungkinan untuk terjadinya pelepasan perlekatan sel germinalis.

Proses deferensiasi spermatogonia berlangsung sangat kompleks di dalam tubulus seminiferus. Spermatogenesis normal memerlukan LH dan FSH. LH bekerja secara langsung pada sel Leydig untuk menghasilkan hormon testosteron, sedangkan hormon yang langsung bekerja pada epitel tubulus seminiferus adalah testosteron dan FSH. FSH diperlukan pada permulaan proses spermatogenesis yang disebut spermatositogenesis. Spermatogonia akan berkembang menjadi spermatosit dan diakhiri terbentuknya spermatid pada spermatositogenesis. Sementara itu, sel Sertoli merupakan sel target dari hormon testosteron, sel Sertoli akan menghasilkan ABP (Verhoeven *et al.*, 2010).

Fungsi utama sel Sertoli yang dipengaruhi oleh testosteron adalah sintesis ABP, sintesis inhibin, sintesis glikoprotein dan metabolisme energi untuk menghasilkan asam laktat yang merupakan salah satu sumber energi utama untuk sel spermatogenik (Verhoeven *et al.*, 2010), jika terjadi gangguan pada sel Sertoli yang merupakan sel pendukung dan pemberi nutrisi bagi sel spermatogenik, akan mengakibatkan hambatan terhadap perkembangan sel spermatogenik dalam tubulus seminiferus. Epitel tubulus seminiferus tersusun atas dua sel yaitu sel spermatogenik (sel epitel germinalis) dan sel Sertoli. Pada penelitian ini hanya digunakan empat jenis sel spermatogenik yaitu spermatogonium, spermatosit I

dan II, spermatid dan spermatozoa. Dari hasil penelitian paparan TCDD berulang selama 35 hari pada jumlah sel spermatogenik menunjukkan adanya perbedaan penurunan yang nyata bila dibanding dengan kelompok kontrol negatif (P0). Pada kontrol negatif data rerata dari jumlah spermatogonium, spermatosit I dan II, spermatid dan spermatozoa berturut turut yaitu 0,11; 0,16; 0,13; 0,24. Jumlah spermatogonium, spermatosit I dan II, spermatid dan spermatozoa pada kontrol positif mengalami penurunan yang signifikan. Penurunan atau hilangnya sejumlah sel spermatogenik disebabkan karena pemberian TCDD, kemungkinan adanya pengaruh atau gangguan pada poros hipotalamus-hipofisis-testis. Kehilangan sel spermatogenik ini masih perlu diamati lebih lanjut, apakah disebabkan kematian pada saat tahap tersebut, sel spermatogonium tidak lagi mempunyai kemampuan untuk berkembang, kerusakan jaringan testis dan sel spermatogenik oleh stres oksidatif, gangguan pada sistem endokrinologi atau hilangnya sel spermatogenik tersebut karena terlepasnya perlekatan sel germinalis pada epitel dan lumen tubulus seminiferus.

Kondisi kerusakan jaringan testis dan sel spermatogenik akibat induksi TCDD selama 35 hari kemungkinan tidak memberi kesempatan testis untuk memperbaiki kerusakan yang terjadi. Proses spermatogenesis yang optimum membutuhkan kerja sama hormon FSH, LH dan testosteron. Jika sistem endokrinologi terganggu maka pematangan sel spermatogenesis akan terganggu sehingga sel spermatogenik mengalami degenerasi. LH yang disekresikan oleh hipofisis anterior merangsang aktifitas adenilsiklase sehingga meningkatkan kadar siklik AMP setelah hormon LH berikatan dengan reseptor pada dinding sel

Leydig. Testosteron yang dihasilkan oleh sel Leydig akan merangsang sel Sertoli dalam tubulus seminiferus untuk menghasilkan FSH yang kemudian akan digunakan untuk mendorong produksi ABP. Testosteron yang berikatan dengan ABP akan mendorong proses spermatogenesis. FSH mempunyai peran besar untuk mendorong pertumbuhan sel gamet pada proses spermatositogenesis (Walker, 2009).

Kadar testosteron yang tinggi pada perlakuan TCDD menyebabkan terjadinya hambatan sekresi GnRH oleh hipotalamus melalui mekanisme umpan balik negatif, akibatnya sekresi hormon gonadotropin yaitu FSH dan LH akan mengalami penurunan, sehingga proses spermatogenesis dalam tubulus seminiferus akan terganggu. FSH memainkan peran utama dalam kontrol proliferasi spermatogonium (McLachlan *et al.*, 2002). Konsentrasi intratestikular testosteron sangat mempengaruhi tahap awal pengembangan sel germinal (Renshan *et al.*, 2008). Penekanan terhadap biosintesis testosteron dapat menghambat spermatogenesis. Testosteron mengikat reseptor androgen sehingga memulai translokasi nuklear membentuk ligan-reseptor yang terikat pada kompleks dan fungsi regulasi dari reseptor androgen. Spermatogenesis tergantung pada tingkat reseptor androgen. Reseptor androgen ditemukan pada sel Leydig, myoid, Sertoli, dan spermatogonia (Zhou *et al.*, 2002). Penelitian ini kadar tinggi testosteron pada serum tidak mencerminkan kadar testosteron pada tubulus seminiferus. Hal ini dapat dilihat dari terganggunya proses spermatogenesis. Efek toksistas TCDD diduga mengganggu reseptor testosteron dalam tubulus seminiferus, sehingga kemungkinan tidak ada testosteron dalam tubulus sminiferus yang memfasilitasi

perkembangan sel spermatogenik. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui keberadaan testosteron dalam tubulus seminiferus dan pengamatan terhadap ekspresi AR dan ABP.

Pemberian TCDD diduga menyebabkan efek samping berupa infertilitas, pada mencit jantan karena menyebabkan gangguan proses spermatogenesis yang selanjutnya akan berdampak pada penurunan jumlah sel spermatogenik dan diameter tubulus seminiferus. Efek toksik TCDD pada penelitian ini teramati mengganggu proses spermatogenesis baik pada tahap spermatositogenesis maupun spermiogenesis. Hal ini didukung oleh penelitian Dirican dan Kalender (2012) yang berhasil membuktikan paparan TCDD mampu meningkatkan abnormalitas pada proses spermatositogenesis dan spermiogenesis.

Pada penelitian ini pemberian TCDD terhadap mencit jantan dapat menyebabkan kerusakan jaringan testis khususnya proses spermatogenesis yang ditandai dengan berkurangnya sel spermatogenik. Hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Yin *et al.* (2012) pada mencit. Hilangnya beberapa sel spermatogenik tubulus seminiferus pada induksi TCDD dalam penelitian ini masih belum diketahui apakah akibat apoptosis atau akibat nekrosis atau sebagai akibat tidak langsung dari terganggunya sekresi testosteron. Namun, bila ditinjau dari beberapa penelitian sebelumnya oleh Yin *et al.* (2012) dan Dhanabalan *et al.* (2012) kehilangan sel spermatogenik ini sebagai akibat dari proses apoptosis.

Penampang melintang tubulus seminiferus pada kelompok perlakuan maupun kontrol dapat dilihat perbedaannya pada gambar 5.7. Perbedaan penampang melintang tubulus seminiferus dapat dilihat dari jumlah sel

spermatogenik serta kepadatan sel yang menyusun tubulus seminiferus. Pengaruh TCDD pada jumlah sel spermatogenik dapat dilihat pada kontrol positif. Gambar 5.7 menunjukkan bahwa kontrol negatif, sel spermatogenik tersusun rapi dengan kepadatan sel yang tinggi. Spermatogonium tersusun atas 1 lapis, spermatosit I dan II tersusun 1-2 lapis, dan spermatid tersusun atas 2-3 lapis, sedangkan pada kontrol positif letak sel spermatogenik tidak beraturan dengan kepadatan sel yang rendah.

Hubungan pemaparan TCDD dan peningkatan dosis vitamin E secara umum semakin tinggi dosis vitamin E yang diberikan semakin tinggi efek pemulihan yang teramati pada sediaan histopatologi tubulus seminiferus. Teramati bahwa fase spermatogenesis yang lebih tua yaitu spermatid dan spermatozoa belum mampu memberikan hasil yang setara dengan perlakuan kontrol negatif. Hal ini sejalan dengan penelitian Dirican dan Kalender (2011) yang menyatakan bahwa paparan TCDD sangat kuat pada sel germinal epitel yang lebih dewasa yaitu spermatid dan spermatozoa. Selain itu, rendahnya kadar testosteron pada intratubulus seminiferus sangat berpengaruh pada *blood testis barrier* (BTB). Proses spermatogenik pertama memerlukan testosteron untuk pemeliharaan dan reformasi BTB yaitu sebuah persimpangan antara sel Sertoli yang berdekatan, membagi kompartemen basal dan adluminal dari epitel seminiferus dan memisahkan sel germinal paska meiosis dari lingkungan luar. BTB menyediakan lingkungan khusus untuk perkembangan sel germinal dan mencegah imunogenik sel antigen germinal dari sistem kekebalan tubuh. Selain mendukung BTB,

testosteron juga diperlukan untuk adesi Sertoli-spermatid dan pelepasan spermatozoa dewasa ke dalam lumen tubulus seminiferus (Walker, 2009).

Testosteron mengontrol sel germinal yang sedang berkembang terutama spermatid. Adanya gangguan pada hormon testosteron menyebabkan spermatid prematur terlepas dari epitel. Penelitian yang dilakukan oleh Lui dan Lee, (2009) membuktikan bahwa testosteron mempengaruhi fungsi perekat antara spermatid dan sel Sertoli, sehingga terjadi lepasnya perlekatan spermatid dari epitel.

Penampang melintang tubulus seminiferus antara kelima perlakuan tersebut menunjukkan perbedaan. Pada kelompok perlakuan vitamin E dosis 37 mg/kg/hari menunjukkan kepadatan sel spermatogonium yang menyerupai kontrol negatif, sel spermatogonium tersusun rapi pada lapisannya. Spermatogonium menduduki lapisan paling basal yang berjumlah 1 lapis. Pengaruh pemberian vitamin E terhadap pemulihan jumlah sel spermatogonium setelah pemberian TCDD dapat dilihat dari perbedaan jumlah spermatogonium antara kontrol positif yang diberikan TCDD dengan perlakuan kombinasi TCDD dan vitamin E dalam berbagai dosis. Pemberian vitamin E dosis rendah menunjukkan rerata jumlah spermatogonium lebih tinggi dibanding kontrol positif. Jumlah sel spermatogonium pada kelompok vitamin E mengalami peningkatan dari dosis 11, 20, 37 mg/kg/hari. Rerata jumlah spermatogonium pada kelompok vitamin E dosis 11, 20, dan 37 mg/kg/hari, masing-masing adalah 0,07; 0,09; dan 0,11. Rerata pada kontrol positif sebesar 0,06. Rerata jumlah sel spermatogonium lebih tinggi dapat dilihat pada kelompok perlakuan vitamin E dosis 37 mg/kg/hari. Pada dosis tersebut, jumlah spermatogonium yang dihasilkan sama dengan jumlah

spermatogonium pada kelompok kontrol negatif. Hal membuktikan bahwa vitamin E pada dosis tersebut memiliki daya pemulihan 100% terhadap jumlah sel spermatogonium.

Kepadatan jumlah spermatisit I dan penampang melintang tubulus seminiferus antara kelompok perlakuan vitamin E dan kontrol dapat dilihat pada gambar 5.4 dan 5.7. Pada kelompok vitamin E dosis 11, 20, 37 mg/kg/hari dan kontrol negatif, spermatisit I dan II menduduki lapisan di atas lapisan spermatogonium yang tersusun antara 1-2 lapis. Jumlah spermatisit I dan II ini jika dilihat dibawah mikroskop, jumlah sel tertinggi yang terdapat pada kelompok vitamin E dosis 37 mg/kg/hari. Lapisan spermatisit I dan II tersusun rapi pada kelompok perlakuan tersebut. Namun lapisan spermatisit I dan II tampak tidak beraturan pada kelompok kontrol positif, karena kepadatan sel tersebut menurun (Gambar 5.7).

Penelitian yang kami lakukan menunjukkan bahwa mencit yang menerima paparan TCDD peroral secara signifikan mengalami gangguan spermatogenesis, terlihat dari jumlah sel spermatogenik yang signifikan menurun. Sel germinal epitelium pada reproduksi jantan sangat rentan terhadap stres oksidatif karena konsentrasi tinggi PUFA dan ciri kapasitas antioksidan yang rendah di dalam tubulus seminiferus juga keseluruhan jaringan testis. Apabila terdapat ketidakseimbangan proses fisiologi dalam testis, akan meningkatkan kerentanan terhadap degeneratif spermatogonium dan akan menghasilkan konsentrasi spermatozoa yang lebih rendah. Penurunan jumlah sel spermatogenik bisa disebabkan oleh efek samping dari TCDD pada spermatogenesis. Efek berbahaya

dari TCDD pada spermatogenesis dapat berasal dari gangguan hormonal. Penurunan jumlah sel spermatogenik yang signifikan merupakan salah satu indikator dari toksisitas biokimiawi pada sistem reproduksi yaitu ketidakstabilan kadar testosteron. Tingkat rendah intratesticular testosteron dapat menyebabkan detasemen sel germinal epitel seminiferus dan dapat memulai apoptosis sel germinal dan selanjutnya menyebabkan infertilitas (Oda dan Maddawy, 2012).

Efek menguntungkan dari vitamin E sebagian besar karena sifat antioksidan yang larut lipid dan memainkan peran sebagai pelindung utama terhadap stres oksidatif dan mencegah produksi peroksida lipid dengan pembilasan radikal yang beracun, produk sampingan dari proses metabolisme dalam membran biologis pada testis. Selain itu, vitamin E penting dalam mempertahankan integritas fisiologis testis, epididimis dan aksesori kelenjar yang memiliki peran penting dalam spermatogenesis dan pematangan spermatozoa (Oda, and Maddawy 2012).

Pengaruh TCDD terhadap penurunan jumlah spermatozoa dianggap sebagai mekanisme yang paling sensitif. AhR dan Arnt juga diekspresikan pada spermatosit, di mana dianggap memainkan peran dalam mengatur apoptosis spermatosit (Schultz *et al.*, 2003). AhR dan Arnt dalam berbagai organ saluran reproduksi jantan dewasa terdeteksi di semua organ (testis, epididimis, vas deferens, prostat vitamin Entral, dorsolateral prostat, dan vitamin Esikula seminalis) (Suominen *et al.*, 2003). Penelitian yang dilakukan oleh schultz *et al* (2003) menunjukkan distribusi kompleks AhR dan Arnt dalam protein mRNA testis golongan rat dan manusia. AhR dan Arnt memediasi efek langsung TCDD pada sel testis pada golongan rat dan manusia.

Efek Merugikan lain dari TCDD adalah terganggunya interaksi antar sel dalam testis, gangguan perkembangan dari sel germinal, gangguan spermatogenesis, penipisan enzim antioksidan dan peningkatan tingkat peroksidasi lipid (Lai *et al.*, 2005). Mekanisme stres oksidatif yang ditimbulkan TCDD dapat dijelaskan bahwa produk yang terbentuk selama steroidogenesis normal dapat bertindak sebagai pseudosubstrat dan berinteraksi dengan P450, sehingga terbentuk kompleks *pseudosubstrate-P450-O2*, yang merupakan sumber kerusakan karena ketidakmampuan pseudosubstrat untuk menangkal radikal bebas (Mathur and D'Cruz, 2011).

Fungsi utama vitamin E tampaknya sebagai *chain-breaking* antioksidan nonspesifik yang mencegah penyebaran radikal bebas. vitamin E memiliki toksisitas yang sangat rendah. Vitamin E memiliki efek perlindungan yang berperan dalam kerusakan oksidatif dari testis. Mekanisme perlindungan vitamin E melalui kemampuannya dengan cepat dan efektif mengikat radikal *peroxyl* lipid sebelum serangan terjadi pada membran lipid testis dan sel spermatogenik. Selain itu, vitamin E merupakan sistem pertahanan non-enzimatik testis dalam mitokondria, spermatozoa, dan mampu menghambat peroksidasi kerusakan testis. Vitamin E memiliki peran penting dalam pemeliharaan dan kelangsungan hidup spermatid (Chandra *et al.*, 2010). Hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Alsharif dan Hassoun (2003) vitamin E secara signifikan menurunkan *superoxide* pada percobaan invitro menggunakan C57BL/6J mice yang terpapar TCDD.

Sebagian besar efek toksik yang ditimbulkan oleh TCDD termediasi oleh pengikatnya TCDD dengan AhR, dimana ikatan ini akan berikatan lagi dengan protein kedua AhR *nuclear translocator*. Ikatan kedua ini untuk merespon jumlah elemen pada gen target dan untuk memodulasi ekspresi gen (Nau, 2006). Aktivasi AhR dapat menginduksi ekspresi berbagai respon elemen gen xenobiotik pada daerah *enhancer*, seperti gen untuk cytochrome P450 1A1 (CYP1A1). Perubahan pada jumlah spermatozoa dan struktur testis mencit merupakan efek dari mekanisme oksidatif stress yang disebabkan oleh TCDD. TCDD dapat menghancurkan pertahanan antioksidan pada sistem chondrosomes testis dan cytomicrosomes, menyebabkan stres oksidatif. TCDD menurunkan aktivitas antioksidan dan meningkatkan hydrogen dioxide dan MDA pada jaringan testis mencit (Latchoumycandane and Mathur, 2002). Vitamin E dapat menurunkan proporsi abnormal dan kematian spermatozoa pada semen secara signifikan dan kuantitas dari alkaline phosphatase (ALP), glutamic oxaloacetic transaminase (GOT), and glutamic pyruvic transaminase (GPT) (Biswas et al., 2009).

Penelitian yang dilakukan oleh Yin *et al.* (2012) menemukan bahwa spermatozoa, spermatosit, dan spermatogonia teridentifikasi mengalami pelepasan perlekatan. Selain itu terjadi nekrosis pada spermatosit dan spermatogonia. Pada penelitian ini kemungkinan penurunan jumlah sel spermatogenik juga disebabkan oleh mekanisme yang sama pada penelitian sebelumnya tersebut.

Vitamin E memiliki efek protektor pada kerusakan struktur testis yang diakibatkan oleh TCDD. Lapisan sel spermatogenik pada tubulus seminiferus jelas tampak pada perlakuan kontrol negatif dan perlakuan vitamin E dosis

tertinggi. Mekanisme efek antagonis vitamin E terhadap TCDD merupakan respon dari abilitas vitamin E untuk menekan aktivasi ekspresi gen target AhR dan stres oksidatif yang disebabkan oleh TCDD. Upregulasi TCDD terhadap transkripsi dan ekspresi dari berbagai *cytochrome*-P450 melalui AhR dilawan oleh vitamin E melalui aktifitas penekanan terhadap produksi P450 sampai tingkat mRNA (Yin *et al.*, 2008).

The background of the page is a solid yellow color with a repeating pattern of circular embossed logos. Each logo features a stylized figure, possibly a person or a deity, within a circular border. The logos are arranged in a grid-like pattern across the entire page.

BAB 7
KESIMPULAN DAN SARAN

BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

1. Pemberian vitamin E pada dosis 37 mg/kg/hari dapat mempertahankan jumlah sel spermatogenik tubulus seminiferus pada mencit yang terpapar 2,3,7,8 *tetrachlorodibenzo-p-dioxin* (TCDD).
2. Pemberian vitamin E pada dosis 37 mg/kg/hari dapat mempertahankan diameter tubulus seminiferus pada mencit yang terpapar 2,3,7,8 *tetrachlorodibenzo-p-dioxin* (TCDD).
3. Pemberian vitamin E pada dosis 11, 37 mg/kg/hari dapat mempertahankan kadar testosteron serum pada mencit yang terpapar 2,3,7,8 *tetrachlorodibenzo-p-dioxin* (TCDD).

7.2 Saran

1. Perlu dilakukan pengamatan terhadap jumlah dan ultrastruktural dari sel Leydig dan sel Sertoli, serta pengamatan terhadap marker reseptor androgen (AR) dan *androgen binding protein* (ABP) juga berbagai kadar hormon seperti GnRH, FSH dan LH pada pemaparan TCDD dan proses *recovery* yang terjadi pada pemberian vitamin E
2. Dilakukan penelitian TCDD dengan jangka waktu pemaparan yang lebih lama untuk melihat ketahanan vitamin E sebagai antagonis untuk memerangi toksisitas TCDD yang disertai dengan pengujian kadar hormon GnRH,

FSH,LH, sel Leydig, sel Sertoli dan kadar testosteron untuk melihat pengaruh lebih lanjut terhadap fertilitas.

3. Hasil penelitian ini memberikan informasi dalam dunia kesehatan bahwa TCDD sangat berpotensi mengganggu fisiologis reproduksi jantan, namun efek patologis dari TCDD tersebut dapat dipulihkan oleh vitamin E, sehingga perlu untuk mengkonsumsi vitamin E pada orang yang tinggal disekitar area beresiko terhadap pencemaran TCDD.

The background of the page is a solid yellow color with a repeating pattern of circular embossed motifs. Each motif is a stylized, circular emblem, possibly a library or institutional logo, featuring a central figure or symbol surrounded by text. The motifs are arranged in a grid-like pattern across the entire page.

DAFTAR PUSTAKA

DAFTAR PUSTAKA

- Agrawal, A., and L.H. Sekhon. 2010. The role of antioxidant therapy in the treatment of male infertility. *Human Fertility*, December 2010; 13(4): 217–225
- Aitken, R.J., and S.D. Roman . 2008. Antioxidant Systems and Oxidative Stress in the Testes . *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis*, edited by C. Yan Cheng. Landes Bioscience and Springer Science+Business Media.
- Akiyama, M., 1999. In vivo scavenging effect of ethylcysteine on reactive oxygen species in human semen. *Nippon. Hinyokika. Gakkai. Zasshi.* 90, 421–428.
- Alam, M.J., M. Khatun, M. Begum, M. Hossain, J. Akhter, U.K. Paul, T. Begum. 2009. Role of Vitamin E on Antispermatic Effects of Indomethacin on Number of Sperm Containing Seminiferous Tubules of Testes in Long Evans Rats. *Bangladesh Journal of Anatomy* January . 7(1):5-9
- Alsharif, N.Z., E.A. Hassoun. 2004. Protective effects of vitamin A and vitamin E succinate against 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-induced body wasting, hepatomegaly, thymic atrophy, production of reactive oxygen species and DNA damage in C57BL/6J mice. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 95(3):131-8.
- Álvarez R.J., R.A. Medellín. 2005. *Mus musculus*. Vertebrados superiores exóticos en México: diversidad, distribución y efectos potenciales. Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México. Bases de datos SNIB-CONABIO. Proyecto U020. México. D.F.
- Amori, G. (1996). *Mus musculus*. 2007 IUCN Red List of Threatened Species. IUCN. Diakses pada 2013-02-07.
- Andersson, A.M., N. Jorgensen, F.L Larsen. 2004. Impaired Leydig cell function in infertile men: A study of 357 idiopathic infertile men and 318 proven fertile controls. *J Clin Endocrinol Metab* 89:3161-7.
- Antoine D. R., B. Jégou and C. Pineau. 2008. *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis : Testicular Development and Spermatogenesis*. Landes Bioscience and Springer Science+Business Media.
- Aragon, A.C., P.G. Kopf, M.J. Campen, J.K. Huwe, M.K. Walker. 2008. In utero and lactational 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin exposure: effects on fetal and adult cardiac gene expression and adult cardiac and renal morphology. *Toxicol Sci* 101:321–330.

- Baek, I.J., D.S. Seo, J.M. Yon. 2007. Tissue expression and cellular localization of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) mRNA in male mice. *J Mol Histol* 38:237-244.
- Beardsley, A., and L. O'Donnell. 2003. Characterization of normal spermiation and spermiation failure induced by hormone suppression in adult rats. *Biol. Reprod.* 68K 1299-1307
- Bell, DR., S. Clode, M.Q. Fan, A. Fernandes, P.M.D. Foster, T. Jiang, G Loizou, A MacNicoll, B.G. Miller, M. Rose, L. Tran, S. White. 2007. Toxicity of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin in the Developing Male Wistar(Han) Rat. II: Chronic Dosing Causes Developmental Delay. *TOXICOLOGICAL SCIENCES* 99(1): 224-233
- Biswas, Mohan J, and Sastry KV (2009) Effect of higher dietary vitamin E concentrations on physical and biochemical characteristics of semen in Kadaknath cockerels. *British Poultry Science* 50(6): 733-738.
- Bjerke, D.L., T.J. Brown, N.J. MacLusky, R.B. Hochberg, R.E. Peterson. 1994. Partial demasculinization and feminization of sex behavior in male rats by inutero and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin is not associated with alterations in estrogen receptor binding or volumes of sexually differentiated brain nuclei. *Toxicol Appl Pharmacol* 127:258-267.
- Blake, S. 2008. *Vitamins and Mineral*. McGraw-Hill Companies, Inc.
- Bookstaff , RC, Moore RW, and Peterson RE. 1990). 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin increases the potency of androgens and estrogens as feedback inhibitors of luteinizing hormone secretion in male rats. *Toxicology and Applied Pharmacology* 104(2): 212-224.
- Brehm, R., and K. Steger. 2005. Regulation of Sertoli cell and germ cell differentiation. In: *Advances in Anatomy, Embryology and cell biology*, Springer-Verlag Berlin 181:2-7.
- Brinster, R.L. 2007. Male germline stem cells: From mice to men. *Science* 316(5823):404-405.
- Brzezinska, S.E. A.B. Slebodzinski, B. Pietras, G. Wieczorek. 1995. Antioxidant effect of Vitamin E and glutathione on lipid peroxidation in boar semen plasma. *Biol. Trace Elem. Res.* 47, 69-74.
- Calkosinski, I., N.L Borodulin, M. Standa, U. Wasilewska, M. Cegielski. 2003. Influence of a single dose of TCDD on estrogen levels and reproduction in female rats. *Med. Wet.* 59 (536).

- Calkosinski, I. 2005. The course of experimentally induced acute pleuritis with use of Nitrogranulogen (NTG) and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). Habilitation thesis. Wroclaw University of Medicine.
- Calkosinski, I., J. Majda, N.L. Borodulin, U. Wasilewska, M. Standa, R. Skalik. 2004. Influence of acute pleuritis on lipid-cholesterol metabolism and blood concentration of sexual hormones in rats. *Med. Wet.* 60(990)
- Calkosiński, I., J.R. Tonderys, J. Bazan, K. Dzierzba, M. Calkosińska, J. Majda, M. Dobrzyński, A.B. Szydelko. 2012. The Influence of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on Hematological Parameters During Experimentally Induced Pleuritis in Rats. *Inflammation*
- Cerolini, S., L. Zaniboni, A. Maldjian, T. Gliozzi. 2006. Effect of docosahexaenoic acid and α -tocopherol enrichment in chicken sperm on semen quality, sperm lipid composition and susceptibility to peroxidation. *Theriogenology* 66: 877–886
- Chaffin CL, Trewin AL, Watanabe G. 1997. Alterations to the pituitary gonadal axis in the peripubertal female rat exposed in utero and through lactation to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Biology of Reproduction* 56(6): 1498–1502.
- Chandra, A.K., A. Chatterjee, R. Ghosh, M. Sarkar. 2010. Vitamin E-supplementation protect chromium (VI)-induced spermatogenic and steroidogenic disorders in testicular tissues of rats. *Food and Chemical Toxicology* 48 (2010) 972–979
- Chang, C., Y.T. Chen, S.D. Yeh. 2004. Infertility with defective spermatogenesis and hypotestosteronemia in male mice lacking the androgen receptor in Sertoli cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101:6876-81.
- Chang, HJ., JS. Park, EK. Lee, MH. Kim, MK. Baek, HR. Kim, HG. Jeong, SY. Choi, YD. Jung. 2009. Ascorbic acid suppresses the 2,3,7,8-tetrachloridibenxo-p-dioxin (TCDD)-induced CYP1A1 expression in human HepG2 cells. *Toxicology in Vitro* 23: 622–626
- Chang, S.I., B. Jin, P. Youn. 2007. Arsenic-induced toxicity and the protective role of ascorbic acid in mouse testis. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007; 218:196-203
- Chen, H., J. Liu, L. Luo. 2005. Vitamin E, aging and Leydig cell steroidogenesis. *Exp Gerontol* 2005;40:728-736.
- Chiarini, G.H., and L.D. Russell. 2001. High-resolution light microscopic characterization of mouse spermatogonia. *Biol Reprod* 2001; 65(4):1170-1178.

- Chow, C.K. 2001. Hand book of vitamin part 4 Vitamin E. University of Kentucky, Lexington, Kentucky page 165-197
- Cooke, P.S., and R.A. Hess, L. Simon. 2006. The transcription factor Ets-related molecule (ERM) is essential for spermatogonial stem cell maintenance and self-renewal. *Anim Reprod* 2006; 3(2):98-107.
- Davies, R., B. Clothier, S.W. Robinson, R.E. Edwards, P. Greaves, J. Luo, T.W. Gant, T. Chernova, T., A.G. Smith. 2008. Essential role of the AH receptor in the dysfunction of heme metabolism induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Chemical Research in Toxicology* 21, 330-340.
- Dhanabalan, S., R. Jubendradass, P. Latha and P.P. Mathur. 2011. Effect of restraint stress on 2,3,7,8 tetrachloro dibenzo-p-dioxin induced testicular and epididymal toxicity in rats. *Hum Exp Toxicol* 30: 567
- Dirican, E.K., Y. Kalender. 2012. Dichlorvos-induced testicular toxicity in male rats and the protective role of vitamins C and E. *Experimental and Toxicologic Pathology* 64 (2012) 821-830
- Dobrzyński, M., I. Całkosiński, I. Przywitowska, J.K. Brzoza, A.C. Waszkiewicz, E. Sołtan, O. Parulska. 2009. Effects of Dioxins in Environmental Pollution on Development of Tooth Disorders. *Polish J. of Environ. Stud.* Vol. 18, No 3 (2009), 319-323
- Doi, H., T. Baba, C. Tohyama, K. Nohara. 2003. Functional activation of arylhydrocarbon receptor (AhR) in primary T cells by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Chemosphere* 52 (2003) 655-662 www.elsevier.com/locate/chemosphere [diunduh pada 8 Maret 2013]
- Ebtekar, M. 2004. Review Paper Effects of Persistent Organic Pollutants on the Immune System: The Case of Dioxins. *Iranian J Env Health Sci Eng*, 2004, *Iranian J Env Health*. Downloaded from <http://journals.tums.ac.ir/> on Tuesday, February 05, 2013
- Eekenazi, B., P. Mocarelli, M. Warner, L. Needham, D.G.J.R. Patterson, S. Samuels, W. Turner, P.M. Gerthoux, P. Brambilla. 2004. Relationship of serum TCDD concentrations and age at exposure of female residents of Seveso, Italy. *Environ. Health Perspect.* 112, 22, 2004.
- Egeland, G.M., M.H. Sweeney, M.A. Fingerhu. 1994. Total serum testosterone and gonadotropin workers exposed to dioxin. *American Journal of Epidemiology* 139: 272-281.
- el-Sabeawy, F., S. Wang, J. Overstreet. 1998. Treatment of rats during pubertal development with 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin alters both

signaling kinase activities and epidermal growth factor receptor binding in the testis and the motility and acrosomal reaction of sperm. *Toxicology and Applied Pharmacology* 150(2): 427–442.

EPA, Environment Protection Agency. 2003. Evaluating Atmospheric Releases Dioxin-Like Compounds from Combustion Sources. http://www.epa.gov/ncea/pdfs/dioxin/nasreview/pdfs/part1_vol3/dioxin_pt1_vol3_ch03_dec2003.pdf [diunduh pada 6 Februari 2013].

Eskenazi, B., P. Mocarelli, M. Warner, L. Needham, D.G. Patterson, S. Samuels, W. Turner, P.M. Gerthoux, P. Brambilla. 2004. Relationship of serum TCDD concentrations and age at exposure of female residents of Seveso, Italy. *Environ. Health Perspect.* 112, 22, 2004.

Evans, H.M., K.S. Bishop. 1922. On the existence of a hitherto unrecognized dietary factor essential for reproduction. *Science* 56, 649–651.

Ezdihar, A.H., M. Al-Ghafri and A. Anishaban. 2003. The Role of Antioxidant Enzymes in TCDD-Induced Oxidative Stress in Various Brain Regions of Rats after Subchronic Exposure. doi:10.1016/S0891-5849(03)00458-1 *Free Radical Biology & Medicine*, Vol. 35, No. 9, pp. 1028–1036, 2003

Faqi, A.S., I. Chahoud . 1998. Antiestrogenic effects of low doses of 2,3,7,8-TCDD in offspring of female rats exposed through-out pregnancy and lactation. *Bull Environ Contam Toxicol* 61:462–469.

Faqi, A.S., P.R. Dalsenter, H.J. Merker, I. Chahoud. 1998. Reproductive toxicity and tissue concentrations of low doses of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in male offspring rats exposed throughout pregnancy and lactation. *Toxicol Appl Pharmacol* 150:383–392

Fix, C., C. Jordan, P. Cano, W.H. Walker. 2004. Testosterone activates mitogen-activated protein kinase and the cAMP response element binding protein transcription factor in Sertoli cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:10919–24

Franca, L.R., G.F. Avelar, F.F. Almeida. 2005. Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. *Theriogenology* 2005; 63(2):300-318.

Frueh, F.W. and C. Johnston. 1999. Research Interests: DIOXIN. Stanford University

Fujimaki, H., K. Nohara, T. Kobayashi. 2002. Effect of a single oral dose of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on immune function in male NC/Nga mice. *Toxicology Science* 66(1): 117–124.

- Ge, R., G. Chen, and M.P. Hardy. 2008. *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis: The Role of the Leydig Cell in Spermatogenic Function*. ©2008 Landes Bioscience and Springer Science+Business Media.
- Geusau, A., K. Abraham, K. Geissle, M.O. Sator, G. Stingl, E. Tschachler. 2002. Severe 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) intoxication: clinical and laboratory effects. *Environ Health Perspect.* 109, 865, 2001.
- Gray, L.E., J.S. Ostery, and W.R. Kelece. 1997. A dose response analysis of a single gestational dose of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in male Long Evans Hooded rat offspring. *Toxicology and Applied Pharmacology* 146: 11–12.
- Gregoraszczyk, E.L., E. Zabielyny, D. Ochwat. 2001. Aryl hydrocarbon receptor (AhR) - linked inhibition of luteal cell progesterone secretion in 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin treated cells. *J. Physiol. Pharm.* 52, 303, 2001.
- Groot, A.D., and W. Koert. 2007. *Het Anabolenboek: 4. The structural Formulas of Testosterone*. www.ergogenics.org/anabolenboek/index4en.html [diunduh pada 8 Maret 2013]
- Hales, D.B. 2002. Testicular macrophage modulation of Leydig cell steroidogenesis. *Journal of Reproductive Immunology* Volume 57, Issue 1, Pages 3-18, October 2002
- Hamm, J.T., B.R. Sparrow, D. Wolf. 2000. In utero and lactation exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) after postnatal development of seminal vesical epithelium. *Toxicology Science* 54: 424–430.
- Hassoun, E.A., M. Al-Ghafri, and A. Abushaban. 2003. The Role of Antioxidant Enzymes in TCDD-Induces Oxidative Stress in Various Brain Region of Rats after Subchronic Exposure. *Free Radical Biology & Medicine*, Vol. 35, No. 9, pp. 1028–1036, 2003. doi:10.1016/S0891-5849(03)00458-1
- Heffner, L.J., dan D.J. Schustz. 2002. *At a glance system reproduksi*. 2nd ed. Jakarta: Erlangga Page: 24-26
- Hess R., França L.R. Structure of the Sertoli cell. In: Griswold M, Skinner M, eds. *Sertoli Cell Biologi*. New York: Academic Press, 2005.
- Hess, R.A. and L.R de-Franca. 2008. *Spermatogenesis and Cycle of the Seminiferous Epithelium*. Veteriner Biosciences, University of Illinois. © 2008 Bioscience Landes and Springer Science.
- Holsberger, D.R., and P.S. Cooke. 2005. Understanding the role of thyroid hormone in Sertoli cell development: A mechanistic hypothesis. *Cell Tissue Res* 2005; 322(1):133-140.

- Hong, Z., L. Hailing, M. Hui, Z. Guijie, Y. Leyan, Y. Dubing. 2010. Effect of Vitamin E supplement in diet on antioxidant ability of testis in Boer goat. *Animal Reproduction Science* 117 (2010) 90–94
- Hong, Z., L. Hailing, M. Hui, Z. Guijie. 2009. Effect of vitamin E supplementation on development of reproductive organs in Boer goat. *Animal Reproduction Science* 113 (2009) 93–101
- IARC (International Agency for Research on Cancer). 1997. Monographs on the evaluation of carcinogenesis risks humans: Polychlorinated Dibenzo-p-dioxins and Polychlorinated dibenzofurans. IARC Scientific Publication France. 69: 1–631.
- Institute of Medicine US. 2000. Dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium, and Carotenoids. Washington: National Academy of Science.
- Ishii, T., S. Matsuki, Y. Iuchi. 2005. Accelerated impairment of spermatogenic cells in SOD1-knockout mice under heat stress. *Free Radic Res* 2005; 39:697-705.
- Johnson, L., P.K. Chaturvedi, J.D. Williams. 1992. Missing generations of spermatocytes and spermatids in seminiferous epithelium contribute to low efficiency of spermatogenesis in humans. *Biol Reprod* 1992; 47(6):1091-1098.
- Junqueira. 2005. Basic Histology “text and atlas”. London: McGraw-Hill Medical.
- Takeyama, M. and C. Tohyama. 2003. Developmental Neurotoxicity of Dioxin and Its Related Compounds *Industrial Health* 2003, 41, 215–230
- Karanth S, Yu WH, Mastronardi CA, et al. (2003) Vitamin E stimulates luteinizing hormone-releasing hormone and ascorbic acid release from medial basal hypothalamus of adult male rats. *Experimental Biology and Medicine* (Maywood) 228(7): 779–785.
- Kato, S., F.Y. Kuriyama and F. Ohtake. 2007. A new signaling pathway of dioxin receptor ligands through targeted protein degradation. *AATEX* 14, Special Issue, 487-494
- Kaur, P., G. Kaur, M.P. Bansal. 2006. Tertiary-butyl hydroperoxide induced oxidative stress and male reproductive activity in mice: Role of transcription factor NF-kappaB and testicular antioxidant enzymes. *Reprod Toxicol* 2006; 22:479-484.
- Kawakami, T, R. Ishimura, K. Nohara, K. Takeda, C. Tohyama, S. Ohsako. 2006. Differential susceptibilities of Holtzman and Sprague-Dawley rats to fetal death and placental dysfunction induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-

dioxin (TCDD) despite the identical primary structure of the aryl hydrocarbon receptor. *Toxicol Appl Pharmacol* 212:224–236.

- Kim, S.Y. and J.H. Yang. 2005. Neurotoxic effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in cerebellar granule cells. *Experimental and Molecular Medicine* 37(1): 58–64.
- Kisker, O., S. Onizuka, C.M. Becker, M. Fannon, E. Flynn, R. D'Amato, B. Zetter, J. Folkman, R. Ray, N. Swamy, S.P. Shepherd. 2003. Vitamin D Binding Protein-Macrophage Activating Factor (DBP-maf) Inhibits Angiogenesis and Tumor Growth in Mice. Copyright © 2003 Neoplasia Press, Inc. *Neoplasia*. 2003 January; 5(1): 32–40.
- Kovacs M and Schally AV (2001) Comparison of mechanisms of action of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) antagonist cetrorelix and LHRH agonist triptorelin on the gene expression of pituitary LHRH receptors in rats. *Proceedings of National Academy of Sciences USA* 98(21): 12197–12202.
- Lai, K.P., M.H. Wong and C.K.C Wong. 2005. Inhibition of CYP450_{1a2} expression in dioxin-exposed rat Leydig cells. *Journal of Endocrinology* (2005) 185, 519–527 0022–0795/05/0185–519
- Lambert, R. 2007. Breeding Strategies for Maintaining Colonies of Laboratory Mice : A Jackson Laboratory Resource Manual 2007. ©2007 The Jackson Laboratory. www.jax.org/jaxmice [diunduh pada 8 Maret 2013]
- Latchoumycandane, C., and P.P. Mathur. 2002. Effects of vitamin E on reactive oxygen species-mediated 2, 3, 7,8-tetrachloro-dibenzo-p-dioxin toxicity in rat testis. *Applied Toxicology* 22(5): 345–351.
- Laupeze, B., L. Amiot, L. Sparfel, E. Le-Ferrec, R. Fauchet, O Fardel. 2002. Polycyclic aromatic hydrocarbons affect functional differentiation and maturation of human monocyte- derived dendritic cells. *J Immunol*, 168: 2652-58.
- Leal, M.C., and L.R. Franca. 2006. The seminiferous epithelium cycle length in the black tufted-ear marmoset (*Callithrix penicillata*) is similar to humans. *Biol Reprod* 2006; 74(4):616-624.
- Lee, N. P. Y. And C.Y. Cheng. 2004. Ectoplasmic specialization, a testis-specific cell-cell actin-based adherens junction type: is this a potential target for male contraceptive development? *Hum. Reprod. Update* 10, 349–369. (doi:10.1093/humupd/dmh026)
- Leeson. 1996. *Histologi Dasar*. Jakarta: EGC.

- Li DJ, Xu ZS, Zhang ZH, et al. (2006) Antagonistic effects of vitamin E on the testicular injury by cyclophosphamide in mice. *Zhonghua Nan Ke Xue* 12(4): 318–322.
- Lui, W.Y., and W.M. Lee. 2009. Molecular mechanisms by which hormones and cytokines regulate cell junction dynamics in the testis. *Journal of Molecular Endocrinology* (2009) 43, 43–51
- M.I. Yousef , G.A. Abdallah , K.I. Kamel. Effect of ascorbic acid and Vitamin E supplementation on semen quality and biochemical parameters of male rabbits. *Animal Reproduction Science* 76 (2003) 99–111
- Mably, T.A., D.L Bjerke, R.W. Moore. 1992. In utero and lactational exposure of male rats to 2,3,7,8,-tetrachlorodibenzo-p-dioxin: Effect on spermatogenesis and reproductive capability. *Toxicology and Applied Pharmacology* 114: 118–126.
- Malole, M.B. dan C.S. Pramono. 1989. Penggunaan Hewan Percobaan di Laboratorium. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan. Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi. Pusat Antar Universitas Bioteknologi. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Mathur, P.P., and S.C. D’Cruz. 2011. The effect of environmental contaminants on testicular function *Asian Journal of Andrology* (2011) 13, 585–591
- McLachlan, R. I., L. O’Donnell, S. J. Meachem, P.G. Stanton, D.M. de-Kretser, K. Pratis, and D. M. Robertson. 2002. Identification of specific sites of hormonal regulation in spermatogenesis in rats, monkeys, and man. *Recent Prog. Horm. Res.* 57, 149–179. (doi:10.1210/rp.57.1.149)
- Meachem, S.J., S.M. Ruwanpura, J. Ziolkowski. 2005. Developmentally distinct in vivo effects of FSH on proliferation and apoptosis during testis maturation. *J Endocrinol* 2005; 186:429-446
- Meistrich, M. L., G. Wilson, K.L. Porter, I. Huhtaniemi, G. Shetty, and G.A. Shuttlesworth. 2003. Restoration of spermatogenesis in dibromochloropropane (DBCP)-treated rats by hormone suppression. *Toxicol. Sci.* 76,418–426. (doi:10.1093/toxsci/kfg237)
- Moeloek, N. 1994. Sistem Reproduksi Jantan/Pria. Dalam Syahrin, M.H. Kamaludin & A. Tjokronegoro: Reproduksi dan Embriologi: Dari Satu Sel Menjadi Organisme. Jakarta: Fakultas Kedokteran UI.
- Mruk, D.D., and C.Y. Cheng. 2004. Sertoli–Sertoli and Sertoli–germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. *Endocr. Rev.* 25, 747–806. (doi:10.1210/er.2003-0022)

- Nau H. 2006. Impacts and impact mechanisms of "dioxins" in humans and animals. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 113(8): 292-297.
- Nilsson, S., and J.A. Gustafsson. 2002. Biological role of estrogen and estrogen receptors. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 37, 1-28. (doi:10.1080/10409230290771438)
- Oda, S.S., Z.Kh.El. Maddawy. 2012. Protective effect of vitamin E and selenium combination on deltamethrin-induced reproductive toxicity in male rats. *Experimental and Toxicologic Pathology* 64: 813-819
- Ohsako, S., Y. Miyabara, M. Sakaue, R. Ishimura, M. Takeyama, H. Izumi. 2002. Developmental stagespecific effects of perinatal 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo- p-dioxin exposure on reproductive organs of male rat offspring. *Toxicol Sci* 66:283-292..
- Packard Instrument Company. 1996. TopCount Topics: Solid-phase RIA in Microplates. <http://www.packardinst.com> [diunduh pada 8 Maret 2013]
- Palaniappan M, Thirupathi M, and Karundevi B (2007) Effects of vitamins C and E on steroidogenic enzymes mRNA expression in polychlorinated biphenyl (Aroclor 1254) exposed adult rat Leydig cells. *Toxicology* 232(3): 170-182.
- PerkinElmer. 2005. cAMP [125I] RADIOIMMUNOASSAY KIT (ADENOSINE 3', 5' CYCLIC MONOPHOSPHATE) CATALOG NUMBER NEK033. PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Inc. www.perkinelmer.com [diunduh pada 8 Maret 2013]
- Pesatori, A.C., C. Zocchetti, S. Guercilena, D. Consonni, D. Turrini, P.A. 1998. Bertazzi. Dioxin exposure and non-malignant health effects: a mortality study. *Occup. Environ. Med.* 55, 126, 1998.
- Pocar, P., B. Fischer, T. Klonisch and S. Hombach-Klonisch. 2005. REPRODUCTION REVIEW Molecular interactions of the aryl hydrocarbon receptor and its biological and toxicological relevance for reproduction. *Society for Reproduction and Fertility* DOI: 10.1530/rep.1.00294 ISSN 1470-1626 (paper) 1741-7899 (online) Online version via www.reproduction-online.org
- Rahman, F., and H.C. Christian. 2007. Non-classical actions of testosterone: an update. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 18 371-378.
- Rooij, D. G. 2001. Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells. *Reproduction* 121, 347-354.
- Rugh, R. 1968. *The Mouse its Reproduction and Development*. Minneapolis: Burgess Publishing Company.

- Rugh, R. 1976. *The Mouse Its Reproduction and Development*. Burgess Publishing Company.
- Russell, L.D., G.H. Chiarini, S.J. Korsmeyer. 2002. Bax-dependent spermatogonia apoptosis is required for testicular development and spermatogenesis. *Biol Reprod* 2002; 66(4):950-958
- Sakai, R., T. Kajiume, H. Inoue, R. Kanno, M. Miyazaki, Y. Ninomiya, M. Kanno. 2003. TCDD treatment eliminates the long-term reconstitution activity of hematopoietic stem cells. *Toxicol Sci*, 72: 84-91.
- Schultz, R., J. Suominen, T. Varre, H. Hakovirta, M. Parvinen, J. Toppari. 2003. Expression of aryl hydrocarbon receptor and aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator messenger ribonucleic acids and proteins in rat and human testis. *Endocrinology* 144:767-776.
- Scott, H.M., J.I. Mason, and R.M. Sharpe. 2009. Steroidogenesis in the Fetal Testis and Its Susceptibility to Disruption by Exogenous Compounds. *Endocrine Reviews*. First published ahead of print November 3, 2009 as doi:10.1210/er.2009-0016
- Slomianka, L. 2009. *Blue Histology - Male Reproductive System*. School of Anatomy and Human Biology - The University of Western Australia
- Smith, B. J. dan S. Mangkoewidjojo. 1988. *Pemeliharaan, Pembiakan dan Penggunaan Hewan Percobaan di Daerah Tropis*. Universitas Indonesia Press, Jakarta.
- Sonmez, M., G. Turk, A. Yuce. 2005. The effect of ascorbic acid supplementation on sperm quality, lipid peroxidation and testosterone levels of male Wistar rats. *Theriogenology* 2005; 63:2063-2072.
- Staples, J.E., F.G. Murante, N.C. Fiore, T.A. Gasiewicz, A.E. Silverstone. 1998. Thymic alterations induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin are strictly dependent on aryl hydrocarbon receptor activation in hemopoietic cells. *J. Immunol.* 160, 3844-3854.
- Suminar, S.A. (2003). Estimasi emisi dioksin dan furan. Hasil penelitian disampaikan pada Enabling Activities to Facilitate Early Action on the Implementation of the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants (POPs) in Indonesia. Workshop Hasil Inventarisasi POPs. UNIDO. KLH. Jakarta.
- Suominen, R., J. Värre, T. Hakovirta, H. Parvinen, M. Toppari, J. Pelto. 2003. Expression of aryl hydrocarbon receptor and aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator messenger ribonucleic acids and proteins in rat and human testis. *Endocrinology*. 2003 Mar;144(3):767-76.

- Taketoh J, Mutoh J, Takeda T, et al. (2007) Suppression of fetal testicular cytochrome P450 17 by maternal exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin: a mechanism involving an initial effect on gonadotropin synthesis in the pituitary. *Life Science* 80: 1259–1267.
- Ten, T.G.W., P.A. Steerenberg, H. Van-Loveren, J.G. Vos, A.E. Von-DemBorne, M. Westra, J.W. Van-DerSlikke, K. Olie, H.J. Pluim, J.G. Koppe. 2003. Persistent hematologic and immunologic disturbances in 8-year-old Dutch children associated with perinatal dioxin exposure. *Environ Health Perspect.* 111, 1519, 2003.
- Uchida, T., S. Yoshida, Y. Inui, K. Takeda. 2002. Effect of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on Testosterone production in isolated murine testicular cells. *Journal of Health Science*, 48(3) 292-295 (2002)
- Uzun, F.G., S. Kalender, D. Durak, F. Demir, Y. Kalender. 2009. Malathion-induced testicular toxicity in male rats and the protective effect of vitamins C and E. *Food and Chemical Toxicology* 47 (2009) 1903–1908
- Vaisberg, C.N., L.V. Jelezarsky, B. Dishlianova. 2005. Activity, substrate detection and immunolocalization of glutathione peroxidase (GPx) in bovine reproductive organs and semen. *Theriogenology* 2005; 64:416-428.
- Verhoeven, G., A. Willems, E. Denoet, J.V. Swinnen and K.D Gendt. 2010. Androgens and spermatogenesis: lessons from transgenic mouse models. *Phil. Trans. R. Soc. B* (2010) 365, 1537–1556 doi:10.1098/rstb.2009.0117
- Vezina, C.M., S.H. Allgeier, R.W. Moore, T.M. Lin, J.C. Bemis, H.A. Hardin. 2008. Dioxin causes ventral prostate agenesis by disrupting dorsoventral patterning in developing mouse prostate. *Toxicol Sci* 106:488–496.
- Walker, W.H. 2009. Molecular mechanisms of testosterone action in spermatogenesis. *Steroids* 74 (2009) 602–607
- Warlina, L., E. Noor, A. Fauzi, R.C. Tarumingkeng, S.H. Sutjahjo. 2008. Kebijakan Manajemen Lingkungan untuk Emisi Dioksin /Furan yang Bersumber dari Industri Logam. *Jurnal Organisasi dan Manajemen*, Volume 4, Nomor 2, September 2008, 63-72
- Warren, G., Foster, S.M. Briceño, D.G. Cyr. 2011. Dioxin-induced changes in epididymal sperm count and spermatogenesis *Ciência & Saúde Coletiva*, 16(6):2893-2905, 2011
- Wegner, F.H. 2003. RIA METHOD ©2003 University of Wisconsin System Board of Regents. <https://wprcfs.primat.wisc.edu/assay/riameth.html> [diunduh pada 8 Maret 2013]

- Weisglas, K.N., S. Patandi, G.A. Berbers, T.C. Sas, P.G. Mulder, P.J. Sauer, H. Hooijkaas. 2000. Immunologic effects of background exposure to polychlorinated biphenyls and dioxins in Dutch preschool children. *Environ. Health Perspect.* 108, 1203, 2000
- Wen, J.C. 2006. The Role of Vitamin E in the Treatment of Male Infertility. *Nutrition Bytes*, 11(1) <http://escholarship.org/uc/item/1s2485fw> [diunduh pada 8 Maret 2013]
- WHO, World Health Organization. 2010. PREVENTING DISEASE THROUGH HEALTHY ENVIRONMENTS EXPOSURE TO DIOXINS AND DIOXIN-LIKE SUBSTANCES: A MAJOR PUBLIC HEALTH CONCERN. <http://www.who.int/> [diunduh pada 6 Februari 2013].
- WHO. 2005. Vitamin and Mineral Requirements in Human Nutrition: Part 5. Vitamin E. Page: 94-107.
- Williams, C.E., R.B. Crawford, M.P. Holsapple, N.E. Kaminski. 1996. Identification of functional aryl hydrocarbon receptor and aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator in murine splenocytes. *Biochem. Pharmacol.* 52, 771-780.
- Wilson, M.J., D. Kaye, S.W. Edward, H.T. Quach, A.A. Sinha, G.T. Vatassery. 2003. Effect of vitamin E deficiency on the growth and secretory function of the rat prostatic complex. *Exp Mol Pathol* 2003;74:267-75.
- Witorsch, R.J. 2002. Low-dose in utero effects of xenoestrogens in mice and their relevance to humans: An analytical review of the literature. *Food Chem Toxicol* 2002; 40:905-912
- Wolf, C.J., J.S. Ostby, L.E. Gray. 1999. Gestational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) severely alters reproductive function of female hamster offspring. *Toxicol Sci* 51:259-264
- Wong, E.W., D.D. Mruk, and C.Y. Cheng. 2008. Biology and regulation of ectoplasmic specialization, an atypical adherens junction type, in the testis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1778 692-708.
- Wu LL, Yan C, Su JF, et al. (2006) Effect of dan zhi xiaoyao san and its extracts on hypothalamus – pituitary gland- adrenal gland secretion in rats with chronic psychological stress. *Journal of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine* 23(5): 413-415.
- Yan, H.H., D.D. Mruk, W.M. Lee, and C.Y. Cheng. 2008. Blood-testisbarrier dynamics are regulated by testosterone and cytokines via their differential effects on the kinetics of protein endocytosis and recycling in Sertoli cells. *FASEB Journal* 22 1945-1959.

- Yao T (2005) *Physiology*. Beijing: People hygiene press, pp. 602–603.
- Yin HP, Xu JP, Zhou XQ, et al. (2008) Antagonistic effects of vitamin E on transcription activity of CYP450 and antioxidant enzyme genes in the liver of mice treated acutely with TCDD. *Acta Zoologica Sinica* 54(6): 1038–1043
- Yin, H.P., J.P. Xu, X.Q. Zhou, and Y. Wang. 2012. Effects of vitamin E on reproductive hormones and testis structure in chronic dioxin-treated mice. *Toxicology and Industrial Health* 28(2) 152–16. Reprints and permission: sagepub.co.uk/journalsPermissions.nav. DOI: 10.1177/0748233711408381 tih.sagepub.com
- Yonemoto, J. 2000. Review Article The Effects of Dioxin on Reproduction and Development National. *Industrial Health* 2000, 38, 259–268
- Yoshida, S., M. Sukeno, T. Nakagawa, K. Ohbo, G. Nagamatsu, T. Suda, and Y. Nabeshima. 2006. The first round of mouse spermatogenesis is a distinctive program that lacks the self-renewing spermatogonia stage. *Development* 133, 1495-1505 (2006) doi:10.1242/dev.02316
- Yousef, M.I. 2010. Vitamin E modulates reproductive toxicity of pyrethroid lambdacyhalothrin in male rabbits. *Food Chem Toxicol* 2010;48:1152–9.
- Yue, D., L. Yan, H. Luo, X. Xu, X. Jin. 2010. Effect of Vitamin E supplementation on semen quality and the testicular cell membranal and mitochondrial antioxidant abilities in Aohan fine-wool sheep. *Animal Reproduction Science* 118 (2010) 217–222
- Zhou XQ, Niu CJ, and Sun RY (2004) The effects of vitamin E on anti-acid stress ability in juveniles soft-shelled turtles, *Pelodiscus sinensis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 137(4): 299–305.
- Zhou, D.X., S.D. Qiu, J. Zhang. 2006. The protective effect of vitamin E against oxidative damage caused by formaldehyde in the testes of adult rats. *Asian J Androl* 2006; 8:584-588.
- Zhou, Q., R. Nie, G.R. Prins. 2002. Localization of androgen and estrogen receptors in adult male mouse reproductive tract. *J Androl* 2002; 23:870-81.



LAMPIRAN

LAMPIRAN

Lampiran 1. Data pengamatan kadar testosteron, diameter tubulus seminiferus, jumlah spermatogonium, spermatisit I dan II, spermatid dan spermatozoa

No	Perlakuan	Ulangan	Kadar Testosteron (ng/dl)	Diameter Tubulus seminiferus (µm)	Jumlah Sel Spermatogenik			
					Spermatogonium	Spermatosit I+II	Spermatid	Spermatozoa
I	P0	1	38,4	305,3	0,1	0,15	0,11	0,24
		2	31	319,6	0,11	0,15	0,12	0,24
		3	31,1	315,33	0,11	0,16	0,13	0,24
		4	38,6	317,43	0,11	0,16	0,14	0,23
		5	34,8	315,27	0,12	0,16	0,14	0,24
II	P1	1	146,4	193,57	0,07	0,05	0,03	0,04
		2	147,3	176,5	0,05	0,04	0,04	0,04
		3	147	173,17	0,05	0,04	0,03	0,05
		4	146	184,9	0,06	0,06	0,04	0,07
		5	146,1	196,23	0,06	0,06	0,04	0,06
III	P2	1	40,9	204,37	0,06	0,06	0,04	0,06
		2	40,7	214,3	0,07	0,06	0,05	0,06
		3	41	212,4	0,06	0,06	0,05	0,05
		4	41,3	216,17	0,07	0,06	0,05	0,05
		5	41,2	214,3	0,07	0,06	0,05	0,05
IV	P3	1	18,1	263,13	0,08	0,11	0,09	0,12
		2	18	262,53	0,09	0,11	0,1	0,13

Lampiran 2. Data penghitungan rerata diameter tubulus seminferus, jumlah spermatogonium, spermatisit I dan II, spermatid dan spermatozoa

No	Perlakuan	Ulangan	Diameter Tubulus seminferus		Spermatogonium		Spermatosit I + II		Spermatid		Spermatozoa			
			Hitung (μm)	Rata-rata (μm)	Hitung	Rata-rata	Hitung	Rata-rata	Hitung	Rata-rata	Hitung	Rata-rata		
I	P0	1	306,9	305,3	128	109,3333333	235	232,6666667	121	129	675	556,3333333		
			299,6		76		240		128		556			
			309,4		124		223		138		438			
				323,8		117		246		131		456		
				319,8	319,6	98	114,3333333	222	229,6666667	150	147	526	552,3333333	
				315,2		128		221		160		675		
				312,1		120		223		172		438		
				316,6	315,3333333	97	116,6666667	260	251	175	179	765	543	
				317,3		133		270		190		426		
				316,3		128		249		198		456		
				316,9	317,4333333	88	123,6666667	239	247	189	195	468	530,6666667	
				319,1		155		253		198		668		
		314,8	150	236		188		661						
		316,4	315,2666667	160	147	249	248,6666667	190	186,3333333	602	567			
		314,6		131		261		181		438				
		191		39		23		8		27				
II	P1	1	219,7	193,5666667	48	42,66666667	20	22	15	9,66666667	8	13,33333333		
							41				23			5
							170				23			

III	P2	2	191	176,5	36	30	17	20,33333333	18	14,6666667	18	17,6666667
			167,8				27		23		15	
		3	170,7	173,1666667	27	24	20	18,6666667	8	9,33333333	38	25,33333333
			172									
		4	171,5	184,9	27	31,33333333	36	36	10	14	20	44,6666667
			176									
		5	177,7	196,2333333	26	39,33333333	46	34,6666667	13	14,3333333	49	40,6666667
			190									
		1	187	204,3666667	36	35,33333333	36	33,6666667	14	13,3333333	41	31
			189,1									
2	207	214,3	48	43,33333333	46	40	17	21,3333333	56	36,6666667		
	192,6										32	36
3	199,3	212,4	36	35,33333333	38	33,6666667	12	13,3333333	47	29,6666667		
	203										40	33
4	210,8	216,1666667	46	43,33333333	30	40	14	20,6666667	26	24		
	216,5										30	45
5	206,9	215,7	44	41	49	39,6666667	26	24	21	24		
	219,5										40	30
6	207,3	219,9	45	44,6666667	35	37,33333333	21	20,6666667	14	24		
	227,8										44	41
7	202,1	219,9	40	44,6666667	35	37,33333333	21	20,6666667	14	24		
	215,7										45	41
8	215,7	216,1666667	44	44,6666667	35	37,33333333	21	20,6666667	14	24		
	219,9										44	41

IV	P3	5	212,9	214,3	45	43,33333333	36	35	28	23,66666667	24	22
			215,7		46		41		23		21	
			218,9		44		32		24		23	
		1	263,13333333	208,3	40	63	32	116,66666667	24	73,66666667	22	152,66666667
				263,4	61		114		71		148	
				260	58		111		70		141	
		2	262,53333333	266	70	85,66666667	125	129	80	93,33333333	169	171,66666667
				262,6	82		128		96		170	
				262	87		129		91		176	
		3	267,1	263	88	89	130	134,33333333	93	96	169	173,66666667
				268,5	88		138		98		176	
				267,4	91		129		91		169	
		4	268	265,4	88	90	136	130,66666667	99	97	176	180
				267,4	89		130		94		190	
				266,3	85		121		90		174	
5	272,36666667	270,3	96	86,66666667	141	140,66666667	107	91	176	181,33333333		
		271,8	90		146		97		195			
		269,1	84		136		86		176			
V	P4	1	276,2	312,1	86	105	140	204,66666667	90	134,33333333	173	375,33333333
			338		106		241		131		346	
			302,8		104		157		95		384	
2	333,73333333	295,5	105	117,33333333	216	254	177	147	396	413		
		330,9	128		259		142		468			

Lampiran 3. Data penghitungan transformasi jumlah spermatozonium, spermatozoid I dan II, spermatozoid dan spermatozoa

No	Perlakuan	Ulangan	Transformasi arsitek Jumlah Sel Spermatozoid (%)											
			Spermatozonium			Spermatozoid I dan II			Spermatozoid			Spermatozoid		
			Akar (sgpt)	persen (/100)	Asin	Akar (sgpt)	persen (/100)	Asin	Akar (sgpt)	persen (/100)	Asin	Akar (sgpt)	persen (/100)	Asin
I	P0	1	10,44030651	0,104403065	0,10459367	15,2643375	0,15264338	0,153242443	11,35781669	0,113578167	0,113824	23,57965225	0,235796522	0,23803812
		2	10,67707825	0,106770783	0,10697469	15,1657509	0,15165751	0,152244963	12,12435565	0,121243557	0,121543	23,49468025	0,234946802	0,23716384
		3	10,81665383	0,108166538	0,10837858	15,8429795	0,1584298	0,15910016	13,37908816	0,133790882	0,134193	23,3023604	0,233023604	0,23518573
		4	11,13552873	0,111355287	0,11158672	15,7162336	0,15716234	0,15781662	13,96424004	0,1396424	0,1401	23,04343724	0,230434372	0,23252404
		5	12,12435565	0,121243557	0,12154259	15,7797338	0,15779734	0,158459646	13,6381817	0,136381817	0,136808	23,8117618	0,238117618	0,24042726
II	P1	1	6,557438524	0,065574385	0,06562147	4,69041576	0,04690416	0,046921373	3,16227766	0,031622777	0,031628	3,60551275	0,03605513	0,03606533
		2	5,477225575	0,054772256	0,05479968	4,47213595	0,04472136	0,04473628	3,872983346	0,038729833	0,03874	4,24240687	0,042424067	0,04243915
		3	4,898979486	0,048989795	0,04900941	4,35889894	0,04358899	0,043602804	3	0,03	0,030005	5	0,05	0,05002086
		4	5,567764363	0,055677644	0,05570645	6	0,06	0,060036058	3,741657387	0,037416574	0,037425	6,708203932	0,067082039	0,06713245
		5	6,244997998	0,06244998	0,06249064	5,91607978	0,0591608	0,059195363	3,741657387	0,037416574	0,037425	6,403124237	0,064031242	0,06407508
III	P2	1	5,916079783	0,059160798	0,05919536	5,83095189	0,05830952	0,058342612	3,60551275	0,03605513	0,036063	5,567764363	0,055677644	0,05570645
		2	6,557438524	0,065574385	0,06562147	6,32455532	0,06324555	0,063287793	4,582575695	0,045825757	0,045842	6,08276253	0,060827625	0,0608652
		3	6,403124237	0,064031242	0,06407508	6,32455532	0,06324555	0,063287793	4,898979486	0,048989795	0,049009	5,477225575	0,054772256	0,05479968
		4	6,708203932	0,067082039	0,06713245	6,08276253	0,06082763	0,060865198	4,582575695	0,045825757	0,045842	4,898979486	0,048989795	0,04900941
		5	6,557438524	0,065574385	0,06562147	5,91607978	0,0591608	0,059195363	4,898979486	0,048989795	0,049009	4,69041576	0,046904158	0,04692137
IV	P3	1	7,937253933	0,079372539	0,07945612	10,8166538	0,10816654	0,108378881	8,602225267	0,086022253	0,08613	12,36931688	0,123693169	0,12401078
		2	9,273618495	0,092736185	0,09286962	11,3578167	0,11357817	0,113823788	9,643650761	0,096436508	0,096587	13,11487705	0,13114877	0,13152767
		3	9,433981132	0,094339811	0,09448031	11,5758369	0,11575837	0,116018468	9,797958971	0,09797959	0,098137	13,19090596	0,13190906	0,13229462
		4	9,486832981	0,09486833	0,09501121	11,4455221	0,11445523	0,11470661	9,848857802	0,098488578	0,098649	13,41640786	0,134164079	0,13456987

Lampiran 4. Data hasil pemeriksaan laboratorium uji kadar hormon testosteron



LABORATORIUM KLINIK UTAMA

Penanggung Jawab : Dr. BETTY AGUSTINA T., SpPK.

LABORATORIUM MEDIS

Klinika

Jl. Mayjen Prof. Dr. Moestopo No. 3
Telp. (031) 5030823, 5033142 Fax. (031) 5030823
SURABAYA

HASIL PEMERIKSAAN LABORATORIUM

Nomer Lab. : 05000360 27 MAY 2013
Nama Pasien : WADE KARMILA [0 Thn]
Alamat :
Orang : PENELITIAN WADE KARMILA
.. :
.. :

PEMERIKSAAN	HASIL PENDERITA	NILAI NORMAL
Testosteron (IF)		
Testosteron P0 = 1	38,4 ng/dl	
-	-	
Testosteron P0 = 2	71,1 ng/dl	
-	-	
Testosteron P0 = 3	31,1 ng/dl	
-	-	
Testosteron P0 = 4	58,2 ng/dl	
-	-	
Testosteron P0 = 5	199 ng/dl	
-	-	
Testosteron P1 = 6	148,4 ng/dl	
-	-	
Testosteron P1 = 7	147,5 ng/dl	
-	-	
Testosteron P1 = 8	147 ng/dl	
-	-	
Testosteron P1 = 9	146 ng/dl	
-	-	
Testosteron P1 = 10	146,3 ng/dl	
-	-	
Testosteron P2 11	40,7 ng/dl	
-	-	
Testosteron P2 12	40,7 ng/dl	
-	-	
Testosteron P2 13	41 ng/dl	
-	-	
Testosteron P2 14	41,3 ng/dl	
-	-	
Testosteron P2 15	41,7 ng/dl	
-	-	
Testosteron P2 16	18,1 ng/dl	
-	-	
Testosteron P2 17	18 ng/dl	
-	-	
Testosteron P2 18	18,1 ng/dl	
-	-	
Testosteron P2 19	14 ng/dl	
-	-	
Testosteron P3 20	10,7 ng/dl	
-	-	
Testosteron P4 21	21,4 ng/dl	
-	-	

Catatan :



dr. BETTY AGUSTINA TAMBUNAN, SpPK.



LABORATORIUM KLINIK UTAMA

Penanggung Jawab : Dr. BETTY AGUSTINA T., SpPK.

LABORATORIUM MEDIS

"Klinika"

Jl. Mayjen Prof. Dr. Moestopo No. 3
 Telp. (031) 5030823, 5033142 Fax. (031) 5033142
 SURABAYA

HASIL PEMERIKSAAN LABORATORIUM

Nomer Lab. : 05000360 27 MAY 2013
 Nama Pasien : WAODE KARMILA [0 Thn]
 Alamat :
 Dokter : PENELITIAN WAODE KARMILA
 .. :

PEMERIKSAAN	HASIL PENDERITA	NILAI NORMAL
ENDOKRINOLOGI		
Testosteron (IF)		
Testosteron P4 22	60,1 ng/dl	
-	*	
Testosteron P4 23	21 ng/dl	
-	*	
Testosteron P4 24	60,2 ng/dl	
-	*	
Testosteron P4 25	21,7 ng/dl	
-	*	

Catatan [28/05/2013][12:05]



Dr. BETTY AGUSTINA TAMBUNAN, SpPK

Lampiran 5. Analisis uji statistik terhadap kadar hormon testosteron pada mencit kelompok kontrol, perlakuan TCDD dan Vitamin E (*α -tocopherol*)

NPar Tests

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		KadarTestosteron
N		25
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	54,9040
	Std. Deviation	48,46528
	Absolute	,331
Most Extreme Differences	Positive	,331
	Negative	-,178
Kolmogorov-Smirnov Z		1,653
Asymp. Sig. (2-tailed)		,008

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Oneway

Descriptives

KadarTestosteron

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
P0	5	34,7800	3,72586	1,66625	30,1537	39,4063	31,00	38,60
P1	5	146,5600	,56833	,25417	145,8543	147,2657	146,00	147,30
P2	5	41,0200	,23875	,10677	40,7236	41,3164	40,70	41,30
P3	5	15,2800	3,29651	1,47425	11,1868	19,3732	10,20	18,10
P4	5	36,8800	21,24399	9,50060	10,5021	63,2579	21,00	60,20
Total	25	54,9040	48,46528	9,69306	34,8985	74,9095	10,20	147,30

ANOVA

KadarTestosteron

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	54467,446	4	13616,861	142,903	,000
Within Groups	1905,744	20	95,287		
Total	56373,190	24			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

KadarTestosteron

Duncan^a

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
P3	5	15,2800		
P0	5		34,7800	
P4	5		36,8800	
P2	5		41,0200	
P1	5			146,5600
Sig.		1,000	,351	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5,000.

Lampiran 6. Analisis uji statistik terhadap diameter tubulus seminiferus mencit kelompok kontrol, perlakuan TCDD dan Vitamin E (*α -tocopherol*)

NPar Tests

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		DiameterTubulusSeminiferus
N		25
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	257,3760
	Std. Deviation	53,22733
	Absolute	,181
Most Extreme Differences	Positive	,181
	Negative	-,154
Kolmogorov-Smirnov Z		,903
Asymp. Sig. (2-tailed)		,389

- a. Test distribution is Normal.
b. Calculated from data.

Oneway

Descriptives

DiameterTubulusSeminiferus

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
P0	5	314,5860	5,48816	2,45438	307,7715	321,4005	305,30	319,60
P1	5	184,8740	10,14504	4,53700	172,2773	197,4707	173,17	196,23
P2	5	212,3080	4,63334	2,07209	206,5549	218,0611	204,37	216,17
P3	5	266,6260	4,00329	1,79033	261,6553	271,5967	262,53	272,37
P4	5	308,4860	15,97813	7,14563	288,6465	328,3255	291,20	333,73
Total	25	257,3760	53,22733	10,64547	235,4048	279,3472	173,17	333,73

ANOVA

DiameterTubulusSeminiferus

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	66292,217	4	16573,054	194,594	,000
Within Groups	1703,346	20	85,167		
Total	67995,562	24			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

DiameterTubulusSeminiferus

Duncan^a

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
P1	5	184,8740			
P2	5		212,3080		
P3	5			266,6260	
P4	5				308,4860
P0	5				314,5860
Sig.		1,000	1,000	1,000	,308

- Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5,000.

Lampiran 7. Analisis uji statistik terhadap jumlah spermatogonium pada mencit kelompok kontrol, perlakuan TCDD dan Vitamin E (*α -tocopherol*)

NPar Tests

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		JumlahSpermatogonium
N		25
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	,0864
	Std. Deviation	,02252
Most Extreme Differences	Absolute	,173
	Positive	,167
	Negative	-,173
Kolmogorov-Smirnov Z		,863
Asymp. Sig. (2-tailed)		,446

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Oneway

Descriptives
JumlahSpermatogonium

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
P0	5	,1100	,00707	,00316	,1012	,1188	,10	,12
P1	5	,0580	,00837	,00374	,0476	,0684	,05	,07
P2	5	,0660	,00548	,00245	,0592	,0728	,06	,07
P3	5	,0900	,00707	,00316	,0812	,0988	,08	,10
P4	5	,1080	,00447	,00200	,1024	,1136	,10	,11
Total	25	,0864	,02252	,00450	,0771	,0957	,05	,12

ANOVA

JumlahSpermatogonium

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,011	4	,003	64,182	,000
Within Groups	,001	20	,000		
Total	,012	24			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

JumlahSpermatogonium

Duncan^a

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
P1	5	,0580		
P2	5	,0660		
P3	5		,0900	
P4	5			,1080
P0	5			,1100
Sig.		,071	1,000	,639

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5,000.

Lampiran 8. Analisis uji statistik terhadap jumlah spermatisit I pada mencit kelompok kontrol, perlakuan TCDD dan Vitamin E (*α -tocopherol*)

NPar Tests

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		JumlahSpermatisitI
N		25
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	,1056
	Std. Deviation	,04510
	Absolute	,244
Most Extreme Differences	Positive	,244
	Negative	-,177
Kolmogorov-Smirnov Z		1,220
Asymp. Sig. (2-tailed)		,102

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Oneway

Descriptives

JumlahSpermatisitI

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
P0	5	,1560	,00548	,00245	,1492	,1628	,15	,16
P1	5	,0500	,01000	,00447	,0376	,0624	,04	,06
P2	5	,0600	,00000	,00000	,0600	,0600	,06	,06
P3	5	,1140	,00548	,00245	,1072	,1208	,11	,12
P4	5	,1480	,00837	,00374	,1376	,1584	,14	,16
Total	25	,1056	,04510	,00902	,0870	,1242	,04	,16

ANOVA

JumlahSpermatisitI

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,048	4	,012	260,304	,000
Within Groups	,001	20	,000		
Total	,049	24			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

JumlahSpermatisitI

Duncan^a

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
P1	5	,0500			
P2	5		,0600		
P3	5			,1140	
P4	5				,1480
P0	5				,1560
Sig.		1,000	1,000	1,000	,077

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5,000.

Lampiran 9. Analisis uji statistik terhadap jumlah spermatid bulat pada mencit kelompok kontrol, perlakuan TCDD dan Vitamin E (*α -tocopherol*)

NPar Tests

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		JumlahSpermatidBulat
N		25
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	,0852
	Std. Deviation	,03831
	Absolute	,221
Most Extreme Differences	Positive	,221
	Negative	-,210
Kolmogorov-Smirnov Z		1,105
Asymp. Sig. (2-tailed)		,174

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Oneway

Descriptives

JumlahSpermatidBulat

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
P0	5	,1280	,01304	,00583	,1118	,1442	,11	,14
P1	5	,0360	,00548	,00245	,0292	,0428	,03	,04
P2	5	,0480	,00447	,00200	,0424	,0536	,04	,05
P3	5	,0980	,00447	,00200	,0924	,1036	,09	,10
P4	5	,1160	,01140	,00510	,1018	,1302	,10	,13
Total	25	,0852	,03831	,00766	,0694	,1010	,03	,14

ANOVA

JumlahSpermatidBulat

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,034	4	,008	114,000	,000
Within Groups	,001	20	,000		
Total	,035	24			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

JumlahSpermatidBulat

Duncan^a

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
P1	5	,0360				
P2	5		,0480			
P3	5			,0980		
P4	5				,1160	
P0	5					,1280
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5,000.

Lampiran 10. Analisis uji statistik terhadap jumlah spermatozoa pada mencit kelompok kontrol, perlakuan TCDD dan Vitamin E (*α-tocopherol*)

NPar Tests

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		JumlahSpermatozoa
N		25
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	,1352
	Std. Deviation	,07790
	Absolute	,199
Most Extreme Differences	Positive	,199
	Negative	-,159
Kolmogorov-Smirnov Z		,994
Asymp. Sig. (2-tailed)		,277

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Oneway

Descriptives

JumlahSpermatozoa

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
P0	5	,2380	,00447	,00200	,2324	,2436	,23	,24
P1	5	,0520	,01304	,00583	,0358	,0682	,04	,07
P2	5	,0540	,00548	,00245	,0472	,0608	,05	,06
P3	5	,1280	,00447	,00200	,1224	,1336	,12	,13
P4	5	,2040	,00894	,00400	,1929	,2151	,19	,21
Total	25	,1352	,07790	,01558	,1030	,1674	,04	,24

ANOVA

JumlahSpermatozoa

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,144	4	,036	563,844	,000
Within Groups	,001	20	,000		
Total	,146	24			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

JumlahSpermatozoa

Duncan^a

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
P1	5	,0520			
P2	5	,0540			
P3	5		,1280		
P4	5			,2040	
P0	5				,2380
Sig.		,697	1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5,000.

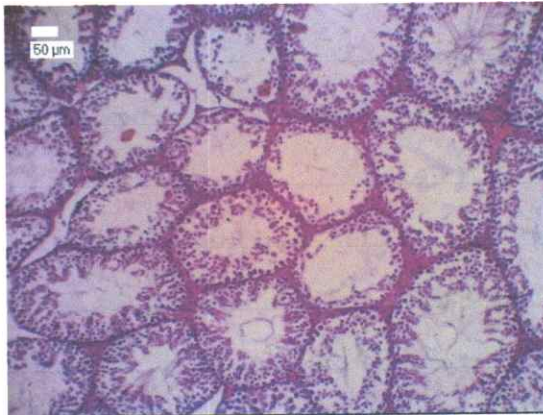
Lampiran 11. Gambaran histopatologi organ testis mencit pada kelompok kontrol, perlakuan TCDD dan Vitamin E (*α -tocopherol*). Pewarnaan HE, pembesaran 100x



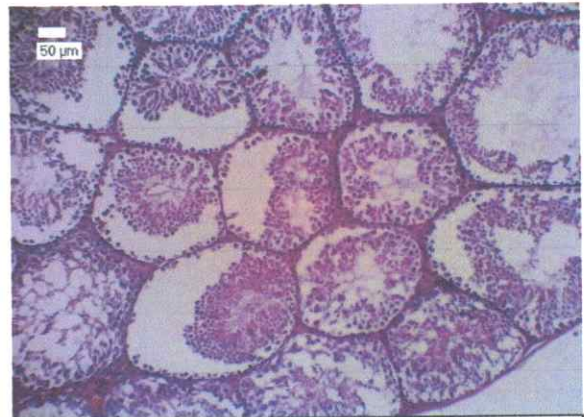
P0: Kontrol pelarut corn oil



P1: Perlakuan TCDD



P2: Perlakuan TCDD + Vit E1

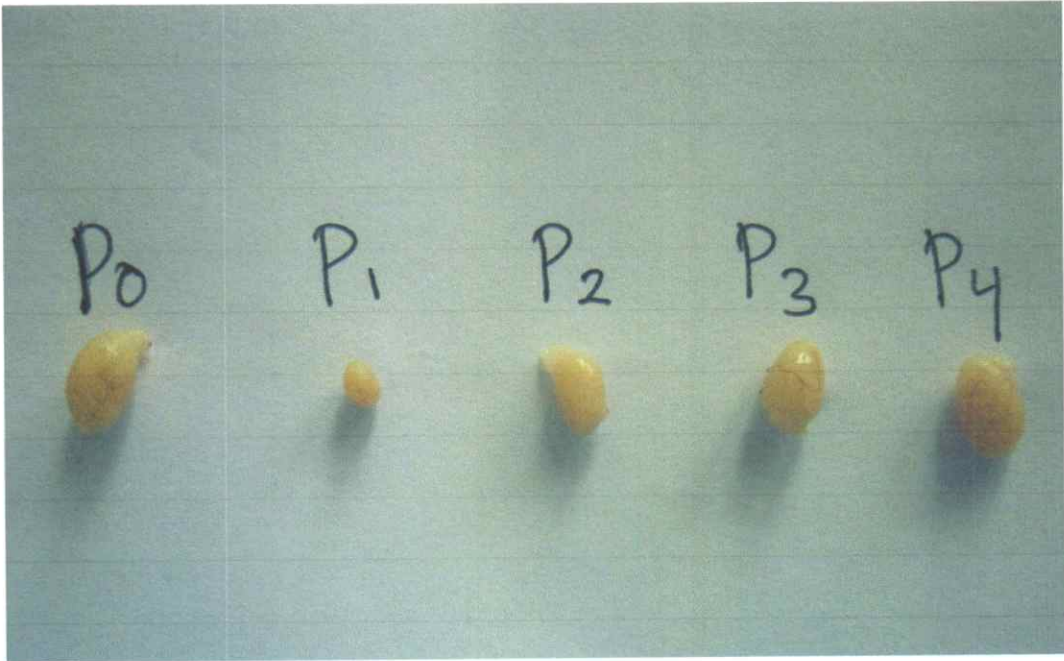


P3: Perlakuan TCDD + Vit E2



P4: Perlakuan TCDD + Vit E3

Lampiran 12. Gambaran makroskopis organ testis mencit pada kelompok kontrol, perlakuan TCDD dan Vitamin E (*α-tocopherol*). Pewarnaan HE, pembesaran 100x



Keterangan:

P0: Kontrol pelarut corn oil
P2: Perlakuan TCDD + Vit E1
P4: Perlakuan TCDD + Vit E3

P1: Perlakuan TCDD
P3: Perlakuan TCDD + Vit E2

Lampiran 13. Foto dokumentasi penelitian



2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin
(Analytical standart, Sigma 48599)



Pengenceran TCDD



Vitamin E (α -tocopherol, Analytical
standart, Sigma T3251)



Pengenceran vitamin E



Minyak jagung
(Mazola Corn oil switzerland)



Sistem perkandangan mencit



Proses pembedahan, koleksi sampel
darah dan organ testis



Proses separasi serum darah untuk
pemeriksaan testosteron

Lampiran 14. Pemeriksaan kadar hormon testosteron menggunakan sistem *Immulite® 1000 Total Testosteron (Siemens Immulite systems)*

Pengertian dan prosedur pengujian

Immulite® 1000 Total Testosteron merupakan analiser untuk pengukuran total secara kuantitatif pada sampel serum atau plasma. Sistem ini terhubung dalam pada sebuah mesin otomatis yang juga terhubung ke sistem komputerisasi. Prinsip kerja menggunakan sebuah fase padat, kompetitif *chemiluminescent enzyme immunoassay*. Prosedur ini melibatkan persaingan antara antigen berlabel dan antigen tidak berlabel dalam mengikat antibodi. Prinsip kerja sistem ini mirip dengan prinsip kerja metode *radioimmunoassay* (RIA).

Pada tes testosteron, alkaline phosphatase (enzim) yang digunakan berlabel testosteron (sama dengan antigen yang akan diuji). Pelabelan tersebut sudah dilakukan dan disediakan pada *testosterone reagent wedge*. Sampel dengan konsentrasi yang tidak diketahui merupakan testosteron yang tidak berlabel. Setelah kalibrasi *analyzer* menggunakan *adjustors*, *wedge* akan direkam oleh *analyzer*. Setidaknya 100ul sampel ditambahkan ke *sampel cups* (jika kurang dari 100ul, probe tidak dapat mendeteksi atau menyerap sampel) dan *sampel cups* ditempatkan ke *sample cup holder*. *Sample cup holder* kemudian ditempatkan pada *analyzer*. Setiap sampel diambil bersama dengan *testosterone test unit* (antibodi). Substrat *chemiluminescent* juga diletakkan pada *analyzer*. Semua informasi ber-*barcode* merupakan kunci yang akan direkam oleh sistem komputerisasi (seperti tes yang akan dijalankan, jumlah *sample cup holder*, nama sampel, dll) dan tes akan mulai berjalan. *Analyzer* secara otomatis akan mencampur sampel, testosteron berlabel dalam *wedge* dan antibodi (unit test). Setelah pencampuran, proses selanjutnya adalah penambahan *chemiluminescent substrate* sehingga akan bereaksi secara kimia dengan enzim untuk menghasilkan cahaya. Cahaya ditangkap dan diukur. Jumlah antigen berlabel yang terikat berbanding terbalik dengan jumlah antigen tidak berlabel.

Prinsip kerja:

Prinsip kerja *Immulite® 1000 Total Testosteron* adalah *solid phase competitive chemiluminescent enzyme immunoassay* (CLIA)

Sampel uji testosteron:

Sampel yang dibutuhkan sistem adalah 20µL serum atau plasma (tanpa penambahan EDTA). Sampel tersebut dimasukkan pada *sample cups* minimal 100µL atau lebih.

Komponen pendukung *Immulite® 1000 Total Testosteron*:

- a. Air destilasi atau deionisasi
- b. Total testosterone test units (LTW1)
Merupakan unit ber-*barcode* berisi drop yang di-*coated* dengan poliklonal *rabbit anti-testosterone*
- c. Total testosterone reagent wedge (LTW2)
Reagen ber-*barcode*. Berisis 7,5mL *alkaline phosphate* (bovine calf intestine) yang terkonjugasi dengan testosteron dalam sebuah *buffer*.
- d. Total testosterone adjustors (LTWL, LTWH)
Terdiri dari dua vial (*Low* dan *High*) masing-masing berisi 4 mL testosteron yang diolah dari serum manusia. Berisi pengawet.
- e. Komponen Kit
 - LSUBX : chemiluminescent substrate
 - LPWS2 : Probe wash module
 - LKPM : Probe cleaning kit
 - LCHx-y : Sample cup holders (barcoded)
 - LSCP : Sample cup (disposable)
 - LSCC : Sample cup caps (optional)
 - CON6: Tri-level, multiconstituent control
 - Kontrol

Performa data:

Hasil pemeriksaan kadar hormon dalam satuan ng/dL dengan faktor konversi ng/dL x 0.03467 → nmol/L

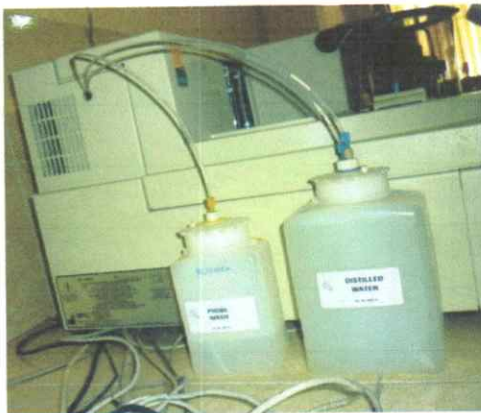
Lampiran 15. Foto dokumentasi proses pengujian kadar hormon testosteron



Total testosterone test units



Chemiluminescent substrate



Water destiled dan probe wash



**Total testosterone reagent wedge,
Total testosterone adjustors**



Sample cup (disposable)



Sample cup holders (barcoded)

Letak komponen pendukung dan *kit*
Siemens Immulite systems



Monitor komputer: memperlihatkan posisi sampel.. ± 40 menit untuk menyelesaikan pengujian setiap sampel



Immulite® 1000 Total Testosteron
(Siemens Immulite systems) dilengkapi
dengan sistem komputerisasi

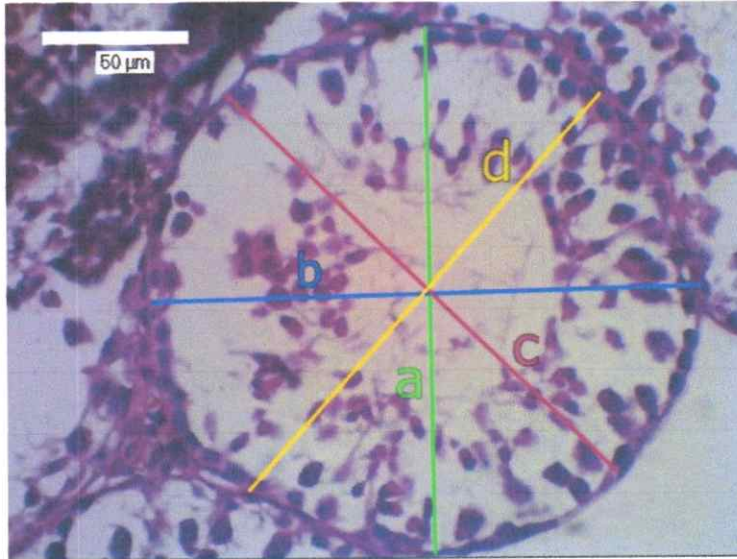


Immulite analyzer: ketika analyzer sedang berjalan, penutup dalam keadaan terbuka. Ketika sistem off analyzer dalam keadaan tertutup



circle area : sample cup holder berisi sample cup dan diantaranya diletakan satu test unit (antibody).

Lampiran 16. Pengukuran diameter tubulus seminiferus menggunakan optilab viewer (skala μm)



Diameter tubulus seminiferus ditentukan melalui evaluasi preparat histopatologi, dihitung dengan memilih tiga lapangan pandang berbeda secara acak yang kemudian dirata-rata sebagai nilai diameter tubulus seminiferus dalam satuan μm . Pengukuran diameter tubulus seminiferus menggunakan program *Optilab viewer* dengan mengukur jarak antara dua titik yang bersebarangan pada garis tengah tubulus seminiferus. Dalam satu tubulus seminiferus ditarik 4 garis dari dua titik yang bersebrangan yaitu garis a,b,c,d, kemudian dihitung rata-ratanya.

Lampiran 17. Pengenceran larutan uji dan perhitungan dosis berdasarkan berat badan mencit.

Perlakuan	Ulangan	PERLAKUAKUAN HARI KE :														
		1		2 s.d 7	7	8 s.d 14	14	15 s.d 21	21	22 s.d 28	28	29 s.d 35	35	36 s.d 42	42	43
		T	R	MA	T	S	T	S	T	S	T	S	T	S	T	BEDAH
P0	1	20	R	MA	25	S	30	S	35	S	30	S	40	S	40	BEDAH
	2	20	R	MA	25	S	25	S	30	S	25	S	35	S	35	BEDAH
	3	20	R	MA	25	S	30	S	35	S	35	S	45	S	45	BEDAH
	4	20	R	MA	25	S	30	S	30	S	30	S	35	S	30	BEDAH
	5	20	R	MA	20	S	25	S	30	S	25	S	35	S	35	BEDAH
P1	6	15	R	MA	25	S	20	S	20	S	25	S	25	S	25	BEDAH
	7	20	R	MA	20	S	25	S	30	S	30	S	15	S	25	BEDAH
	8	20	R	MA	20	S	25	S	25	S	30	S	25	S	25	BEDAH
	9	15	R	MA	20	S	30	S	30	S	30	S	30	S	25	BEDAH
	10	20	R	MA	20	S	20	S	20	S	20	S	25	S	20	BEDAH
P2	11	20	R	MA	20	S	30	S	30	S	30	S	30	S	20	BEDAH
	12	20	R	MA	25	S	25	S	25	S	25	S	20	S	20	BEDAH
	13	20	R	MA	25	S	30	S	30	S	25	S	20	S	15	BEDAH
	14	15	R	MA	20	S	25	S	30	S	30	S	25	S	20	BEDAH
	15	15	R	MA	25	S	30	S	35	S	30	S	25	S	15	BEDAH
P3	16	20	R	MA	25	S	20	S	30	S	25	S	30	S	20	BEDAH
	17	20	R	MA	25	S	30	S	35	S	30	S	30	S	20	BEDAH
	18	20	R	MA	25	S	30	S	30	S	25	S	35	S	30	BEDAH
	19	20	R	MA	20	S	30	S	30	S	35	S	30	S	30	BEDAH
	20	20	R	MA	25	S	30	S	35	S	35	S	40	S	35	BEDAH
P4	21	20	R	MA	25	S	30	S	30	S	35	S	30	S	25	BEDAH
	22	20	R	MA	25	S	30	S	30	S	35	S	35	S	30	BEDAH
	23	20	R	MA	20	S	25	S	30	S	35	S	35	S	30	BEDAH
	24	15	R	MA	15	S	30	S	30	S	35	S	35	S	30	BEDAH
	25	15	R	MA	15	S	20	S	25	S	25	S	35	S	25	BEDAH
berat badan rata-rata (gram)		18,8		22,4		27		29,6		29,4		30,6		26,8		BEDAH
berat badan rata-rata (kg)		0,0188		0,0224		0,027		0,0296		0,0294		0,0306				BEDAH
		Masa Aklimasi		Perlakuan minggu I		Perlakuan minggu II		Perlakuan minggu III		Perlakuan minggu IV		Perlakuan minggu V				PEMBEDAHAN

Ketrangan:

M.A : Masa aklimasi

R : Randomisasi

S : Penyondean / oral gavage

T : Penimbangan berat badan (gram)

Pengenceran stock TCDD :

stock 10 μ g/mL → ditambahkan 9mL corn oil sehingga konsentrasi stock TCDD adalah 10 μ g/10mL atau 1 μ g/mL atau 1ng/1 μ L

Pengenceran stok Vitamin E (α -tocopherol):

stock 5 g / 5 mL VE → diambil 1 g dan di tempatkan botol kaca steril kemudian ditambahkan corn oil 9 mL sehingga konsentrasi stock pengenceran adalah 1 g /10 mL

Perlakuan minggu I**P0**

pemberian corn oil untuk 5 ekor mencit → penyondean 0,1 mL corn oil per ekor mencit

P1-P4

pemberian TCDD untuk 20 ekor mencit → $100\text{ng} \times 0,0224\text{kg} = 2,24\text{ng/ekor}$ mencit → untuk 20 ekor mencit = 44,8 ng. Jika perekor mencit diberi volume 0,1mL corn oil, maka dosis pengenceran dari konsentrasi 1ng/1 μ L TCDD adalah 44,8 μ L TCDD ditambah 2mL corn oil.

P2

Pemberian vitamin E untuk 5 ekor mencit dosis 11mg/kg → $11 \times 0,0224\text{kg} = 0,2464\text{mg/ekor}$ mencit → untuk 5 ekor mencit = 1,232 mg. Jika perekor mencit diberi volume 0,1mL corn oil, maka dosis pengenceran dari konsentrasi 1g/10mL Vitamin E adalah 12,32 μ L Vitamin E ditambah 0,5mL corn oil.

P3

Pemberian vitamin E untuk 5 ekor mencit dosis 20mg/kg → $20 \times 0,0224\text{kg} = 0,448\text{mg/ekor}$ mencit → untuk 5 ekor mencit = 2,24 mg. Jika perekor mencit diberi volume 0,1mL corn oil, maka dosis pengenceran dari konsentrasi 1g/10mL Vitamin E adalah 22,4 μ L Vitamin E ditambah 0,5mL corn oil.

P4

Pemberian vitamin E untuk 5 ekor mencit dosis 37mg/kg → $37 \times 0,0224\text{kg} = 0,8288\text{mg/ekor}$ mencit → untuk 5 ekor mencit = 4,144 mg. Jika perekor mencit diberi volume 0,1mL corn oil, maka dosis pengenceran dari konsentrasi 1g/10mL Vitamin E adalah 41,44 μ L Vitamin E ditambah 0,5mL corn oil.

Perlakuan minggu II**P0**

pemberian corn oil untuk 5 ekor mencit → penyondean 0,1 mL corn oil per ekor mencit

P1-P4

pemberian TCDD untuk 20 ekor mencit → $100\text{ng} \times 0,027\text{kg} = 2,7\text{ng/ekor}$ mencit → untuk 20 ekor mencit = 54 ng. Jika perekor mencit diberi volume 0,1mL corn oil, maka dosis pengenceran dari konsentrasi $1\text{ng}/1\mu\text{L}$ TCDD adalah 54 μL TCDD ditambah 2mL corn oil.

P2

Pemberian vitamin E untuk 5 ekor mencit dosis $11\text{mg}/\text{kg}$ → $11 \times 0,027\text{kg} = 0,297\text{mg/ekor}$ mencit → untuk 5 ekor mencit = 1,485 mg. Jika perekor mencit diberi volume 0,1mL corn oil, maka dosis pengenceran dari konsentrasi $1\text{g}/10\text{mL}$ Vitamin E adalah 14,85 μL Vitamin E ditambah 0,5mL corn oil.

P3

Pemberian vitamin E untuk 5 ekor mencit dosis $20\text{mg}/\text{kg}$ → $20 \times 0,027\text{kg} = 0,54\text{mg/ekor}$ mencit → untuk 5 ekor mencit = 2,7 mg. Jika perekor mencit diberi volume 0,1mL corn oil, maka dosis pengenceran dari konsentrasi $1\text{g}/10\text{mL}$ Vitamin E adalah 27 μL Vitamin E ditambah 0,5mL corn oil.

P4

Pemberian vitamin E untuk 5 ekor mencit dosis $37\text{mg}/\text{kg}$ → $37 \times 0,027\text{kg} = 0,999\text{mg/ekor}$ mencit → untuk 5 ekor mencit = 4,995 mg. Jika perekor mencit diberi volume 0,1mL corn oil, maka dosis pengenceran dari konsentrasi $1\text{g}/10\text{mL}$ Vitamin E adalah 49,95 μL Vitamin E ditambah 0,5mL corn oil.

Perlakuan minggu III**P0**

pemberian corn oil untuk 5 ekor mencit → penyondean 0,1 mL corn oil per ekor mencit

P1-P4

pemberian TCDD untuk 20 ekor mencit → $100\text{ng} \times 0,0296\text{kg} = 2,96\text{ng/ekor}$ mencit → untuk 20 ekor mencit = 59,2 ng. Jika perekor mencit diberi volume 0,1mL corn oil, maka dosis pengenceran dari konsentrasi $1\text{ng}/1\mu\text{L}$ TCDD adalah 59,2 μL TCDD ditambah 2mL corn oil.

P2

Pemberian vitamin E untuk 5 ekor mencit dosis $11\text{mg}/\text{kg}$ → $11 \times 0,0296\text{kg} = 0,3256\text{mg/ekor}$ mencit → untuk 5 ekor mencit = 1,628 mg. Jika perekor mencit diberi volume 0,1mL corn oil, maka dosis pengenceran dari

kosentrasi 1g/10mL Vitamin E adalah 16,28 μ L Vitamin E ditambah 0,5mL corn oil.

P3

Pemberian vitamin E untuk 5 ekor mencit dosis 20mg/kg \rightarrow 20 x 0,0296kg = 0,592mg/ekor mencit \rightarrow untuk 5 ekor mencit = 2,96 mg. Jika perekor mencit diberi volume 0,1mL corn oil, maka dosis pengenceran dari kosentrasi 1g/10mL Vitamin E adalah 29,6 μ L Vitamin E ditambah 0,5mL corn oil.

P4

Pemberian vitamin E untuk 5 ekor mencit dosis 37mg/kg \rightarrow 37 x 0,0296kg = 1,0952mg/ekor mencit \rightarrow untuk 5 ekor mencit = 5,476 mg. Jika perekor mencit diberi volume 0,1mL corn oil, maka dosis pengenceran dari kosentrasi 1g/10mL Vitamin E adalah 54,76 μ L Vitamin E ditambah 0,5mL corn oil.

Perlakuan minggu IV**P0**

pemberian corn oil untuk 5 ekor mencit \rightarrow penyondean 0,1 mL corn oil per ekor mencit

P1-P4

pemberian TCDD untuk 20 ekor mencit \rightarrow 100ng x 0,0294kg = 2,94ng/ekor mencit \rightarrow untuk 20 ekor mencit = 58,8 ng. Jika perekor mencit diberi volume 0,1mL corn oil, maka dosis pengenceran dari kosentrasi 1ng/1 μ L TCDD adalah 58,8 μ L TCDD ditambah 2mL corn oil.

P2

Pemberian vitamin E untuk 5 ekor mencit dosis 11mg/kg \rightarrow 11 x 0,0294 kg = 0,3234mg/ekor mencit \rightarrow untuk 5 ekor mencit = 1,617 mg. Jika perekor mencit diberi volume 0,1mL corn oil, maka dosis pengenceran dari kosentrasi 1g/10mL Vitamin E adalah 16,17 μ L Vitamin E ditambah 0,5mL corn oil.

P3

Pemberian vitamin E untuk 5 ekor mencit dosis 20mg/kg \rightarrow 20 x 0,0294kg = 0,588mg/ekor mencit \rightarrow untuk 5 ekor mencit = 2,94 mg. Jika perekor mencit diberi volume 0,1mL corn oil, maka dosis pengenceran dari kosentrasi 1g/10mL Vitamin E adalah 29,4 μ L Vitamin E ditambah 0,5mL corn oil.

P4

Pemberian vitamin E untuk 5 ekor mencit dosis 37mg/kg \rightarrow 37 x 0,0294kg = 1,0878mg/ekor mencit \rightarrow untuk 5 ekor mencit = 5,439 mg. Jika perekor mencit diberi volume 0,1mL corn oil, maka dosis pengenceran dari kosentrasi 1g/10mL Vitamin E adalah 54,39 μ L Vitamin E ditambah 0,5mL corn oil.

Perlakuan minggu V**P0**

pemberian corn oil untuk 5 ekor mencit → penyondean 0,1 mL corn oil per ekor mencit

P1-P4

pemberian TCDD untuk 20 ekor mencit → $100\text{ng} \times 0,0306\text{kg} = 3,06\text{ng/ekor mencit}$ → untuk 20 ekor mencit = 61,2 ng. Jika perekor mencit diberi volume 0,1mL corn oil, maka dosis pengenceran dari konsentrasi $1\text{ng}/1\mu\text{L}$ TCDD adalah 61,2 μL TCDD ditambah 2mL corn oil.

P2

Pemberian vitamin E untuk 5 ekor mencit dosis $11\text{mg}/\text{kg}$ → $11 \times 0,0306\text{ kg} = 0,3366\text{mg/ekor mencit}$ → untuk 5 ekor mencit = 1,683 mg. Jika perekor mencit diberi volume 0,1mL corn oil, maka dosis pengenceran dari konsentrasi $1\text{g}/10\text{mL}$ Vitamin E adalah 16,83 μL Vitamin E ditambah 0,5mL corn oil.

P3

Pemberian vitamin E untuk 5 ekor mencit dosis $20\text{mg}/\text{kg}$ → $20 \times 0,0306\text{kg} = 0,612\text{mg/ekor mencit}$ → untuk 5 ekor mencit = 3,06 mg. Jika perekor mencit diberi volume 0,1mL corn oil, maka dosis pengenceran dari konsentrasi $1\text{g}/10\text{mL}$ Vitamin E adalah 30,6 μL Vitamin E ditambah 0,5mL corn oil.

P4

Pemberian vitamin E untuk 5 ekor mencit dosis $37\text{mg}/\text{kg}$ → $37 \times 0,0306\text{kg} = 1,1322\text{mg/ekor mencit}$ → untuk 5 ekor mencit = 5,661 mg. Jika perekor mencit diberi volume 0,1mL corn oil, maka dosis pengenceran dari konsentrasi $1\text{g}/10\text{mL}$ Vitamin E adalah 56,61 μL Vitamin E ditambah 0,5mL corn oil.

Lampiran 18. Sertifikat kelaikan etik / *ethical clearance* penelitian.



**KOMISI ETIK PENELITIAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
*Animal Care and Use Committee (ACUC)***

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK
“ ETHICAL CLEARANCE ”**

No : 267-KE

**KOMISI ETIK PENELITIAN (ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE)
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN UNIVERSITAS AIRLANGGA SURABAYA,
TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG
DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA :**

PENELITIAN BERJUDUL : Potensi Vitamin E Terhadap Jumlah Sel
Spermatogenik, Diameter Tubulus Seminiferus dan
Kadar Testosteron Pada Mencit Jantan Yang
Dipapar 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-P-Dioxin (TCDD)

PENELITI UTAMA : Waode Karmila Wati

**UNIT/LEMBAGA/TEMPAT
PENELITIAN** : Program Studi Pascasarjana
Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya

DINYATAKAN : LAIK ETIK

Surabaya, 28 Juni 2013

Mengetahui,
Dekan FKH-Unair,



Prof. Romziah Sidik, Ph.D.,drh.
NIP. 195312161978062001

Ketua,



Dr. E. Bimo Aksono, M.Kes.,Drh.
NIP. 196609201992031003