

TESIS

**POTENSI VITAMIN E (α -TOCOPHEROL) TERHADAP SEL
SPERMATOGENIK, DIAMETER TUBULUS SEMINIFERUS,
DAN KADAR MALONDIALDEHID (MDA) TESTIS MENCIT
(*Mus musculus*) YANG DIINDUKSI 2,3,7,8-
TETRACHLORODIBENZO-P-DIOXIN (TCDD)**

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS



Oleh :

ROSIDA ACHLIS
NIM 061141003

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

**POTENSI VITAMIN E (*α*-*TOCOPHEROL*) TERHADAP
SEL SPERMATOGENIK, DIAMETER TUBULUS
SEMINIFERUS, DAN KADAR *MALONDIALDEHID*
(MDA) TESTIS MENCIT (*Mus musculus*) YANG
DIINDUKSI 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
Surabaya**

**ROSIDA ACHLIS
061141003**

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

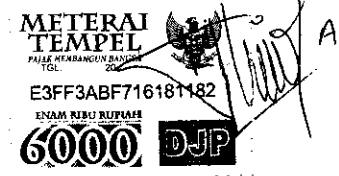
PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam Tesis berjudul :

Potensi Vitamin E (*α -Tocopherol*) Terhadap Sel Spermatogenik, Diameter Tubulus Seminiferus, Dan Kadar *Malondialdehid* (Mda) Testis Mencit (*Mus Muskulus*) Yang Diinduksi 2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzo-P-Dioxin (TCDD)

tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan 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, 15 Agustus 2013



Rosida Achlis
NIM. 061141003

Lembar Pengesahan

TESIS INI TELAH DISETUJUI

Tanggal 16 Agustus 2013

Oleh :

Pembimbing Ketua



Prof. Dr. Ismudiono, drh., MS.

NIP. 195205161978031002

Pembimbing



Dr. Hani Plumeriastuti, drh., M.Kes.

NIP. 195908081987012001

Mengetahui,

Ketua Program Studi Ilmu Biologi Reproduksi
Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga



Prof. Dr. Wurlina, drh., MS.

NIP. 195409181983012001

Usulan Penelitian Tesis ini Telah diuji dan dinilai pada

Tanggal : 1 Agustus 2013

PANITIA PENGUJI TESIS

Ketua : Prof. Dr. Wurlina, drh., MS.
Sekretaris : Dr. Suherni Susilowati, drh., M.Kes.
Anggota : Dr. Rr. Sri Pantja Madyawati, drh., MSi.
Prof. Dr. Ismudiono, drh., MS.
Dr. Hani Plumeriastuti, drh., M.Kes.

Surabaya, 2 Agustus 2013

Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Airlangga
Dekan



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

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur kehadirat Allah SWT atas karunia yang telah dilimpahkan sehingga penulis dapat melaksanakan penelitian dan menyelesaikan tesis dengan judul **Potensi Vitamin E (*α-tocopherol*) Terhadap Sel Spermatogenik, Diameter Tubulus Seminiferus, Dan Kadar *Malondialdehid* (Mda) Testis Mencit (*Mus Muskulus*) Yang Diinduksi 2, 3, 7, 8-*Tetrachlorodibenzo-P-Dioxin* (TCDD).**

Pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan terima kasih kepada :

- Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya Prof. Hj. Romziah sidik, drh., Ph.D. atas kesempatan mengikuti pendidikan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.
- Prof. Dr. Ismudiono, drh., MS., selaku pembimbing utama dan Dr. Hani Plumeriastuti, drh., M.Kes., selaku dosen pembimbing serta atas saran dan bimbingannya sampai dengan terselesaikannya tesis ini.
- Prof. Dr. Wurlina, drh., MS., selaku ketua penguji tesis, Dr. Suherni Susilowati, drh., M.Kes., selaku sekretaris penguji tesis, dan Dr. Rr. Sri Pantja Madyawati, drh., M.Si., selaku anggota penguji tesis atas wawasan keilmuan dan masukan yang sangat berharga demi perbaikan tesis ini.
- Dr. Widjiati, drh., M.Si., selaku dosen pembimbing penelitian atas segala arahan, bimbingan dan kesabaran selama penelitian. Seluruh

Staf pengajar Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya atas wawasan keilmuan selama mengikuti pendidikan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.

- Ayah saya yang saya hormati dan cintai, H. Achlis, Alm., yang tiada henti-hentinya memberikan doa, kasih sayang yang berlimpah, dukungan, dorongan moral dan materiil, serta nasihat-nasihat yang sangat berharga sebagai bekal saya dalam menjalani hidup. Ibu saya yang saya hormati dan cintai, Hj. Sutarni, yang selalu memberikan semangat dan doa, dan untuk kakak saya tercinta Mochammad Akmal serta adik saya Dahniar Achlis, terima kasih banyak telah memberikan semangat dan motivasi sehingga saya dapat menyelesaikan tesis ini.
- Riza Nurhuda atas kesabaran, motivasi, semangat, doa, dan dukungan yang telah diberikan sehingga terselesaikannya tesis ini.
- Teman-teman penelitian Ajeng, Mila, Nia, Lia, dan Arsa, terima kasih atas kerjasama dan kesabarannya dalam menyelesaikan penelitian ini.

Teman-teman program magister Ilmu Biologi Reproduksi, Fakultas Kedokteran Hewan angkatan 2011 dan semua pihak yang tidak bisa disebutkan satu persatu tetapi sudah membantu dalam penyusunan tesis ini terima kasih atas bantuan kalian.

Akhirnya penulis menyadari bahwa makalah ini jauh dari sempurna, untuk itu penulis mengharap kritik dan saran dari pembaca sebagai upaya

penyempurnaan makalah ini. Semoga hasil yang dituangkan dalam makalah ini dapat bermanfaat bagi pembaca sekalian.

Surabaya, Agustus 2013

Penulis

RINGKASAN

Potensi Vitamin E (*α-Tocopherol*) Terhadap Sel Spermatogenik, Diameter Tubulus Seminiferus, Dan Kadar *Malondialdehid* (Mda) Testis Mencit (*Mus Muskulus*) Yang Diinduksi 2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzo-P-Dioxin (TCDD)

Rosida Achlis

Ringkasan

Dioksin merupakan istilah umum yang digunakan untuk menyebut sekelompok zat-zat kimia berbahaya yang termasuk ke dalam golongan senyawa *polychlorinated dibenzo-p-dioxin* (PCDD). 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) merupakan dioksin yang paling toksik. TCDD adalah kontaminan lingkungan yang bersifat persisten, lipofilik, memiliki tingkat metabolisme dan ekskresi yang rendah, dan lebih cenderung terakumulasi di dalam tubuh. Pencemaran akibat dioksin memberikan dampak buruk terhadap kesehatan hewan dan manusia antara lain kerusakan kulit, imunotoksisitas, hepatotoksisitas, karsinogenesis, teratogenesis, gangguan endokrin, neurotoksisitas, serta gangguan reproduksi. Gangguan reproduksi jantan yang disebabkan TCDD antara lain mengurangi fertilitas, menurunkan tingkat testosteron serum, dan menekan pertumbuhan serta maturasi spermatozoa.

Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan kemampuan vitamin E (*α-tocopherol*) dalam mempertahankan jumlah sel spermatogenik, diameter tubulus seminiferus, dan menurunkan kadar *Malondialdehyde* (MDA) testis mencit akibat paparan 2,3,7,8 tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD).

Penelitian ini menggunakan sampel 30 ekor mencit jantan berumur 11 minggu. Terdapat 5 kelompok perlakuan diantaranya: kelompok kontrol negatif (P0), kelompok kontrol positif TCDD (P1) diberi TCDD dosis 100 ng/kgBB/hari.,

kelompok Perlakuan 2 (P2) diberi TCDD dosis 100 ng/kgBB/ hari dan vitamin E dosis 11 mg/kgBB/hari, kelompok Perlakuan 3 (P3) diberi TCDD dosis 100 ng/kgBB/ hari dan vitamin E dosis 20 mg/kgBB/hari, dan kelompok Perlakuan 4 (P4) diberi TCDD dosis 100 ng/kgBB/ hari dan vitamin E dosis 37 mg/kgBB/hari. Adaptasi dilakukan selama satu minggu, perlakuan dilakukan selama 9 hari berdasarkan siklus epitel tubulus seminiferus testis mencit. Testis mencit dikoleksi dan diperiksa kadar *malondialdehyde* (MDA) serta dibuat sediaan histopatologi untuk memeriksa jumlah sel spermatogenik dan diameter tubulus seminiferus

Hasil pemeriksaan histopatologi diperoleh bahwa jumlah sel spermatogenik tertinggi didapatkan pada kelompok kontrol negatif (P0) yang tidak berbeda nyata dengan kelompok Perlakuan 4 yang diberi TCDD 100 ng/kgBB/hari dan vitamin E 37 mg/kgBB/hari tetapi berbeda nyata dengan kelompok perlakuan yang lain. Jumlah sel spermatogenik terendah didapatkan pada kelompok Perlakuan 1 yang diberi TCDD 100ng/kgBB/hari yang berbeda nyata dengan kelompok Perlakuan 2 yang diberi TCDD 100 ng/kgBB/hari dan vitamin E 11 mg/kgBB/hari dan kelompok Perlakuan 3 yang diberi TCDD 100 ng/kgBB/hari dan vitamin E 20 mg/kgBB/hari sedangkan kelompok Perlakuan 2 tidak berbeda nyata dengan kelompok Perlakuan 3.

Hasil data diameter tubulus seminiferus yang diperoleh menunjukkan bahwa rata-rata terbesar didapatkan pada perlakuan Kontrol yang tidak berbeda nyata dengan kelompok Perlakuan 4, kelompok Perlakuan dan kelompok Perlakuan 2, tetapi terdapat perbedaan yang nyata dengan kelompok kontrol positif (P1) yang memiliki angka terendah.

Data hasil analisis kadar *malondialdehyd* (MDA) diperoleh hasil bahwa kelompok kontrol negatif (P0) berbeda nyata dengan seluruh kelompok perlakuan dan merupakan kelompok perlakuan dengan nilai terendah. Kelompok kontrol positif (P1) yang diberi TCDD 100 ng/kgBB/hari yang mempunyai nilai tertinggi juga berbeda nyata dengan seluruh kelompok perlakuan. Kelompok Perlakuan 2 yang diberi TCDD 100 ng/kgBB/hari dan vitamin E 11 mg/kgBB/hari tidak berbeda nyata dengan kelompok Perlakuan 3 yang diberi TCDD 100 ng/kgBB/hari dan vitamin E 20 mg/kgBB/hari tetapi berbeda nyata dengan kelompok Perlakuan 4 yang diberi TCDD 100 ng/kgBB/hari dan vitamin E 37 mg/kgBB/hari.

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa pemberian vitamin E (*α-tocopherol*) dapat mempertahankan jumlah sel spermatogenik, diameter tubulus seminiferus, dan dapat menurunkan kadar *malondialdehyde* (MDA) testis mencit akibat paparan 2,3,7,8 *tetrachlorodibenzo-p-dioxin* (TCDD). Sebagai saran konsumsi vitamin E (*α-tocopherol*) disarankan bagi masyarakat umumnya terutama yang berisiko sebagai antioksidan penangkal radikal bebas akibat paparan yang disebabkan TCDD, perlu dilakukan penelitian lanjutan tentang efek TCDD dan proteksi vitamin E sebagai antioksidan pada organ atau sistem organ lain, serta perlu dilakukan penelitian tentang antioksidan alami yang dapat mencegah efek negatif yang ditimbulkan akibat paparan TCDD.

**POTENTIAL OF VITAMIN E (α -TOCOPHEROL) AGAINST ON
SPERMATOGENIC CELLS, SEMINIFEROUS TUBULE DIAMETER,
AND LEVELS OF MALONDIALDEHYDE (MDA) TESTES OF MICE
(MUS MUSCULAR) INDUCED WITH 2, 3, 7, 8
TETRACHLORODIBENZO-P-DIOXIN (TCDD)**

Rosida Achlis

Summary

Dioxin is a general term used to refer to hazardous chemical compound of the polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDD). 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) is the most toxic of dioxin. TCDD is persistent environmental pollutants, accumulate in body due to its lipophilic properties, slow metabolism and excretion. The negative effects of TCDD in human and animals are chloroacne in dermal, imunotoxicity, hepatotoxicity, carcinogenesis, teratogenesis, endocrine disorders, neurotoxicity, and reproductive disorders. The toxic effects of TCDD in male reproductive systems include a reduction in the size of the testes, prostate gland and seminal vesicle, decrease in sperm count, as well as an increase in the number of abnormal sperm. It has also been reported that TCDD causes atrophy and testicular damage

This study aimed to demonstrate the ability of vitamin E (α -tocopherol) in maintaining the number of spermatogenic cells, seminiferous tubule diameter, and lower levels of malondialdehyde (MDA) testes of mice caused by exposure to 2,3,7,8 tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) .

This study used a sample of 30 male mice aged 11 weeks. Of which there are 5 groups: control negative group (P0), control positif TCDD group (P1) were given a dose of 100 ng TCDD / kgBB / day., Treatment group 2 (P2) were given a

dose of 100 ng TCDD / kgBB / day and vitamin E dose of 11 mg / kgBB / day treatment group 3 (P3) were given a dose of 100 ng TCDD / kgBB / day and vitamin E dose of 20 mg / kgBB / day, and the treatment group 4 (P4) were given a dose of 100 ng TCDD / kgBB / day and vitamin E dose of 37 mg / kgBB / day. Adaptation is performed during one week, the treatment is done for 9 days of treatment based on the cycle of the seminiferous tubules epithelium of mice. Mice testes were collected and examined levels of malondialdehyde (MDA) as well as histopathological preparations were made to check the number of spermatogenic cells and seminiferous tubule diameter

The results of histopathological examination shows that the highest number of spermatogenic cells obtained in the control negative group (P0) were not significantly different from the treatment group 4 were given TCDD 100 ng / kgBB / day and vitamin E 37 mg / kgBB / day but significantly different from the treatment group other. Lowest number of spermatogenic cells obtained in control positif group (P1) were given TCDD 100ng/kgBB/ day significantly different with the treatment group 2 were given TCDD 100 ng / kgBB / day and vitamin E 11 mg / kgBB / day and treatment group 3 were given TCDD 100 ng / kgBB / day and vitamin E 20 mg / kgBB / day while the treatment group 2 was not significantly different from the treatment group 3.

Seminiferous tubule diameter data result obtained shows that the largest average obtained in the control treatment were not significantly different from the treatment group 4, treatment group and treatment group 2, but there is a real difference by control positif group (P1) which has the lowest rate.

Malondialdehyd levels of data analysis (MDA) obtained results that the control group was significantly different across the treatment group and a treatment group with the lowest value. Control positif group 1 (P1) were given TCDD 100 ng / kg / day which has the highest value also significantly different across treatment groups. Treatment group 2 were given TCDD 100 ng / kg / day and vitamin E 11 mg / kg / day was not significantly different from the treatment group 3 were given TCDD 100 ng / kg / day and vitamin E 20 mg / kg / day but with significantly different treatment group 4 were given TCDD 100 ng / kg / day and vitamin E 37 mg / kg / day.

Based on the results of this study concluded that administration of vitamin E (α -tocopherol) can maintain spermatogenic cell number, diameter, and can reduce levels of malondialdehyde (MDA) testes of mice caused by exposure to 2,3,7,8 tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). As a suggestion of vitamin E (α -tocopherol) is recommended for the general public especially at risk as antioxidant free-radical scavengers caused due to exposure to TCDD, further research needs to be done on the effects of TCDD and vitamin E as an antioxidant protection to other organs or organ systems, as well as the need conducted research on natural antioxidants that may prevent the negative effects caused by exposure to TCDD.

POTENTIAL OF VITAMIN E (α -TOCOPHEROL) AGAINST ON SPERMATOGENIC CELLS, SEMINIFEROUS TUBULE DIAMETER, AND LEVELS OF MALONDIALDEHYDE (MDA) TESTES OF MICE (MUS MUSCULAR) INDUCED WITH 2, 3, 7, 8-TETRACHLORODIBENZO-P-DIOXIN (TCDD)

Rosida Achlis

ABSTRACT

This research was aimed to investigate the effect of vitamin E on spermatogenic cell, diameter of seminiferous tubule, and testicular Malondialdehyde (MDA) 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 group), 100 ng/kg/d and 0 mg/kg/d (Group I), 100 ng/kg/d and 11 mg/kg/d (Group II), 100 ng/kg/d and 20 mg/kg/d (Group III), and 100 ng/kg/d and 37 mg/kg/d (Group IV) respectively. Vitamin E and TCDD were given by oral gavage for 9 days. The results demonstrated that TCDD decreased the number of spermatogenic cell, seminiferous tubule diameter, and increased level of Malondialdehyde (MDA). Vitamin E can protect the negative effect caused by exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). Best dose of vitamin E is 37 mg/kg/d decreased level of testicular Malondialdehyde (MDA).

Keywords : Vitamin E, mice, spermatogenic cell, seminiferous tubule, Malondialdehyde, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin.

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN SAMPUL DALAM	ii
PERSYARATAN GELAR	iii
PERNYATAAN	iv
PERSETUJUAN	v
PENETAPAN PANITIA PENGUJI	vi
UCAPAN TERIMA KASIH	vii
RINGKASAN	x
SUMMARY	xiii
ABSTRAK	xvi
DAFTAR ISI.....	xvii
DAFTAR TABEL.....	xx
DAFTAR GAMBAR.....	xxi
DAFTAR LAMPIRAN	xxiii
SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG	xxiv
BAB 1 PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Perumusan Masalah.....	5
1.3 Tujuan Penelitian.....	6
1.3.1 Tujuan Umum	6
1.3.2 Tujuan Khusus	6
1.4 Manfaat Penelitian	6
1.4.1 Manfaat Keilmuan	6
1.4.2 Manfaat Praktis	7
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Tinjauan Tentang TCDD	8
2.1.1 Sifat Fisika dan Kimia TCDD.....	8
2.1.2 Pembentukan TCDD	10
2.1.3 Toksisitas TCDD	11
2.1.4 Siklus Pemasukan TCDD Ke Dalam Tubuh	12
2.1.5 Absorpsi, Distribusi, Metabolisme, dan Ekskresi TCDD ...	13
2.1.6 TCDD Pada Reproduksi	14
2.2 Tinjauan Tentang Radikal Bebas	17
2.2.1 Sumber Radikal Bebas	18
2.2.2 Tipe Radikal Bebas Dalam Tubuh	21
2.2.3 Reaksi Perusakan Oleh Radikal Bebas	22
2.2.4 <i>Malondialdehyde</i> (MDA)	24
2.3 Tinjauan Tentang Antioksidan	25
2.3.1 Antioksidan Enzimatis	25

2.3.2	Antioksidan Nonenzimatis	26
2.4	Tinjauan Tentang Vitamin E	26
2.4.1	Sifat Kimia Vitamin E	27
2.4.2	Metabolisme Vitamin E	28
2.4.3	Vitamin E Sebagai Antioksidan	29
2.4.4	Vitamin E Terhadap Fungsi Reproduksi	30
2.5	Tinjauan Tentang Mencit (<i>Mus musculus</i>).....	31
2.6	Tinjauan Tentang Fisiologi Reproduksi Mencit Jantan	33
2.6.1	Testis	33
2.6.2	Tubulus Seminiferus	35
2.6.3	Spermatozoa Mencit	37
2.6.4	Sel-Sel Germinal	38
2.6.5	Jaringan Interstisial	39
2.6.6	Spermatogenesis	40

BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1	Kerangka Konseptual	44
3.2	Hipotesis Penelitian	49

BAB 4 MATERI DAN METODE

4.1	Jenis dan Rancangan Penelitian	50
4.2	Populasi, Sampel, Besar Sampel, dan Teknik Pengambilan Sampel	51
4.2.1	Sampel Penelitian	51
4.2.2	Besar sampel	51
4.2.3	Teknik Pengambilan Sampel	52
4.3	Variabel Penelitian	52
4.3.1	Klasifikasi Variabel	52
4.3.2	Definisi Operasional Variabel	53
4.4	Bahan Penelitian	53
4.5	Instrumen Penelitian	54
4.6	Waktu dan Tempat Penelitian	55
4.7	Prosedur Penelitian	55
4.7.1	Penentuan Dosis TCDD	55
4.7.2	Penentuan Dosis Vitamin E	55
4.7.3	Pembuatan Larutan Uji	58
4.7.4	Persiapan Hewan Coba	58
4.7.5	Tahapan Perakuan	59
4.7.6	Prosedur Pemeriksaan dan Pengamatan	59
4.7.6.1	Pengamatan Jumlah Sel Spermatogenik Tubulus Seminiferus Testis Mencit	59
4.7.6.2	Pengamatan Gambaran Mikroskopis Tubulus Seminiferus Testis Mencit	60
4.7.6.3	Pemeriksaan Kadar MDA Testis Mencit	60
4.7.6.4	Penilaian Kadar MDA Hati Mencit	60
4.8	Bagan Kerangka Operasional	62
4.9	Analisis Data	63

BAB 5 ANALISIS HASIL PENELITIAN	
5.1 Data Sel Spermatogenik Tubulus Seminiferus	64
5.2 Data Gambaran Histopatologi Diameter Tubulus Seminiferus	71
5.3 Data Kadar MDA (<i>malondialdehyde</i>) Testis Mencit	73
BAB 6 PEMBAHASAN	
6.1 Potensi Vitamin E Terhadap Jumlah Sel Spermatogenik Tubulus Seminiferus Testis Mencit Yang Diinduksi <i>2,3,7,8-tetrachloro</i> <i>dibenzo-p-dioxin</i> (TCDD)	76
6.2 Potensi Vitamin E Terhadap Diameter Tubulus Seminiferus Testis Mencit Yang Diinduksi <i>2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-</i> <i>dioxin</i> (TCDD)	81
6.3 Potensi Vitamin E Terhadap Kadar <i>malondialdehyde</i> (MDA) Testis Mencit Yang Diinduksi <i>2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-</i> <i>dioxin</i> (TCDD)	82
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN	
7.1 Kesimpulan	86
7.2 Saran	86
DAFTAR PUSTAKA.....	87
LAMPIRAN	97

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
2.1 Sifat fisis dan kimia dioksin	9
2.2 Data Biologis Mencit	33
4.1 Konversi Perhitungan Dosis Untuk Beberapa Jenis Hewan dan Manusia	56
5.1 Rerata Dan Standar Deviasi Jumlah Sel Spermatogonium, Sel Spermatisit Primer, Sel Spermatisit Sekunder, Sel Spermatid, Dan Sel Spermatozoa Serta Total Sel Spermatogenik Tubulus Seminiferus 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)	65
5.2 Rerata dan Standar Deviasi Diameter Tubulus Seminiferus Testis 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)	72
5.3 Rerata dan Standar Deviasi Kadar MDA Testis 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)	74

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Struktur molekul 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin	8
2.2 Mekanisme Kerja TCDD	13
2.3 Struktur Bangun Vitamin E (α - Tocopherol)	27
2.4 Mencit Galur Balb/c	32
2.5 Sayatan Histologis Testis Tubulus Seminiferus	36
2.6 Sel Spermatozoa Mencit	38
2.7 Spermatogenesis Mencit (<i>Mus musculus</i>)	41
3.1 Kerangka Konseptual Penelitian	48
4.1 Prosedur Operasional Penelitian	61
5.1 Diagram batang rerata jumlah sel spermatogonium, spermatosit primer, spermatosit sekunder, spermatid, dan spermatozoa pada tubulus seminiferus 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)	69
5.2 Gambaran jumlah sel spermatogenik dalam tubulus seminiferus pada berbagai kelompok perlakuan dengan pewarnaan HE perbesaran 400x. Kelompok kontrol negatif (P0), kelompok kontrol positif (P1) dan kelompok perlakuan kombinasi TCDD dengan Vitamin E dosis 11, 20 dan 37 mg/kg/hari (P2, P3, P4)	70
5.3 Gambaran sel spermatogonium, sel spermatosit primer, sel spermatosit sekunder, sel spermatid dan sel spermatozoa tubulus seminiferus testis mencit dengan pewarnaan HE perbesaran 1000x. tanda panah A (spermatogonium), B (spermatosit primer), C (spermatosit sekunder), D (spermatid), dan E (spermatozoa)	71
5.4 Diagram batang rerata diameter tubulus seminiferus testis 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)	73

5.5 Diagram batang rerata kadar MDA testis mencit pada 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) 75

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	halaman
1. Rekam Data Berat Badan Mencit Selama Perlakuan	97
2. Pembuatan Sediaan TCDD	98
3. Pembuatan Sediaan Vitamin E (<i>α-tocopherol</i>)	99
4. Prosedur Pembuatan Preparat Histopatologi Testis Mencit	100
5. Prosedur Pemeriksaan Kadar MDA Testis Mencit	103
6. Perhitungan Gambaran Histopatologi Jumlah Sel Spermatogenik Tubulus Seminiferus Testis Mencit Dalam 5 Lapangan	104
7. Perhitungan Gambaran Histopatologi Diameter Tubulus Seminiferus Testis Mencit Dalam 5 Lapangan Pandang	108
8. Hasil Pemeriksaan Kadar MDA Testis Mencit Dalam nmol/ml	109
9. Analisis Data (ANOVA) Jumlah Sel Spermatogonium, Sel Spermatosit Primer, Spermatosit Sekunder, Spermatid, dan Spermatozoa Tubulus Seminiferus Testis Mencit	110
10. Analisis Data (ANOVA) Diameter Tubulus Seminiferus Testis Mencit	117
11. Analisis Data (ANOVA) Kadar MDA Testis Mencit	121
12. Foto – foto Penelitian	125
13. Sertifikat kelaikan etik / <i>ethical clearance</i> penelitian	126

SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG

AhR	: <i>Arylhydrocarbon Receptor</i>
ANOVA	: <i>Analysis Of Variance</i>
Arnt	: <i>Arylhydrocarbon receptor nuclear translocator</i>
BB	: Berat badan
Ca ²⁺	: Calcium
cAMP	: <i>Cyclic Adenosine Monophosphate</i>
cc	: Cubic centimeter
cm	: Centimeter
CO ₂	: Carbon dioksida
Cu	: <i>Cuprum/ Tembaga</i>
CYP450	: <i>Cytochrome P450</i>
DNA	: <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
DRE	: <i>Dioxin-Responsive Enhancer Elements</i>
Fe	: Ferum (besi)
g	: Gram
GPC	: <i>Glycerol Phosphoryl Choline</i>
H ₂ O ₂	: <i>Hydrogen peroxide</i>
H ₂ O	: <i>Hydrogen oxide/ Air</i>
HDL	: <i>High Density Lipoprotein</i>
IU	: International Unit
I-TEQ	: International-Toxic Equivalent
Kg	: Kilogram
MDA	: <i>Malondialdehyde</i>
mg	: milligram
ml	: milliliter
Mn	: mangan
m ³	: meter kubik
ng	: nanogram
nmol	: nanomol

NO [•]	: <i>Nitric Oxide</i>
O ₂	: <i>Oxygen</i>
O ₂ ^{•-}	: <i>Superoxide radical</i>
¹ O ₂	: <i>Singlet oxygen</i>
[•] OH	: <i>Hydroxyl radical</i>
PCDD	: <i>Polychlorinated Dibenzo-P-Dioxin</i>
POPs	: <i>Persistent Organic Pollutants</i>
PUFA	: <i>Polyunsaturated Fatty Acid</i>
pg	: <i>picogram</i>
RAL	: <i>Rancangan Acak Lengkap</i>
Rpm	: <i>Round per minute</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Spesies</i>
SOD	: <i>Superoxide Dismutase</i>
TCDD	: <i>Tetrachlorodibenzo-P-Dioxin</i>
TBARs	: <i>Thiobarbituric Acid-Reactive substances</i>
WHO	: <i>World Health Organization</i>
µg	: <i>Mikrogram</i>
°C	: <i>Derajat Celsius</i>
%	: <i>Persen</i>
<	: <i>Kurang dari</i>
µm	: <i>Mikrometer</i>
µl	: <i>Mikroliter</i>
α	: <i>Alfa</i>
β	: <i>Beta</i>

BAB 1

PENDAHULUAN

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Dioksin merupakan istilah umum yang digunakan untuk menyebut sekelompok zat-zat kimia berbahaya yang termasuk ke dalam golongan senyawa *polychlorinated dibenzo-p-dioxin* (PCDD), *polychlorinated dibenzo-p-furan* (PCDF) dan *polychlorinated biphenyl* (PCBs). Sekelompok senyawa kimia ini termasuk ke dalam golongan senyawa pencemar organik yang sulit teruraikan (*Persistent Organic Pollutants (POPs)*) yang menyebabkan pencemaran lingkungan serta masalah kesehatan baik pada manusia maupun hewan (Warlina, 2008).

2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) merupakan dioksin yang paling toksik dari golongan *polychlorinated dibenzo-p-dioxin* (PCDDs) (Lensu *et al.*, 2011). Oleh karena itu, TCDD menjadi jenis dioksin yang paling banyak diteliti dibandingkan dengan senyawa dioksin lain (Hutahaean, 2010). TCDD adalah kontaminan lingkungan yang bersifat persisten dan merupakan hasil samping dari industri klorin, proses pembakaran sampah, kertas, pemutihan pulp, emisi industri baja dan emisi kendaraan (Aly *and* Khafagy, 2011).

Badan kesehatan dunia atau WHO pada tahun 2010 mengungkapkan bahwa TCDD termasuk karsinogenik paling berbahaya dan beracun, bersifat lipofilik, memiliki tingkat metabolisme dan ekskresi yang rendah, dan lebih cenderung terakumulasi di dalam tubuh (Yin *et al.*, 2012).

Semua orang di negara industri berpotensi untuk terkontaminasi dioksin, furans, co-planar PCBs dan campuran serupa lainnya. Senyawa-senyawa ini terakumulasi dalam tubuh dan membentuk total toksisitas dioksin dengan konsentrasi yang lebih tinggi (Lester, 1994).

Poliklorinasi dari TCDD biasanya dibuang ke perairan dan terakumulasi membentuk sedimen. Penumpukan TCDD di lingkungan dan perairan akan menyebabkan zat ini masuk ke dalam rantai makanan dan berdampak buruk pada semua makhluk hidup (Pesatori, 1998).

Dioksin dapat memasuki tubuh melalui rantai makanan, kontak dengan kulit, inhalasi, dan transplasenta. Rantai makanan merupakan jalur utama pemasukan dioksin ke dalam tubuh, baik secara langsung melalui dioksin yang terkandung dalam makanan maupun secara tidak langsung oleh proses pengemasan/pengepakan jika menggunakan bahan hidrokarbon khlorin. Makanan asal hewan lebih riskan terhadap dioksin karena sifat alami dioksin yang mudah larut dalam lemak (Roeder *et al.*, 1998).

Pencemaran akibat dioksin memberikan dampak buruk terhadap kesehatan hewan dan manusia antara lain kerusakan kulit, imunotoksisitas, hepatosisitas, karsinogenesis, teratogenesis, gangguan endokrin, neurotoksisitas, serta gangguan reproduksi (Lu *et al.*, 2009).

Gangguan reproduksi jantan yang disebabkan TCDD antara lain mengurangi fertilitas, menurunkan tingkat testosteron serum, dan menekan pertumbuhan serta maturasi spermatozoa (Latchoumycandane *et al.*, 2003). Selain itu efek merugikan lainnya dari TCDD adalah dapat menghancurkan pertahanan

antioksidan pada sistem chondrosomes testis dan cytomicrosomes, menyebabkan stres oksidatif (Latchoumycandane *and* Mathur, 2002). TCDD memiliki efek antiandrogenik baik pada manusia maupun pada hewan dan dapat mempengaruhi struktur dan fungsi dari testis. TCDD menghambat pertumbuhan dan diferensiasi dari epitel vesikula seminalis selama perkembangan postnatal, atropi dan penurunan diameter dari tubulus seminiferus. TCDD juga dapat menyebabkan feminisasi pada mencit jantan dan disfungsi organ reproduksi (Yin *et al.*, 2012).

Paparan TCDD menyebabkan stres oksidatif dalam beberapa jaringan dan spesies (Latchoumycandane *et al.*, 2002). Hassoun *et al.*, (2001) menyatakan pemberian TCDD meningkatkan produksi anion superoksida, lipid peroksidasi, kerusakan DNA, penurunan glutation jaringan otak dan hati mencit.

Pemberian TCDD juga menunjukkan adanya peningkatan kadar *Malondialdehyde* (MDA) plasma darah (Saragih, 2005), kerusakan jaringan testis serta epididimis tikus (Latchoumycandane *et al.*, 2002), kerusakan membran plasma, gangguan fungsi, dan penurunan motilitas spermatozoa (Kobayashi *et al.* 2004).

Salah satu penyebab kerusakan sel ataupun jaringan adalah akibat pembentukan radikal bebas. Radikal bebas adalah suatu senyawa atau molekul yang mengandung satu atau lebih elektron tidak berpasangan pada orbital luarnya (Valko *et al.*, 2007). Kondisi stres oksidatif, radikal bebas akan menyebabkan terjadinya peroksidasi lipid membran sel dan merusak organisasi membran sel. Membran sel ini sangat penting bagi fungsi reseptor dan fungsi enzim, sehingga terjadinya peroksidasi lipid membran sel oleh radikal bebas dapat mengakibatkan

hilangnya fungsi seluler secara total (Singh, 1992; Evans, 2000). Peroksidasi lipid yang ditimbulkan oleh stres oksidatif akibat radikal bebas dapat ditentukan dengan mengukur parameter kadar *Malondialdehyde* (MDA) (Simanjuntak, 2007).

Vitamin E (*α-tocopherol*) merupakan vitamin yang larut dalam lemak dan secara fisiologi berperan penting dalam tubuh, terutama sebagai penangkal radikal bebas dan berfungsi sebagai pelindung terhadap peroksidasi lemak di dalam membran (Sulistyowati, 2006). Vitamin E bekerja sebagai antioksidan pemutus rantai, mengendalikan peroksida lemak dengan menyumbangkan hidrogen ke dalam reaksi yang mampu mengubah radikal peroksil (hasil peroksidasi lipid) menjadi radikal tokoferol yang kurang reaktif sehingga tidak mampu merusak rantai asam lemak dan melindungi sel dari kerusakan (Winarsi, 2007).

Berdasarkan penelitian yang pernah dilakukan, ditemukan adanya efek proteksi oleh vitamin E 2 mg/kg berat badan per oral terhadap fungsi reproduksi mencit jantan yang dipapar Merkuri 1,25 mg/kg berat badan/ hari yang ditandai dengan peningkatan dalam jumlah dan motilitas sperma yang hidup. Hal ini menunjukkan bahwa vitamin E sebagai antioksidan mampu melindungi atau memperbaiki fungsi reproduksi mencit jantan yang terpapar oleh berbagai zat penginduksi stres oksidatif (Rao and Sharma, 2001).

Penelitian terbaru yang dilakukan Yin *et al.* (2012) telah membuktikan bahwa vitamin E berpengaruh terhadap fungsi endokrin reproduksi, memperbaiki struktur testis, serta jumlah spermatozoa mencit yang terpapar toksisitas TCDD. Mekanisme vitamin E sebagai antioksidan terhadap paparan TCDD yaitu dengan

memutus ikatan TCDD dengan reseptor AhR (*Aryl hydrocarbon receptor*) yang terdapat pada sitoplasma sel.

Efek vitamin E terhadap reproduksi jantan telah banyak diteliti pada berbagai spesies. Namun, belum banyak yang meneliti efek vitamin E terhadap jumlah sel spermatogenik, diameter tubulus seminiferus, dan kadar *Malondialdehyde* pada hewan jantan yang terpapar TCDD. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi vitamin E terhadap mekanisme reproduksi mencit jantan yang terpapar TCDD. Vitamin E diharapkan memberi efek mencegah atau mengurangi toksisitas yang ditimbulkan oleh TCDD.

1.2 Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut di atas dapat dirumuskan permasalahan sebagai berikut:

1. Apakah pemberian vitamin E (*α -tocopherol*) dalam berbagai dosis dapat mempertahankan jumlah sel spermatogenik testis mencit yang diinduksi 2,3,7,8 *tetrachlorodibenzo-p-dioxin* (TCDD)?
2. Apakah pemberian vitamin E (*α -tocopherol*) dalam berbagai dosis dapat mempertahankan diameter tubulus seminiferus testis mencit yang diinduksi 2,3,7,8 *tetrachlorodibenzo-p-dioxin* (TCDD)?
3. Apakah pemberian vitamin E (*α -tocopherol*) dalam berbagai dosis dapat menurunkan kadar *Malondialdehyde* (MDA) testis mencit yang diinduksi 2,3,7,8 *tetrachlorodibenzo-p-dioxin* (TCDD)?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Tujuan umum dari penelitian ini adalah untuk membuktikan bahwa vitamin E (*α-tocopherol*) memiliki pengaruh positif terhadap reproduksi jantan akibat paparan 2,3,7,8 *tetrachlorodibenzo-p-dioxin* (TCDD).

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Membuktikan kemampuan vitamin E (*α-tocopherol*) dalam mempertahankan jumlah sel spermatogenik testis mencit akibat paparan 2,3,7,8 *tetrachlorodibenzo-p-dioxin* (TCDD).
2. Membuktikan kemampuan vitamin E (*α-tocopherol*) dalam mempertahankan diameter tubulus seminiferus testis mencit akibat paparan 2,3,7,8 *tetrachlorodibenzo-p-dioxin* (TCDD).
3. Membuktikan kemampuan vitamin E (*α-tocopherol*) dalam menurunkan kadar *Malondialdehyde* (MDA) testis mencit akibat paparan 2,3,7,8 *tetrachlorodibenzo-p-dioxin* (TCDD).

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Keilmuan

1. Memberikan informasi ilmiah bahwa vitamin E (*α-tocopherol*) dapat mempertahankan jumlah sel spermatogenik testis mencit akibat paparan 2,3,7,8 *tetrachlorodibenzo-p-dioxin* (TCDD).

2. Memberikan informasi ilmiah bahwa vitamin E (*α -tocopherol*) dapat mempertahankan diameter tubulus seminiferus testis mencit akibat paparan 2,3,7,8 *tetrachlorodibenzo-p-dioxin* (TCDD).
3. Memberikan informasi ilmiah bahwa vitamin E (*α -tocopherol*) dapat menurunkan kadar *Malondialdehyde* (MDA) testis mencit akibat paparan 2,3,7,8 *tetrachlorodibenzo-p-dioxin* (TCDD).

1.4.2 Manfaat Praktis

Memberikan informasi kepada masyarakat mengenai khasiat vitamin E (*α -tocopherol*) sebagai antioksidan potensial untuk mencegah berbagai sumber radikal bebas terutama efek negatif dari 2,3,7,8 *tetrachlorodibenzo-p-dioxin* (TCDD) sebagai salah satu senyawa kimia toksik kontaminan lingkungan pada reproduksi jantan.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

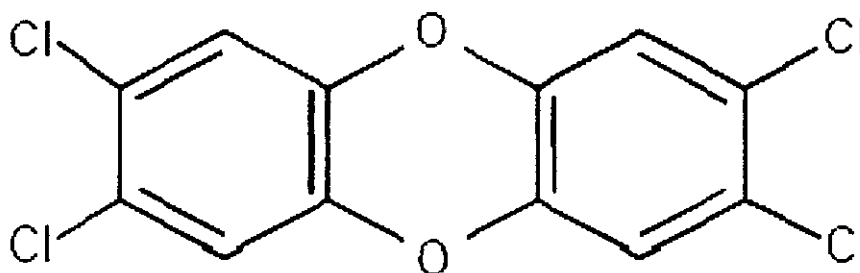
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Tentang TCDD

2.1.1 Sifat Fisika dan Kimia TCDD

Dioksin termasuk senyawa organik persisten atau *Persistent Organic Pollutants* (POPs), merupakan sekelompok zat kimia berbahaya yang termasuk dalam golongan senyawa PCDD (*Polychlorinated Dibenzo-p-Dioxin*). Golongan PCDD memiliki 75 jenis senyawa yang memiliki taraf toksisitas yang berbeda-beda, mulai dari yang taraf toksisitas rendah hingga taraf toksisitas tinggi. Senyawa dioksin ini mempunyai kesamaan sifat dan toksisitas dengan poliklorinasi dibenzo furans (PCDFs) dan poliklorinasi bifenil (PCBs). Ketiga senyawa di atas merupakan golongan senyawa hidrokarbon aromatik terhalogenasi. Hasil klorinasi dan brominasi dibenzodioksin dan dibenzofuran merupakan senyawa aromatik trisiklik yang mempunyai kesamaan sifat dan struktur kimia (Dobrzynski *et al.*, 2009).

Senyawa PCDD yang memiliki toksisitas paling tinggi adalah TCDD (*2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin*) yang biasa disebut dioksin (Lensu *et al.*, 2011). Struktur molekul dan sifat fisis dioksin ditampilkan pada Gambar 1 dan Tabel 1 di bawah ini:



Gambar 2.1 Struktur molekul *2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin* (Dobrzynski *et al.*, 2009)

Tabel 2.1. Sifat fisis dan kimia dioksin

Sifat Fisis dan Kimia Dioksin	Parameter
Rumus kimia $C_2H_2nCl_n$	n = 1 sampai 4
Flash point	170-380°C
Konduktivitas panas	Tinggi
Warna	tidak berwarna
Kelarutan dalam air	tidak larut

(Martunus, 2007)

2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) lebih mudah larut dalam pelarut non polar daripada pelarut polar (Saragih, 2005). TCDD larut dalam o-diklorobenzene, kloroform, n-oktanol, dan methanol dengan daya kelarutan berturut-turut sebesar 1,4 g/L; 0,37 g/L; 0,048 g/L dan 001 g/L. Daya kelarutan TCDD dalam air sangat rendah (hidrofobik) sehingga TCDD yang berada dalam sistem perairan akan terlihat pada bahan organik dan sedimen-sedimen dengan kekuatan yang berbeda (Susanti, 2000).

2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) merupakan senyawa yang tidak berbau, demikian juga senyawa segolongan dioksin yang lain juga tidak dikenal baunya. Senyawa yang dalam bentuk murni berupa kristal atau padatan tak berwarna ini di lingkungan berada dalam berbagai variasi keadaan tidak murni. Senyawa ini akan menempel ke tanah, kayu, atau permukaan lain yang merupakan bahan organik seperti pada dedaunan. Di udara dan perairan, senyawa ini ditemukan dalam bentuk uap air atau dalam bentuk zat terlarut tergantung pada jumlah materi, temperature dan faktor-faktor lain yang ada di lingkungan (Juniarti, 2005). Selain itu TCDD juga cenderung akan terakumulasi dalam jaringan lemak atau mempunyai sifat lipofilik (Warlina, 2008). Sifat mudah larut dalam lemak (lipofilik) TCDD mengakibatkan TCDD terakumulasi dalam

jaringan lemak dengan kadar yang tinggi dan dalam waktu yang lama. TCDD yang terdapat dalam jaringan lemak ikan dan ternak serta sekresi susu ternak, akan mengkontaminasi produk makanan dengan bahan baku ikan, daging, dan susu tersebut. Waktu paruh TCDD dalam jaringan lemak manusia selama 7 sampai 8 tahun dan waktu paruh TCDD pada jaringan lemak ternak mencapai 16,5 minggu (Bintoro, 2009; Susanti, 2000).

2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) bersifat tidak reaktif, stabil, dan tahan terhadap kerusakan secara alami untuk periode waktu yang lama, TCDD terikat kuat dengan kandungan bahan organik tanah dan waktu paruh dalam tanah berkisar 10 sampai 30 tahun (Juniarti, 2005). Sifat TCDD yang dapat terurai oleh radiasi sinar ultraviolet matahari, merupakan mekanisme alam utama yang dapat merusak TCDD. TCDD yang terlarut dalam methanol dapat terurai secara sempurna oleh sinar ultraviolet buatan dalam waktu 20 jam dan oleh sinar matahari dalam waktu 36 jam (Susanti, 2000).

2.1.2 Pembentukan TCDD

2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) muncul sebagai produk samping proses pembakaran bahan kimia yang mengandung senyawa organoklorin, pembuatan plastik *Polyvinil Chloride* (PVC) dan proses *Polychlorinated Biphenils* (PCBs). Menurut *Environment Protection Agency* (EPA) terdapat empat sumber utama TCDD yaitu hasil pembakaran sampah, hasil samping proses produksi pestisida, hasil pembakaran pada proses produksi baja, dan air buangan industri terutama industri kertas yang menggunakan klor sebagai

pemutih (Schechter *et al.*, 2005 ; Winarti dan Munarso, 2005). Pembakaran sampah, baik sampah rumah tangga dan sampah medis dari rumah sakit diidentifikasi menjadi sumber terbesar TCDD. Pada pembakaran sampah rumah tangga saja dapat menghasilkan 0,1 ng/m³ TCDD atau bahkan dapat 10 hingga 20 kali lebih besar. Peristiwa kebakaran hutan dan aktifitas gunung merapi juga turut menyumbang terbentuknya TCDD (Juniarti, 2005).

2.1.3 Toksisitas TCDD

Toksisitas TCDD dipengaruhi oleh dosis, rute pemberian, umur dan jenis kelamin spesies. Salah satu efek toksik TCDD adalah *wasting syndrome*, yaitu sindrom kelemahan yang ditandai dengan penurunan berat badan. Penurunan berat badan tersebut disebabkan karena TCDD menurunkan sekitar 30% absorbs aktif glukosa pada usus kecil (Ebtakar, 2004).

Chloracne adalah efek klinis yang karakteristik akibat toksisitas TCDD pada manusia, kelinci, dan monyet. *Chloracne* meliputi hiperkeratosis dan pembentukan komedo pada kulit yang sedikit ditumbuhi rambut. Pada kelinci dan monyet ditambah terdapat edema di sekitar mata (Ebtakar, 2004).

2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) juga bersifat karsinogenik. Gejala tumor termasuk nodul neoplastik hati, kolangiokarsinoma, karsinoma saluran telinga, ginjal, dan kemih, serta menginduksi karsinoma hati, paru-paru, langit-langit mulut, dan lidah (Ray dan Prasad, 1992).

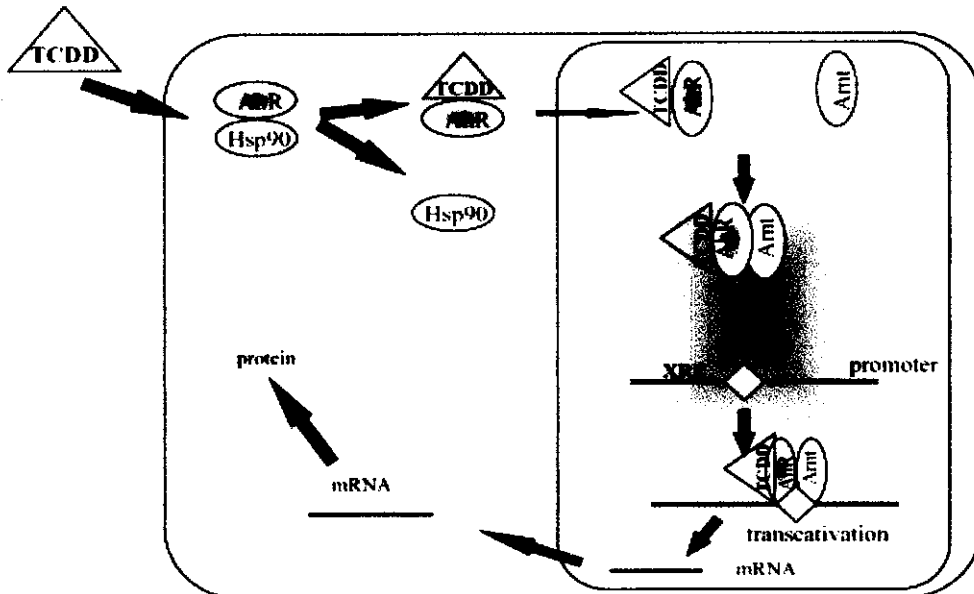
2.1.4 Siklus Pemasukan TCDD Ke Dalam Tubuh

2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) memasuki tubuh melalui rantai makanan (gastrointestinal), kontak dermal, dan inhalasi atau transpulmoner serta transplasenta. Rantai makanan merupakan jalur utama pemasukan TCDD ke dalam tubuh baik secara langsung melalui dioksin yang terkandung dalam makanan maupun secara tidak langsung oleh proses pengemasan/pengepakan jika menggunakan bahan hidrokarbon khlorin. Makanan asal hewan lebih riskan terhadap dioksin karena sifat alami dioksin yang mudah larut dalam lemak (Roeder *et al.*, 1998).

Kontak dermal TCDD hanya terjadi pada lapisan luar kulit (*stratum corneum*) dan tidak mengalami penetrasi ke dalam lapisan dermis. Persentasi pemasukan TCDD melalui inhalasi atau transpulmoner relatif lebih kecil apabila dibandingkan dengan rute pemasukan yang lain karena TCDD memiliki tekanan uap yang rendah (Llobert *et al.*, 2003; Juniarti, 2005).

Dalam tubuh TCDD menembus selaput sel, akan berikatan dengan *Arylhydrocarbon receptor* (AhR) yang berada di sitoplasma kemudian bersama-sama menembus inti sel. Di inti sel, AhR yang telah berikatan dengan TCDD membentuk dimer dan berikatan dengan reseptor Arnt (*Arylhydrocarbon receptor nuclear translocator*) membentuk kompleks senyawa trimer. Kompleks senyawa trimer TCDD-AhR-Arnt ini mengikat elemen DNA tertentu yaitu *Dioxin-Responsive enhancer Elements* (DRE). Ikatan tersebut akan mengubah ekspresi dari berbagai macam gen termasuk sitokrom P450 (Yin *et al.*, 2012). Sitokrom P450 merupakan enzim yang terlibat dalam rangkaian pembentukan radikal bebas

melalui reaksi enzimatik (Yang *et al*, 2005). Mekanisme kerja senyawa TCDD dalam mengikat reseptor AhR ditampilkan pada Gambar 2.2 dibawah ini.



Gambar 2.2 Mekanisme Kerja TCDD (Massaad *et al.*, 2002).

2.1.5 Absorpsi, Distribusi, Metabolisme, dan Ekskresi TCDD

2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) diabsorpsi melalui gastrointestinal, dermal, dan transpulmoner. Paparan TCDD secara oral dalam makanan, hampir 90% dari dosis yang diberikan akan diabsorpsi oleh gastrointestinal. Absorpsi TCDD oleh gastrointestinal bervariasi tergantung dosis, pelarut, dan umur spesies. Absorpsi dermal TCDD tergantung dosis, formulasi, dan durasi kontak. Efek sistemik yang timbul setelah terpapar TCDD pada paru-paru membuktikan bahwa TCDD juga diabsorpsi transpulmoner (EPA, 2012). Setelah diabsorpsi, TCDD dibawa oleh darah dan limfe untuk didistribusikan ke seluruh organ tubuh. Pada darah dan limfe, TCDD bergabung dengan lipoprotein dan kilomikron (EPA, 2012). Hati dan jaringan lemak merupakan deposit utama

TCDD. Sifat TCDD yang mudah larut dalam lemak menyebabkan lemak sebagai deposit utama TCDD (Susanti, 2004).

Rute metabolisme utama TCDD adalah hidroksilasi dan berkonjugasi dengan asam glukoronat atau asam sulfat. Ekskresi TCDD terutama melalui urin dan feses serta empedu. Pada mamalia, air susu juga merupakan salah satu rute ekskresi TCDD. Unggas yang sedang bertelur, kurang lebih 1% TCDD ditranslokasi ke telur (Dobrzynski, 2009). Urin terutama mengandung metabolit terkonjugasi, sedangkan feses mengandung metabolit non konjugasi (Susanti, 2000).

2.1.6 TCDD Pada Reproduksi

2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) menyebabkan kelainan reproduksi dan mengurangi fertilitas pada tikus jantan (Gray *et al.*, 1997). Efek toksisitas TCDD dalam sistem reproduksi pria antara lain: berkurangnya ukuran testis, kelenjar prostat, menghambat pertumbuhan dan diferensiasi vesikula seminalis selama perkembangan postnatal, penurunan jumlah sperma, serta peningkatan jumlah sperma abnormal (Latchoumycandane *et al.*, 2003). TCDD memiliki efek antiandrogenik pada manusia dan hewan, sehingga juga berpengaruh terhadap bentuk dan fungsi testis, penurunan diameter tubulus seminiferus, dan feminisasi serta disfungsi organ reproduksi (Yin *et al.*, 2012). TCDD menyebabkan kerusakan dan atrofi testis serta sel sertoli dan juga perubahan dalam sel germinal (Aly and Khafagy, 2011).

Studi epidemiologi menemukan bahwa tingkat testosteron memiliki korelasi negatif dengan serum TCDD, dan penurunan jumlah spermatozoa menjadi setengah dari normal pada pria yang terpapar TCDD secara kronis (Egeland *et al.*, 1994.). Penelitian Yin *et al.*, (2012) mengatakan bahwa TCDD mengakibatkan penurunan dalam jumlah spermatozoa dan kerusakan struktur testis pada tikus. Efek yang paling toksik yang disebabkan oleh TCDD termediasi oleh pengikatan AhR dengan protein kedua yaitu *aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator* (Arnt) dengan jumlah respon unsur-unsur gen target sehingga memodulasi ekspresi gen (Nau, 2006).

Aktivasi AhR diinduksi dari ekspresi berbagai gen dengan elemen respon xenobiotik di daerahnya enhancer, seperti reseptor sitokrom P450 1A1 (CYP1A1). Hasil penelitian Esser *et al.* (2005) mengatakan bahwa TCDD mengganggu fisiologis sinyal AhR tersebut, menyebabkan perubahan spesifik sel dalam transkripsi gen dan diferensiasi sel, serta dengan menghasilkan efek toksik.

2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) yang dikombinasikan dengan AhR memicu perubahan dalam ekspresi *monoamine oxidase* terkait dengan enzim CYP450 yang diaktifkan oleh AhR (Yin *et al.*, 2012).

Perubahan jumlah spermatozoa dan struktur testis pada tikus karena efek stres oksidatif yang disebabkan oleh TCDD (Yin *et al.*, 2012). Dioksin menurunkan aktivitas antioksidan dan meningkatkan level *hydrogen dioxide* (Latchoumycandane *and* Mathur, 2002) dan MDA pada jaringan testis tikus (Yin *et al.*, 2012).

Dhanabalan *and* Mathur (2009) melaporkan bahwa TCDD meningkatkan peroksidasi lipid dan produksi hidrogen peroksida serta penurunan aktivitas antioksidan enzimatis SOD dan CAT dalam mitokondria dan fraksi mikrosomal dari testis tikus.

Sel Sertoli sangat penting untuk pengembangan dan pemeliharaan fungsi testis (McLaren, 2000). Setiap agen yang merusak kelangsungan hidup dan fungsi sel sertoli memiliki efek mendalam pada spermatogenesis. Selain itu, tingginya tingkat asam lemak tak jenuh ganda atau *polyunsaturated fatty acids* (PUFA) dalam testis mamalia sangat rentan terhadap serangan radikal bebas di membran plasma (Aly *and* Khafagy, 2011).

Sel Sertoli menjadi target berbagai macam paparan dan pengujian toksisitas sistem reproduksi pria baik secara *in vivo* maupun *in vitro* (Krishnamoorthy *et al.*, 2005). Radikal bebas atau *Reactive Oxygen Spesies* (ROS) yang dihasilkan di sel sertoli dan mitokondria secara alami ditangkap oleh antioksidan sistem pertahanan tubuh yang berupa antioksidan enzimatis seperti superoxide dismutase (SOD), katalase (CAT), glutathione reduktase (GR) dan glutathione peroksidase (GPX) (Arenas *et al.*, 2007.). Ketidakseimbangan antara ROS dan sistem antioksidan dapat menghasilkan stress oksidatif. Induksi stres oksidatif karena paparan TCDD merupakan mekanisme penting dari efek racun TCDD pada fraksi mitokondria dan epididimis testis tikus (Latchoumycandane *et al.*, 2003.). Selanjutnya, telah dilaporkan bahwa TCDD mengganggu sistem endokrin, menyebabkan toksisitas pada testis tikus dari peningkatan produksi ROS (Dhanabalan dan Mathur, 2009; Adamsson *et al.*, 2009).

2.2 Tinjauan Tentang Radikal Bebas

Radikal bebas adalah salah satu produk reaksi kimia dalam tubuh, dimana senyawa kimia ini sangat reaktif karena mengandung elektron yang tidak berpasangan pada orbital luarnya. Sehingga sebagian besar radikal bebas bersifat tidak stabil (Aini, 2002). Di dalam sel hidup, radikal bebas terbentuk pada membran plasma, mitokondria, peroksisom, retikulum endoplasma dan sitosol melalui reaksi-reaksi enzimatik yang berlangsung dalam proses metabolisme (Winarsi, 2007).

Radikal bebas berfungsi untuk memberikan perlindungan tubuh terhadap serangan bakteri parasit, namun tidak menyerang sasaran spesifik sehingga akan menyerang asam lemak tidak jenuh ganda dari membran sel, protein, dan DNA. Radikal bebas memiliki dua sifat, yaitu reaktif, cenderung menarik elektron, dan dapat mengubah molekul menjadi suatu radikal (Hariyatmi, 2004).

Pada proses metabolisme normal, tubuh memproduksi partikel kecil dengan tenaga besar disebut sebagai radikal bebas. Atom atau molekul dengan elektron bebas ini dapat digunakan untuk menghasilkan tenaga dan beberapa fungsi fisiologis seperti kemampuan untuk membunuh virus dan bakteri. Radikal bebas mempunyai tenaga yang sangat tinggi sehingga zat ini juga dapat merusak jaringan normal apabila jumlahnya terlalu banyak. Radikal bebas dapat mengganggu produksi DNA, lapisan lipid pada dinding sel, mempengaruhi pembuluh darah, dan produksi prostaglandin. Radikal bebas juga dijumpai pada lingkungan, beberapa logam (misalnya besi, tembaga), asap rokok, polusi udara,

obat, bahan beracun, makanan dalam kemasan, bahan aditif, dan sinar ultraviolet dari matahari maupun radiasi (Droge, 2002).

Tubuh memiliki mekanisme proteksi yang menetralkan radikal bebas yang terbentuk, antara lain dengan adanya enzim-enzim *superoksida dismutase* (SOD), *katalase*, dan *glutathion peroksidase*(GPX)(Winarsi, 2007). Namun dalam kondisi tertentu, radikal bebas dapat melebihi sistem pertahanan tubuh, kondisi ini disebut sebagai stres oksidatif (Agarwal *et al*, 2005). Pada kondisi ini, keseimbangan antara radikal bebas dengan kemampuan antioksidan alami tubuh akan terganggu yang akhirnya akan menyebabkan kerusakan jaringan (Winarsi, 2007).

2.2.1 Sumber Radikal Bebas

Radikal bebas yang terdapat pada tubuh manusia berasal dari dua sumber yaitu eksogen dan endogen (Harliansyah, 2001). Adapun sumber endogen meliputi:

- a. Autooksidasi ; Autooksidasi merupakan produk dari proses metabolisme aerobik. Autooksidasi menghasilkan reduksi dari oksigen diradikal dan pembentukan kelompok reaktif oksigen.
- b. Oksidasi enzimatik ; Beberapa jenis enzim mampu menghasilkan radikal bebas dalam jumlah yang cukup bermakna, meliputi *xanthine oksidase (activated in ischemia-reperfusion)*, *prostaglandin synthase*, *lipoxygenase*, *aldehyde oxidase*, dan *amino acid oxidase*.

c. **Respiratory burst**; Merupakan terminologi yang digunakan untuk menggambarkan proses sel fagositik menggunakan oksigen dalam jumlah yang besar selama fagositosis. Lebih kurang 70 – 90 % penggunaan oksigen tersebut dapat diperhitungkan dalam produksi superoksida. Fagositik sel tersebut memiliki sistem membran bound flavoprotein cytochrome-b-245 NADPH-oxidase keluar dalam bentuk inaktif. Paparan terhadap bakteri yang diselimuti imunoglobulin, kompleks imun, komplemen atau leukotrien dapat mengaktifkan enzim NADPH-oxidase. Aktifasi tersebut mengawali respiratory burst pada membran sel untuk memproduksi superoksida. Kemudian H₂O₂ dibentuk dari superoksida dengan cara dismutasi bersama generasi berikutnya dari OH dan HOCl oleh bakteri. Sedangkan untuk sumber eksogen adalah sebagai berikut:

a. **Obat-obatan**

Beberapa macam obat dapat meningkatkan produksi radikal bebas dalam bentuk peningkatan tekanan oksigen. Bahan-bahan tersebut bereaksi bersama hiperoksia dapat mempercepat tingkat kerusakan. Termasuk di dalamnya antibiotika kelompok quinoid atau berikatan logam untuk aktifitasnya (nitrofurantoin), obat kanker seperti bleomycin, anthracyclines (adriamycin), dan methotrexate, yang memiliki aktifitas pro-oksidan. Selain itu, radikal juga berasal dari fenilbutason, beberapa asam fenamat dan komponen aminosalisilat dari sulfasalazin dapat menginaktivasi protease, dan penggunaan asam askorbat dalam jumlah banyak mempercepat peroksidasi lemak.

b. **Asap Rokok**

Oksidan dalam rokok mempunyai jumlah yang cukup untuk memainkan peranan yang besar terjadinya kerusakan saluran napas. Telah diketahui bahwa oksidan asap tembakau menghabiskan antioksidan intraseluler dalam sel paru (*in vivo*) melalui mekanisme yang dikaitkan terhadap tekanan oksidan. Diperkirakan bahwa tiap hisapan rokok mempunyai bahan oksidan dalam jumlah yang sangat besar, meliputi aldehida, epoxida, peroxida, dan radikal bebas lain yang mungkin cukup berumur panjang dan bertahan hingga menyebabkan kerusakan alveoli. Bahan lain seperti nitrit oksida, radikal peroksil, dan radikal yang mengandung karbon ada dalam fase gas. Juga mengandung radikal lain yang relative stabil dalam fase tar.

c. Radiasi

Radioterapi memungkinkan terjadinya kerusakan jaringan yang disebabkan oleh radikal bebas. Radio elektromagnetik (sinar X, sinar gamma) dan radiasi partikel (partikel elektron, photon, neutron, alfa, beta) menghasilkan radikal primer dengan cara memindahkan energinya pada komponen seluler seperti air. Radikal primer tersebut dapat mengalami reaksi sekunder bersama oksigen yang terurai atau bersama cairan seluler.

d. Karbontetraklorida (CCl₄)

Karbontetraklorida (CCl₄) adalah bahan dasar yang digunakan untuk CFC (Chloroflourocarbon) pada pendingin dan pada kaleng aerosol yang dapat menyebabkan kerusakan lapisan ozon. Gas ozon yang berada di stratosfer merupakan gas yang dapat menyerap sinar ultraviolet dari matahari. Apabila lapisan ozon bocor akibat gas CFC (Chloroflourocarbon) maka ultra violet akan

langsung ke bumi dan menjadi radikal yang menyebabkan keganasan pada kulit serta dapat menyebabkan katarak (Mukono, 2005).

Perusakan sel oleh radikal bebas didahului oleh kerusakan membran sel. Kerusakan membran sel tersebut dapat terjadi dengan cara: (a) terjadi ikatan kovalen antara radikal bebas dengan komponen membran, sehingga terjadi perubahan struktur dari fungsi reseptor; (b) oksidasi gugus *thiol* pada komponen membran oleh radikal bebas yang menyebabkan proses transport membran terganggu; (c) terjadi reaksi peroksidasi lipid membran yang mengandung PUFA (*polyunsaturated fatty acid*) (Winarsi, 2007).

2.2.2 Tipe Radikal Bebas Dalam Tubuh

Radikal bebas terpenting dalam tubuh adalah radikal derivat dari oksigen yang disebut kelompok oksigen reaktif (*reactive oxygen species/ROS*), termasuk di dalamnya adalah triplet ($3O_2$), tunggal (*singlet*/ 1O_2), anion superoksida (O_2^-), radikal hidroksil ($-OH$), nitrit oksida (NO^-), peroksinitrit ($ONOO^-$), asam hipoklorus ($HOCl$), hidrogen peroksida (H_2O_2), radikal alkoxy (LO^-), dan radikal peroksil (LO_2). Radikal bebas yang mengandung karbon (CCL_3) yang berasal dari oksidasi radikal molekul organik. Radikal yang mengandung hidrogen hasil dari penyerangan atom H (H^-). Bentuk lain adalah radikal yang mengandung sulfur yang diproduksi pada oksidasi glutathion menghasilkan radikal thiy ($R-S$). Radikal yang mengandung nitrogen juga ditemukan, misalnya radikal fenyldiazine (Rahman, 2011).

2.2.3 Reaksi Perusakan Oleh Radikal Bebas

Definisi tekanan oksidatif (*oxidative stress*) adalah suatu keadaan dimana tingkat *reactive oxygen intermediate* (ROI) yang toksik melebihi pertahanan antioksidan endogen. Keadaan ini mengakibatkan kelebihan radikal bebas, yang akan bereaksi dengan lemak, protein, asam nukleat seluler, sehingga terjadi kerusakan lokal dan disfungsi organ tertentu. Lemak merupakan biomolekul yang rentan terhadap serangan radikal bebas (Droge, 2002).

a. Peroksidasi Lipid

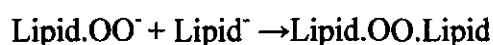
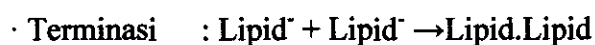
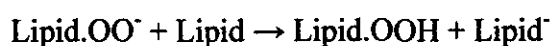
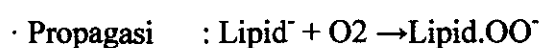
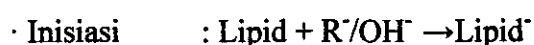
Peroksidasi lipid adalah mekanisme dari trauma sel, baik pada tumbuhan ataupun hewan, dengan demikian peroksidasi lipid digunakan sebagai indikator dari stres oksidatif pada sel dan jaringan. Target utama dari ROS adalah protein, asam lemak tak jenuh dan lipoprotein, serta unsur DNA termasuk karbohidrat dan RNA. Asam lemak tak jenuh merupakan yang paling rentan terhadap serangan ROS (Winarsi, 2007; Valko *et al*, 2007).

Tingginya konsentrasi asam lemak tak jenuh dalam fosfolipid di setiap membran sel tidak hanya membuat mereka menjadi sasaran utama untuk reaksi dengan agen oksidasi tetapi juga memungkinkan mereka untuk berpartisipasi dalam rantai panjang reaksi radikal bebas (Marnet, 2000).

Peroksida lipid yang berasal dari asam lemak tak jenuh ganda, bersifat tak stabil dan terurai membentuk beberapa senyawa kompleks, termasuk senyawa karbonil reaktif, terutama *malondialdehyde* (MDA). MDA secara luas banyak digunakan sebagai salah satu indikator peroksidasi lipid yang dapat ditentukan

dalam suatu pengukuran dengan menggunakan asam tiobarbiturat. Metode pengukuran ini disebut *TBA-reactant* substansi (TBARs) (Winarsi, 2007).

Schafer *et al.*, (2000) mengatakan bahwa peroksidasi lipid yang diperantarai ROS mempunyai tiga komponen utama reaksi, yaitu reaksi inisiasi, propagasi, dan terminasi:



b. Kerusakan protein

Protein dan asam nukleat lebih tahan terhadap radikal bebas daripada PUFA, sehingga kecil kemungkinan dalam terjadinya reaksi berantai yang cepat. Serangan radikal bebas terhadap protein sangat jarang kecuali bila sangat ekstensif, ini terjadi hanya jika radikal tersebut mampu berakumulasi (jarang pada sel normal), atau bila kerusakannya terfokus pada daerah tertentu dalam protein. Salah satu penyebab kerusakan terfokus adalah jika protein berikatan dengan ion logam transisi (Proctor, 1984)

c. Kerusakan DNA

Seperti pada protein kecil kemungkinan terjadinya kerusakan di DNA menjadi suatu reaksi berantai, biasanya kerusakan terjadi bila ada lesi pada susunan molekul, apabila tidak dapat diatasi, dan terjadi sebelum replikasi maka

akan terjadi mutasi. Radikal oksigen dapat menyerang DNA jika terbentuk disekitar DNA seperti pada radiasi biologis (Allen, 2000).

2.2.4 *Malondialdehyde (MDA)*

Malondialdehyde (MDA) adalah salah satu golongan aldehid yang dihasilkan akibat peroksidasi lipid PUFA yang mempunyai lebih banyak ikatan rangkap seperti asam oleat, asam arakhidonat, dan *decoxahecanoid* (DHA) membran. Sehingga pengukuran MDA sering digunakan sebagai indikator peroksidasi lipid jaringan (Mc Kee, 2003). Senyawa ini memiliki tiga rantai karbon dengan rumus molekul $C_3H_4O_2$. MDA pada keadaan normal dioksidasi secara cepat menjadi asetat atau malonat dan melalui siklus krebs diubah menjadi karbondioksida. MDA dapat berikatan dengan asam amino bebas sehingga terjadi modifikasi protein yang akan menjadi antigen yang selanjutnya menjadi autoantibodi. MDA dapat berikatan dan berpolimerisasi dengan komponen membran sel dan membran organel sehingga merusak susunan dan fungsi membran seperti transport ion, aktifitas enzim, dan kemampuan permukaan sel dalam menentukan agregasi. Keadaan ini bisa merusak integritas sel dan jaringan karena MDA dapat berdifusi maka akan bereaksi dengan basa nitrogen dari DNA sehingga MDA mempunyai efek mutagenik, genotoksik, dan karsinogenik (Dachlan dkk., 2011).

Tingginya konsentrasi MDA menunjukkan adanya proses oksidasi dalam membran sel. MDA dapat bereaksi dengan komponen nukleofilik atau elektrofilik. MDA dapat berikatan dengan berbagai molekul biologis seperti

protein, asam nukleat, dan amino fosfolipid secara kovalen (Winarsi, 2007). *Malondialdehyde* (MDA) yang mempunyai berat molekul rendah ini adalah satu dari beberapa molekul hasil penguraian endoperoksida lipid yang terbentuk selama proses peroksidasi lipid (Mardiani, 2008).

2.3 Tinjauan Tentang Antioksidan

Antioksidan adalah substansi yang diperlukan tubuh untuk menetralkan radikal bebas dan mencegah kerusakan yang ditimbulkan oleh radikal bebas terhadap sel normal, protein, dan lemak (Iswara, 2009). Antioksidan berfungsi untuk menangkal atau meredam efek negatif oksidan dalam tubuh, bekerja dengan cara mendonorkan satu elektronnya kepada senyawa yang bersifat oksidan sehingga aktifitas senyawa oksidan tersebut dapat dihambat (Winarsi, 2007).

Antioksidan dikelompokkan menjadi 2, yaitu :

1. Antioksidan enzimatis
2. Antioksidan non enzimatis

2.3.1. Antioksidan Enzimatis

Antioksidan enzimatis merupakan antioksidan endogenus, yang termasuk di dalamnya adalah enzim superoksida dismutase (SOD), katalase, glutathion peroksidase (GSH-PX), serta glutathion reduktase (GSH-R) (Tuminah, 2000). Sebagai antioksidan, enzim-enzim ini bekerja menghambat pembentukan radikal bebas, dengan cara memutuskan reaksi berantai (polimerisasi), kemudian

mengubahnya menjadi produk yang lebih stabil, sehingga antioksidan kelompok ini disebut juga *chain-breaking-antioxidant* (Winarsi, 2007).

Enzim katalase dan glutathion peroksidase bekerja dengan cara mengubah H_2O_2 menjadi H_2O dan O_2 sedangkan SOD bekerja dengan cara mengkatalisis reaksi dismutasi dari radikal anion superoksida menjadi H_2O_2 (Langseth, 1995; Winarsi, 2007).

2.3.2. Antioksidan Nonenzimatis

Antioksidan non-enzimatis disebut juga antioksidan eksogenus, antioksidan ini bekerja secara preventif, dimana terbentuknya senyawa oksigen reaktif dihambat dengan cara pengkelatan metal, atau dirusak pembentukannya (Winarsi, 2007). Antioksidan non-enzimatis bisa didapat dari komponen nutrisi sayuran, buah dan rempah-rempah. Komponen yang bersifat antioksidan dalam sayuran, buah dan rempah-rempah meliputi vitamin C, vitamin E, β -karoten, flavonoid, isoflavon, flavon, antosianin, katekin dan isokatekin (Kahkonen, *et al*, 1999). Senyawa-senyawa fitokimia ini membantu melindungi sel dari kerusakan oksidatif yang disebabkan oleh radikal bebas.

2.4 Tinjauan Vitamin E

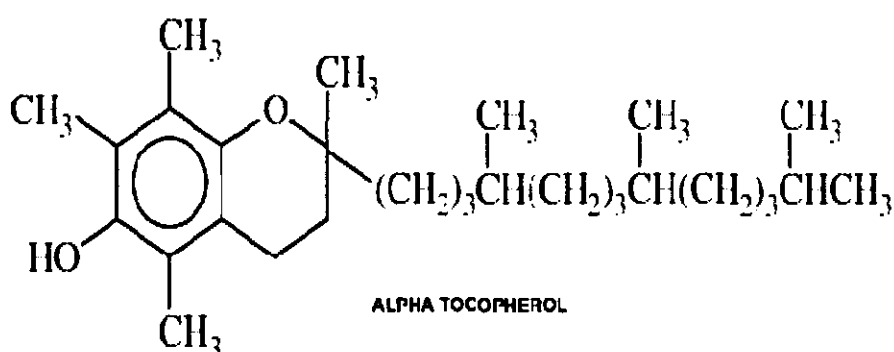
Istilah vitamin E sering digunakan untuk menyatakan setiap campuran dari tocopherol yang aktif secara biologis. Tocopherol adalah suatu antioksidan yang sangat efektif, yang dengan mudah menyumbangkan atom hidrogen pada gugus

hidroksil (OH) dari struktur cincin ke radikal bebas sehingga radikal bebas menjadi tidak reaktif (Silalahi, 2006).

Tocopherol pertama kali ditemukan tahun 1922 dan merupakan vitamin yang larut dalam lemak (Burton, 1994). Vitamin ini secara alami memiliki 8 isomer yang dikelompokkan dalam 4 tocopherol ($\alpha, \beta, \gamma, \delta$) dan 4 tocotrienol ($\alpha, \beta, \gamma, \delta$) (Sareharto, 2010).

2.4.1 Sifat Kimia Vitamin E

Vitamin E merupakan salah satu vitamin yang larut dalam lemak yang melindungi tubuh dari radikal bebas. Bentuk vitamin E ini dibedakan berdasarkan letak berbagai grup metil pada cincin fenil rantai cabang molekul dan ketidakjenuhan rantai cabang. α -tocopherol merupakan bentuk tokoferol yang paling aktif dan paling penting untuk aktivitas biologi tubuh, sehingga aktivitas vitamin E diukur sebagai α -tocopherol (Sudjadi dan Rohman, 2008). Struktur kimia vitamin E (α -tocopherol) ditunjukkan pada Gambar 2.3.



Gambar 2.3 Struktur Bangun Vitamin E (α -tocopherol) (Sulistiyowati, 2006).

2.4.2 Metabolisme Vitamin E

Vitamin E terdiri atas 2 kelas substansi aktif biologis yaitu tocopherol dan tocotrienol, dimana yang terpenting adalah α -tocopherol. Struktur kimia vitamin E terdiri atas rantai samping gugus merupakan nukleus *methylated 6-chromanol* (3,4-dihydro-2H-1-benzopyran-6-ol), kemudian 3 unit isoprenoid, dan ikatan ester atau hidroksil bebas pada C-6 dari nukleus chromanol (Mustacich *et al.*, 2007).

Seperti vitamin larut lemak yang lain, vitamin E diabsorpsi di usus halus secara difusi, absorpsinya tergantung adanya lemak dalam diet, fungsi kelenjar biliar dan pankreas yang baik. Vitamin E tidak mempunyai protein pembawa yang spesifik dalam plasma, vitamin E yang terabsorpsi bergabung ke dalam kilomikron, yang secara cepat berpindah ke lipoprotein plasma dimana dia terikat tidak spesifik (Sareharto, 2010).

Vitamin E ditangkap oleh hepar dan bergabung dengan *Very-Low-Density Lipoprotein* (VLDL), lebih banyak dalam bentuk α -tocopherol dibanding bentuk yang lain, untuk kemudian disekresikan kembali. Sebagian besar sisa VLDL kaya trigliserida akan kembali ke hepar, sebagian lagi berubah oleh lipoprotein lipase menjadi *Low-Density Lipoprotein* (LDL). Selama proses ini vitamin E juga secara spontan berpindah ke lipoprotein densitas tinggi (*High-Density Lipoprotein* / HDL). Tocopherol plasma lebih banyak didistribusikan oleh LDL dan HDL. Transpor vitamin E oleh *polyunsaturated lipids* menjamin perlindungan lipid tersebut terhadap radikal bebas, kadar tocopherol yang bersirkulasi cenderung sesuai dengan kadar total lipid dan kolesterol (Mustacich *et al.*, 2007).

Masuknya vitamin E ke dalam sel dapat terjadi melalui proses mediasi reseptor (LDL membawa vitamin ini ke dalam sel) atau melalui proses yang dibantu oleh lipoprotein lipase dimana vitamin E dilepaskan dari kilomikron dan VLDL. Di dalam sel, transpor intraseluler dari tocopherol membutuhkan protein pengikat tocopherol intraseluler. Vitamin E pada sebagian besar sel-sel non adiposa terdapat pada membran sel dimana dapat dimobilisasi (Gallagher, 2004).

2.4.3 Vitamin E Sebagai Antioksidan

Manfaat paling besar dari vitamin E adalah kemampuannya sebagai antioksidan. Vitamin E berkolaborasi dengan oksigen menghancurkan radikal bebas. Secara umum, manfaat dari vitamin E antara lain mencegah penyakit hati, mengurangi kelelahan, membantu memperlambat penuaan karena oksidasi, mensuplai oksigen ke darah, menguatkan dinding pembuluh kapiler darah dan juga membantu mencegah sterilitas (Iswara, 2009). Vitamin ini berfungsi sebagai pelindung terhadap peroksidasi lemak di dalam membran (Sulistyowati, 2006).

Vitamin E merupakan antioksidan larut lemak dalam sel. Berada pada bagian lemak dalam membran sel, melindungi fosfolipid *unsaturated* dalam membran dari degradasi oksidatif terhadap oksigen reaktif spesies yang tinggi dan radikal bebas yang lain. Vitamin E dikenal sebagai komponen penting dari sistem pertahanan antioksidan seluler, yang melibatkan enzim-enzim yang lain seperti superoksida dismutase (SODs), glutathion peroksidase (GPXs), glutathion reduktase (GR), katalase, tioredoksin reduktase (TR), dan faktor-faktor non enzim

(misalnya glutation, asam urat), yang mana banyak tergantung pada zat gizi esensial yang lain (Sareharto, 2010).

Vitamin E merupakan antioksidan nonenzimatis yang melindungi membran sel dari oksidasi oleh radikal bebas. Vitamin ini mampu mengendalikan peroksida lemak dengan menyumbangkan hidrogen ke dalam reaksi yang mampu mengubah radikal peroksil (hasil peroksidasi lipid) menjadi radikal tocopherol yang kurang reaktif, sehingga tidak mampu merusak rantai asam lemak dan selanjutnya melindungi sel dari kerusakan (Hariyatmi, 2004). Vitamin ini berada di dalam lapisan fosfolipid membran sel yang akan melindungi asam lemak jenuh dan komponen membran sel lain dari oksidasi radikal bebas dengan memutuskan rantai peroksida lipid yang banyak muncul karena adanya reaksi antara lipid dan radikal bebas (Iswara, 2009). Maka, oleh karena itu, α -tokoferol ini mampu sebagai pemutus rantai peroksida lemak pada membran dan *Low Density Lipoprotein*. Vitamin E yang larut dalam lemak merupakan antioksidan yang melindungi *Poly Unsaturated Fatty Acids* (PUFAs) dan komponen sel serta membran sel dari oksidasi oleh radikal bebas (Hariyatmi, 2004).

2.4.4 Vitamin E Terhadap Fungsi Reproduksi

Vitamin E merupakan antioksidan pemecah rantai utama dan terdapat pada cairan ekstrasel. Vitamin E dapat menetralkan hidroksil, superoksida, dan radikal hidrogen peroksida dan mencegah aglutinasi sperma (Agarwal *et al.*, 2005). Penelitian terhadap kualitas semen dan parameter biokimia pada kelinci jantan yang diberikan vitamin E dan minuman suplemen atau kombinasinya dapat

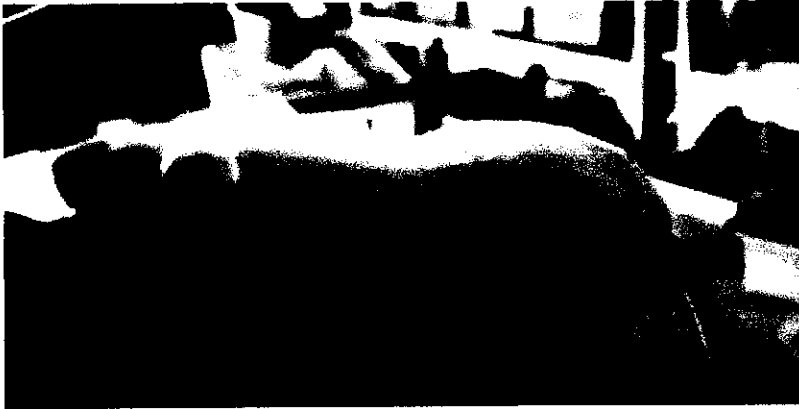
mengurangi produksi radikal bebas dan dapat memperbaiki kualitas cairan semen kelinci (Yousef *et al.*, 2003).

Vitamin E sedikit ditemui jumlahnya pada cairan semen laki-laki infertil. Vitamin E meningkatkan jumlah sperma secara *invivo* pada laki-laki infertil dengan dosis antara 200-1000 mg/hari (Agarwal *et al.*, 2005). Penelitian (Acharya *et al.*, 2006), terhadap testis tikus yang diberi cadmium (Cd) dengan memberikan suplemen vitamin E dengan dosis 100 mg/kg berat badan menurunkan kadar peroksidasi lipid, meningkatkan jumlah sperma, menurunkan persentase sperma abnormal, meningkatkan aktifitas enzim antioksidan.

2.5 Tinjauan Tentang Mencit (*Mus musculus*)

Mencit (*Mus musculus*) merupakan hewan yang paling banyak digunakan sebagai hewan model untuk percobaan laboratorium dengan kisaran 40-80% (Setyadi, 2006). Hal ini disebabkan karena mencit sangat produktif dan mudah dipelihara dalam jumlah banyak, harganya relatif murah, variasi genetiknya cukup besar serta anatomi dan fisiologisnya terkarakteristik dengan baik (Yossa, 2008).

Mencit membutuhkan makanan setiap harinya sekitar 3-5 g, faktor yang perlu diperhatikan dalam memberikan makanan kepada mencit diantaranya yaitu kualitas pakan bahan pangan terutama daya cerna dan palatabilitas. Hal ini dikarenakan kualitas makanan mencit akan berpengaruh terhadap kondisi mencit secara keseluruhan diantaranya kemampuan untuk tumbuh dan berkembangbiak ataupun perlakuan terhadap pengobatan (Alvernita, 2011).



Gambar 2.4 Mencit Galur Balb/c

Klasifikasi mencit menurut Riskana (1999) adalah sebagai berikut :

Kingdom : Animalia

Filum : Chordota

Sub Filum : Vertebrata

Kelas : Mamalia

Ordo : Rodentia

Sub Ordo : Myomorpha

Famili : Muridae

Genus : Mus

Spesies : *Mus musculus*

Mencit (*Mus musculus*) dewasa memiliki berat badan sekitar 20-40 g pada hewan jantan sedangkan 18-35 g pada hewan betina (Alvernita, 2011). Mencit memiliki beberapa data biologis, menurut Mangkoewidjojo dan Smith(1998) berdasarkan Tabel 2. 2.

Tabel 2.2 Data Biologis Mencit

Lama hidup	1-2 tahun
Pubertas	28-49 hari
Umur dikawinkan	8 minggu
Status kelamin	Poliestrus
Berat dewasa	Jantan :20-40 gram Betina :18-35 gram
Kebutuhan air	<i>ad libitum</i>
Kebutuhan pakan per hari	4-5 gram
Protein	20-25 %
Lemak	5-12 %
Serat kasar	2,5%
Karbohidrat	45-60%

2.6 Tinjauan Tentang Fisiologi Reproduksi Mencit Jantan

Sistem reproduksi mencit jantan terdiri dari sepasang testis yang dibungkus skrotum, epididimis dan vas deferens, kelenjar aseptoris, uretra dan penis. Pada awal pembentukan sampai menjelang kelahiran, testis mencit berada dalam rongga abdomen, kemudian testis tersebut turun dan masuk ke dalam skrotum setelah beberapa hari dilahirkan (Rugh, 1976). Turunnya testis ke dalam skrotum, dimaksudkan agar suhu sekitar testis tersebut lebih rendah dari suhu rongga abdomen. Suhu testis mamalia berkisar antara 1°C - 8°C lebih rendah daripada suhu rongga abdomen. Pada mencit suhu testis 28,5 °C dan suhu rongga abdomen 37,1°C (Amir, 1992).

2.6.1 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 (Syahrums, 1994).

Lebih dari 90% testis terdiri dari tubulus seminiferus yang merupakan tempat menghasilkan spermatozoa. Tubulus tersebut tersusun berliku-liku di dalam testis dan sangat panjang. Pada mencit jantan muda struktur tubulus terdiri dari epithelium lembaga yang menghasilkan sel-sel spermatogonia dan sel sertoli. Pada jantan yang lebih tua spermatogonia tumbuh menjadi spermatosit primer yang setelah pembelahan meiosis pertama tumbuh menjadi spermatosid sekunder haploid. Spermatosid sekunder akan menjadi spermatid yang menjalani spermatogenesis yang akhirnya akan menjadi spermatozoa yang terdiri dari kepala, tubuh dan ekor (Nalbandov, 1990).

Dinding tubulus seminiferus terdiri dari tiga lapisan dari luar ke dalam yaitu tunika propria, lamina basalis, dan lapisan epithelium. Tunika propria terdiri dari beberapa lapisan fibroblast dan berfungsi sebagai alat transportasi sel spermatozoa dari tubulus ke epididimis dengan cara berkontraksi. Lapisan epitel terdiri dari dua macam sel yaitu sel spermatogenik (sel benih) dan sel sertoli (Junquiera, *et al.*, 1998).

Epididimis terletak pada bagian dorsolateral testis, merupakan suatu struktur memanjang dari bagian atas sampai bagian bawah testis yang panjangnya mencapai 4m sampai 6m. Organ ini terdiri dari bagian caput, korpus dan kauda epididimis (Rugh, 1968). Dari tubulus seminiferus testis, spermatozoa lewat ke dalam saluran mengulir pada epididimis. Selama perjalanan ini, spermatozoa

menjadi motil dan mendapatkan kemampuan untuk membuahi (Campbell *et al.*, 2004).

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. Bagian tunika memasuki testis dan bagian arteri testikular yang masuk disebut sebagai hilus. Arteri memberi nutrisi setiap bagian testis, dan kemudian akan kontak dengan vena testikular yang menghasilkan hilus (Rugh, 1976).

2.6.2 Tubulus Seminiferus

Tubulus seminiferus terdiri atas suatu lapisan jaringan ikat fibrosa, lamina basalis yang berkembang baik, dan suatu epitel germinal kompleks 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-sel mioid gepeng yang memperlihatkan ciri otot polos. Epitel tubulus seminiferus terdiri atas dua jenis sel yaitu sel sertoli atau sel penyokong dan sel-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 interstisial, terdiri atas gumpalan sel leydig ataupun sel sertoli dan kaya akan darah dan cairan limfe. Sel interstisial testis mempunyai inti bulat yang besar dan mengandung granul yang kasar. Sitoplasmanya bersifat eosinofilik. Diyakini

bahwa jaringan interstitial menguraikan hormon testosteron jantan. Epitel seminiferus tidak mengandung sel spermatogenik secara eksklusif, tetapi mempunyai nutrisi yang menjaga sel sertoli, yang tidak dijumpai di tubuh lain. Sel sertoli bersentuhan dengan dasarnya ke membran basalis dan menuju lumen tubulus seminiferus (Rugh, 1976). Gambaran histopatologi potongan melintang tubulus seminiferus testis ditampilkan pada Gambar 2.5 di bawah ini.



Gambar 2.5 Sayatan Histologi Testis Tubulus Seminiferus (Hill, 2009)

Setiap tubulus ini dilapisi oleh epitel berlapis majemuk. Garis tengahnya lebih kurang 150-250 μm dan panjangnya 30-70 cm. Panjang seluruh tubulus satu testis mencapai 250 m. Tubulus kontortus ini membentuk jalinan yang tempat masing-masing tubulus berakhir buntu atau dapat bercabang. Pada ujung setiap lobulus, lumennya menyempit dan berlanjut ke dalam ruas pendek yang dikenal sebagai tubulus rektus, atau tubulus lurus, yang menghubungkan tubulus seminiferus dengan labirin saluran-saluran berlapis epitel yang berkesinambungan

yaitu rete testis. Rete ini, terdapat dalam jaringan ikat mediastinum yang dihubungkan dengan bagian kepala epididimis oleh 10-20 duktus eferent (Janqueira, 2005).

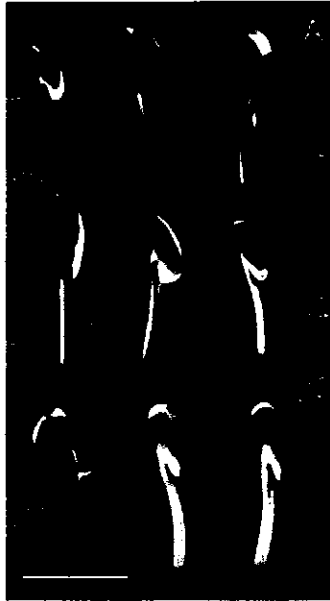
Pada mencit, siklus epitel seminiferus terdiri dari 12 stadium. Waktu yang diperlukan untuk satu siklus epitel seminiferus pada mencit antara 201-203 jam (8-9 hari). Dengan demikian waktu seluruhnya yang diperlukan untuk proses spermatogenesis yang terdiri dari empat siklus epitel seminiferus adalah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

2.6.3 Spermatozoa Mencit

Spermatozoa pada umumnya memiliki empat bagian utama, yaitu kepala, akrosom, bagian tengah dan ekor. Kepala terutama terdiri dari nukleus, yang mengandung informasi genetik (Sherwood, 2001). Menurut Rugh (1968), spermatozoa mencit yang normal terbagi atas bagian kepala yang bengkok seperti kait, bagian tengah yang pendek dan bagian ekor yang sangat panjang. Panjang bagian kepala kurang lebih 0,0080 mm sedangkan panjang spermatozoa seluruhnya sekitar 0,1226 (122,6 mikron). Gambaran struktur spermatozoa mencit dengan kepala seperti kait ditampilkan pada Gambar 2.6.

Kualitas spermatozoa meliputi beberapa aspek, yaitu motilitas spermatozoa yang dapat dibagi menjadi tiga kriteria (motilitas baik, motilitas kurang baik dan tidak motil), morfologi spermatozoa meliputi bentuknya (normal atau abnormal, abnormalitas dapat terjadi pada kepala, *midpiece* atau ekor),

konsentrasi atau jumlah spermatozoa dan viabilitas (daya hidup) spermatozoa (Asfahani *et al.*, 2010).



Gambar 2.6 Sel Spermatozoa Mencit (Subratha, 1998)

2.6.4 Sel-Sel Germinal

Sel germinal primordial mencit jantan muncul sekitar 8 hari kebuntingan dengan jumlah hanya 100, yang merupakan awal dari jutaan spermatozoa yang akan dirproduksi dan masih berada di daerah ekstra gonad. Karena sel germinal kaya akan alkanin fosfatase untuk mensuplai energi pergerakannya melalui jaringan embrio, maka sel germinal dapat dikenal dengan teknik pewarnaan. Pada hari ke-9 dan ke-10 kebuntingan, sebagian mengalami degenerasi dan sebagian lain mengalami proliferasi dan bahkan bergerak (pada hari ke-11 dan ke-12) ke daerah genitalia. Pada saat itu jumlahnya mencapai sekitar 5000 dan proses identifikasi testis dapat dilakukan. Proses proliferasi dan diferensiasi berlangsung di daerah medulla testis. Menuju akhir masa fetus, aktivitas mitosis sel germinal primordial dalam bagian genitalia berkurang dan beberapa sel mulai degenerasi

menjelang hari ke-19 kebuntingan. Tidak berapa lama setelah kelahiran, sel tampak lebih besar, yaitu spermatogonia. Setelah itu akan ada spermatogonia dalam testis mencit sepanjang hidupnya dan terdapat 3 jenis spermatogonia : tipe A, tipe intermediate dan tipe B (Rugh, 1976).

2.6.5 Jaringan Interstisial

Celah di antara tubulus seminiferus dalam testis diisi kumpulan jaringan ikat, saraf, pembuluh darah dan limfe. Kapiler testis adalah dari jenis bertingkat yang memungkinkan perpindahan antar molekul 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 interstisial atau sel leydig dari testis, yang memiliki ciri sel pensekresi steroid. Sel-sel ini menghasilkan hormon pria testosterone yang berfungsi bagi perkembangan ciri kelamin pria sekunder (Junqueira, 2005).

Sel leydig merupakan sel yang memberikan gambaran mencolok untuk jaringan tersebut. Sel-sel leydig letaknya berkelompok memadat pada daerah segitiga yang terbentuk oleh susunan-susunan tubulus seminiferus. Sel-sel tersebut besar, dengan sitoplasma sering bervakuol pada sajian mikroskop cahaya. Inti selnya mengandung butir-butir kromatin kasar dan anak inti yang jelas. Umumnya pula dijumpai sel yang memiliki dua inti. Sitoplasma sel kaya dengan

benda-benda inklusi seperti titik lipid, dan pada manusia juga mengandung kristaloid berbentuk batang (Leeson *et al.*, 1996).

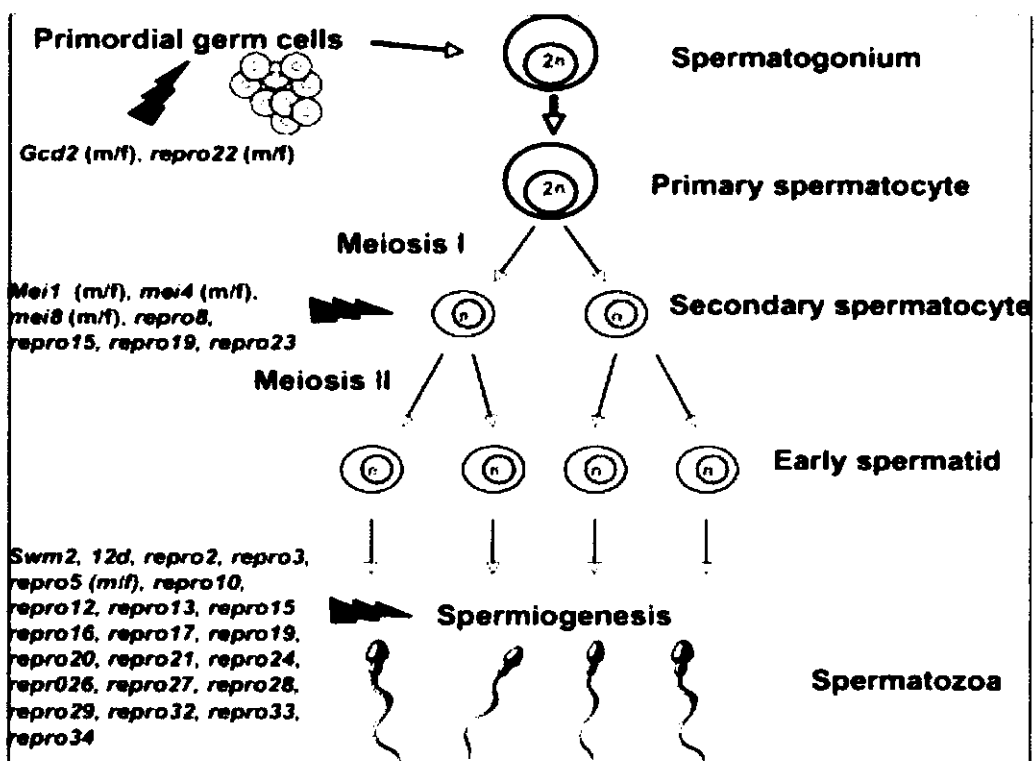
Sel sertoli adalah sel piramid memanjang yang sebagian memeluk sel-sel dari garis keturunan spermatogenik. Dasar sel sertoli melekat pada lamina basalis, sedangkan ujung apeksnya sering meluas ke dalam lumen tubulus seminiferus. Dengan mikroskop cahaya, bentuk sel sertoli tidak jelas terlihat karena banyaknya juluran lateral yang mengelilingi sel spermatogenik. Kajian dengan mikroskop elektron mengungkapkan bahwa sel ini mengandung banyak retikulum endoplasma licin, sedikit retikulum endoplasma kasar, sebuah kompleks golgi yang berkembang baik, dan banyak mitokondria dan lisosom. Inti yang memanjang yang sering berbentuk segitiga, memiliki banyak lipatan dan sebuah anak inti yang mencolok, memiliki sedikit heterokromatin. Fungsi utama sel sertoli adalah untuk menunjang, melindungi dan mengatur nutrisi spermatozoa. Selain itu, sel sertoli juga berfungsi untuk fagositosis kelebihan sitoplasma selama spermatogenesis, sekresi sebuah protein pengikat androgen dan inhibin, dan produksi hormon anti-Mullerian (Junqueira, 2005).

2.6.6 Spermatogenesis

Spermatogenesis merupakan suatu proses pembentukan spermatozoa, mencakup spermasitogenesis dan spermiogenesis (Dorland, 2002). Spermatogenesis ini berlangsung pada epitel germinal di dalam tubulus seminiferus. Spermatogenesis ini terdiri dari dua tahap, yaitu: spermasitogenesis dan spermiogenesis.

a. Spermatositogenesis

Dimulai dengan proliferasi spermatogonia asal yang disebut spermatogonium tipe A yang berinti lonjong dan nukleus di pinggir, menjadi spermatogonium tipe B yang berinti bundar dan bernukleus agak di tengah. Spermatogonium tipe B inilah yang akan berkembang menjadi spermatosit I (primer). Spermatosit I berada di lapisan kedua tubulus ke arah lumen. Pada setiap spermatogonium, salah satu dari pasangan kromosom membawa informasi genetik yang menentukan seks dari turunan terakhir. Pasangan ini terdiri dari satu kromosom "X" dan kromosom "Y" (Tortora dan Derrickson, 2006). Gambaran proses spermatogenesis pada mencit dapat dilihat pada Gambar 2.7 di bawah ini.



Gambar 2.7 Spermatogenesis Mencit (*Mus musculus*) (Subratha, 1998).

Spermatosit I hasil spermatositogenesis ini kemudian menjauh dari lamina basalis dan sitoplasmanya semakin banyak. Spermatosit I mengalami meiosis I,

sehingga terbentuk spermatosit II. Spermatosit II ini kemudian mengalami meiosis II untuk membentuk spermatid. Pada meiosis I, spermatosit I mengalami subfase leptoten, zigoten, pakiten, diploten, dan diakinesis dari profase, disusul metaphase, anaphase, dan telofase. Pada meiosis II, ia juga menempuh profase, metaphase, anaphase, dan telofase. Cytokinesis pada meiosis I dan II tidak membagi sel benih secara lengkap namun terpisah oleh interseluler bridge. Melalui jembatan ini, berlangsung komunikasi antar sel bertetangga. Meiosis I menghasilkan spermatosit II yang berinti lebih gelap yang kemudian mengalami meiosis II untuk membentuk spermatid yang berinti lonjong runcing, mempunyai ekor halus dan pendek dalam sitoplasmanya (Tortora dan Derrickson, 2006).

d. Spermiogenesis

Spermiogenesis adalah perkembangan dari spermatid haploid menjadi spermatozoa. Tidak ada pembelahan sel yang terjadi pada tahap spermiogenesis. Setiap spermatid menjadi satu sel spermatozoa. Selama proses ini, spermatid berubah menjadi spermatozoa yang panjang dan ramping, sebuah akrosom membentuk tutup dari nukleus yang berkondensasi dan memanjang, flagella berkembang, dan mitokondria membelah. Proses spermatogenesis ini berlangsung di sel sertoli, ketika sel sertoli terdisposisi karena adanya kelebihan sitoplasma yang terkelupas, maka sel sertoli beserta spermatozoa yang ada ikut keluar, proses ini dinamakan spermiasi. Spermatozoa kemudian masuk ke lumen tubulus seminiferus. Cairan di sekresikan oleh sel sertoli mendorong spermatozoa masuk ke saluran di testis (Tortora dan Derrickson, 2006). Spermatozoa merupakan sel germinal jantan matang, yang merupakan unsur generatif semen yang

mengadakan fertilisasi ovum dan mengandung informasi genetik untuk dihantarkan ke zigot oleh yang jantan. Menurut strukturnya, spermatozoa dibedakan menjadi dua kelompok, yaitu yang berflagela dan yang tidak berflagela. Pada hewan umumnya termasuk kelompok yang berflagela. Pada manusia, pergerakan dan fertilitas spermatozoa dimungkinkan karena gerakan flagel melalui medium cairan dengan kecepatan mendekati 1 sampai 4 mm per menit. Spermatozoa normal cenderung untuk bergerak lurus daripada gerakan berputar-putar. Aktifitas spermatozoa lebih meningkat pada medium netral dan sedikit basa seperti yang terdapat pada semen ejakulasi, tetapi akan sangat ditekan dalam medium yang agak asam dan medium yang sangat asam dapat mematikan spermatozoa. Aktifitas spermatozoa akan meningkat dengan peningkatan suhu, demikian juga halnya kecepatan metabolisme, menyebabkan hidup spermatozoa dapat dipersingkat (Guyton, 2006).

BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS

BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual

Testis sebagai tempat berlangsungnya spermatogenesis bersifat sangat rentan terhadap proses oksidasi oleh radikal bebas. Radikal bebas ini akan menimbulkan gangguan pada spermatogenesis dan membran spermatozoa. Membran sel spermatozoa mengandung sejumlah besar asam lemak tak jenuh rantai ganda. Bila radikal bebas yang terbentuk bertemu dengan asam lemak tak jenuh ganda dalam membran sel, akan terjadi reaksi peroksidasi lipid dari membran sel tersebut yang mengakibatkan peningkatan fluiditas membran, gangguan integritas membran dan inaktivasi ikatan membran dengan enzim dan reseptor. Hal ini akan menyebabkan peningkatan kerusakan sel termasuk spermatozoa (Suhadi, 1996), berkurangnya ATP intraseluler dengan cepat sehingga berakibat kerusakan aksonema, penurunan viabilitas spermatozoa, meningkatnya kerusakan morfologi midpiece serta kehilangan kemampuan kapasitas dan reaksi akrosom spermatozoa (Sikka, 1996).

Spermatogenesis adalah suatu proses perkembangan sel spermatogenik yang membelah beberapa kali dan akhirnya berdiferensiasi menghasilkan spermatozoa. Sel-sel spermatogenik terdiri atas spermatogonium, spermatosit primer, spermatosit sekunder, spermatid, dan spermatozoa yang tersebar dalam empat sampai delapan lapisan yang menempati ruangan antara lamina basalis dan lumen tubulus. (Hess *et al.*, 2008).

2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) menurunkan hormon GnRH, luteinizing hormone (LH) dan follicle stimulating hormone (FSH) testis, serum testosteron, jumlah spermatozoa, dan merusak struktur testis menciit (Yin *et al.*, 2012).

Penelitian Latchoumycandane *et al.*(2003) pada tikus membuktikan bahwa TCDD menginduksi radikal bebas atau *Reactive Oxygen Spesies* (ROS). TCDD juga meningkatkan hidrogen peroksida dan memicu peroksidasi lipid di mitokondria. Hidrogen peroksida mengganggu pertahanan antioksidan enzimatis seperti *superoxide dismutase* (SOD), katalase, *glutathione reductase*, dan *glutathione peroxidase* di epididimis testis. Selain itu, TCDD menurunkan berat testis, epididimis, vesikula seminalis dan ventral prostat tanpa menurunkan berat badan pada tikus (Latchoumycandane *et al.*2002)

Keadaan normal peningkatan radikal bebas berupa *superoxide anion* (O_2^-) ini akan dinetralsir oleh enzim *superoxide dismutase* (SOD) menjadi *hydrogen peroksida* (H_2O_2). Selanjutnya H_2O_2 oleh enzim katalase atau glutation peroksidase dinetralkan menjadi air (H_2O) dan oksigen (O_2). Namun bila enzim antioksidan tubuh rendah dan tidak mampu menetralsir peningkatan radikal O_2^- ataupun H_2O_2 menjadi air, maka O_2^- yang terbentuk bereaksi dengan H_2O_2 dan bantuan indikator Fe^{2+} dan Cu^{2+} membentuk senyawa radikal hidroksil (HO^{\cdot}) yang mampu menyebabkan kerusakan pada membran sel, protein dan DNA sel. (Gutteridge and Halliwell, 1999)

Menurut Suryohudoyo (2007), akibat yang ditimbulkan reaksi rantai peroksidasi lipid membran sel adalah terputusnya rantai asam lemak menjadi

berbagai senyawa yang bersifat toksik terhadap sel. Senyawa yang terbentuk dan toksik tersebut adalah antara lain berbagai macam aldehida seperti *malondialdehyde* (MDA).

Rantai makanan merupakan jalur utama pemasukan dioksin ke dalam tubuh, baik secara langsung melalui dioksin yang terkandung dalam makanan maupun secara tidak langsung oleh proses pengemasan/pengepakan (Roeder *et al.*, 1998). Oleh karena itu dalam penelitian ini dilakukan metode paparan dioksin secara peroral.

Efek yang paling toksik yang disebabkan oleh TCDD termediasi oleh pengikatan AhR dengan protein kedua yaitu *aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator* (Arnt) dengan jumlah respon unsur-unsur gen target sehingga memodulasi ekspresi gen (Nau, 2006).

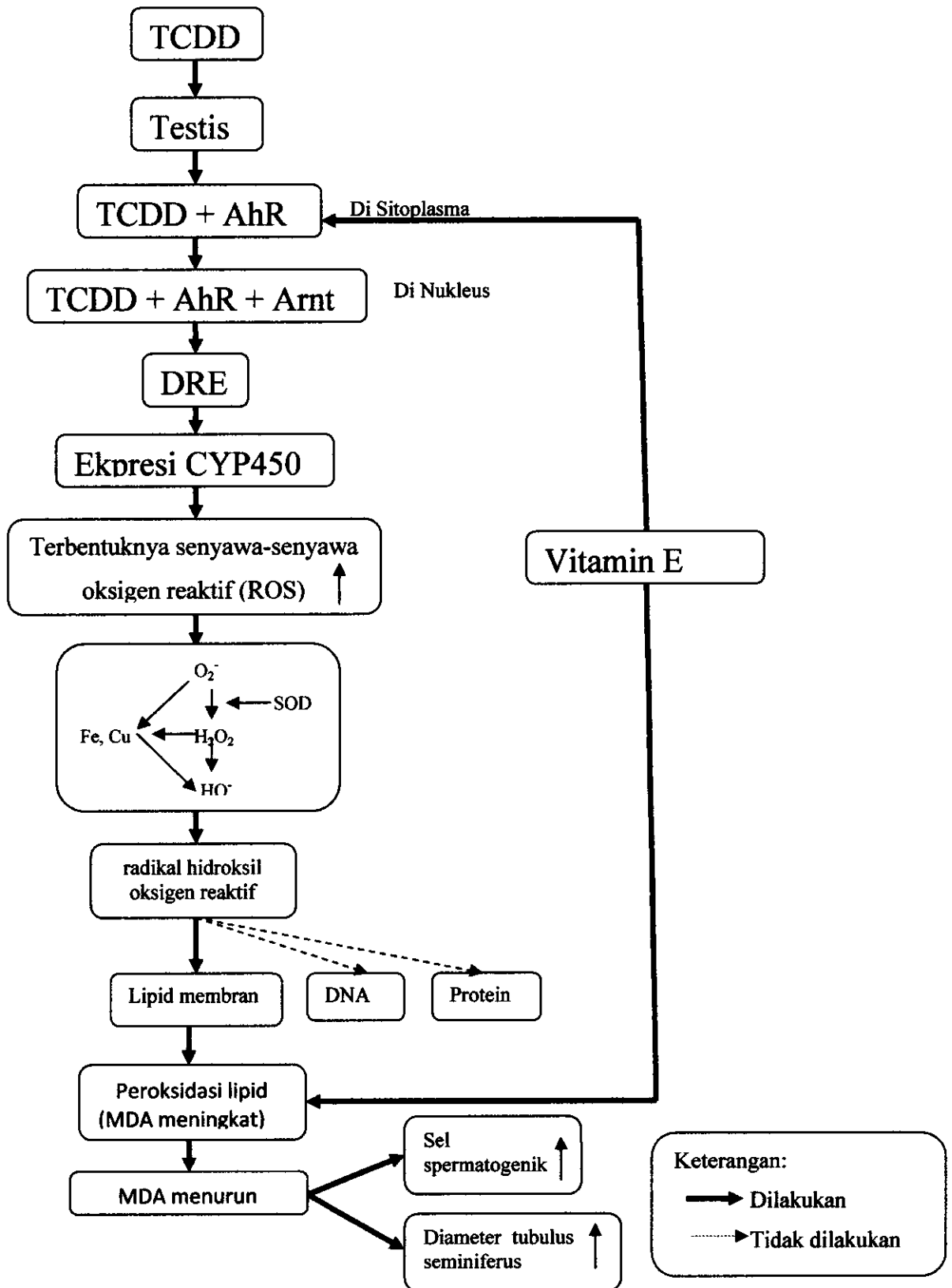
Aktivasi AhR diinduksi dari ekspresi berbagai gen dengan elemen respon xenobiotik di daerahnya enhancer, seperti reseptor sitokrom P450 1A1 (CYP1A1). Hasil penelitian Esser *et al.*, (2005) mengatakan bahwa TCDD mengganggu fisiologis sinyal AhR tersebut, menyebabkan perubahan spesifik sel dalam transkripsi gen dan diferensiasi sel, serta menghasilkan efek toksik.

TCDD yang berikatan AhR memicu perubahan dalam ekspresi *monoamine oxidase* terkait dengan enzim sitokrom P450 yang diaktifkan oleh AhR. Sedangkan vitamin E dapat menghambat transkripsi dan ekspresi dari sitokrom P450 dan gen steroid dehidrogenase melalui penghambatan terhadap AhR. Selain itu vitamin E dapat menurunkan *competitive binding* dari TCDD

terhadap reseptor androgen. Mekanisme tersebut dikenal sebagai mekanisme antioksidan *chain breaking* (Yin *et al.*, 2012).

2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) secara cepat mengikat AhR tanpa mengubah reseptor pada tingkat mRNA, yang mengakibatkan ekspresi sitokrom P450 dalam waktu 2 jam dan mencapai puncak pada 4 jam (Doi *et al.*, 2003), oleh sebab itu dalam penelitian ini vitamin E diberikan 4 jam setelah induksi TCDD.

Lama satu daur epitel seminiferus pada mencit adalah 207 ± 6 jam (Johnson and Everitt, 1990). Penelitian ini dilakukan satu kali siklus epitel yaitu 9 hari untuk mengetahui jumlah sel spermatogenik, gambaran histologi tubulus seminiferus, dan kadar MDA testis mencit oleh paparan TCDD.



Gambar 3.1. Kerangka Konseptual Penelitian

3.2. Hipotesis Penelitian

1. Pemberian vitamin E (*α-tocopherol*) dalam berbagai dosis dapat mempertahankan jumlah sel spermatogenik testis mencit yang diinduksi 2,3,7,8 tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD).
2. Pemberian vitamin E (*α-tocopherol*) dalam berbagai dosis dapat mempertahankan diameter tubulus seminiferus testis mencit yang diinduksi 2,3,7,8 tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD).
3. Pemberian vitamin E (*α-tocopherol*) dalam berbagai dosis dapat menurunkan kadar *malondialdehyde* (MDA) testis mencit yang diinduksi 2,3,7,8 tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD).

BAB 4

MATERI DAN METODE PENELITIAN

BAB 4 MATERI DAN METODE

4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris (*experimental laboratoric*) dengan asumsi semua populasi sama dan memiliki kriteria yang homogen serta karakteristik sama. Pengukuran awal tidak dilakukan karena asumsi semua kelompok berasal dari satu populasi dan objek yang diteliti adalah testis yang harus mengorbankan hewan coba.

Rancangan penelitian yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan lima kelompok perlakuan dan masing-masing terdiri atas 6 ekor mencit. Perlakuan pada tiap kelompok diberikan selama 9 hari berdasarkan satu siklus epitel tubulus seminiferus. Kelompok perlakuan pada penelitian ini meliputi :

- Perlakuan 0 : kelompok kontrol negatif (P0), tanpa diberi TCDD dan hanya pemberian pelarut *corn oil* 0,1ml/ekor/hari peroral selama 9 hari.
- Perlakuan 1 : kelompok kontrol positif perlakuan I (P1), pemberian TCDD dosis 100 ng/kgBB/hari sebanyak 0,1ml/ekor/hari peroral selama 9 hari.
- Perlakuan 2 : kelompok perlakuan II (P2), pemberian TCDD dosis 100 ng/kg/hari sebanyak 0,1ml/ekor/hari peroral, setelah empat jam diikuti pemberian vitamin E dosis 11 mg/kgBB/hari sebanyak 0,1ml/ekor/hari peroral selama 9 hari.

- Perlakuan 3 : Kelompok perlakuan III (P3), pemberian TCDD dosis 100 ng/kg/hari sebanyak 0,1ml/ekor/hari peroral, setelah empat jam diikuti pemberian vitamin E dosis 20 mg/kg/hari sebanyak 0,1ml/ekor/hari peroral selama 9 hari.
- Perlakuan 4 : Kelompok perlakuan IV (P4), pemberian TCDD dosis 100 ng/kg/hari sebanyak 0,1ml/ekor/hari peroral, setelah empat jam diikuti pemberian vitamin E dosis 37 mg/kg/hari sebanyak 0,1ml/ekor/hari peroral selama 9 hari.

4.2 Populasi, Sampel, Besar Sampel, dan Teknik Pengambilan Sampel

4.2.1 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah 30 ekor mencit (*Mus musculus*) jantan strain BALB/c sebagai hewan coba laboratorium. Adapun kriteria subyek penelitian yang digunakan adalah mencit jantan yang sehat, umur 11 minggu dengan berat badan berkisar 20 gram dengan ciri-ciri bulu halus, mata bersinar, tidak pincang, tidak didapatkan adanya bekas luka, belum pernah dikawinkan, dan belum pernah digunakan untuk penelitian lain.

4.2.2 Besar Sampel

Penentuan besar sampel yang digunakan pada penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan menggunakan rumus :

$$t(n - 1) \geq 15.$$

Keterangan : t = jumlah perlakuan

n = ulangan

Dalam penelitian ini $t = 5$, maka ulangan yang dibutuhkan sebanyak:

$$t(n - 1) \geq 15.$$

$$5(n - 1) \geq 15$$

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Hasil perhitungan didapatkan besar ulangan minimal adalah 4 ulangan tiap perlakuan (Kusriningrum, 2009). Dalam penelitian ini digunakan 6 ulangan per perlakuan, dengan jumlah sampel keseluruhan adalah 30 sampel.

4.2.3 Teknik Pengambilan Sampel

Teknik pengambilan sampel yang digunakan adalah *simple random sampling*. Mencit dibagi secara acak menjadi lima kelompok perlakuan penelitian yang masing-masing perlakuan penelitian terdiri dari 6 ekor mencit. Metode pengacakan dilakukan dengan menggunakan program *Statistical Product and Service Solution (SPSS) for Windows 20.0*.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Klasifikasi Variabel

Penelitian ini terdiri dari beberapa variabel:

1. Variabel bebas (*independent variable*) yaitu vitamin E berbagai dosis.
2. Variable antara yaitu TCDD dosis 100ng/kgBB/hari

3. Variabel tergantung (*dependent variable*) yaitu jumlah sel spermatogenik tubulus seminiferus, gambaran histopatologi diameter tubulus seminiferus, dan kadar *Malondialdehyde* (MDA) testis mencit.
4. Variabel Kendali yaitu jenis hewan coba, jenis kelamin, umur, berat badan mencit, pakan dan minuman, kesehatan, kondisi/karakteristik kandang, perawatan hewan coba, dan cara pemberian paparan.

4.3.2 Definisi Operasional Variabel

1. Sel spermatogenik adalah sel yang terlibat dalam spermatogenesis di tubulus seminiferus meliputi spermatogonium, spermatosit primer, spermatosit sekunder, spermatid, dan spermatozoa.
2. Gambaran histopatologi diameter tubulus seminiferus adalah jarak terdekat antara 2 titik yang bersebrangan pada garis tengah tubulus.
3. Kadar *Malondialdehyde* (MDA) testis mencit adalah produk akhir peroksidasi lipid, digunakan sebagai biomarker biologis peroksidasi lipid untuk menilai stres oksidatif.

4.4 Bahan Penelitian

Bahan pada penelitian ini meliputi: 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) dan Vitamin E (*α-tocopherol*) Sigma T3251 *for analytical standart* yang diperoleh dari Sigma Aldrich Singapore. Minyak jagung yang digunakan adalah Mazola[®]-Codaa Switzerland AG. Pakan mencit yang digunakan adalah pakan BR1[®]. Air minum yang digunakan adalah air minum kemasan. Formalin 10%

digunakan sebagai pengawet testis mencit setelah dipanen untuk dibuat preparat histopatologi. *Dry ice* digunakan sebagai media penyimpanan organ testis mencit untuk diperiksa kadar MDA. Bahan-bahan lain yang digunakan pada penelitian ini adalah bahan-bahan untuk membuat preparat histopatologi meliputi : alkohol (70%, 80%, 90% dan 96%), alkohol absolut (I, II dan III), alkohol asam, amoniak cair, *aquadest*, *egg albumin*, *entellan*, *gliserin*, *paraffin* (I, II dan III), *paraffin* cair, *xylol* (I dan II), pewarna Hematoxylin-Eosin (HE). Bahan-bahan untuk memeriksa kadar MDA antara lain: *Phospat Buffer Saline* (PBS) dingin, larutan *Thiobarbiturat acid* (TBA) 0,37%, larutan *Thichloroacetat acid* (TCA) 15%, dan HCl 0,25 N.

4.5. Instrumen Penelitian

Instrumen-instrumen yang digunakan pada penelitian ini adalah kandang hewan coba berupa kandang individual yang terbuat dari bak plastik, tempat minum beserta *nipple*, dan serbuk gergaji sebagai alas kandang. Instrumen-instrumen lain yang digunakan dalam penelitian ini adalah sonde lambung, botol kaca gelap, masker, *vortex*, *disposable syringe*, *needle*, *hand gloves*, mikrotip, mikropipet, pinset, gunting bedah, *scalpel*, cawan perti, bak seksi, pot plastik, kertas label, kertas koran, *cool box*, *dry ice*, aluminium foil, kantung plastik, mikroskop, dan mikroskop foto. Instrumen-instrumen yang digunakan untuk membuat preparat untuk membuat preparat histopatologi testis mencit meliputi: alat *tissue processor*, *cover glass*, *object glass*, *hot plate*, bak rendam reagen, cetakan besi, kertas tisu, mikrotom, dan *water bath*. Instrumen-instrumen yang

digunakan untuk memeriksa kadar MDA testis mencit meliputi : timbangan digital, tabung reaksi, rak tabung reaksi, sentrifuse effendrop, dan spektrofotometer,

4.6 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Embriologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Gedung *Diagnostic Center* (GDC) Rumah Sakit Umum Daerah (RSUD) Dr. Soetomo, Laboratorium Patologi Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, dan Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Surabaya. Penelitian ini dilakukan selama dua bulan mulai bulan April hingga Mei 2013.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Penentuan Dosis TCDD

Dosis 2,3,7,8-*tetrachlorodibenzo-p-dioxin* (TCDD) yang digunakan untuk penelitian ini adalah dosis tunggal yaitu 100ng/kgBB/hari. Dosis ditentukan berdasarkan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Fujimaki *et al.*, (2002) dan Yin *et al.*, (2012). 2,3,7,8-*tetrachlorodibenzo-p-dioxin* (TCDD) diberikan secara peroral dengan menggunakan sonde lambung selama 9 hari.

4.7.2 Penentuan Dosis Vitamin E

Penentuan dosis vitamin E didasarkan atas penelitian sebelumnya oleh Yin *et al.*, (2012) dengan menggunakan dosis 20,50, dan 500 mg/kgBB/hari,

terdapat fenomena bahwa penghambatan toksisitas TCDD terhadap hormon reproduksi dan struktur jaringan testis oleh vitamin E lebih tinggi pada dosis vitamin E terkecil yaitu 20mg/kgBB/hari, sehingga perlu dilakukan penelitian dengan rentang dosis tengah 20mg/kgBB/hari.

Dosis tertinggi ditentukan berdasarkan konversi dosis manusia. Bahan makanan yang dikonsumsi manusia setiap harinya mengandung 25 IU vitamin E. Kebutuhan maksimal dari vitamin E, manusia memerlukan konsumsi tambahan 100-400 IU/hari. Beberapa penelitian telah menunjukkan bahwa dosis ini merupakan dosis optimal untuk mengurangi resiko penyakit kronis (*Institute of Medicine US*, 2012). Adapun konversi dosis vitamin E manusia ke mencit adalah sebagai berikut:

Tabel 4.1 Konversi Perhitungan Dosis Untuk Beberapa Jenis Hewan dan Manusia (Ghosh,1971)

	Mencit 20 g	Tikus 200g	Marmot 400 g	Kelinci 1,5 kg	Kucing 2 kg	Kera 4kg	Anjing 12 kg	Manusia 70 kg
Mencit 20 g	1,0	7,0	2,25	27,8	29,7	64,1	124,2	387,9
Tikus 200 g	0,14	1,0	1,74	3,9	4,2	9,2	17,8	56,0
Marmot 400 g	0,08	0,57	1,0	2,25	2,4	5,2	10,2	31,5
Kelinci 1,5 kg	0,04	0,25	0,44	1,0	1,08	2,4	4,5	14,2
Kucing 2 kg	0,03	0,23	0,41	0,92	1,0	2,2	4,1	13,0
Kera 4 kg	0,016	0,11	0,19	0,42	0,45	1,0	1,9	6,1
Anjing 12 kg	0,008	0,06	0,10	0,22	0,24	0,52	1,0	3,1
Manusia 70 kg	0,0026	0,018	0,031	0,07	0,076	0,16	0,32	1,0

1. Dosis manusia 125 IU

Konversi manusia ke mencit 20 gram = 0,0026

Dosis untuk mencit 20 gram = 125 x 0,0026 = 0,325 IU

Dosis perkilogram mencit perhari = 16,25 IU/kgBB/hari

1 IU setara dengan 2/3mg

Maka dosis perkilogram mencit perhari 11 mg/kgBB?hari

2. Dosis manusia 425 IU

Konversi manusia ke mencit 20 gram = 0,0026

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

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

1 IU setara dengan 2/3mg

Maka dosis perkilogram mencit perhari 37 mg/kgBB?hari

Dosis vitamin E ditentukan dengan menggunakan rumus:

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

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

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

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

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

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

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

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

Maka penentuan dosis vitamin E yang digunakan secara berurutan adalah :
11, 20 dan 37 mg/kgBB/hari.

4.7.3 Pembuatan Larutan Uji

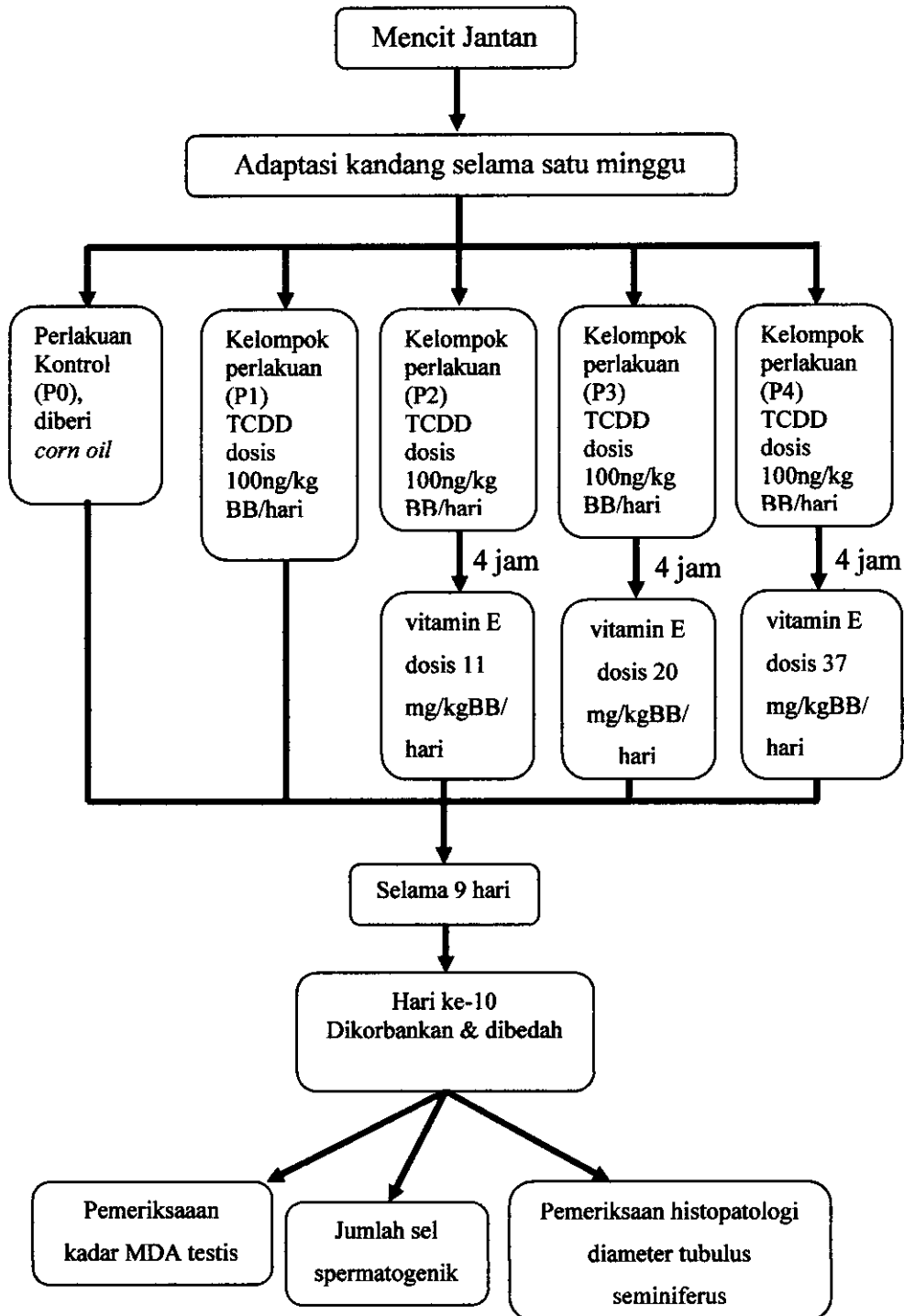
Sediaan TCDD dilarutkan dalam *corn oil*, selanjutnya dimasukkan dalam botol kaca steril. Hal yang sama juga dilakukan pada sediaan vitamin E. Sediaan vitamin E dilarutkan dalam *corn oil*, selanjutnya dibuat seri dosis dalam botol kaca steril. Dosis yang diberikan pada mencit terdiri dari tiga dosis yaitu 11, 20, dan 37mg/kgBB/hari. Setiap botol yang berisi larutan uji diberi label. Pembuatan sediaan TCDD terdapat pada Lampiran 2, dan pembuatan sediaan vitamin E terdapat pada Lampiran 3.

4.7.4 Persiapan Hewan Coba

Mencit ditempatkan di dalam kandang individual yang terbuat dari bahan plastik berukuran 30x20x10 cm yang ditutup dengan kawat kasa. Dasar kandang dilapisi dengan sekam padi setebal 0,5-1 cm dan diganti setiap tiga hari. Cahaya ruangan dikontrol 12 jam terang (pukul 06.00 sampai dengan pukul 18.00) dan 12 jam gelap (pukul 18.00 sampai pukul 06.00), sedangkan suhu dan kelembaban ruangan dibiarkan berada pada kisaran alamiah. Mencit diberi pakan pelet BR-1[®]-PT Comfeed Indonesia Ltd., dan air mineral kemasan *ad libitum* setiap hari. Perlakuan dilakukan setelah satu minggu adaptasi dengan lingkungan.

standar MDA murni dalam berbagai konsentrasi. Kemudian nilai hasil perkalian pada kurva standar baku dikalikan lagi dengan faktor pengenceran yang digunakan. Kadar MDA diukur berdasarkan jumlah μg atau nm MDA pada setiap mg atau ml sampel (Rahman, 2011).

4.8 Bagan Kerangka Operasional



Gambar 4.1 Prosedur Operasional Penelitian

4.9 Analisis Data

Data dipresentasikan dalam bentuk rata-rata \pm standar deviasi (mean \pm SD). Dilakukan uji normalitas dan homogenitas data. Jika data berdistribusi normal dan homogen maka dilakukan uji ANOVA karena data yang diperoleh merupakan data rasio. Bila terdapat perbedaan yang nyata diantara kelompok penelitian ($p < 0,05$), selanjutnya dilanjutkan dengan uji Duncan untuk melihat perbedaan antar kelompok kontrol dan masing-masing perlakuan. Semua analisis data dilakukan dengan menggunakan program SPSS *for Windows* 20,0. (Kusriningrum. 2009).

BAB 5

HASIL PENELITIAN

BAB 5 ANALISIS HASIL PENELITIAN

5.1 Data Sel Spermatogenik Tubulus Seminiferus

Pengamatan terhadap sel spermatogenik meliputi sel spermatogonium, sel spermatosit primer, sel spermatosit sekunder, sel spermatid, dan sel spermatozoa tubulus seminiferus. Pengamatan jumlah sel spermatogenik dilakukan berdasarkan langkah yang telah dijelaskan pada bagian metode. Setiap sampel dilakukan pengamatan jumlah sel spermatogenik dalam lima tubulus seminiferus (Lampiran 6) dan diambil nilai rata-ratanya.

Berdasarkan kumpulan data yang telah diperoleh selama penelitian, jumlah setiap jenis sel spermatogenik yang diperoleh dilanjutkan uji normalitas data (uji *Kolmogrov-Smirnov*), dan semua data diperoleh terdistribusi normal. Kemudian untuk mengetahui perbedaan jumlah setiap jenis sel spermatogenik pada kelompok kontrol negatif (P0) dan kelompok kontrol positif (P1) yang hanya diberi TCDD dengan kelompok perlakuan kombinasi TCDD dan vitamin E dosis 11, 20, dan 37 mg/kg/hari (P2, P3, dan P4) dilakukan analisis statistik dengan menggunakan uji ANOVA (*analysis of variant*) uji F satu arah dengan taraf kepercayaan 95% pada Lampiran 9 dan diperoleh hasil $p < 0,05$. Hasil tersebut menunjukkan perbedaan yang nyata diantara kelompok perlakuan, sehingga dilanjutkan dengan menggunakan uji jarak berganda Duncan untuk mempermudah pengamatan terhadap adanya penurunan atau peningkatan jumlah sel spermatogenik pada setiap kelompok perlakuan (P0 sampai P4). Hasil

pengukuran data rerata dan standar deviasi sel spermatogenik tubulus seminiferus mencit jantan tiap kelompok perlakuan ditunjukkan pada Tabel 5.1 di bawah ini.

Tabel 5.1 Rerata Dan Standar Deviasi Jumlah Sel Spermatogonium, Sel Spermatisit Primer, Sel Spermatisit Sekunder, Sel Spermatisid, Dan Sel Spermatozoa Serta Total Sel Spermatogenik Tubulus Seminiferus 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 Sel Spermatogonium, Spermatisit Primer, Spermatisit Sekunder, Spermatisid, Spermatozoa, dan Total Sel Spermatogenik (buah) (X±SD)					
	Spermato gonium	spermatisit primer	spermatisit sekunder	spermatisid	Spermatozoa	Total sel spermatogenik
P0	38,63 ^b ± 10,49	62,70 ^b ± 14,08	118,83 ^c ± 29,98	84,27 ^c ± 34,87	70,93 ^d ± 20,67	375,37 ^c ± 63,91
P1	19,43 ^a ± 7,23	36,23 ^a ± 9,91	48,37 ^a ± 16,22	35,03 ^a ± 34,82	25,37 ^a ± 17,59	164,43 ^a ± 29,02
P2	21,10 ^a ± 9,43	42,03 ^a ± 15,33	54,97 ^a ± 25,54	48,60 ^{ab} ± 7,76	38,47 ^{ab} ± 9,88	205,17 ^a ± 26,01
P3	27,73 ^{ab} ± 14,34	51,73 ^{ab} ± 16,38	88,53 ^b ± 14,91	58,10 ^{abc} ± 13,50	47,57 ^{bc} ± 15,47	273,67 ^b ± 38,55
P4	28,13 ^{ab} ± 12,39	61,13 ^b ± 13,33	95,53 ^{bc} ± 18,01	71,77 ^{bc} ± 29,84	60,20 ^{cd} ± 18,42	316,77 ^{bc} ± 76,55

Keterangan: Superskrip dengan notasi yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata antar perlakuan ($p < 0.05$).

Setelah dilakukan analisis dengan uji Duncan, maka diperoleh hasil bahwa jumlah sel spermatogonium kelompok kontrol negatif (P0) menunjukkan perbedaan yang nyata ($p < 0,05$) terhadap kelompok kontrol positif (P1) dan kelompok perlakuan kombinasi TCDD dan vitamin E dosis 11 (P2). Pada perlakuan P1, jumlah sel spermatogonium mengalami penurunan. Perlakuan P1 dan P2 tidak berbeda nyata ($p < 0,05$), hal ini berarti penurunan sel spermatogonium P1 dan P2 dianggap setara. Kelompok kontrol negatif (P0) tidak berbeda nyata ($p < 0,05$) dengan kelompok perlakuan kombinasi TCDD dan Vitamin E dosis 20 dan 37 mg/kg/hari (P3 dan P4). Hal ini menunjukkan bahwa

terjadi peningkatan jumlah sel spermatogonium kelompok perlakuan P3 dan P4 dianggap setara dengan kelompok kontrol negatif (P0).

Hasil yang diperoleh pada sel spermatosit primer menunjukkan bahwa kelompok kontrol negatif (P0) memiliki perbedaan yang nyata ($p < 0,05$) terhadap kelompok kontrol positif (P1) maupun kelompok perlakuan kombinasi TCDD dengan vitamin E dosis 11 mg/kg/hari, tetapi tidak berbeda nyata ($p < 0,05$) dengan perlakuan kombinasi TCDD dan vitamin E dosis 20 dan 37 mg/kg/hari (P3 dan P4). Kelompok kontrol positif TCDD (P1) tidak berbeda nyata dengan kelompok perlakuan kombinasi TCDD dengan vitamin E dosis 11 mg/kg/hari (P2), jumlah sel spermatosit primer kontrol positif (P1) mengalami penurunan dibanding kontrol negatif (P0). Kelompok kontrol positif (P1) menunjukkan perbedaan yang nyata ($p < 0,05$) dengan kelompok perlakuan kombinasi TCDD dan vitamin E dosis 37 mg/kg/hari (P4) tetapi tidak berbeda nyata dengan kelompok perlakuan kombinasi TCDD dan vitamin E dosis 20 mg/kg/hari (P3). Perlakuan P3 mulai ada peningkatan jumlah sel spermatosit primer yang tidak berbeda nyata ($p < 0,05$) dengan perlakuan kombinasi TCDD dan vitamin E dosis 37 mg/kg/hari (P4), hal ini berarti jumlah sel spermatosit primer kelompok perlakuan P3 setara dengan kelompok perlakuan P4.

Jumlah sel spermatosit sekunder tertinggi pada kelompok kontrol negatif (P0) yang menunjukkan perbedaan yang nyata ($p < 0,05$) terhadap kelompok kontrol positif (P1), kelompok perlakuan kombinasi TCDD dan vitamin E dosis 11 dan 20 mg/kg/hari (P2 dan P3) tetapi tidak berbeda nyata ($p < 0,05$) dengan perlakuan kombinasi TCDD dan vitamin E dosis 37 mg/kg/hari (P4). Jumlah sel

spermatisit sekunder kelompok kontrol positif (P1) mengalami penurunan dibanding dengan kelompok kontrol negatif (P0). Kelompok kontrol positif (P1) tidak berbeda nyata ($p < 0,05$) dengan kelompok perlakuan kombinasi TCDD dengan vitamin E dosis 11 mg/kg/hari (P2), hal ini menunjukkan jumlah sel spermatisit sekunder P1 setara dengan kelompok P2. Kelompok kontrol positif (P1) menunjukkan perbedaan yang nyata ($p < 0,05$) terhadap kelompok perlakuan kombinasi TCDD dan vitamin E dosis 20 dan 37 mg/kg/hari (P3 dan P4). Tetapi kelompok perlakuan P3 tidak berbeda nyata ($p < 0,05$) dengan kelompok perlakuan P4. Kelompok perlakuan kombinasi TCDD dan vitamin E dosis 37 mg/kg/hari (P4) tidak berbeda nyata dengan kelompok kontrol negatif (P0) yang artinya jumlah sel spermatisit sekunder P4 mengalami peningkatan dan setara dengan perlakuan kontrol negatif (P0).

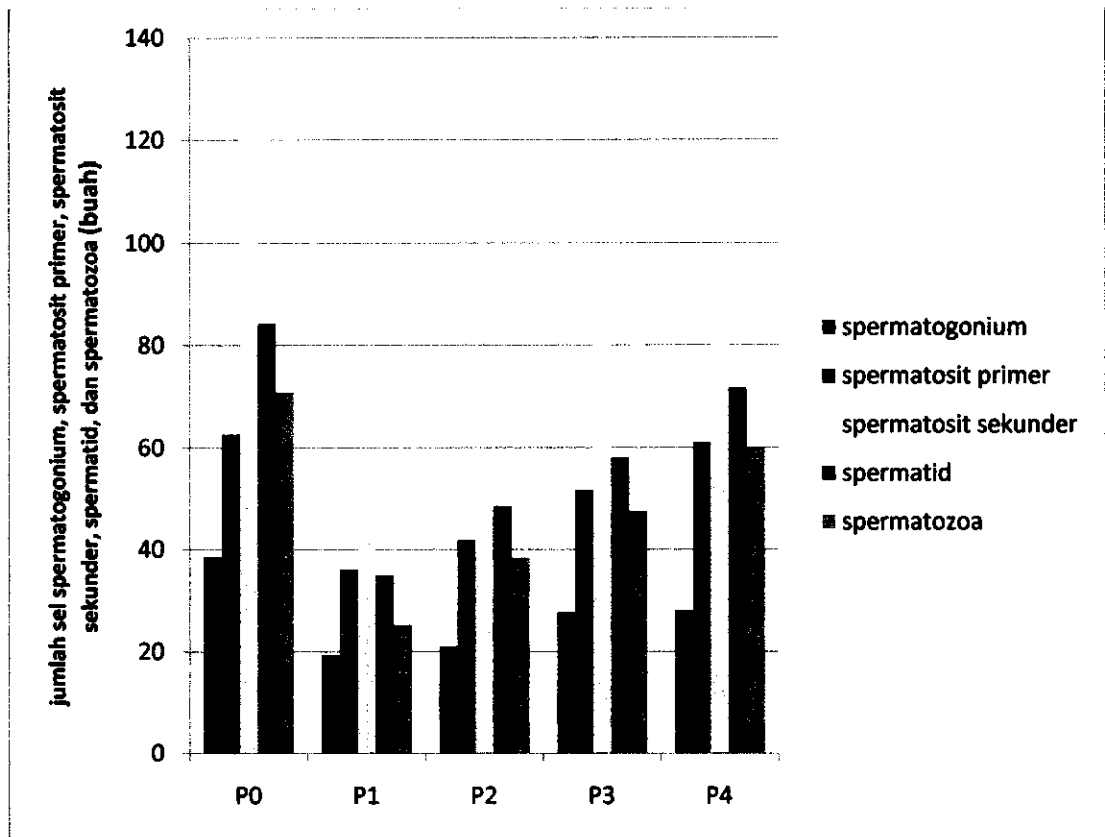
Hasil yang diperoleh pada jumlah sel spermatid menunjukkan bahwa kelompok perlakuan kontrol positif (P1) memiliki jumlah rata-rata sel spermatid terendah diantara kelompok yang lain. Kelompok kontrol positif (P1) menunjukkan adanya perbedaan yang nyata ($p > 0,05$) dengan kelompok kontrol negatif (P0) dan kelompok kombinasi TCDD dan vitamin E 37 mg/kg/hari (P4), tetapi tidak berbeda nyata dengan kelompok perlakuan kombinasi TCDD dan vitamin E dosis 11 dan 20 mg/kg/hari (P2 dan P3). Kelompok perlakuan kontrol negatif (P0) menunjukkan adanya perbedaan yang nyata ($p < 0,05$) terhadap kelompok kontrol positif (P1) dan kelompok perlakuan kombinasi TCDD dan vitamin E dosis 11 mg/kg/hari (P2) tetapi tidak berbeda nyata dengan kelompok perlakuan kombinasi TCDD dan vitamin E dosis 20 dan 37 mg/kg/hari. Hal ini

menunjukkan jumlah sel spermatid kelompok perlakuan P3 dan P4 setara dengan kelompok kontrol negatif (P0).

Data yang diperoleh pada jumlah sel spermatozoa menunjukkan bahwa kelompok perlakuan kontrol negatif (P0) berbeda nyata ($p < 0,05$) dengan kelompok kontrol positif (P1), kelompok perlakuan kombinasi TCDD dan vitamin E dosis 11 dan 20 mg/kg/hari (P2 dan P3) tetapi tidak berbeda nyata dengan kelompok kombinasi TCDD dan vitamin E dosis 37 mg/kg/hari (P4) yang artinya jumlah sel spermatozoa kelompok P0 setara dengan kelompok perlakuan P4. Kelompok kontrol positif (P1) tidak berbeda nyata dengan kelompok kombinasi TCDD dan vitamin E dosis 11 mg/kg/hari (P2). Kelompok perlakuan P2 tidak berbeda nyata dengan kelompok perlakuan kombinasi TCDD dan vitamin E dosis 20 mg/kg/hari (P3), perlakuan P3 juga tidak berbeda nyata dengan perlakuan kombinasi TCDD dan vitamin E dosis 37 mg/kg/hari (P4).

Total sel spermatogenik merupakan jumlah dari sel spermatogonium, sel spermatosit primer, sel spermatosit sekunder, sel spermatid dan sel spermatozoa. Total sel spermatogenik tertinggi didapatkan pada kelompok kontrol negatif (P0) yang tidak berbeda nyata ($p < 0,05$) dengan kelompok perlakuan kombinasi TCDD dan vitamin E dosis 37 mg/kg/hari (P4). Kelompok kontrol positif (P1) berbeda nyata ($p < 0,05$) dengan kelompok kontrol negatif (P0), kelompok perlakuan kombinasi TCDD dan vitamin E dosis 20 dan 37 mg/kg/hari (P3 dan P4) tetapi tidak berbeda nyata dengan perlakuan kombinasi TCDD dan vitamin E dosis 11 mg/kg/hari (P2). Perubahan jumlah sel spermatogonium, sel spermatosit primer,

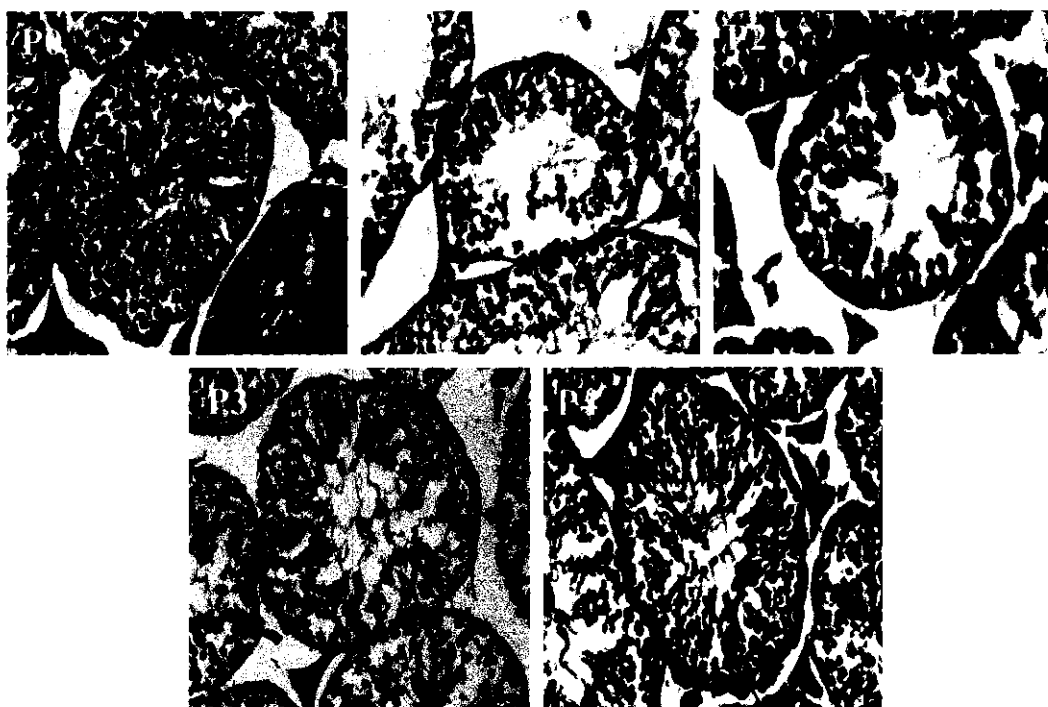
sel spermatosit sekunder, sel spermatid, dan sel spermatozoa pada setiap kelompok perlakuan diilustrasikan pada Gambar 5.1.



Gambar 5.1 Diagram batang rerata jumlah sel spermatogonium, spermatosit primer, spermatosit sekunder, spermatid, dan spermatozoa pada tubulus seminiferus 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).

Gambaran histopatologi jumlah sel spermatogenik tubulus seminiferus pada setiap perlakuan ditunjukkan pada Gambar 5.2. Pada kelompok kontrol negatif (P0) tubulus tampak dipenuhi oleh sel spermatogenik, sedangkan pada kontrol positif (P1) tampak adanya penurunan jumlah sel spermatogenik yang cukup signifikan, kelompok perlakuan kombinasi TCDD dengan vitamin E dosis 11 mg/kg/hari (P2) jumlah sel spermatogenik tampak mengalami penurunan

namun terlihat lebih banyak dari pada kelompok kontrol positif (P1), kelompok perlakuan kombinasi TCDD dengan vitamin E dosis 20 mg/kg/hari (P3) terlihat adanya perbaikan jumlah sel spermatogenik dibanding dengan kontrol positif TCDD (P1), sedangkan kelompok perlakuan kombinasi TCDD dengan vitamin E dosis 37 mg/kg/hari (P4) nampak peningkatan jumlah sel spermatogenik yang cukup signifikan dan hampir mendekati kontrol negatif (P0).



Gambar 5.2 Gambaran jumlah sel spermatogenik dalam tubulus seminiferus pada berbagai kelompok perlakuan dengan pewarnaan HE perbesaran 400x. Kelompok kontrol negatif (P0), kelompok kontrol positif (P1) dan kelompok perlakuan kombinasi TCDD dengan Vitamin E dosis 11, 20 dan 37 mg/kg/hari (P2, P3, P4).

Gambaran histopatologi sel spermatogenik meliputi sel spermatogonium, spermatosit primer, spermatosit sekunder, spermatid, dan spermatozoa ditunjukkan pada Gambar 5.3. Sel spermatogonium tampak bulat inti padat, sel spermatosit primer tampak lebih besar dan sitoplasma mulai terlihat tipis, sel

spermatisit sekunder terlihat lebih kecil dan inti kurang jelas, sel spermatid terlihat mulai memanjang, dan sel spermatozoa sudah terbentuk kepala dan ekor.



Gambar 5.3 Gambaran sel spermatogonium, sel spermatisit primer, sel spermatisit sekunder, sel spermatid dan sel spermatozoa tubulus seminiferus testis mencit dengan pewarnaan HE perbesaran 1000x. tanda panah A (spermatogonium), B (spermatisit primer), C (spermatisit sekunder), D (spermatid), dan E (spermatozoa).

5.2 Data Gambaran Histopatologi Diameter Tubulus Seminiferus

Pengukuran diameter tubulus seminiferus dilakukan dengan mengukur garis silang tengah tubulus dari tepi membran basalis yang saling berseberangan. Setiap sampel dilakukan pengukuran lima tubulus seminiferus (Lampiran 7) dan dirata-rata. Data yang diperoleh berupa diameter tubulus seminiferus dengan satuan μm .

Data yang diperoleh kemudian dilanjutkan uji normalitas data (uji *Kormogrov-Smirnov*), diperoleh data terdistribusi normal, selanjutnya dilakukan

analisis statistik dengan menggunakan uji ANOVA dan diperoleh hasil $p < 0,05$ pada Lampiran 10. Hasil tersebut menunjukkan terdapat perbedaan yang nyata diantara kelompok perlakuan, sehingga dilanjutkan dengan menggunakan uji Duncan. Hasil pengukuran data rata-rata dan standar deviasi diameter tubulus seminiferus mencit jantan tiap kelompok perlakuan ditunjukkan pada Tabel 5.2.

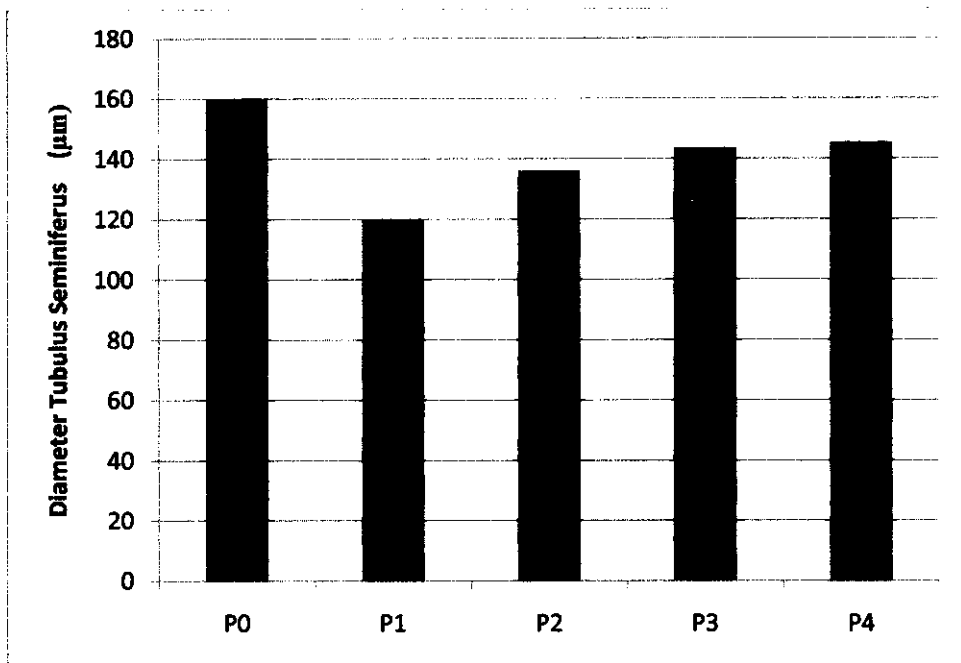
Tabel 5.2 Rerata dan Standar Deviasi Diameter Tubulus Seminiferus Testis Mencit Kelompok Kontrol Negatif (P0), Kontrol Positif (P1), Dan Perlakuan Kombinasi TCDD Dengan Vitamin E Dosis 11, 20, Dan 37 mg/kg/hari (P2, P3, P4)

Perlakuan	Diameter Tubulus Seminiferus (μm) ($\bar{X} \pm \text{SD}$)
P0	160,244 ^b \pm 24,859
P1	120,375 ^a \pm 9,305
P2	136,175 ^{ab} \pm 14,631
P3	143,699 ^{ab} \pm 13,487
P4	145,538 ^b \pm 27,476

Keterangan: Superskrip dengan notasi yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata antar perlakuan ($p < 0.05$).

Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa rata-rata dan standar deviasi diameter tubulus seminiferus terbesar didapatkan pada perlakuan kontrol negatif (P0) yang tidak berbeda nyata ($p < 0,05$) dengan kelompok perlakuan kombinasi TCDD dan vitamin E dosis 11, 20, dan 37 mg/kg/hari (P2, P3, dan P4), tetapi terdapat perbedaan yang nyata dengan kelompok kontrol positif (P1) yang diberi TCDD 100 ng/kgBB/hari yang memiliki angka terendah.

Perubahan diameter tubulus seminiferus pada setiap kelompok perlakuan diilustrasikan pada Gambar 5.4 di bawah ini.



Gambar 5.4 Diagram batang rerata diameter tubulus seminiferus testis 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 Data Kadar MDA (*malondialdehyde*) Testis Mencit

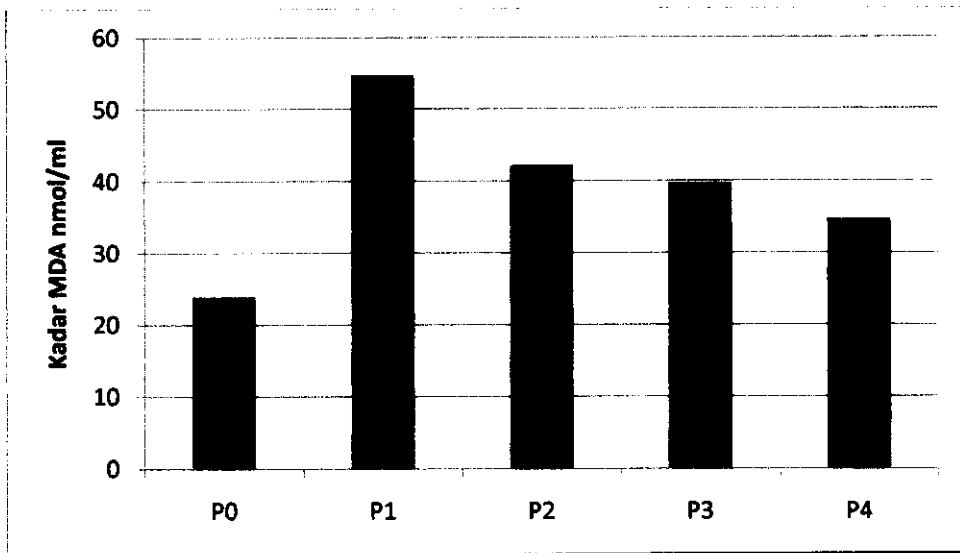
Pengukuran kadar *malondialdehyde* (MDA) dilakukan menggunakan uji TBARs seperti yang sudah dijelaskan pada metode. Data diperoleh dengan satuan nmol/ml. Data yang diperoleh kemudian dilanjutkan uji normalitas data (uji *Kormogrov-Smirnov*), diperoleh data terdistribusi normal, selanjutnya dilakukan analisis statistik dengan menggunakan uji ANOVA dan diperoleh hasil $p < 0,05$ pada Lampiran 11. Hasil tersebut menunjukkan terdapat perbedaan yang nyata diantara kelompok perlakuan, sehingga dilanjutkan dengan menggunakan uji Duncan. Hasil pengukuran data rata-rata dan standar deviasi kadar MDA testis mencit jantan tiap kelompok perlakuan ditunjukkan pada Tabel 5.3.

Tabel 5.3 Rerata dan Standar Deviasi Kadar MDA Testis 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	Kadar MDA Testis (nmol/ml) ($\bar{X} \pm SD$)
P0	23,952 ^a ± 5,692
P1	54,773 ^d ± 9,655
P2	42,267 ^c ± 2,237
P3	39,806 ^{bc} ± 2,369
P4	34,809 ^b ± 2,284

Keterangan: Superskrip dengan notasi yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata antar perlakuan ($p < 0.05$).

Hasil analisis dengan uji Duncan menunjukkan bahwa kelompok kontrol negatif (P0) berbeda nyata ($p < 0.05$) dengan seluruh kelompok perlakuan dan merupakan kelompok perlakuan dengan nilai kadar MDA terendah. Kelompok kontrol positif TCDD (P1) yang mempunyai nilai kadar MDA tertinggi juga berbeda nyata dengan seluruh kelompok perlakuan. Kelompok perlakuan kombinasi TCDD dan vitamin E dosis 11 mg/kg/hari (P2) tidak berbeda nyata dengan kelompok perlakuan kombinasi TCDD dan vitamin E dosis 20 mg/kg/hari (P3) tetapi berbeda nyata dengan kelompok perlakuan kombinasi TCDD dan vitamin E dosis 37 mg/kg/hari (P4). Gambaran rerata kadar MDA testis mencit disajikan dalam diagram batang pada Gambar 5.5 di bawah ini.



Gambar 5.5 Diagram batang rerata kadar MDA testis mencit pada 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).

BAB 6
PEMBAHASAN

BAB 6 PEMBAHASAN

6.1 Potensi Vitamin E Terhadap Jumlah Sel Spermatogenik Tubulus Seminiferus Testis Mencit Yang Diinduksi *2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin* (TCDD)

Pengamatan terhadap perkembangan sel spermatogenik melalui preparat histopatologi testis mencit menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400 kali menunjukkan adanya penurunan populasi sel spermatogenik yang terjadi pada semua dosis yang diberikan dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif (P0).

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 (Wati, 2013).

Proses deferensiasi spermatogonia berlangsung sangat kompleks di dalam tubulus seminiferus. Spermatogenesis normal memerlukan LH dan FSH. Hormon

LH merangsang hormon androgen oleh sel-sel Leydig. Hormon perangsang folikel (FSH / *Folicle Stimulating Hormon*) mempengaruhi tubulus seminiferus untuk meningkatkan spermatogenesis. Karena androgen juga diperlukan untuk produksi spermatozoa, maka LH merangsang spermatogenesis secara tak langsung. LH dan FSH diatur bergantian oleh sebuah hormon dari hipotalamus yaitu GnRH. Konsentrasi LH, FSH dan GnRH dalam darah diatur melalui umpan-balik negatif. GnRH juga dikontrol melalui umpan balik negatif dari LH dan FSH (Verhoeven *et al.*, 2010). Hipotalamus mensekresi GnRH (*gonadotrophin Releasing Hormon*) yang merangsang kelenjar hipofisis anterior untuk mensekresi *Folicle Stimulating Hormone* (FSH) *LuteinizingHormone* (LH). Kedua hormon ini memegang peran utama mengatur fungsi seksual jantan. FSH dibawa melalui aliran darah menuju testis dan mengawali proses proliferasi spermatogenesis. Selanjutnya LH akan menyelesaikan proses pematangan dan pembentukan spermatozoa (Prajogo, 2007). LH yang disekresi oleh kelenjar hipofisis anterior akan dibawa melalui aliran darah menuju testis. Di dalam testis LH merangsang sel intersitial untuk mensekresi testosteron yang diperlukan untuk pematangan akhir spermatozoa. Pembentukan testosteron sebanding dengan LH yang tersedia. Gangguan pada proses sekresi dan pengangkutan LH dan FSH dapat mengganggu spermatogenesis (Prajogo, 2007).

Pengamatan terhadap jumlah sel spermatogenik tubulus seminiferus testis mencit menunjukkan bahwa jumlah sel spermatogenik terendah terdapat pada kelompok kontrol positif (P1). Kelompok kontrol positif (P1) merupakan kelompok perlakuan penelitian yang diberi TCDD dengan dosis 100ng/kgBB/hari

sebanyak 0,1ml/ekor/hari peroral. Jumlah sel spermatogenik kelompok kontrol positif (P1) lebih rendah dari kelompok kontrol negatif (P0), hal ini sependapat dengan penelitian terbaru Yin *et al* (2012) yang mengatakan bahwa TCDD dapat menyebabkan kerusakan tubulus seminiferus, degenerasi, *swelling*, penurunan jumlah spermatozoa sampai nekrosis sel spermatogonium, sel spermatosit primer, dan sel spermatosit sekunder.

Menurut Aly dan Khafagy (2011), salah satu perubahan yang disebabkan oleh sifat toksik TCDD adalah terbentuknya radikal bebas. Radikal bebas dapat merusak membran sel melalui peroksidasi lipid. Telah diketahui bahwa membran sel terdiri dari *lipid bilayer* yang merupakan struktur pembangun sel. Peningkatan peroksidasi lipid di membran dapat mengakibatkan terjadinya gangguan transport ion-ion esensial dari dan dalam sel, sehingga pada akhirnya dapat menimbulkan kematian pada sel, TCDD merupakan faktor lingkungan yang dapat menjadi toksin terhadap sel spermatogenik tubulus seminiferus. Efek radikal bebas oleh TCDD dapat menyebabkan stress oksidasi pada sel-sel spermatogenik di tubulus seminiferus testis. Stress oksidasi pada testis dapat menyebabkan gangguan pada proses oksidasi fosforilasi sehingga terjadi peningkatan produksi radikal bebas. Peningkatan radikal bebas ini disebabkan karena antioksidan yang tersedia dalam tubuh tidak mampu lagi mengubah oksigen reaktif (O^{\cdot}) menjadi senyawa yang netral O_2 . Antioksidan tersebut memberikan pertahanan yang sangat efektif terhadap peroksidasi lipid, tetapi stres oksidasi yang berat dapat berakibat pada habisnya antioksidan yang tersedia. Adanya peroksidasi lipid pada membran sel spermatogenik menghasilkan senyawa MDA. Dengan demikian kadar MDA yang

tinggi menunjukkan terjadinya peroksidasi lipid pada membran sel spermatogenik. Keadaan ini diindikasikan dengan menurunnya jumlah sel spermatogenik pada kelompok kontrol positif (P1) secara signifikan dibanding kelompok kontrol negatif (P0). Pemeriksaan histopatologi menunjukkan penurunan rerata sel spermatogenik pada kelompok kontrol positif. Ini disebabkan banyaknya sel spermatogonium yang rusak dan terjadi kematian sel akibat peroksidasi lipid pada membran sel spermatogonium. Peroksidasi lipid merupakan proses pembentukan peroksida dari asam lemak yang memiliki ikatan rangkap yang diselingi gugus metilen ($-\text{CH}_2-$), yaitu ikatan dalam PUFA. Hasil akhir peroksidasi lipid pada membran adalah terputusnya rantai asam lemak tidak jenuh dan menghasilkan MDA sel spermatogenik dan menyebabkan apoptosis sel spermatogenik, sehingga jumlah sel spermatogenik kelompok kontrol positif (P1) jauh berkurang daripada kelompok kontrol negatif (P0).

Seperti pada penelitian Agarwal, *et al.*, (2005), bahwa radikal bebas dapat menekan spermatogenesis sehingga dihasilkan sperma yang sedikit pula. Laksmi and Sudhakar (2010) menemukan kerusakan tubulus seminiferus yang ditandai dengan atrofi tubuler yaitu kehilangan sel-sel spermatogenik di dalam tubulus, nekrosis tubuler, hilangnya sel-sel intermedia, dan penurunan spermatogenesis yang terlihat dari menurunnya jumlah sel spermatogenik yang terlihat dalam lumen tubulus pada mencit jantan.

Kelompok perlakuan kombinasi TCDD dan vitamin E dosis 11, 20, dan 37 mg/kg/hari (P2, P3, dan P4) menunjukkan rerata jumlah sel spermatogenik mengalami pemulihan. Jumlah sel spermatogenik P2, P3, dan P4 mengalami

peningkatan dibanding dengan kelompok kontrol positif (100 ng/kg/hari TCDD) (P1), hal ini menunjukkan terdapat efek proteksi Vitamin E (*α-tocopherol*) terhadap paparan TCDD. Efek menguntungkan dari vitamin E sebagian besar karena sifat antioksidan yang larut lipid dan memainkan peran sebagai pelindung utama terhadap stress 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 (Wati, 2013).

Pemberian Vitamin E dapat memproteksi kerusakan sel-sel spermatogenik tubulus seminiferus karena fungsi vitamin E (*α-tocopherol*) sebagai antioksidan yang melindungi *Poly Unsaturated Fatty Acids* (PUFA) dan komponen sel serta membran sel dari oksidasi oleh radikal bebas yang dibentuk oleh senyawa-senyawa toksik yang akhirnya menyebabkan kerusakan komponen seluler. Kemampuan vitamin E ini juga menyebabkan proses spermatogenesis di dalam tubulus seminiferus berjalan secara normal tanpa pengaruh negatif dari TCDD (Yin *et al*, 2012). Vitamin E mampu mengendalikan peroksida lemak dengan menyumbangkan hidrogen ke dalam reaksi yang mampu mengubah radikal peroksil (hasil peroksidasi lipid) menjadi radikal tocopherol yang kurang reaktif, sehingga tidak mampu merusak rantai asam lemak dan selanjutnya melindungi sel dari kerusakan (Hariyatmi, 2004). Vitamin ini berada di dalam lapisan fosfolipid membran sel yang akan melindungi asam lemak jenuh dan komponen membran

sel lain dari oksidasi radikal bebas dengan memutuskan rantai peroksida lipid yang banyak muncul karena adanya reaksi antara lipid dan radikal bebas (Iswara, 2009).

6.2 Potensi Vitamin E Terhadap Diameter Tubulus Seminiferus Testis Mencit Yang Diinduksi 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)

Pengamatan terhadap diameter tubulus seminiferus melalui preparat histopatologi testis mencit menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400 kali menunjukkan gambaran normal tubulus seminiferus pada kelompok kontrol negatif (P0). Penurunan drastis diameter tubulus seminiferus terlihat pada kelompok kontrol positif TCDD (P1). Hal ini disebabkan oleh pengaruh negatif dari radikal bebas akibat paparan TCDD. Radikal bebas menyebabkan hilangnya sel spermatogonium, sel spermatosit primer, sel spermatosit sekunder, sel spermatid, dan spermatozoa tubulus seminiferus sehingga terbentuk lumen yang membesar yang mendorong pengecilan diameter tubulus seminiferus. Hasil penelitian Sakr *et al.*, (2009) mendapatkan adanya degenerasi sel spermatogenik yang menyebabkan hilangnya kumpulan sel spermatogenik sehingga secara langsung menyebabkan pengurangan diameter tubulus seminiferus sehingga memperkecil diameter tubulus tersebut.

Kelompok perlakuan kombinasi TCDD dan vitamin E dosis 11, 20, dan 37 mg/kg/hari (P2, P3, dan P4) terlihat adanya pemulihan diameter tubulus seminiferus 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) terjadi pemulihan yang signifikan ($p < 0,05$) bila dibanding dengan kelompok kontrol

positif (P1) dan tidak berbeda nyata ($p < 0,05$) dengan kelompok kontrol negatif (P0). Diameter tubulus seminiferus dipengaruhi oleh jumlah sel spermatogenik. 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) dan juga penelitian oleh Wati (2013). Pemulihan vitamin E terhadap diameter tubulus seminiferus karena efektivitas vitamin E sebagai antioksidan yang mampu menangkal radikal bebas sehingga spermatogenesis di dalam tubulus seminiferus berjalan secara normal tanpa pengaruh negatif dari paparan TCDD. Jumlah sel spermatogenik yang terbentuk di dalam tubulus seminiferus menimbulkan dorongan akan bertambahnya diameter tubulus seminiferus testis mencit.

6.3 Potensi Vitamin E Terhadap Kadar *malondialdehyde* (MDA) Testis Mencit Yang Diinduksi 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)

Malondialdehyde (MDA) adalah suatu senyawa yang merupakan hasil dari oksidasi lipid yang menjadi peroksida. Pengukuran kadar MDA merupakan cara pengukuran aktivitas radikal bebas secara tidak langsung, sebab yang diukur

adalah produk dari reaksi radikal bebas bukan pengukuran radikal bebas secara langsung (Edyson, 2002).

Pengukuran kadar MDA (*malondialdehyde*) testis mencit pada kelompok kontrol negatif (P0) merupakan gambaran kadar MDA normal dalam tubuh tanpa adanya paparan zat toksik. Kadar MDA tertinggi diperoleh pada kelompok kontrol positif TCDD (P1) yang secara signifikan terjadi peningkatan dibanding kelompok P0. Hal ini membuktikan bahwa TCDD dapat menginduksi terjadinya stress oksidasi dalam tubuh. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) masuk ke dalam tubuh, menembus membran sel dan akan berikatan dengan reseptor spesifiknya yaitu AhR (*Arylhydrocarbon receptor*) yang berada di sitoplasma kemudian bersama-sama penetrasi ke dalam inti sel. Di dalam inti sel, AhR yang berikatan dengan TCDD membentuk dimer dan berikatan dengan reseptor Arnt (*Arylhydrocarbon receptor nuclear translocator*) membentuk kompleks senyawa trimer. Kompleks senyawa trimer ini mengikat elemen DNA tertentu yaitu DRE. Ikatan tersebut akan mengubah ekspresi dari berbagai macam gen termasuk sitokrom P450 1A1 (Yin *et al*, 2012). Sitokrom P450 merupakan enzim yang terlibat dalam rangkaian pembentukan radikal bebas melalui reaksi enzimatik (Yang *et al*, 2005).

Tubuh memiliki mekanisme proteksi yang menetralkan radikal bebas yang terbentuk, antara lain dengan adanya enzim-enzim *superoksida dismutase* (SOD), *katalase*, dan *glutathion peroksidase* (GPX) (Winarsi, 2007). Namun dalam kondisi tertentu, radikal bebas dapat melebihi sistem pertahanan tubuh, kondisi ini disebut sebagai stres oksidasi (Agarwal *et al*, 2005). Pada kondisi ini,

keseimbangan antara radikal bebas dengan kemampuan antioksidan alami tubuh akan terganggu yang akhirnya akan menyebabkan kerusakan jaringan (Winarsi, 2007).

Membran sel terdiri dari banyak komponen penting yaitu fosfolipid, glikolipid (banyak mengandung PUFA), kolesterol, dan protein (Suryohudoyo, 2007). *Polyunsaturated Fatty Acid* (PUFA) sangat peka terhadap radikal hidroksil (OH^\cdot). Proses oksidasi PUFA oleh radikal hidroksil (OH^\cdot) sering disebut dengan peroksidasi lipid. Peroksidasi PUFA merupakan suatu reaksi rantai radikal bebas yang diinisiasi oleh abstraksi atom hidrogen oleh radikal hidroksil (OH^\cdot), dan membentuk suatu produk yaitu radikal lipid. Apabila radikal lipid bereaksi dengan oksigen, maka akan terbentuk radikal peroksil (CO_2^\cdot). Radikal peroksil (CO_2^\cdot) dapat mengabstraksi atom hidrogen pada lemak yang lain. Apabila hal tersebut terjadi, maka akan terbentuk radikal lipid hidroperoksida ($\text{CO}_2\text{H}^\cdot$). Radikal lipid hidroperoksida ($\text{CO}_2\text{H}^\cdot$) adalah produk primer peroksidasi yang bersifat sangat sitotoksik. Proses dari peroksidasi lipid tersebut menghasilkan suatu produk yaitu MDA. *Malondialdehyde* (MDA) terbentuk dari radikal lipid hidroperoksida ($\text{CO}_2\text{H}^\cdot$) yang sudah dipecah menjadi produk peroksidasi lipid sekunder (Winarsi, 2007).

Sejalan dengan penelitian Yoshida dan Ogawa (2000) menyatakan bahwa beberapa parameter yang menunjukkan kejadian stres oksidatif akibat TCDD diantaranya 1) hasil degradasi seperti lipid peroksidasi, tiol oksidasi, *Malondialdehyde* (MDA), 2) antioksidan non enzimatis yaitu glutathion, vitamin C, vitamin E, asam urat, ubikuinon, 3) antioksidan enzimatis yaitu superoksida

dismutase (SOD), katalase, *glutathione peroxidase* (GSH-PX), *glutathione reductase* (GR), 4) sitokrom P450 CYP1A1, CYP1B1.

Penurunan kadar MDA oleh vitamin E mulai terjadi pada kelompok perlakuan kombinasi TCDD dan vitamin E dosis 11 dan 20 mg/kg/hari (P2 dan P3) bahkan pada kelompok perlakuan kombinasi TCDD dan vitamin E dosis tertinggi 37 mg/kg/hari (P4), penurunan kadar MDA hampir mendekati kelompok kontrol negatif (P0). Hal ini terkait dengan kemampuan vitamin E sebagai antioksidan dan daya hambatnya terhadap aktivasi dan pembentukan radikal bebas. Vitamin E merupakan antioksidan larut lemak yang penting dalam sistem antioksidan tubuh. Fungsinya adalah sebagai penghalang pertama terjadinya antioksidan pada PUFA dan oksidasi LDL oleh radikal bebas hal ini karena vitamin terdapat pada fosfolipid membran sel sehingga efektif melindungi kerusakan lemak (Adikwu dan Nelson, 2012).

Peran vitamin E sebagai penghambat peroksidasi lipid dengan cara mengikat radikal lipid hidroperoksida ($\text{CO}_2\text{H}^\cdot$) oleh tokoferol menjadi radikal tokoferoksil (TOO^\cdot). Radikal tokoferoksil (TOO^\cdot) tidak bersifat sitotoksik seperti radikal lipid hidroperoksida ($\text{CO}_2\text{H}^\cdot$). Fungsi utama tokoferol adalah mengikat radikal lipid hidroperoksida ($\text{CO}_2\text{H}^\cdot$) sebelum radikal lipid hidroperoksida ($\text{CO}_2\text{H}^\cdot$) mengikat substansi lain. Dengan reaksi pengikatan tersebut, pembentukan radikal bebas dalam tubuh dapat dihambat sehingga stres oksidatif dapat dicegah (Setiawan dan Suhartono, 2007).

BAB 7

KESIMPULAN

BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat ditarik kesimpulan :

1. Pemberian vitamin E (*α-tocopherol*) dapat mempertahankan jumlah sel spermatogenik testis menciit dari kerusakan akibat paparan 2,3,7,8 *tetrachlorodibenzo-p-dioxin* (TCDD).
2. Pemberian vitamin E (*α-tocopherol*) dapat mempertahankan diameter tubulus seminiferus testis menciit akibat paparan *tetrachlorodibenzo-p-dioxin* (TCDD).
3. Pemberian vitamin E (*α-tocopherol*) dapat menurunkan kadar *malondialdehyde* (MDA) testis menciit akibat paparan 2,3,7,8 *tetrachlorodibenzo-p-dioxin* (TCDD).

7.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat dikemukakan beberapa saran sebagai berikut:

1. Konsumsi vitamin E (*α-tocopherol*) disarankan bagi masyarakat umumnya dan masyarakat berisiko khususnya sebagai antioksidan penangkal radikal bebas akibat paparan yang disebabkan TCDD.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai dosis optimal vitamin E sebagai antioksidan dalam memproteksi efek negatif dari TCDD.
3. Perlu dilakukan penelitian tentang antioksidan alami yang dapat mencegah efek negatif yang ditimbulkan akibat paparan TCDD.

DAFTAR PUSTAKA

DAFTAR PUSTAKA

- Acharya, U. and M. Mishra. 2006. Testicular Dysfunction and Antioxidative Defense System of Swiss Mice After Chromic Acid Exposure. *Reprod Toxicol.* 22: 87-91.
- Adamsson, A., U. Simanainen, M. Viluksela, J. Paranko, and J. Toppari. 2009. The Effects of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin on Foetal Male Rat Steroidogenesis. *Int J Androl.* 32 (5), 575–585.
- Adikwu, E. and B. Nelson. 2012. Hepatoprotective Effect of Vitamin A. *American J. of Pharm. and Toxicol.* 7(4): 154-163.
- Agarwal, A., A. Prabakaran, and T.M. Said. 2005. Oxidative Stress and Antioxidants in Male Infertility a Difficult Balance, *Iranian Journal of Reproductive Medicine*, 3(1): 1-8.
- Allen, RG. and M. Tressini. 2000. Oxidative Stress and Gene Regulation. *Free Radical Biol Med.* 28:463-99.
- Aly, Hamdy., and R.M. Khafagy. 2011. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) Induced Cytotoxicity Accompanied by Oxidative Stress in Rat Sertoli Cells: Possible Role of Mitochondrial Fractions of Sertoli Cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* 252:273–280.
- Amir, A. 1992. Pengaruh Penyuntikan Ekstrak Biji Pepaya Gandul (*Carica Papaya L.*) Terhadap Sel-Sel Spermatogenik Mencit Dan Jumlah Anak Hasil Perkawinannya. Tesis. Biologi Kedokteran. Program Pascasarjana Universitas Indonesia. Jakarta. Hal. 22-39
- Arenas-Ríos, E., M.A. Galván, P.E. Mercado, R. L. Wilchis, D.L. Cervantes, and A. Rosado. 2007. Superoxide Dismutase, Catalase, And Glutathione Peroxidase In The Testis Of The Mexican Big-Eared Bat (*Corynorhinus Mexicanus*) During Its Annual Reproductive Cycle. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 148, 150–158.
- Ashfahani, E. D., N. Wiratmini, and Sukmaningsih. 2010. Effect of Temu Putih (*Curcuma Zedoaria Berg. Roscoe.*) Extract Treatment on Viability and Motility of Mice (*Mus Musculus L.*) Spermatozoa. *Jurnal Biologi Xiv* (1): 20-23.
- Bintoro, V. P. 2009. Peranan Ilmu dan Teknologi Dalam Peningkatan Keamanan Pangan Asal Ternak. Pidato Pengukuhan Diucapkan Pada Peresmian Jabatan Guru Besar Dalam Teknologi Hasil Ternak Pada Fakultas

- Peternakan Universitas Diponegoro. Badan Penerbit Universitas Diponegoro. Semarang. 14-15.
- Burton, G.W. 1994. Vitamin E : Molecular and Biological Function. Proceedings Of The Nutrition Society. pg. 53.
- Całkosiński. 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.
- Campbell, Reece dan Mitchell. 2004. Biologi. Jilid 3. Edisi Kelima. Jakarta: Erlangga. Hal. 156.
- Dachlan, E.G., Widjiati, dan B. Santoso. 2011. Pengaruh Paparan Partikulat Jelaga Terhadap Peningkatan Lipid Peroksidase, Kejadian Apoptosis Plasenta dan Luaran Kebuntingan pada Mekanisme Molekuler Gangguan Kebuntingan Tikus (*Rattus Novergicus*). [Laporan Penelitian] Universitas Airlangga.
- Dhanabalan, S., and P.P. Mathur. 2009. Low Dose of 2,3,7,8 Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin Induces Testicular Oxidative Stress in Adult Rats Under The Influence Of Corticosterone. *Exp Tox Pathol* 61: 415–423.
- Dobrzyński, M., I. Całkosiński, I. Przywitowska, J. K. Brzoza, A. C. Waszkiewicz, E. Sołtan, and O. Parulska. 2009. Effects of Dioxins in Environmental Pollution on Development of Tooth Disorders. *Polish J. of Environ. Stud.* Vol. 18, No 3:319-323.
- Doi, H., T. Baba, C. Tohyama, and K. Nohara. 2003. Functional Activation of Arylhydrocarbon Receptor (Ahr) In Primary T Cell By 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Chemosphere* 52.655-662.
- Dorland, W. and A. Newman. 2002. Kamus Kedokteran Dorland. Edisi 29. Jakarta: EGC.
- Droge W. 2002. Free Radicals in The Physiological Control of Cell Function. *Physiol Rev.*82:47-95.
- Ebtekar, M. 2004. Effects of Persistent Organic Pollutans On The Immune System: The Case of Dioxin. *Iranian J. Env. Health. Sci. Eng.* I(2): 1-7.
- Edyson. 2002. Pengaruh Pemberian Kombinasi Vitamin C Dan E Terhadap Aktivitas Superoxide Dismutase (SOD) Dan Kadar Malondialdehyde (MDA) Pada Eritrosit *Rattus Norvegicus* Galur Winstar Yang Diinduksi L-Tiroksin. Tesis. Universitas Airlangga. Surabaya.

- Egeland, G.M., M.H. Sweeney, and M.A. Fingerhu. 1994. Total Serum Testosterone and Gonadotropins in Workers Exposed to Dioxin. *American Journal of Epidemiology* 139: 272–281.
- Environment Protection Agency (EPA). 2003. Evaluating Atmospheric Release Dioxin-like Compounds from Combustion Sources. US Environmental Protection Agency. Washington DC. 34-87.
- Environment Protection Agency (EPA). 2012. EPA's Reanalysis of Key Issue Related to Dioxin Toxicity and Response to NAS Comment, Volume I (CAS No. 1746-01-6). In Support of Summary Information On The Integrated Risk Information System (IRIS). US Environmental Protection Agency. Washington, DC. 1-344.
- Esser, C., S. Steinwachs, and C. Herder. 2005. Effects of a Single Dose Of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin, Given at Post-Puberty, In Senescent Mice. *Toxicology Letters* 157(2): 89–98.
- Evans, W.J. 2000. Vitamin E, Vitamin C, and Exercise. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 72, 647S-52S.
- Febriani, B. 2012. Pengaruh Pemberian Ekstrak Buah Pinang Terhadap Histologi Testis Mencit. Universitas Pendidikan Indonesia. Bandung.
- Gallagher, M.I. 2004. Vitamins. In: Mahan LK, Escott-Stump S. Krause's Food, Nutrition, & Diet Therapy. Pennsylvania: Saunders. P. 75-119.
- 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.
- Guyton, A. 2006. Textbook of Medical Physiology. Eleventh Edition. Pennsylvania: Elsevier Saunders.
- Hariyatmi. 2004. Kemampuan Vitamin E Sebagai Antioksidan Terhadap Radikal Bebas pada Lanjut Usia. *Jurnal MIPA*. 14(1): 53-54.
- Harliansyah. 2001. Mengunyah Halia Menyah Penyakit. *Jurnal Penelitian*. Malaysia: UKM Malaysia.
- Hill, Mark. 2009. UNSW Embryology Weblog. [Http://Embryology.Med.Unsw.Edu.Au](http://Embryology.Med.Unsw.Edu.Au). Diakses Pada 28 Maret 2013.

- Hong, Z., L. Hailinga, M. Hui, and Z. Guijie. 2009. Effect of Vitamin E Supplementation on Development of Reproductive Organs in Boer Goat. *Animal Reproduction Science*. 113: 93-101.
- Hutahaean, S. 2010. Kajian Palatogenesis Mencit (*Mus musculus L.*) Akibat pemberian 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. Disertasi Sekolah Pasca Sarjana Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta. 1-3.
- Iswara, A. 2009. Pengaruh Pemberian Antioksidan Vitamin C Dan E Terhadap Kualitas Spermatozoa Tikus Putih Terpajan Alletherin. *Skripsi*. Semarang: Universitas Negeri Semarang.
- Juniarti. 2005. Pengaruh Dioksin Terhadap Kesehatan. *Jurnal Kedokteran Yarsi* 13(2):244-252.
- Junqueira. 2005. Basic Histology "Text and Atlas". London: Mcgraw-Hill Medical.
- Kahkonen, M.P., I.H. Anu, J.V. Heikki, Jussipr, P. Kalevi, T.S. Kujala, and H. Marina. 1999. Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds, *J. Agric. Food Chem.* 47:3954-3962.
- Kobayashi, N., K. Nakata, T. Eriguchi, F.Horiguchi, J. Nakanishi, and S. Masunaga. 2004. Application of a Mathematical Model to Predict Dioxin Concentration in the Tokyo Bay Estuary. *Organohalogen Comp* (66):2366-2372.
- Krishnamoorthy, G., P. Murugesan, R. Muthuvel, D.N. Gunadharini, M.R. Vijayababu, A. Arunkumar, P. Venkataraman, M.M. Aruldas, and J. Arunakaran, 2005. Effect of Aroclor 1254 on Sertoli Cellular Antioxidant System, Androgen Binding Protein and Lactate in Adult Rat in Vitro. *Toxicology* 212, 195–205.
- Kusriningrum, RS. 2009. Buku Ajar Perancangan Percobaan. Cetakan kedua. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Penerbit Dani Abadi. Surabaya.
- Laksmi, B.V.S and M. Sudhakar. 2010. Protective Effect Of Zingiber Officinale On Gentamicin- Induced Nephrotoxicity In Rats, *Int. J. Pharmacol.* 14(1): 22-31.
- Langseth, L. 1995. Oxidants, Antioxidants, and Disease Prevention. ILSI Europe Concise Monograph Series. Brussel, Belgium. : 1-24.

- Latchoumycandane, C., K.C. Chitra, and P.P. Mathur. 2002. Induction of Oxidative Stress in Rat Epididymal Sperm After Exposed to 2,3,7,8 – Tetrachlorodibenzo -P-Dioxin. *Archives of Toxicology* 76(2): 113–118.
- Latchoumycandane, C., and P.P. Mathur. 2002. Induction of Oxidative Stress in the Rat Testis After Short-Term Exposure to the Organochlorine Pesticide Methoxychlor. *Arch Toxicol* 76:692–698.
- Latchoumycandane, C., K.C. Chitra, and P.P. Mathur. 2003. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) Induces Oxidative Stress in the Epididymis and Epididymal Sperm of Adult Rats. *Arch Toxicol* 77:280–284.
- Llobert, J. M., J.L. Domingo, A. Bocio, C. Casas, A. Teixido, and L. Muller. 2003. Human Exposure to Dioxins Through The Diet in Catalonia, Spain : Carcinogenic and Non-Carcinogenic Risk. *Chemosphere J.* 50: 1193-1200.
- Lensu, Sanna., P.Tiittanen, J. Lindén, J. Tuomisto, and R. Pohjanvirta. 2011. Effects of a Single Exposure to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on Macroand Microstructures of Feeding and Drinking in Two Differently TCDD-Sensitive Rat Strains. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 99:487–499.
- Lester, S. 1994. How to Start to Stop Dioxin Exposure in Your Community. <http://www.ejnet.org/dioxin/dioxin.html> [Diakses pada tanggal 15 Maret 2013].
- Lu, C.F., Y.M. Wang, S.Q. Peng, L.B. Zou, D.H. Tan, G. Liu, Z. Fu, Q.X. Wang, and J. Zhao. 2009. Combined Effects of Repeated Administration of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and Polychlorinated Biphenyls on Kidneys of Male Rats. *Arch Environ Contam Toxicol* 57:767–776.
- Marnett, L.J. 2000. Oxyradical and DNA Damage. *Carcinogenesis*. Vol.21: 361-370.
- Martunus, Z. 2007. Ekstraksi Dioksin dalam Limbah Air Buangan Industri Pulp dan Kertas dengan Pelarut Toluena. Fakultas Teknik Universitas Riau. Pekanbaru. *Jurnal Sains dan Teknologi* 6(1): 1-4
- Massaad, C., F. Entezami, L. Massade, M. Benahmed, F. Olivennes, R. Barouki, and S. Hamamah. 2002. How Can Chemical Compounds Alter Human Fertility. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. Vol. 100:Issue 2. 127–137.

- Matsushita, M. 2003. Enabling Facilities to Facilitate Early Action on Implementation of the Stockholm Convention on Organics Pollutans (POPs) in Indonesia. Makalah pada Workshop Sosialisasi Hasil Inventarisasi Bahan Kimia POPs di Indonesia KLH. Jakarta.
- Mc Kee, T., and J.R. Mc Kee. 2003. Aerobic Metabolism II: Electron Transport and Oxidative Phosphorylation In: Biochemistry the Molecular Basis of Life. 3rd Ed. McGraw-Hill, NY 10020. 319-326.
- Mclaren, A., 2000. Germ and Somatic Cell Lineages in the Developing Gonad. Mol Cell Endocrinol. 163, 3-9.
- Mukono. 2005. Toksikologi Lingkungan. Surabaya: Airlangga University Press.
- Mustacich, D.J., R.S. Bruno, and M.G. Traber. 2007. Vitamin E. In: Litwack G. Vitamin E, Vitamins and Hormones, Advances in Research And Applications, Volume 76. California: Elsevier.
- Nau, H. 2006. Impacts and Impact Mechanisms of "Dioxins" in Humans and Animals. Dtsch Tierarztl Wochenschr 113(8): 292-297.
- Pangestuti, D. 2011. Pengaruh Pemberian Ekstrak Jahe (*Zingiber Officinale* Rosc.) Terhadap Kadar Malondialdehid (Mda) Testis dan Gambaran Histopatologi Tubulus Seminiferus Testis Mencit yang Diberi Plumbum Asetat. Tesis. Program Studi Magister Ilmu Biomedik. Fakultas Kedokteran. Universitas Sumatera Utara. Medan
- Percival, M. 1998. Antioxidants, Clinical Nutrition Insights, Rev. 10:98.
- Pesatori, A., C. Zocchetti., S. Guercilena., D. Consonni., D. Turrini., and P. Alberto. 1998. Dioxin Exposure and non-Malignant Health Effect : A Mortality Study. Occupational and Enviromental Medicine. 55:126-131.
- Prajogo, B. 2007. Pengaruh Daun Justicia Gendarussa Burm. F. Terhadap Spermatogenesis Mencit. Jurnal Ilmiah Keluarga Berencana Dan Kesehatan Reproduksi. Badan Koordinasi Keluarga Berencana Nasional (BKKBN) Departemen Kesehatan. Jakarta.
- Proctor, P.H. and E.S. Reynolds. 1984. Free Radicals And Disease In Man. Physiol Chem Phys Med.16:175-95.
- Rahman, MN. 2011. Perbedaan Penggunaan Berbagai Diluter Terhadap Kadar Malondialdehyde (Mda) dan Motilitas Spermatozoa Sapi Friesian Holstein (Fh) pada Proses Pembekuan Semen. Tesis. Program Magister Ilmu Biologi Reproduksi. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya.

- Rao, M.V., and P.S. Sharma. 2001. Protective Effect of Vitamin E Against Mercuric Chloride Reproductive Toxicity in Male Mice. *Reproductive Toxicology*, 15, 705-12.
- Ray, P. K. and A.K. Prasad. 1992. Immunotoxic And Other Health Effect of TCDD and Toxic Oil. In: *Principle and Practice of Immunotoxicology*. Blacwell Scientific Publication. Boston. 251-256.
- Riskana, T. 1999. Pengaruh Cara Ekstrasi Terhadap Peningkatan Kadar Asam Urat pada Darah Mencit. Fakultas Kedokteran. Universitas Brawijaya. Malang
- Roeder, R., M.J. Garber and G.T. Schelling. 1998. Assessment of Dioxin in Foods from Animal Origin. *J. Anim. Sci.* 76:142-151.
- Rugh, R. 1968. *The Mouse. Its Reproduction and Development*. Minneapolis: Burgers. 7-9, 20-21.
- Rugh R. 1976 *The Mouse Its Reproduction and Development*, Minneapolis, Burgess Publishing Company. Pp:1-23.
- Sakr, S.A., Y.A. Okdah, E.K. El-Adly. 2009. Effect of Ginger (*Zingiber Officinale*) on Mancozeb Fungicide Induced Testicular. Damage in Albino Rats. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 3(2): 1328-1333.
- Saleh, R.A., A. Agarwal, E.A. Nada, M.H. El-Tonsy, R.K. Sharma, A. Meyer, D.R. Nelson, and A.J. Thomas. 2003. Negative Effects of Increased Sperm DNA Damage in Relation to Seminal Oxidative Stress in Men with Idiopathic and Male Factor Infertility. *Fertility and Sterility*: 79 (Suppl 3), 1597-1605.
- Saragih, H.T.S. 2005. Pengaruh Ekstrak Etanol Propolis (EEP) Terhadap Hepatotoksisitas dan Stres Oksidasi Akibat Pemberian 2,3,7,8 tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) Secara Kronis Pada Tikus Albino (*Sprague Dawley*). Tesis Sekolah Pasca Sarjana Universitas Gajah Mada. Yogyakarta. 7-9.
- Sareharto, T.P. 2010. Kadar Vitamin E Rendah Sebagai Faktor Resiko Peningkatan Bilirubin Serum pada Neonatus. Tesis Program Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro. Semarang. 24-30.
- Schechter, A., L. Birnbaum, J. J. Ryan, and J.D. Constable. 2005. Dioxins: An Overview. *Review Environment Research*. Article in Press Science Direct. 1-10.

- Setiawan, B. dan E. Suhartono. 2007. Peroksidasi Lipid dan Penyakit Terkait Stres Oksidatif Pada Bayi Prematur. *Majalah Kedokteran*. 57(1): 10-14.
- Sherwood, L. 2001. *Fisiologi Manusia*. Edisi Kedua. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran. Hal. 697-700
- Silalahi, J. 2006. *Makanan Fungsional*. Yogyakarta: Kanisius. Hal. 41, 47, 49-51.
- Simanjuntak, K. 2007. Radikal Bebas Dari Senyawa Toksik Karbontetraklorida (CCl₄). *Bina Widya*. 18 (01) : 7- 31.
- Singh, V.S. 1992. A Current Perspective on Nutrition and Exercise. *Journal of Nutrition*, 122, 760-65.
- Suastika, K. 2007. Pemanfaatan Vitamin C dan E sebagai Antioksidan untuk Memperbaiki Kuantitas dan Kualitas Spermatozoa. *Jurnal Kedokteran dan Farmasi*. 3(20): 103-105.
- Subratha, I.M. 1998. *Spermatogenesis, Kontrol Endokrin dan Struktur Spermatozoa*. Denpasar: Fakultas Kedokteran Universitas Udayana.
- Sudjadi dan A. Rohman. 2008. *Analisis Kuantitatif Obat, Gadjah Mada Universitas Press*. Yogyakarta. Hal: 191-193.
- Sulistyowati, Y. 2006. Pengaruh Pemberian Likopen Terhadap Status Antioksidan (Vitamin C, Vitamin E, Gluthation Peroksidase) Tikus (*Rattus Norvegicus Galur Sprague Dawley*) Hiperkolesterolemik. Tesis. Program Studi Magister Ilmu Biomedik. Universitas Diponegoro. Semarang.
- Suryohudoyo, P. 2007. Oksidan, Antioksidan dan Radikal Bebas. *Kapita Selekta Ilmu Kedokteran Molekular, Info Medika*. Jakarta. 31-47.
- Susanti, R. 2000. Efek 2,3,7,8 *tetrachlorodibenzo-p-dioxin* (TCDD) terhadap Gambaran Hematologik, Respon Neutrofil dan Limfosit Tikus Putih (*Rattus novegicus*). Tesis Sekolah Pasca Sarjana Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta. 6-23.
- Susanti, R. 2004. Respon Imun Seluler Terhadap Intoksikasi 2,3,7,8 *Tetrachlorodibenzo-p-dioxin* Pada Tikus. *Jurnal Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Semarang*. Semarang.
- Syahrin, M.H. 1994. *Reproduksi dan Embriologi: Dari Satu Sel Menjadi Organisme*. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta.

- Tortora, G.J. and B. Derrickson. 2006. Principles Of Anatomy And Physiology. 11th Edition. USA: Wiley.
- Tuminah, S. 2000. Radikal Bebas dan Antioksidan : Kaitannya Dengan Nutrisi Dan Penyakit. *Cermin Dunia Kedokteran* 128:49-50
- Valko, M., L. Dieter, M. Jan, TD. Mark, Cronin , M. Milan, and T. Joshua. 2007. Free Radicals and Antioxidants in Normal Physiological Functions and Human Disease, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39: 44–84.
- Verhoeven, G., A. Willems, E. Denolet, J.V. Swinnen, and K.D. Gendt. 2010. Androgens and Spermatogenesis: lessons from transgenic mouse models. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 365: 1537-1556.
- Wang, X.H., X.Q. Zhou, J.P. Xu, Y. Wang, and J. Liu. 2009. The Effects of Vitamin E on NK Cell Activity and Lymphocyte Proliferation in Treated Mice By 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Immunopharmacology and Immunotoxicology.* 1–7.
- Warlina, L. 2008. Model Dampak Pencemaran untuk Penyusunan Kebijakan Pengendalian Dioksin/Furan (Studi Kasus Industri Logam di Kawasan Cilegon). Tesis Sekolah Pasca Sarjana Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Wati, W. 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). Tesis. Universitas Airlangga. Surabaya. 115-120.
- Webster, T. 1994. Dioxin and Human Health; A Public Health Assessment of Dioxin Exposure in Canada. Boston University School of Public Health. Boston.
- Winarsi, H. 2007. Antioksidan Alami dan Radikal Bebas, Cetakan ke-5. Penerbit Kanisius. Yogyakarta. Hal:1-218.
- Winarti, C. dan S.J. Munarso. 2005. Kajian Kontaminasi Dioksin Pada Bahan Pangan. Prosiding Seminar Nasional Teknologi Inovatif PAscapanen Untuk Pengembangan Industri Berbasis Pertanian. 1208-1216
- Yang, Y. M., D. Y. Huang, G.F. Liu, J.C. Zhong, K.Du, Y. F. Li and X. H. Song. 2005. Inhibitory Effect of Vitamin A on TCDD-induced Cytochrome P450 1A1 Enzyme Activity and Expression. *Toxicological Science.* 85:727-734.

- 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.
- Yoshida, R and Y. Ogawa. 2000. Oxidative Stress Induced by 2,3,7,8-TCDD : An Application of Oxidative Stress Markers to Cancer Risk Assessment of Dioxins. *Indust. Health. J.* 38: 5-14.
- Yossa, I. 2008. Profil Toksisitas Limbah Kerak Kilang Minyak (Green Coke) Terhadap Mencit (*Mus Musculus*). Tesis Sekolah Pasca Sarjana Institut Pertanian Bogor. Bogor. 14-15.
- Yousef, M.I., G.A. Abdallah, and K.I. Kamel. 2003. Effect of Ascorbic Acid and Vitamin E Supplementation on Semen Quality and Biochemical Parameters of Male Rabbits. *Anim Reprod Sc.* 76: 99-111.
- Zavos, P.M., J.R. Correa, C.S. Karagounis, A. Ahparaki, C. Phoroglou, and C.L. Hicks. 1998. An Electron Microscope Study of The Axonemal Ultrastructure in Human Spermatozoa From Male Smokers And Nonsmokers. *Fertility And Sterility*, 69, 430-434.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Rekam Data Berat Badan Mencit Selama Perlakuan

Kelompok Perlakuan	Berat Badan Mencit (gram)				
		Tgl 3-5-13 adaptasi	Tgl 10-5-13	Tgl 17-5-13	Tgl 20-5-13
Perlakuan Kontrol (P0)	1	20	25	30	30
	2	25	30	35	30
	3	15	25	25	25
	4	20	25	30	30
	5	20	25	25	25
Rata-rata		20	26	29	28
Perlakuan 1 (P1)	1	15	20	15	15
	2	20	25	20	20
	3	25	30	20	20
	4	20	25	15	15
	5	20	30	25	20
Rata-rata		20	26	19	18
Perlakuan 2 (P2)	1	15	20	20	20
	2	20	25	20	20
	3	20	25	25	25
	4	25	30	20	20
	5	20	25	20	20
Rata-rata		20	25	21	21
Perlakuan 3 (P3)	1	20	25	25	25
	2	25	30	25	25
	3	25	30	30	30
	4	15	20	20	20
	5	20	25	20	20
Rata-rata		21	26	24	24
Perlakuan 4 (P4)	1	25	25	20	20
	2	25	30	30	30
	3	20	25	20	25
	4	20	25	25	25
	5	20	25	25	25
Rata-rata		22	26	24	25

Lampiran 2. Pembuatan Sediaan TCDD

Sediaan TCDD yang tersedia $10 \mu\text{g}/10 \text{ ml} = 10.000 \text{ ng}/10.000 \mu\text{l} = 1 \text{ ng}/\mu\text{l}$

Dosis TCDD yang dipakai adalah $100\text{ng}/\text{kgBB}/\text{hari}$

Jika rata-rata berat badan mencit 20 gram, maka $= \frac{20}{1000} \times 100 \text{ ng} = 2 \text{ ng/ekor}$

Tiap kelompok perlakuan terdiri dari 6 ekor mencit, jadi : $2 \text{ ng} \times 6 \text{ ekor} = 12 \text{ ng}$

Tiap ekor mencit diberi 0,1 ml larutan TCDD peroral

Enam ekor mencit = $0,1 \times 6 \text{ ekor} = 0,6 \text{ ml}$

Jadi larutan TCDD yang dibuat untuk 6 ekor mencit adalah $12 \mu\text{l}$ TCDD ad 0,6 ml corn oil.

Lampiran 3. Pembuatan Sediaan Vitamin E (*α-tocopherol*)

Sediaan vitamin E yang tersedia adalah $5 \text{ g}/5 \text{ ml} = 5.000 \text{ mg}/5.000 \mu\text{l} = 1 \text{ mg}/1 \mu\text{l}$

Larutan vitamin E diberikan 0,1 ml per ekor mencit

Jika rata-rata berat badan mencit 20 gram, maka:

- Vitamin E dosis 11mg/kgBB/hari = $\frac{20}{1000} \times 11 \text{ mg} = 0,22 \text{ mg/ ekor}$

Untuk 6 ekor mencit = $0,22 \text{ mg} \times 6 = 1,32 \text{ mg}$

Jadi larutan vitamin E yang dibuat untuk 6 ekor mencit adalah 1,32 μl

Vitamin E ad 0,6 ml corn oil.

- Vitamin E dosis 20 mg/kgBB/hari = $\frac{20}{1000} \times 20 \text{ mg} = 0,4 \text{ mg/ ekor}$

Untuk 6 ekor mencit = $0,4 \text{ mg} \times 6 = 2,4 \text{ mg}$

Jadi larutan vitamin E yang dibuat untuk 6 ekor mencit adalah 2,4 μl

Vitamin E ad 0,6 ml corn oil.

- Vitamin E dosis 37 mg/kgBB/hari = $\frac{20}{1000} \times 37 \text{ mg} = 0,74 \text{ mg/ ekor}$

Untuk 6 ekor mencit = $0,74 \text{ mg} \times 6 = 4,44 \text{ mg}$

Jadi larutan vitamin E yang dibuat untuk 6 ekor mencit adalah 4,44 μl

Vitamin E ad 0,6 ml corn oil.

Lampiran 4. Prosedur Pembuatan Preparat Histopatologi Testis Mencit

Pembuatan preparat histopatologi testis mencit dilakukan di GDC RSUD

Dr. Soetomo, dengan tahap-tahap sebagai berikut :

Fikasasi

Jaringan testis diambil, kemudian difiksasi dalam larutan BNF 10% selama 2-10 jam.

Pencucian

Setelah proses fiksasi dilakukan pencucian dengan alkohol 70%.

Dehidrasi

Dilakukan secara bertahap, dengan alkohol 70% selama 10 menit, alkohol 80%, 90%, 96%, masing-masing selama 60 menit, kemudian dengan alkohol absolut 30 menit.

Penjernihan

Dilakukan segera setelah proses dehidrasi dengan menggunakan toluol murni.

Infiltrasi

Proses infiltrasi parafin dilakukan di dalam oven dengan suhu 56°C. Organ testis dimasukkan kedalam campuran toluol-parafin dengan perbandingan 1:1 selama 30 menit. Kemudian berturut dimasukkan kedalam:

Parafin Murni I selama 1 jam

Parafin Murni II selama 1 jam

Parafin murni III selama 1 jam

Penanaman

Sediaan dari parafin murni III dimasukkan kedalam kotak kertas kecil sebagai cetakan yang telah berisi parafin cair, dan dibiarkan sampai parafin mengeras.

Pengirisan

Blok parafin testis yang telah mengeras ditempelkan pada holder dengan menggunakan spatula, letakkan holder beserta blok parafin pada tempatnya di mikrotom. Pengirisan dilakukan dengan ketebalan $\pm 6\mu\text{m}$.

Penempelan

Pada gelas benda diolesi dengan albumin dan ditetesi dengan aquadest. Kemudian beberapa pipa parafin diletakkan di permukaan aquadest pada gelas benda dan dibiarkan beberapa saat, kemudian gelas benda dipindahkan ke meja pemanas hingga kering.

Pewarnaan

Pewarnaan dengan hematoxylin-Eosin (H-E) melalui tahapan:

- Deparafinisasi preparat dengan xylol sampai bebas paraffin
- Hidrasi dengan alkohol 96%, 90%, 80%, 70%, 50%, 30%, aquadest
- Inkubasi dalam larutan haematoxylin Erlich selama 30 menit
- Cuci dengan air mengalir ± 10 menit
- Dichelupkan kedalam akuades
- Dimasukkan alkohol 30%, 50%, 70%
- Kemudian dimasukkan kedalam larutan Eosin 0,5% selama 3 menit
- Dehidrasi dengan alkohol mulai dari 70%, 80%, 90% dan alkohol absolute

- Dikeringkan dengan kertas penghisap
- Inkubasi dengan xylol selama 1 malam
- Preparat ditutup dengan gelas penutup setelah ditetesi dengan kanada balsam terlebih dahulu, lalu diberi label.

Lampiran 5. Prosedur Pemeriksaan Kadar MDA Testis Mencit

Pemeriksaan kadar MDA testis dilakukan pada hari ke-10. Pemeriksaan kadar MDA pada testis mencit dilakukan di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya. Metode pemeriksaan kadar MDA menurut Pangestuti, 2011 dengan tahap-tahap:

1. Sampel testis ditimbang sebanyak 100mg.
2. Sampel yang telah ditimbang selanjutnya ditambah 9 ml larutan PBS dingin, lalu digerus.
3. Gerusan tersebut disentrifuse dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit.
4. Diambil 4 ml supernatan
5. Kemudian supernatan tersebut ditambah 1 ml larutan TCA 15% dan diberikan 1 ml larutan TBA 0,37% dalam HCl 0,25 N
6. Setelah itu dipanaskan dalam waterbath 80° C selama 15 menit.
7. Kemudian didinginkan pada suhu ruang selama 60 menit.
8. Setelah didinginkan, disentrifuse kembali dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit.
9. Kemudian absorbansi supernatan MDA sampel diukur pada spektrofotometer dengan $\lambda = 532$ nm.
10. Dihitung kadar MDA dengan menggunakan persamaan garis regresi dari kurva standar (baku) larutan MDA.

Lampiran 6. Perhitungan Gambaran Histopatologi Jumlah Sel Spermatogonium, Spermatisit Primer, Spermatisit Sekunder, Spermatisid, dan Spermatozoa Tubulus Seminiferus Testis Mencit Pada 5 Tubulus

KODE PREPARAT	T S	SPERMA TOGONI UM	SPERMA TOSIT PRIMER	SPERMATO SIT SEKUNDER	SPERMA TID	SPERMATO ZOA
1	1	64	76	152	62	46
	2	59	68	78	58	89
	3	41	77	155	67	56
	4	23	74	89	59	41
	5	20	71	140	51	39
Σ TOTAL		207	366	614	297	271
2	1	32	52	167	151	74
	2	27	48	161	143	68
	3	38	57	173	139	87
	4	35	49	169	153	72
	5	29	55	165	157	82
Σ TOTAL		161	261	835	743	383
3	1	48	52	112	113	114
	2	51	61	92	93	80
	3	45	58	61	95	109
	4	53	65	119	117	118
	5	43	59	105	25	120
Σ TOTAL		240	295	489	443	541
4	1	47	53	136	10	66
	2	43	57	133	38	41
	3	39	51	139	88	72
	4	42	22	128	83	71
	5	36	25	119	37	82
Σ TOTAL		207	208	655	256	332
5	1	44	75	117	164	63
	2	51	81	115	40	76
	3	47	71	119	37	81
	4	33	77	113	39	65
	5	65	79	111	158	63
Σ TOTAL		240	383	575	438	348
6	1	20	70	91	75	50
	2	18	76	66	71	45
	3	23	67	72	62	56
	4	24	79	87	74	49
	5	19	76	81	69	53
Σ TOTAL		104	368	397	351	253
7	1	10	47	5	29	11
	2	8	45	65	31	9
	3	9	44	21	25	12
	4	16	50	17	27	16
	5	13	42	11	31	14
Σ TOTAL		56	228	119	143	62
	1	31	18	162	21	16
	2	35	19	49	15	11

8	3	26	21	10	18	8
	4	21	39	6	56	10
	5	28	15	54	53	6
Σ TOTAL		141	112	281	163	51
9	1	26	34	16	38	48
	2	27	39	63	37	51
	3	29	31	13	42	39
	4	31	33	61	45	7
	5	28	30	15	37	37
Σ TOTAL		141	167	168	199	182
10	1	9	56	85	39	12
	2	21	53	51	37	21
	3	15	57	90	43	19
	4	9	53	60	45	15
	5	15	29	4	41	14
Σ TOTAL		69	248	290	205	81
11	1	18	37	74	38	57
	2	16	41	63	39	68
	3	21	36	60	43	38
	4	22	32	62	19	56
	5	15	29	73	21	60
Σ TOTAL		92	175	332	160	279
12	1	21	31	27	37	2
	2	19	28	34	32	20
	3	13	36	21	43	24
	4	17	29	29	33	1
	5	14	33	150	36	59
Σ TOTAL		84	157	261	181	106
13	1	13	52	118	43	33
	2	21	61	121	55	29
	3	14	58	114	31	67
	4	17	65	32	49	35
	5	15	59	35	52	26
Σ TOTAL		80	295	420	230	190
14	1	44	45	24	71	19
	2	46	49	19	63	53
	3	41	41	17	69	23
	4	35	12	21	55	17
	5	32	39	27	59	21
Σ TOTAL		198	186	108	317	133
15	1	9	22	100	48	51
	2	17	27	78	55	56
	3	19	20	51	59	47
	4	19	21	44	51	49
	5	11	25	81	37	45
Σ TOTAL		75	115	354	250	248
16	1	21	57	31	31	72
	2	17	55	37	35	37
	3	19	55	25	79	34
	4	15	55	9	51	33
	5	21	51	27	37	65
Σ TOTAL		93	273	129	233	241
	1	12	51	60	39	29

17	2	14	28	67	22	25
	3	15	9	56	44	31
	4	19	13	58	30	33
	5	17	31	53	84	19
Σ TOTAL		77	132	294	219	137
18	1	24	54	87	46	8
	2	21	51	83	43	26
	3	26	55	39	21	72
	4	19	52	43	54	76
5	20	48	92	45	23	
Σ TOTAL		110	260	344	209	205
19	1	49	64	81	36	21
	2	43	54	86	39	15
	3	45	51	89	68	19
	4	46	59	78	66	59
5	52	61	79	32	57	
Σ TOTAL		235	289	413	241	171
20	1	12	62	108	54	42
	2	14	65	134	97	50
	3	11	67	154	49	65
	4	9	59	70	60	71
5	17	45	38	55	61	
Σ TOTAL		63	298	504	315	289
21	1	42	69	81	104	69
	2	49	80	78	71	68
	3	38	32	71	62	41
	4	41	72	69	87	70
5	40	63	51	91	82	
Σ TOTAL		210	316	350	415	330
22	1	13	51	112	67	21
	2	16	85	107	71	31
	3	19	87	116	59	18
	4	19	69	113	11	31
5	21	45	109	57	60	
Σ TOTAL		88	337	557	265	161
23	1	24	36	82	71	62
	2	19	34	73	60	57
	3	31	39	134	69	65
	4	21	31	78	45	60
5	56	33	55	29	59	
Σ TOTAL		151	173	422	274	303
24	1	12	38	82	44	35
	2	16	22	88	55	20
	3	21	45	82	49	41
	4	19	29	78	43	26
5	17	5	80	42	51	
Σ TOTAL		85	139	410	233	173
25	1	37	39	86	68	56
	2	11	33	83	18	61
	3	13	36	72	62	53
	4	17	43	78	21	17
5	32	40	85	65	19	
Σ TOTAL		110	191	404	234	206

26	1	28	69	86	51	74
	2	29	59	83	55	70
	3	23	61	72	91	112
	4	33	67	78	49	75
	5	35	75	85	77	68
Σ TOTAL		148	331	404	323	399
27	1	15	69	118	54	71
	2	19	71	109	55	68
	3	13	79	121	61	65
	4	17	74	115	49	73
	5	14	66	123	52	70
Σ TOTAL		78	359	586	271	347
28	1	38	69	121	54	81
	2	29	71	90	152	68
	3	31	67	144	61	55
	4	37	74	54	149	73
	5	41	66	141	71	73
Σ TOTAL		176	347	550	485	350
29	1	35	69	122	122	73
	2	37	71	48	123	68
	3	41	67	117	118	75
	4	117	74	127	120	66
	5	15	66	125	115	55
Σ TOTAL		245	347	539	598	337
30	1	17	53	17	76	36
	2	24	47	118	20	39
	3	9	66	112	69	17
	4	19	48	121	40	43
	5	18	45	15	37	32
Σ TOTAL		87	259	383	242	167

Lampiran 7. Perhitungan Gambaran Histopatologi Diameter Tubulus Seminiferus Testis Mencit Dalam 5 Lapangan Pandang

Ko de	TS	Diame ter	Kod e	T S	Diamet er	Ko de	TS	Diamet er	Ko de	TS	Diame ter	Ko de	TS	Diame ter
1	1	163,66	7	1	116,02	13	1	166,74	19	1	167,67	25	1	109,11
	2	161,74		2	116,70		2	143,21		2	158,42		2	137,04
	3	163,98		3	115,20		3	145,75		3	166,27		3	112,92
	4	182,69		4	132,23		4	132,15		4	159,87		4	114,19
	5	159,77		5	128,09		5	129,10		5	159,15		5	113,16
2	1	207,85	8	1	115,62	14	1	117,1	20	1	141,67	26	1	137,68
	2	182,50		2	120,41		2	134,4		2	130,54		2	136,37
	3	211,65		3	120,30		3	122,4		3	136,88		3	114,83
	4	217,99		4	115,34		4	143,1		4	152,74		4	133,67
	5	197,71		5	136,11		5	149,7		5	151,09		5	144,88
3	1	110,49	9	1	124,50	15	1	131,27	21	1	127,72	27	1	113,69
	2	111,10		2	137,82		2	139,54		2	128,26		2	113,29
	3	153,36		3	123,09		3	137,72		3	129,06		3	113,42
	4	145,75		4	135,61		4	143,40		4	140,26		4	135,36
	5	136,87		5	157,39		5	137,82		5	157,52		5	110,27
4	1	181,24	10	1	109,00	16	1	154,62	22	1	142,12	28	1	167,64
	2	163,44		2	103,93		2	172,84		2	168,26		2	153,71
	3	139,41		3	100,12		3	157,74		3	175,54		3	169,81
	4	154,60		4	108,99		4	150,96		4	153,60		4	171,59
	5	164,74		5	116,60		5	153,58		5	150,89		5	163,54
5	1	132,97	11	1	118,37	17	1	124,34	23	1	131,86	29	1	185,25
	2	125,47		2	105,43		2	114,11		2	121,43		2	222,33
	3	171,84		3	130,50		3	85,79		3	145,70		3	165,40
	4	157,54		4	107,70		4	125,26		4	114,06		4	181,58
	5	120,41		5	110,29		5	119,28		5	143,21		5	169,83
6	1	192,18	12	1	138,28	18	1	130,54	24	1	134,48	30	1	163,28
	2	156,44		2	110,42		2	141,12		2	131,95		2	125,55
	3	164,93		3	136,66		3	119,14		3	149,70		3	188,31
	4	132,29		4	114,07		4	125,64		4	121,79		4	152,70
	5	142,71		5	106,47		5	136,88		5	119,26		5	145,75

Lampiran 8. Hasil Pemeriksaan Kadar MDA Testis Mencit Dalam nmol/ml

Perlakuan	Sampel	Absorbansi	Kadar MDA
Kontrol P0	1	0,165	24.307
	2	0,203	30.091
	3	0,211	31.308
	4	0,144	21.111
	5	0,121	17.610
	6	0,132	19.284
P1	1	0,298	44.550
	2	0,456	68.597
	3	0,393	59.009
	4	0,407	61.139
	5	0,334	50.029
	6	0,303	45.311
P2	1	0,294	43.941
	2	0,277	41.353
	3	0,256	38.157
	4	0,291	43.484
	5	0,294	43.941
	6	0,286	42.723
P3	1	0,268	39.984
	2	0,282	42.114
	3	0,237	35.265
	4	0,267	39.831
	5	0,274	40.897
	6	0,273	40.745
P4	1	0,228	33.896
	2	0,221	32.830
	3	0,217	32.221
	4	0,256	38.157
	5	0,236	35.113
	6	0,246	36.635

Lampiran 9. Analisis Data (ANOVA) Jumlah Sel Spermatogonium, Sel Spermatisit Primer, Spermatisit Sekunder, Spermatid, dan Spermatozoa Tubulus Seminiferus Testis Mencit

NPar Tests

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		SPGM	SPZ1	SPZ2	SPZTD	SPZ	TotalSPZGK
N		30	30	30	30	30	30
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	27.007	50.767	81.247	59.553	48.507	267.080
	Std. Deviation	12.3971	16.7313	33.4556	26.7557	22.5350	90.2879
Most Extreme Differences	Absolute	.190	.107	.129	.204	.094	.130
	Positive	.190	.107	.129	.204	.094	.130
	Negative	-.112	-.096	-.062	-.124	-.081	-.064
Kolmogorov-Smirnov Z		1.042	.586	.707	1.116	.514	.712
Asymp. Sig. (2-tailed)		.228	.882	.699	.165	.955	.690

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Summarize

Case Processing Summary^a

	Cases					
	Included		Excluded		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
SPGM * Perlakuan	30	100.0%	0	0.0%	30	100.0%
SPZ1 * Perlakuan	30	100.0%	0	0.0%	30	100.0%
SPZ2 * Perlakuan	30	100.0%	0	0.0%	30	100.0%
SPZTD * Perlakuan	30	100.0%	0	0.0%	30	100.0%
SPZ * Perlakuan	30	100.0%	0	0.0%	30	100.0%
TotalSPZGK * Perlakuan	30	100.0%	0	0.0%	30	100.0%

a. Limited to first 100 cases.

Case Summaries^a

		SPGM	SPZ1	SPZ2	SPZTD	SPZ	TotalSPZGK
P0	1	41.4	73.2	122.8	59.4	54.2	351.0
	2	32.2	52.2	167.0	148.6	76.6	476.6
	3	48.0	59.0	97.8	88.6	108.2	401.6
	4	41.4	41.6	131.0	51.2	66.4	331.6
	5	48.0	76.6	115.0	87.6	69.6	396.8
	6	20.8	73.6	79.4	70.2	50.6	294.6
	N	6	6	6	6	6	6
Total	Mean	38.633	62.700	118.833	84.267	70.933	375.367
	Std. Deviation	10.4899	14.0813	29.9862	34.8663	20.6722	63.9191
P1	1	11.2	45.6	23.8	28.6	12.4	121.6
	2	28.2	22.4	56.2	32.6	10.2	149.6
	3	28.2	33.4	33.6	39.8	36.4	171.4
	4	13.8	49.6	58.0	41.0	16.2	178.6
	5	18.4	35.0	66.4	32.0	55.8	207.6
	6	16.8	31.4	52.2	36.2	21.2	157.8
	N	6	6	6	6	6	6
Total	Mean	19.433	36.233	48.367	35.033	25.367	164.433
	Std. Deviation	7.2282	9.9063	16.2212	4.8207	17.5925	29.0218
P2	1	16.0	59.0	84.0	46.0	38.0	243.0
	2	39.6	37.2	21.6	63.4	26.6	188.4
	3	15.0	23.0	70.8	50.0	49.6	208.4
	4	18.6	54.6	25.8	46.6	48.2	193.8
	5	15.4	26.4	58.8	43.8	27.4	171.8
	6	22.0	52.0	68.8	41.8	41.0	225.6
	N	6	6	6	6	6	6
Total	Mean	21.100	42.033	54.967	48.600	38.467	205.167
	Std. Deviation	9.4342	15.3307	25.5488	7.7594	9.8855	26.0115
P3	1	47.0	57.8	82.6	48.2	34.2	269.8
	2	12.6	59.6	100.8	63.0	57.8	293.8
	3	42.0	63.2	70.0	83.0	66.0	324.2

	4		17.6	67.4	111.4	53.0	32.2	281.6
	5		30.2	34.6	84.4	54.8	60.6	264.6
	6		17.0	27.8	82.0	46.6	34.6	208.0
	N		6	6	6	6	6	6
Total	Mean		27.733	51.733	88.533	58.100	47.567	273.667
	Std.							
	Deviation		14.3369	16.3828	14.9118	13.4995	15.4746	38.5517
	1		22.0	38.2	80.8	46.8	41.2	229.0
	2		29.6	66.2	80.8	64.6	79.8	321.0
	3		15.6	71.8	117.2	54.2	69.4	328.2
	4		35.2	69.4	110.0	97.0	70.0	381.6
P4	5		49.0	69.4	107.8	119.6	67.4	413.2
	6		17.4	51.8	76.6	48.4	33.4	227.6
	N		6	6	6	6	6	6
Total	Mean		28.133	61.133	95.533	71.767	60.200	316.767
	Std.							
	Deviation		12.6286	13.3355	18.0101	29.8464	18.4169	76.5573
To tal	N		30	30	30	30	30	30
	Mean		27.007	50.767	81.247	59.553	48.507	267.080
	Std. Deviation		12.3971	16.7313	33.4556	26.7557	22.5350	90.2879

a. Limited to first 100 cases.

Oneway

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	
					Lower Bound	Upper Bound			
					SPGM	P0			6
P1	6	19.433	7.2282	2.9509	11.848	27.019	11.2	28.2	
P2	6	21.100	9.4342	3.8515	11.199	31.001	15.0	39.6	
P3	6	27.733	14.3369	5.8530	12.688	42.779	12.6	47.0	
P4	6	28.133	12.6286	5.1556	14.880	41.386	15.6	49.0	
Total	30	27.007	12.3971	2.2634	22.378	31.636	11.2	49.0	

SPZ1	P0	6	62.700	14.0813	5.7487	47.923	77.477	41.6	76.6
	P1	6	36.233	9.9063	4.0442	25.837	46.629	22.4	49.6
	P2	6	42.033	15.3307	6.2587	25.945	58.122	23.0	59.0
	P3	6	51.733	16.3828	6.6882	34.541	68.926	27.8	67.4
	P4	6	61.133	13.3355	5.4442	47.139	75.128	38.2	71.8
	Total	30	50.767	16.7313	3.0547	44.519	57.014	22.4	76.6
SPZ2	P0	6	118.833	29.9862	12.2418	87.365	150.302	79.4	167.0
	P1	6	48.367	16.2212	6.6223	31.344	65.390	23.8	66.4
	P2	6	54.967	25.5488	10.4303	28.155	81.779	21.6	84.0
	P3	6	88.533	14.9118	6.0877	72.884	104.182	70.0	111.4
	P4	6	95.533	18.0101	7.3526	76.633	114.434	76.6	117.2
	Total	30	81.247	33.4556	6.1081	68.754	93.739	21.6	167.0
SPZTD	P0	6	84.267	34.8663	14.2341	47.677	120.857	51.2	148.6
	P1	6	35.033	4.8207	1.9680	29.974	40.092	28.6	41.0
	P2	6	48.600	7.7594	3.1678	40.457	56.743	41.8	63.4
	P3	6	58.100	13.4995	5.5111	43.933	72.267	46.6	83.0
	P4	6	71.767	29.8464	12.1847	40.445	103.089	46.8	119.6
	Total	30	59.553	26.7557	4.8849	49.563	69.544	28.6	148.6
SPZ	P0	6	70.933	20.6722	8.4394	49.239	92.627	50.6	108.2
	P1	6	25.367	17.5925	7.1821	6.905	43.829	10.2	55.8
	P2	6	38.467	9.8855	4.0357	28.092	48.841	26.6	49.6
	P3	6	47.567	15.4746	6.3175	31.327	63.806	32.2	66.0
	P4	6	60.200	18.4169	7.5187	40.873	79.527	33.4	79.8
	Total	30	48.507	22.5350	4.1143	40.092	56.921	10.2	108.2
TotalSPZ	P0	6	375.367	63.9191	26.0949	308.288	442.446	294.6	476.6
	P1	6	164.433	29.0218	11.8481	133.977	194.890	121.6	207.6
	P2	6	205.167	26.0115	10.6192	177.869	232.464	171.8	243.0
	P3	6	273.867	38.5517	15.7387	233.209	314.124	208.0	324.2
	P4	6	316.767	76.5573	31.2544	236.425	397.109	227.6	413.2
	Total	30	267.080	90.2879	16.4842	233.386	300.794	121.6	476.6

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
SPGM	Between Groups	1375.325	4	343.831	2.789	.048
	Within Groups	3081.593	25	123.264		
	Total	4456.919	29			
SPZ1	Between Groups	3229.773	4	807.443	4.129	.011
	Within Groups	4888.393	25	195.536		
	Total	8118.167	29			
SPZ2	Between Groups	20650.168	4	5162.542	10.929	.000
	Within Groups	11808.847	25	472.354		
	Total	32459.015	29			
SPZTD	Between Groups	8899.395	4	2224.849	4.690	.006
	Within Groups	11860.740	25	474.430		
	Total	20760.135	29			
SPZ	Between Groups	7661.005	4	1915.251	6.776	.001
	Within Groups	7066.013	25	282.641		
	Total	14727.019	29			
TotalSPZGK	Between Groups	171646.501	4	42911.625	16.566	.000
	Within Groups	64758.827	25	2590.353		
	Total	236405.328	29			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

SPGM

Duncan

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
P1	6	19.433	
P2	6	21.100	
P3	6	27.733	27.733
P4	6	28.133	28.133
P0	6		38.633
Sig.		.226	.120

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.

SPZ1

Duncan

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
P1	6	36.233	
P2	6	42.033	
P3	6	51.733	51.733
P4	6		61.133
P0	6		62.700
Sig.		.080	.211

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.

SPZ2

Duncan

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
P1	6	48.367		
P2	6	54.967		
P3	6		88.533	
P4	6		95.533	95.533
P0	6			118.833
Sig.		.604	.582	.075

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.

SPZTD

Duncan

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
P1	6	35.033		
P2	6	48.600	48.600	
P3	6	58.100	58.100	58.100
P4	6		71.767	71.767
P0	6			84.267
Sig.		.094	.093	.059

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.

SPZ

Duncan

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
P1	6	25.367			
P2	6	38.467	38.467		
P3	6		47.567	47.567	
P4	6			60.200	60.200
P0	6				70.933
Sig.		.189	.357	.205	.279

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.

TotalSPZGK

Duncan

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
P1	6	164.433		
P2	6	205.167		
P3	6		273.667	
P4	6		316.767	316.767
P0	6			375.367
Sig.		.178	.155	.057

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.

Lampiran 10. Analisis Data (ANOVA) Diameter Tubulus Seminiferus Testis Mencit

NPar Tests

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Diameter TS
N		30
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	141.20627
	Std. Deviation	22.250230
Most Extreme Differences	Absolute	.128
	Positive	.128
	Negative	-.075
Kolmogorov-Smirnov Z		.699
Asymp. Sig. (2-tailed)		.713

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Summarize

Case Processing Summary^a

	Cases					
	Included		Excluded		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
Diameter_TS *	30	96.8%	1	3.2%	31	100.0%
Perlakuan						

a. Limited to first 100 cases.

Case Summaries^a

		Diameter TS
Perlakuan P0	1	166.368
	2	203.540
	3	131.514
	4	160.686
	5	141.646
	6	157.710
Total	N	6
	Mean	160.24400

		Std. Deviation	24.859453
	1		121.648
	2		121.556
	3		135.682
	4		107.728
P1	5		114.458
	6		121.180
		N	6
	Total	Mean	120.37533
		Std. Deviation	9.305107
	1		143.390
	2		133.340
	3		137.950
	4		157.948
P2	5		113.756
	6		130.664
		N	6
	Total	Mean	136.17467
		Std. Deviation	14.630723
	1		162.276
	2		142.584
	3		136.564
	4		158.082
P3	5		131.252
	6		131.436
		N	6
	Total	Mean	143.69900
		Std. Deviation	13.486557
	1		117.284
	2		133.486
	3		117.206
P4	4		165.258
	5		184.878
	6		155.118
	Total	N	6

	Mean	145.53833
	Std. Deviation	27.475559
	N	30
Total	Mean	141.20627
	Std. Deviation	22.250230

a. Limited to first 100 cases.

Oneway

Descriptives

Diameter TS

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					P0	6		
P1	6	120.37533	9.305107	3.798794	110.61022	130.14044	107.728	135.682
P2	6	136.17467	14.630723	5.972968	120.82066	151.52867	113.756	157.948
P3	6	143.69900	13.486557	5.505864	129.54573	157.85227	131.252	162.276
P4	6	145.53833	27.475559	11.216850	116.70450	174.37216	117.206	184.878
Total	30	141.20627	22.250230	4.062318	132.89789	149.51464	107.728	203.540

ANOVA

Diameter TS

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5079.964	4	1269.991	3.422	.023
Within Groups	9277.145	25	371.086		
Total	14357.109	29			

Post Hoc Tests**Homogeneous Subsets****Diameter_TS**

Duncan

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
P1	6	120.37533	
P2	6	136.17467	136.17467
P3	6	143.69900	143.69900
P4	6		145.53833
P0	6		160.24400
Sig.		.057	.057

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.

Lampiran 11. Analisis Data (ANOVA) Kadar MDA Testis Mencit**NPar Tests****One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test**

		MDA testis
N		30
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	39.12110
	Std. Deviation	11.343351
Most Extreme Differences	Absolute	.159
	Positive	.159
	Negative	-.080
Kolmogorov-Smirnov Z		.873
Asymp. Sig. (2-tailed)		.432

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Summarize**Case Processing Summary^a**

	Cases					
	Included		Excluded		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
MDA_testis *	30	96.8%	1	3.2%	31	100.0%
Perlakuan						

a. Limited to first 100 cases.

Case Summaries^a

		MDA testis
	1	24.307
	2	30.091
	3	31.308
Perlakuan P0	4	21.111
	5	17.610
	6	19.284
	Total N	6

		Mean	23.95183
		Std. Deviation	5.692215
	1		44.550
	2		68.597
	3		59.009
	4		61.139
P1	5		50.029
	6		45.311
		N	6
	Total	Mean	54.77250
		Std. Deviation	9.655230
	1		43.941
	2		41.353
	3		38.157
	4		43.484
P2	5		43.941
	6		42.723
		N	6
	Total	Mean	42.26650
		Std. Deviation	2.237010
	1		39.984
	2		42.114
	3		35.265
	4		39.831
P3	5		40.897
	6		40.745
		N	6
	Total	Mean	39.80600
		Std. Deviation	2.368622
	1		33.896
	2		32.830
	3		32.221
P4	4		38.157
	5		35.113
	6		36.635

	N	6
Total	Mean	34.80867
	Std. Deviation	2.284012
	N	30
Total	Mean	39.12110
	Std. Deviation	11.343351

a. Limited to first 100 cases.

Oneway

Descriptives

MDA testis

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
P0	6	23.95183	5.692215	2.323837	17.97822	29.92545	17.610	31.308
P1	6	54.77250	9.655230	3.941731	44.63996	64.90504	44.550	68.597
P2	6	42.26650	2.237010	.913256	39.91890	44.61410	38.157	43.941
P3	6	39.80600	2.368622	.966986	37.32028	42.29172	35.265	42.114
P4	6	34.80867	2.284012	.932444	32.41174	37.20559	32.221	38.157
Total	30	39.12110	11.343351	2.071003	34.88542	43.35678	17.610	68.597

ANOVA

MDA testis

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3024.196	4	756.049	26.724	.000
Within Groups	707.280	25	28.291		
Total	3731.476	29			

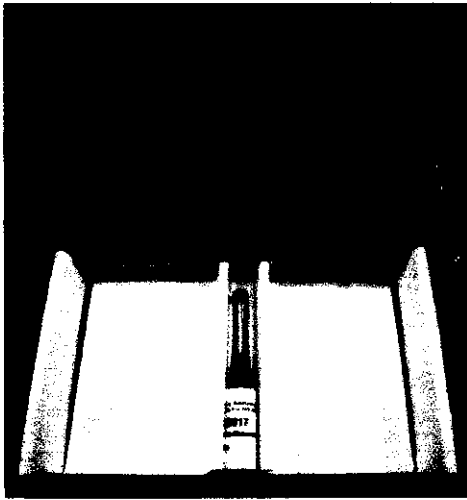
Post Hoc Tests**Homogeneous Subsets****MDA_testis****Duncan**

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
P0	6	23.95183			
P4	6		34.80867		
P3	6		39.80600	39.80600	
P2	6			42.26650	
P1	6				54.77250
Sig.		1.000	.116	.431	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.

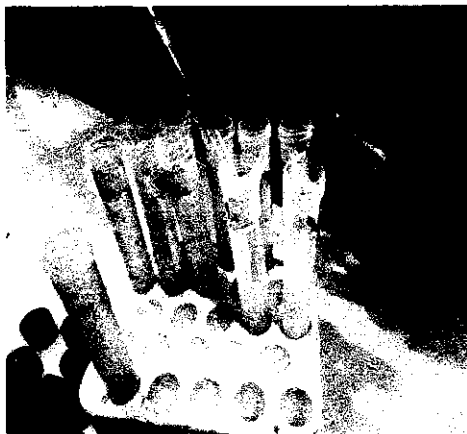
Lampiran 12. Foto – foto Penelitian



Sediaan TCDD



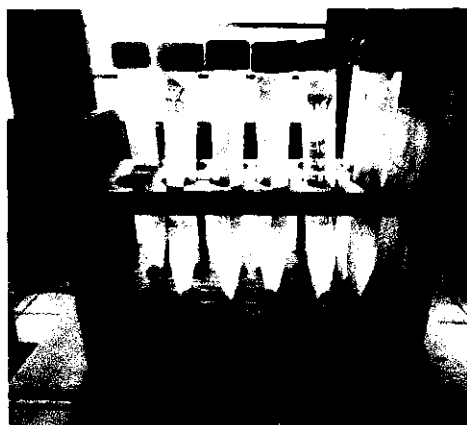
Minyak Jagung



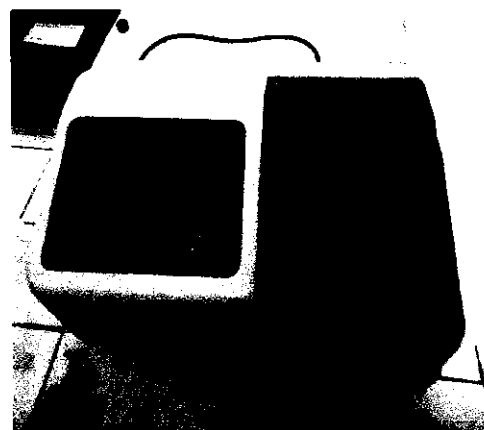
Pemeriksaan MDA



Alat Sentrifuse



Hasil sentrifuse MDA



Spektrofotometer

Lampiran 13. Sertifikat kelaikan etik / *ethical clearance* penelitian

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

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK
“ ETHICAL CLEARANCE ”**

No : 266-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 (α -Tocopherol) Terhadap Jumlah Sel Spermatogenik, Gambaran Histopatologi Tubulus Seminiferus, dan Kadar Malondialdehyde (MDA) Testis Mencit (*Mus musculus*) Yang Diinduksi 2,3,7,8 -Tetrachlorodibenzo-P-Dioxin (TCDD)

PENELITI UTAMA : Rosida Achlis

UNIT/LEMBAGA/TEMPAT PENELITIAN : Program Studi Magister Ilmu Biologi Reproduksi 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