

**EFEK LAMA WAKTU PEMBERIAN 2-METHOXYETHANOL
TERHADAP KADAR *REACTIVE OXYGEN SPECIES* DAN JUMLAH
SPERMATOZOA TIKUS PUTIH
(*Rattus norvegicus*)**

SKRIPSI

SITI NUZULUL MASKUROTIN

MPB 36/06

Mac
e



**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2006**



**EFEK LAMA WAKTU PEMBERIAN 2-METHOXYETHANOL
TERHADAP KADAR REACTIVE OXYGEN SPECIES DAN JUMLAH
SPERMATOZOA TIKUS PUTIH
(*Rattus norvegicus*)**

SKRIPSI

Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Memperoleh
Gelar Sarjana Sains Bidang Biologi Pada
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Airlangga

Oleh :

SITI NUZULUL MASKUROTIN
NIM. 080212576

Tanggal Lulus : 13 Juli 2006

Disetujui oleh :

Pembimbing I.

Dra. ALFIAH HAYATI, M.Kes.

Pembimbing II.

Drs. I.B.RAI PIDADA, M.Si.

LEMBAR PENGESAHAN NASKAH SKRIPSI

Judul : Efek Lama Waktu Pemberian 2-Methoxyethanol Terhadap Kadar *Reactive Oxygen Species* dan Jumlah Spermatozoa Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)
Penyusun : Siti Nuzulul Maskurotin
NIM : 080212576
Tanggal Ujian : 13 Juli 2006

Disetujui oleh :

Pembimbing I.

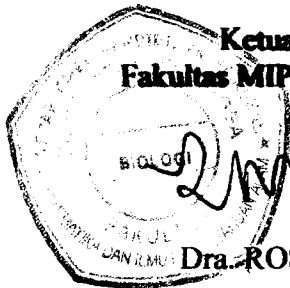
Dra. ALFIAH HAYATI, M.Kes.

Pembimbing II,

Drs. I.B.RAI PIDADA, M.Si

Mengetahui :

Ketua Jurusan Biologi
Fakultas MIPA Universitas Airlangga



Dra. ROSMANIDA, M.Kes.



Sesungguhnya, Aku mengingatkan kepadamu supaya kamu tidak termasuk orang-orang yang tidak berpengetahuan.(QS. Hud : 46)

Dan, apakah orang yang mati kemudian dia kami hidupkan dan kami berikan kepadanya cahaya yang terang, yang dengan cahaya itu dia dapat berjalan ditengah-tengah masyarakat manusia, serupa dengan orang yang keadaannya berada dalam gelap gulita yang berkali-kali tidak dapat keluar daripadanya.

(QS. Al-An'am : 122)

Bacalah dengan nama Rabb-mu Yang menciptakan.(QS. Al-Alaq : 1)

Dan, katakanlah : "Ya Rabb-ku, tambahkanlah kepadaku ilmu pengetahuan".(QS. Thaha : 144)

Dan, Dia telah mengajarkan kepadamu apa yang belum kamu ketahui.

Dan adalah karunia Allah itu sangat besar.(QS. An-Nisa : 113)

**Jangan mengira bahwa setelah kebaikan itu
Tidak ada keburukan
Dan janganlah mengira bahwa keburukan itu
Hanyalah pukulan sekejap**

**Nikmati dan bersenang-senanglah,
Karena setiap sesuatu akan ada akhirnya
Sebagaimana ia juga ada pada awalnya**

**Dan, sampaikan kabar gembira pada malam hari
Bahwa sang fajar pasti datang mengusirnya
Dari puncak-puncak gunung dan dasar lembah
Kabarkan juga
Kepada orang yang dilanda kesusahan
Pertolongan akan datang secepat kelebatan cahaya
dan kedipan mata**

**Dan, Sesungguhnya orang yang berakal tidak akan bosan
menerima manfaat pendapat, tidak berputus asa dalam kondisi
apapun, dan tidak akan berhenti berpikir dan berusaha**

(Aidh bin Abdullah)

PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

Skripsi ini tidak dipublikasikan, namun tersedia di perpustakaan dalam lingkungan Universitas Airlangga, diperkenankan untuk dipakai sebagai referensi kepustakaan, tetapi pengutipan harus seizin penyusun dan harus menyebutkan sumbernya sesuai kebiasaan ilmiah. Dokumen skripsi ini merupakan hak milik Universitas Airlangga.



Siti Nuzulul Maskurotin, 2006, Efek Lama Waktu Pemberian *2-methoxyethanol* Terhadap Kadar *Reactive Oxygen Species* dan Jumlah Spermatozoa Tikus Putih (*Rattus norvegicus*). Skripsi ini dibawah bimbingan Dra. Alfiah Hayati, M.Kes dan Drs.I.B.Rai Pidada, M.Si. Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Airlangga Surabaya.

ABSTRAK

Senyawa *2-methoxyethanol* merupakan senyawa golongan *glycol ether* yang diketahui sebagai bahan yang bersifat toksik dan teratogenik baik pada individu dewasa maupun pada embrio. Sifat toksik 2-ME disebabkan oleh senyawa metabolitnya yang berupa *methoxyaceticacid* (MAA) yang dapat memicu terbentuknya radikal bebas dan menyebabkan degenerasi sel spermatogenik. Berdasarkan sifat toksik dari 2-ME tersebut perlu dilakukan penelitian yang bertujuan untuk mengetahui apakah lama waktu pemberian 2-ME menyebabkan peningkatan kadar *Reactive oxygen species* (ROS) dan penurunan jumlah spermatozoa tikus putih (*Rattus norvegicus*).

Hewan percobaan yang digunakan adalah 30 ekor tikus putih jantan dewasa (umur 12 minggu) dari strain Wistar, berat badan 120-150 gram. Hewan coba dibagi menjadi 3 kelompok perlakuan yang diinjeksi melalui subkutan 0,2 ml 2-ME dosis 200 mg/kg bb yang dibedakan berdasarkan lama waktu pemberian (1 hari, 3 hari, dan 6 hari), dan 3 kelompok kontrol yang diinjeksi 0,2 ml larutan garam fisiologis dan dibedakan berdasarkan lama waktu pemberian (1 hari, 3 hari, dan 6 hari). Sperma diambil dari epididimis bagian kauda dan vas deferens. Pengujian kadar ROS sperma menggunakan metode khemiluminisen dan penghitungan jumlah spermatozoa menggunakan metode *hemositometer*. Analisis data dilakukan dengan menggunakan uji ANOVA, beda nyata terkecil (BNT), uji T, dan regresi linier.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian 2-ME selama 1, 3 dan 6 hari mampu meningkatkan kadar ROS sperma secara signifikan. Rerata kadar ROS pada kelompok 1 hari (P_1) adalah $3,7040 \pm 0,3270$, kelompok 3 hari (P_2) sebesar $4,9720 \pm 0,9246$ dan kelompok 6 hari (P_3) sebesar $5,7720 \pm 0,7889$. Sedangkan hasil uji untuk jumlah spermatozoa menunjukkan bahwa pemberian 2-ME selama 1, 3 dan 6 hari tidak berpengaruh terhadap jumlah spermatozoa. Dari hasil uji regresi antara kadar ROS dan jumlah spermatozoa menunjukkan jika peningkatan kadar ROS sperma tidak berpengaruh terhadap jumlah spermatozoa. Kesimpulan dari penelitian ini adalah, pemberian 2-ME selama 1, 3 dan 6 hari mampu meningkatkan kadar ROS sperma tikus tetapi tidak berpengaruh terhadap jumlah spermatozoanya, dan peningkatan kadar ROS sperma tidak berpengaruh terhadap jumlah spermatozoa.

Kata kunci : 2-ME, *Reactive oxygen species* (ROS), jumlah spermatozoa.

Siti Nuzulul Maskurotin, 2006, The Long Term Effect Of 2-methoxyethanol To The Reactive Oxygen Species degree and Count Of Rat Sperm (*Rattus norvegicus*). This script is under guidance of Dra. Alfiah Hayati, M.Kes and Drs. I.B. Rai Pidada, M.Si. Department of Biology, Mathematics and Science Faculty, Airlangga University, Surabaya.

ABSTRACT

2-methoxyethanol is a substance that known as a toxic and teratogenic for adult or embryo, this substance includes in family of glycol ether. The 2-ME toxicity is caused by its metabolites the methoxyacetic acid (MAA) and methoxyacetaldehyde (MALD) which can trigger the formation of free radicals and cause degeneration of spermatogenic cell. It is necessary to investigate the long term effect 2-ME to the Reactive Oxygen Species (ROS) and count of rat sperm (*Rattus norvegicus*).

This research use 30 male Wistar rat (age 12 week), with weight 120-150 gram. The animals research are divide into three treatment groups which injected by 0,2 ml 2-ME with dose 200 mg/kg body weight and three control group which injected by 0,2 ml of physiological solution that divided for long term effect (1, 3 and 6 day). The sperm was taken from the part of cauda epididymis and vas deferent. The testing ROS sperm concentration has done by using chemiluminescence method. Observation on the sperm count has done by using Haemocytometers. The data were analyzed by one way ANOVA and than continuing by LSD (Least Significant Different), T-test, and Linier regression.

The result of the research showed that long term effect 2-ME during 1, 3 and 6 day could increase ROS sperm significantly. The average ROS concentration of one day group (P_1) is $3,7040 \pm 0,3270$, the three days groups (P_2) is $4,9720 \pm 0,9246$, and six day group (P_3) is $5,7720 \pm 0,7889$. While the analyzed result to sperm count showed that administration 2-ME during 1, 3 and 6 day is not influence to sperm count significantly. The result of regression test on ROS sperm concentration and sperm count showed that increase of ROS concentration is not influence to the sperm count. The conclusion of this result were, long term effect 2-ME could increase ROS sperm degree, but it's not influence to sperm count and increase ROS degree is not influence to sperm count.

Key word : 2-ME, Reactive Oxygen Species (ROS), sperm count.

KATA PENGANTAR

Segala puji syukur kehadiran Allah Subhannahu Wa Ta'ala yang telah melimpahkan rahmat, hidayah serta petunjuk-Nya sehingga penyusun dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul "Efek Lama Waktu Pemberian 2-Methoxyethanol Terhadap Kadar Reactive Oxygen Species dan Jumlah Spermatozoa Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)". Penelitian ini merupakan bagian dari penelitian pembimbing kami dengan topik "Analisis Kualitas Sperma Tikus Terhadap Pemaparan 2-Methoxyethanol". Penyusunan skripsi ini merupakan salah satu syarat bagi penyusun untuk memperoleh gelar Sarjana Sains di Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Airlangga, Surabaya.

Penyusun menyadari masih banyak kekurangan yang harus dilengkapi dalam penyusunan skripsi ini. Oleh karena itu penyusun mengharapkan masukan dan saran demi penyempurnaan skripsi ini. Akhirnya, semoga penelitian yang dilakukan penyusun dan naskah skripsi ini bermanfaat bagi penyusun maupun bagi para pembacanya.

Surabaya, Maret 2006

Siti Nuzulul Maskurotin

UCAPAN TERIMAKASIH

Penyusun dapat menyelesaikan penyusunan skripsi ini berkat ridho dari Allah SWT serta do'a, dukungan dan bantuan dari semua pihak. Oleh karena itu pada kesempatan kali ini penyusun ingin mengucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Drs. H.Abdul Latief Burhan, M.S, selaku Dekan Fakultas MIPA, Universitas Airlangga, Surabaya.
2. Dra. Rosmanida, M.Kes, selaku ketua Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Airlangga, Surabaya.
3. Dra. Alfiah Hayati M.Kes, sebagai dosen pembimbing I yang telah banyak memberikan bimbingan, arahan, dukungan dan semangat kepada penyusun selama penelitian dan penyusunan skripsi ini.
4. Drs. I.B. Rai Pidada M.Si, sebagai dosen pembimbing II yang telah membimbing, mengarahkan dan memberikan saran-saran yang sangat bermanfaat bagi penyusun.
5. Ibu Tri Nurhariyati S.Si, M.Kes, sebagai dosen wali yang selama ini telah memberikan bimbingan, arahan, semangat serta nasehat kepada penyusun.
6. Dra. Sri Puji Astuti W. M.Si, selaku dosen penguji III atas saran-saran dan masukan yang diberikan kepada penyusun.
7. Dr. Bambang Irawan, selaku dosen penguji IV yang telah memberikan saran-saran yang berguna bagi penyusun.

8. Seluruh staf pengajar di Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam yang selama beberapa tahun ini telah bersedia membagi pengetahuan ilmiahnya kepada penyusun.
9. Bapak (Jumangin) dan Ibu (Fatekah), yang selama ini telah memberikan kasih sayang yang tak ternilai harganya. Oleh karena itu penyusun ingin menyampaikan ucapan terimakasih yang sebanyak-banyaknya, karena hanya sepele kata itu yang mampu penulis berikan.
10. Paman-pamanku (Mochsan, Dhoni, Alim dan Juwadi), nenek (Masitah), bibiku (kanah), atas dukungan yang diberikan kepada penyusun baik dukungan moril maupun materiil serta kasih sayang yang diberikan.
11. Adik-adikku tercinta (Sholikah dan Aulia) serta sepupuku Hidayah, atas semangat dan kasih sayang yang diberikan selama ini.
12. Saudara-saudaraku senasib dan sepenanggungan selama penelitian Ergina, Yuyun, Ratri dan Dian PP yang telah banyak membantu baik saat penelitian, maupun selama masa kuliah bersama.
13. Mbak Jean dan Mbak Eja yang berada jauh diseberang sana, atas bantuan-bantuannya selama penelitian dan penulisan skripsi ini.
14. Sahabat-sahabatku Lye, Endah, Titin, Army, Lisa, Aspin dan semua teman-teman Biologi angkatan 2002 yang tak mungkin penulis sebutkan satu persatu.
15. Kakakku, terimakasih atas do'a dan semangat yang diberikan sehingga penyusun menjadi lebih optimis dalam menyelesaikan penyusunan skripsi ini.

16. Saudari-saudariku di Mulyorejo Utara 37, yaitu : mbak Yuli, mbak Sari, Adek, Nur, mbak Dina, mbak Eva, Mack2, Yopi, Via dan teman-teman yang lain atas bantuan dan kebersamaannya selama ini.
17. Segenap karyawan dan karyawan di Jurusan Biologi : mas Eko, pak Eko, pak Sukaji, pak Narto, pak Warni, mas Yanto, mbak Yatminah dan mbak Ari atas bantuannya kepada penulis.

Semoga Allah Subhannahu Wa Ta'ala membalas segala kebaikannya dengan balasan yang lebih baik, serta memberikan rahmat, hidayah serta karunia-Nya, amin.



DAFTAR ISI

	Halaman
LEMBAR JUDUL.....	i
LEMBAR PERNYATAAN	ii
LEMBAR PENGESAHAN.....	iii
LEMBAR PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI.....	iv
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
KATA PENGANTAR.....	vii
UCAPAN TERIMAKASIH.....	viii
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang Permasalahan	1
1.2 Rumusan Masalah	5
1.3 Asumsi	5
1.4 Hipotesis Penelitian	6
1.5 Tujuan Penelitian	7
1.6 Manfaat Penelitian	7
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Tinjauan Umum Tentang 2-ME	8
2.1.1 Paparan 2-ME	8
2.1.2 Distribusi dan metabolisme 2-ME.....	9
2.1.3 Toksisitas 2-ME terhadap organ reproduksi jantan.....	10
2.2 Tinjauan Tentang Spermatozoa	10
2.2.1 Maturasi spermatozoa	11
2.2.2 Jumlah spermatozoa	12
2.3 Radikal Bebas	12
2.4 <i>Reactive Oxygen Species</i>	13
2.5 Kegunaan dan Dampak ROS	17
2.6 Antioksidan	18
2.7 ROS dan Sperma.....	21
BAB III METODE PENELITIAN	
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian	23
3.2 Bahan dan Alat Penelitian	23
4.1.1 Hewan coba	23
4.1.1 Bahan penelitian	23
4.1.1 Alat penelitian	24
3.3 Rancangan Penelitian	24
3.4 Variabel Penelitian	24

3.5 Tahap Perlakuan	25
3.5.1 Pembuatan larutan <i>2-methoxyethanol</i>	25
3.5.2 Pengelompokan dan perlakuan hewan percobaan.....	25
3.6 Pengambilan Spermatozoa	26
3.7 Pemeriksaan Kadar ROS Sperma.....	27
3.8 Penghitungan Jumlah Spermatozoa	27
3.9 Analisis Data	28
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Hasil	29
4.1.1 Efek lama waktu pemberian 2-ME terhadap kadar ROS sperma	29
4.1.2 Efek lama waktu pemberian 2-ME terhadap kadar ROS sperma pada kelompok kontrol.....	30
4.1.3 Efek lama waktu pemberian 2-ME terhadap kadar ROS sperma pada kelompok perlakuan.....	30
4.1.4 Kadar ROS sperma pada kelompok kontrol dan perlakuan dengan variasi lama waktu pemberian	32
4.1.5 Efek lama waktu pemberian 2-ME terhadap jumlah spermatozoa ...	33
4.1.6 Efek lama waktu pemberian 2-ME terhadap jumlah spermatozoa kelompok kontrol.....	34
4.1.7 Efek lama waktu pemberian 2-ME terhadap jumlah spermatozoa kelompok perlakuan.....	35
4.1.8 Jumlah spermatozoa pada kelompok kontrol dan perlakuan dengan variasi lama waktu pemberian	36
4.1.9 Hubungan antara kadar ROS sperma dengan jumlah spermatozoa tikus putih.....	37
4.2 Pembahasan.....	39
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	
5.1 Kesimpulan.....	44
5.2 Saran.....	44
DAFTAR PUSTAKA	45

DAFTAR TABEL

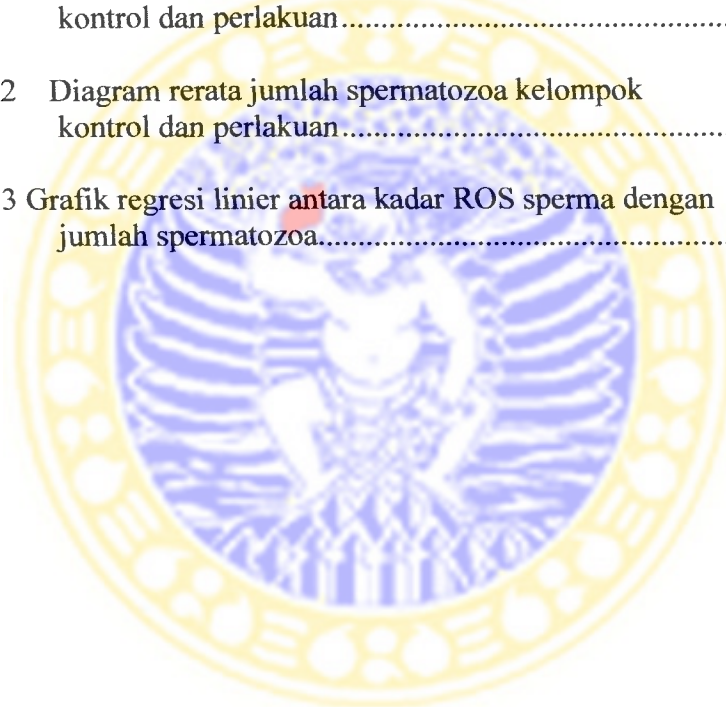
Nomor	Judul	Halaman
Tabel 2.1	Sumber ROS.....	15
Tabel 2.2	Macam-macam antioksidan.....	20
Tabel 4.1	Rerata kadar ROS sperma tikus putih pada kelompok Kontrol	29
Tabel 4.2	Rerata kadar ROS sperma tikus putih pada kelompok Perlakuan	29
Tabel 4.3	Rangkuman hasil uji ANOVA satu arah untuk kadar ROS sperma kelompok kontrol	30
Tabel 4.4	Rangkuman hasil uji ANOVA satu arah untuk kadar ROS sperma kelompok perlakuan	31
Tabel 4.5	Rangkuman hasil uji BNT terhadap kadar ROS sperma tikus kelompok perlakuan	31
Tabel 4.6	Rangkuman hasil uji T terhadap kadar ROS sperma dengan waktu pemberian selama 1, 3 dan 6 hari.....	32
Tabel 4.7	Rerata jumlah spermatozoa tikus putih pada kelompok kontrol	33
Tabel 4.8	Rerata jumlah spermatozoa tikus putih pada kelompok perlakuan	33
Tabel 4.9	Rangkuman hasil uji ANOVA satu arah untuk jumlah spermatozoa kelompok kontrol.....	34
Tabel 4.10	Rangkuman hasil uji ANOVA satu arah untuk jumlah spermatozoa kelompok perlakuan	35
Tabel 4.11	Rangkuman hasil uji T terhadap jumlah spermatozoa dengan waktu pemberian selama 1, 3 dan 6 hari.....	37
Tabel 4.12	Rangkuman hasil uji korelasi antara kadar ROS dengan jumlah spermatozoa.....	37

Tabel 4.13 Rangkuman hasil uji ANOVA regresi terhadap kadar ROS dan jumlah spermatozoa..... 38



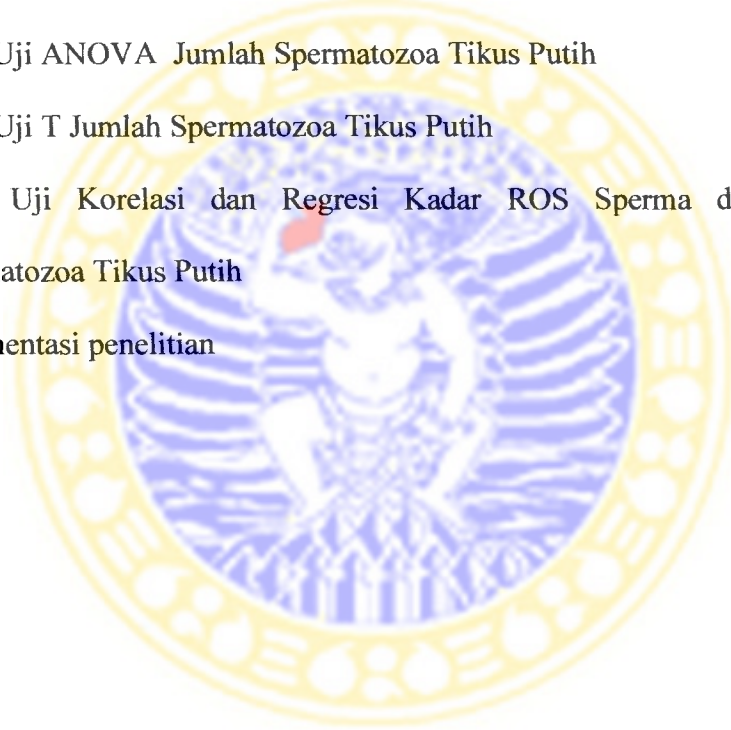
DAFTAR GAMBAR

Nomor	Judul	Halaman
Gambar 2.1	Skema biotransformasi 2-ME.....	9
Gambar 2.2	Proses terjadinya peroksidasi lipid dan protein membran sel	18
Gambar 2.3	Skema enzim mikrosom hati	19
Gambar 4.1	Diagram rerata kadar ROS sperma kelompok kontrol dan perlakuan.....	32
Gambar 4.2	Diagram rerata jumlah spermatozoa kelompok kontrol dan perlakuan.....	36
Gambar 4.3	Grafik regresi linier antara kadar ROS sperma dengan jumlah spermatozoa.....	39



DAFTAR LAMPIRAN

- | Nomor | Judul |
|--------------|---|
| 1. | Tabel Hasil Pengaruh Lama Waktu Pemberian 2-ME Terhadap Kadar ROS Sperma dan jumlah spermatozoa tikus putih |
| 2. | Hasil Uji ANOVA dan BNT Untuk Kadar ROS Sperma Tikus Putih |
| 3. | Hasil Uji T Kadar ROS Sperma Tikus Putih |
| 4. | Hasil Uji ANOVA Jumlah Spermatozoa Tikus Putih |
| 5. | Hasil Uji T Jumlah Spermatozoa Tikus Putih |
| 6. | Hasil Uji Korelasi dan Regresi Kadar ROS Sperma dengan Jumlah Spermatozoa Tikus Putih |
| 7. | Dokumentasi penelitian |



BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kebutuhan manusia akan bahan, barang dan jasa untuk menunjang kehidupannya dari waktu ke waktu semakin meningkat. Oleh karena itu manusia diuntut untuk selalu berusaha memenuhi kebutuhannya dengan berbagai upaya. Salah satu upaya yang dapat dilakukan ialah dengan mengembangkan berbagai industri, diantaranya industri cat, pernis, plastik, tinta maupun industri elektronik. Industri-industri tersebut sering menggunakan senyawa-senyawa kimia dalam proses produksinya. Salah satu senyawa kimia yang sering digunakan adalah 2-*methoxyethanol* (2-ME).

Senyawa 2-ME merupakan senyawa golongan *Glycol ether* yang digunakan sebagai salah satu bahan dasar plastik (*plastisizer*) (Rumanta *et al.*, 2001). Selain itu 2-ME juga digunakan dalam industri cat, pernis, pencelup, dan resin. Senyawa tersebut diketahui bersifat toksik dan teratogenik baik pada manusia maupun hewan (Anonimus, 2002). Menurut Suyono dan Wijaya (1995) resiko paparan terbesar dari bahan ini adalah para pekerja bagian produksi yang menggunakan bahan ini sebagai pembuat zat pewarna, pencelup, tukang cetak dan lain-lain.

Senyawa 2-ME dapat masuk ke dalam tubuh hewan dan manusia melalui pernapasan (terhirup), pencernaan (tertelan) dan melalui kontak langsung dengan kulit. Senyawa ini dalam tubuh akan mengalami oksidasi menjadi 2-

methoxyacetaldehid (MALD) dengan katalisis alkohol dehidrogenase dan selanjutnya menjadi *methoxyacetic acid* (MAA) dengan bantuan aldehyd dehidrogenase. Kedua senyawa metabolit tersebut diketahui sebagai senyawa yang sangat berbahaya bagi sel (Moslen *et al.*, 1995).

Pada hewan jantan, 2-ME merupakan toksikan reproduksi dengan testis sebagai sasaran utamanya. Kelainan yang ditimbulkan antara lain, menurunnya berat testis dan berat kelenjar asesori, menurunnya produksi cairan tubulus seminiferus, atrofi tubulus seminiferus, degenerasi sel-sel spermatogenik terutama spermatosit *pachiten* pada tahap profase, dan terganggunya sel sertoli dalam pembentukan laktat yang diperlukan dalam spermatogenesis (Rumanta *et al.*, 2001). Sedangkan pada pengecat kapal yang menggunakan 2-ME sebagai bahan pelarut dalam pembuatan cat, dapat meningkatkan kejadian oligospermia sampai azoospermia (Li *et al.*, 1997).

Penelitian Rumanta *et al.* (2001) menyatakan bahwa MAA dapat menginduksi kerusakan sel-sel spermatogenik dalam testis dengan cara merusak sistem *blood testis barrier* yang dibentuk oleh sel Sertoli. Hal ini ditunjukkan dengan terjadinya vakuolisasi sel Sertoli menciit yang di induksi dengan MAA pada kadar 100, 150, 225 dan 300 mg/kg berat badan. Senyawa 2-ME mempunyai sifat sangat reaktif dan oksidan kuat. Sehingga proses oksidasi 2-ME dalam sel dapat memicu terbentuknya radikal bebas atau oksidan. Radikal bebas adalah atom, gugus atom atau molekul yang orbital terluarnya memiliki elektron yang tidak berpasangan (Gitawati, 1995). Bahan ini bersifat sangat reaktif dan oksidan yang dapat menimbulkan kerusakan sel atau jaringan (McGee *et al.*, 2003).

Menurut Gitawati (1995) dalam kurun waktu 15 tahun terakhir banyak studi dilakukan untuk mengetahui peran radikal bebas dalam menimbulkan kerusakan sel dan terjadinya berbagai macam kelainan tubuh. Salah satu radikal bebas yang banyak dipelajari dan dikenal bersifat toksik bagi sel hidup adalah radikal bebas oksigen (superoksida) dan derivatnya (radikal hidroksil).

Hasil penelitian Hayati *et al.*, (2004) menyatakan bahwa pemberian 2-ME dosis 200 mg/kg berat badan pada mencit jantan selama 3 minggu berturut-turut tanpa penghentian menyebabkan penurunan ukuran diameter tubulus seminiferus dan jumlah sel spermatogenik yang lebih parah dibandingkan dengan kelompok yang diberi penghentian. Hal ini menunjukkan bahwa lama waktu pemberian 2-ME yang berbeda dapat menimbulkan efek yang berbeda pula.

Reactive Oxygen Species (ROS) adalah senyawa oksidan yang dihasilkan dari proses reduksi satu elektron oksigen. Senyawa ROS dibentuk dalam sel secara terus menerus melalui metabolisme normal (Marks *et al.*, 2000). Senyawa ROS pada kadar normal penting untuk melawan benda asing yang patogen, sedangkan dalam jumlah berlebih akan mengoksidasi lipid, protein dan DNA sehingga menyebabkan kerusakan atau kematian sel (Sudjarwo, 1999).

Pada kondisi normal seminal plasma mengandung mekanisme antioksidan yang dapat menetralkan ROS dan melindungi spermatozoa dari kerusakan (Sikka, 1996). Antioksidan yang terdapat dalam seminal plasma dan spermatozoa antara lain superoksida dismutase (SOD), katalase, glutathion peroksidase serta beberapa senyawa yang mempunyai aktifitas seperti SOD dan katalase. Diantaranya α -tokoferol, asam askorbat, glutathion, piruvat, taurin, hipotaurin dan albumin. Jika

produksi ROS dan antioksidan seimbang maka tidak akan terjadi kerusakan sel spermatozoa. Sebaliknya, jika produksi ROS melebihi kemampuan antioksidan maka dapat menimbulkan infertilitas atau kemandulan (Lamirande *et al.*, 1997).

Beberapa penelitian yang telah dilakukan akhir-akhir ini menunjukkan bahwa 25% - 40% pria infertil memiliki kadar ROS yang tinggi dalam spermanya (Saleh dan Agarwal, 2002). Kadar ROS sperma yang tinggi ini berkorelasi kuat dengan kejadian oligospermia, asthenospermia dan morfologi abnormal spermatozoa (Park *et al.*, 2004). Seperti sel hidup yang lain, spermatozoa juga menghasilkan ROS, yang sebagian besar berasal dari aktivitas metabolisme normal (Lamirande *et al.*, 1997). Dalam kadar rendah ROS di pergunakan untuk proses maturasi spermatozoa, tetapi dalam kadar tinggi ROS pada spermatozoa dapat menyebabkan terbentuknya peroksidasi lipid (Lamirande *et al.*, 1997) dan mempengaruhi kualitas sperma (Sanocka dan Kurpisz, 2004). Kadar ROS yang tinggi dalam sperma dapat menyebabkan peroksidasi asam lemak tak jenuh pada membran plasma spermatozoa (Sharma *et al.*, 1999) morfologi abnormal, dan penurunan motilitas spermatozoa serta berpengaruh pada fusi spermatozoa-oosit (Potts *et al.*, 1999). Peroksidasi asam lemak tak jenuh pada membran spermatozoa menyebabkan degradasi lemak, sehingga terbentuk berbagai produk seperti malondialdehid (MDA). Malondialdehid terdapat dalam darah atau urin dan dapat digunakan sebagai indikator kerusakan membran akibat radikal bebas (Marks *et al.*, 2000).

Berdasarkan uraian tersebut diatas dapat diketahui bahwa 2-ME dapat menimbulkan kerusakan sel-sel spermatogenik pada testis. Sedangkan kadar ROS

yang tinggi dalam sperma dapat menyebabkan peroksidasi lipid pada sel spermatozoa. Akan tetapi belum ada penelitian yang menyatakan bahwa 2-ME berpengaruh terhadap kadar ROS sperma dan hubungannya dengan jumlah spermatozoa. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui efek 2-ME terhadap kadar ROS sperma dan jumlah spermatozoa tikus putih (*Rattus norvegicus*).

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut diatas, dapat dirumuskan masalah sebagai berikut :

1. Apakah lama waktu pemberian 2-ME berpengaruh terhadap kadar ROS sperma tikus putih (*Rattus norvegicus*) ?
2. Apakah lama waktu pemberian 2-ME berpengaruh terhadap jumlah spermatozoa tikus putih (*Rattus norvegicus*) ?
3. Bagaimanakah hubungan antara kadar ROS sperma dengan jumlah spermatozoa setelah pemberian 2-ME ?

1.3 Asumsi

Penelitian ini didasarkan pada asumsi bahwa 2-ME sebagai oksidan kuat dan reaktif yang dapat memicu terbentuknya radikal bebas, sehingga pemberian 2-ME pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) dapat meningkatkan kadar ROS sperma dan menyebabkan penurunan jumlah spermatozoa.

1.4 Hipotesis Penelitian

Hipotesis kerja

1. Jika 2-ME bersifat oksidatif dan dapat menimbulkan terbentuknya radikal bebas, maka lama waktu pemberian 2-ME pada tikus jantan akan mempengaruhi kadar ROS spermanya.
2. Jika 2-ME bersifat toksik terhadap sistem reproduksi jantan, maka lama waktu pemberian 2-ME kepada tikus jantan akan mempengaruhi jumlah spermatozoanya.
3. Jika 2-ME bersifat toksik dan reaktif terhadap sistem reproduksi jantan serta memicu terjadinya kematian sel dan terbentuknya radikal bebas, maka terdapat hubungan antara kadar ROS sperma dengan jumlah spermatozoa tikus jantan.

Hipotesis statistik

1. H_0 : Lama waktu pemberian 2-ME tidak berpengaruh terhadap kadar ROS sperma tikus putih.
 H_1 : Lama waktu pemberian 2-ME berpengaruh terhadap kadar ROS sperma tikus putih.
2. H_0 : Lama waktu pemberian 2-ME tidak berpengaruh terhadap jumlah spermatozoa tikus putih.
 H_1 : Lama waktu pemberian 2-ME berpengaruh terhadap jumlah spermatozoa tikus putih.
3. H_0 : Tidak ada hubungan antara kadar ROS sperma dengan jumlah spermatozoa tikus putih.

H₁ : Ada hubungan antara kadar ROS sperma dengan jumlah spermatozoa tikus putih.

1.5 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Mengetahui pengaruh lama waktu pemberian 2-ME terhadap kadar ROS sperma tikus putih (*Rattus norvegicus*).
2. Mengetahui pengaruh lama waktu pemberian 2-ME terhadap jumlah spermatozoa tikus putih (*Rattus norvegicus*).
3. Mengetahui hubungan antara kadar ROS sperma dengan jumlah spermatozoa tikus putih (*Rattus norvegicus*).

1.6 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai acuan dalam upaya mengungkapkan terjadinya gangguan reproduksi pada pria akibat bahan polutan yang berasal dari bahan dasar plastik, cat atau pernis ditinjau dari aspek kualitas sperma. Selain itu hasil dari penelitian dapat digunakan sebagai suatu peringatan kepada para pekerja yang berhubungan dengan bahan yang menggunakan 2-methoxyethanol.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Tinjauan Umum Tentang 2-ME

Senyawa 2-ME merupakan sinonim dari *ethyleneglycol monomethylether* (EGME) atau *methyl glycol* dan *methyl cellosolve*. Pada suhu kamar, senyawa ini berupa cairan tidak berwarna, mempunyai aroma eter ringan dengan struktur kimia $\text{CH}_3\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, dan titik didih 124°C serta titik beku $-85,1^\circ\text{C}$ (Johanson, 2000).

Senyawa 2-ME tidak tersedia di alam. Senyawa ini diproduksi dari reaksi antara *ethylene oxide* dengan *methanol*. Pada tahun 1993 penggunaan 2-ME diperkirakan mencapai 260 ton per tahun (Johanson, 2000). Senyawa 2-ME sering digunakan sebagai pelentur dalam industri plastik; pelarut dalam cat, pernis, pencelup, pewarna tekstil; bahan bakar pesawat, sabun, detergen, dan kosmetik (Anonimus, 2002).

2.1.1 Paparan 2-ME

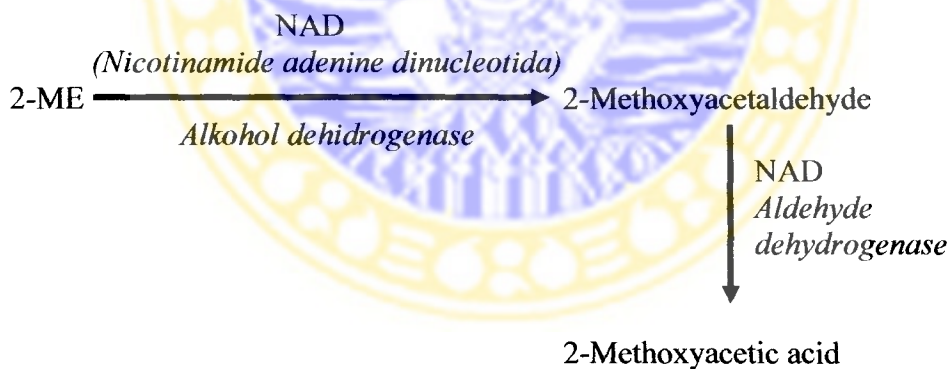
Senyawa 2-ME dapat memasuki tubuh melalui makanan atau minuman yang terkontaminasi, pernapasan, atau kulit jika terjadi kontak langsung (Hayati *et al.*, 2004). Paparan terbesar adalah absorpsi melalui kulit (Suyono dan Wijaya, 1995).

American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH) telah merekomendasikan batas paparan kerja terhadap 2-ME melalui inhalasi

adalah 5 ppm, dengan asumsi waktu kerja rata-rata 8 jam sehari. Sedangkan *National Occupational Hazard Survey* merekomendasikan batas paparan adalah 0,1 ppm dengan waktu kerja rata-rata 10 jam sehari (Anonimus, 2002).

2.1.2 Distribusi dan metabolisme 2-ME

Di dalam tubuh, senyawa 2-ME merupakan hasil hidrolisis dari *dimethylphtalate* (DMEP). Senyawa 2-ME akan mengalami proses hidrolisis menjadi *2-methoxyacetaldehid* dengan bantuan alkohol dehidrogenase. Senyawa MALD yang terbentuk juga akan mengalami proses hidrolisis dengan katalisator enzim aldehyd dehidrogenase menjadi *2-methoxyacetic acid*. Senyawa MALD dan MAA yang merupakan hasil metabolisme 2-ME diketahui bersifat toksik pada jaringan hepar dan testis (Moslen *et al.*, 1995).



Gambar 2.1. Skema biotransformasi 2-ME (Moslen *et al.*, 1995)

Perubahan 2-ME menjadi MAA dalam serum atau plasma darah berlangsung relatif cepat dengan waktu paruh 6 jam pada tikus dan 20 jam pada monyet, sedangkan waktu paruh ekskresi MAA lewat urin pada manusia berjalan sekitar 77 jam (Johanson, 2000). Jumlah total MAA yang di ekskresikan lewat urin pada manusia sekitar 86% dari 2-ME yang terhirup.

2.1.3 Toksisitas 2-ME pada organ reproduksi jantan

Senyawa 2-ME dapat menyebabkan gangguan reproduksi pada hewan jantan, yaitu berkurangnya berat testis, jumlah sperma, atrofi testis dan azoospermia (Johanson, 2000). Penelitian Hayati *et al.*(2004) membuktikan bahwa pendedahan 2-ME dengan dosis 200 mg/kg bb pada mencit jantan menyebabkan penurunan mortalitas, meningkatkan abnormalitas spermatozoa dan azoospermia setelah pemberian 2-ME selama 3 minggu. Hal ini disebabkan oleh sel-sel spermatogenik yang telah rusak akibat pemberian 2-ME diabsorpsi oleh sel-sel sertoli dalam tubulus seminiferus.

Penelitian Rumanta *et al.*(2001) dengan menggunakan mencit swiss Webster jantan yang diberi MAA secara *gavage* dengan dosis 100, 150, 225 dan 300 mg/kg bb menyebabkan penurunan berat testis dan epididimis, penurunan jumlah dan motilitas spermatozoa serta peningkatan jumlah spermatozoa abnormal.

2.2. Tinjauan Tentang Spermatozoa

Spermatozoa merupakan sel yang sangat penting dalam proses fertilisasi. Spermatozoa diproduksi dalam tubulus seminiferus pada testis dan dibentuk dari sel spermatogonium yang terletak pada lamina basalis. Proses pembentukan spermatozoa dari spermatogonium disebut sebagai spermatogenesis (Junquiera *et al.*, 1995).

Proses spermatogenesis dibagi dalam 3 fase yaitu : (1) fase spermatositogenesis, yaitu proses perkembangan spermatogonium menjadi

spermatisit, (2) fase miosis yaitu tahap masak dari spermatisit yang menghasilkan spermatid dengan jumlah kromosom haploid, (3) fase spermiogenesis, yaitu proses transformasi spermatid menjadi spermatozoa (Delman dan Brown, 1992).

Spermatozoa bergerak dari tubulus seminiferus menuju epididimis melalui duktus eferens. Pada epididimis, spermatozoa mengalami proses pemasakan sebelum mampu membuahi ovum. Spermatozoa dari tubulus seminiferus masih bersifat imotil. Spermatozoa dapat aktif bergerak setelah menyentuh bahan-bahan yang disekresikan oleh kelenjar-kelenjar aksesoris (ampula, kelenjar vesicular, kelenjar bulbourethralis dan kelenjar prostat). Meskipun demikian, banyak diantara spermatozoa tersebut mengalami degenerasi dan diserap kembali oleh sel-sel epitelium epididimis dan duktus deferens (Frandsen, 1992).

2.2.1 Maturasi spermatozoa

Maturasi spermatozoa merupakan proses transformasi spermatozoa dari keadaan immatur menjadi spermatozoa matur yang mampu untuk melakukan fertilisasi (Vernett *et al.*, 2001). Proses maturasi spermatozoa terjadi dalam epididimis bagian kaput dan korpus, sedangkan bagian kauda berfungsi sebagai tempat penyimpanan. Selama proses maturasi, spermatozoa mengalami serangkaian perubahan morfologi dan fungsional yang bertujuan untuk meningkatkan kemampuannya dalam proses fertilisasi. Perubahan-perubahan tersebut antara lain : peningkatan motilitas, perubahan pola metabolik, perubahan sifat permukaan membran plasma, stabilisasi membran plasma dan pengurangan

jumlah sitoplasma (Dellman dan Brown, 1992). Menurut Poernomo *et al.*, (2004) selama maturasi spermatozoa juga mengalami dehidrasi pada nukleoplasmanya sehingga menyebabkan perubahan bentuk kepala dari bulat menjadi lonjong meruncing. Bentuk kepala seperti ini meningkatkan potensi sel spermatozoa dalam proses fertilisasi.

2.2.2 Jumlah spermatozoa

Jumlah spermatozoa merupakan salah satu parameter yang sangat penting dalam menentukan kualitas sperma, karena jumlah spermatozoa sangat penting untuk menentukan fertilitas. Oleh karena itu penghitungan jumlah spermatozoa rutin dilakukan dalam analisis sperma (Yatim, 1990).

Pada pria dewasa normal jumlah sperma yang diejakulasikan biasanya 3,5 ml dengan jumlah spermatozoa per ml adalah 35-200 juta. Jika jumlah spermatozoanya kurang dari 20 juta/ml, maka dapat dikatakan mengalami infertilitas (Guyton dan Hall, 1997). Sedangkan pada hewan jantan normal jumlah spermatozoanya lebih banyak. Misalnya pada domba jantan sebesar $4,4 \times 10^9$ per ml dan pada sapi sebanyak $2,0 \times 10^9$ per ml (Frandsen, 1992).

2.3. Radikal Bebas

Radikal bebas adalah suatu gugus, molekul, atom atau ion yang mempunyai satu elektron yang tidak berpasangan. Karena mempunyai elektron yang tidak berpasangan, maka radikal bebas bersifat tidak stabil dan cenderung menarik satu elektron dari lingkungannya untuk mencapai keadaan yang stabil

(Sudjarwo, 1999). Kecenderungan radikal bebas untuk menarik pasangan elektron dari lingkungannya, menyebabkan radikal bebas digolongkan sebagai oksidan. Akan tetapi tidak setiap oksidan adalah radikal bebas (Suryohudoyo, 2000).

Radikal bebas lebih berbahaya jika dibandingkan dengan oksidan yang bukan radikal. Hal ini disebabkan oleh sifat radikal bebas sangat reaktif dan cenderung untuk membentuk radikal baru yang selanjutnya jika bertemu dengan molekul lain akan membentuk radikal baru lagi, sehingga terjadilah reaksi berantai (*chain reaction*). Reaksi rantai tersebut akan berhenti jika radikal bebas yang terbentuk dapat diredam (Suryohudoyo, 2000).

Menurut Gitawati (1995) radikal bebas dalam tubuh dapat terbentuk melalui berbagai cara, misalnya:

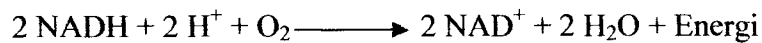
1. Absorpsi radiasi (ionisasi, sinar ultra violet, radiasi sinar tampak, radiasi panas).
2. Reaksi redoks yang melibatkan oksigen.
3. Polutan, sampah organik yang dibakar, dan rokok.
4. Proses fagositosis oleh sel-sel fagositik.

Radikal bebas selain berasal dari luar tubuh dapat juga dihasilkan dari proses-proses metabolisme biologis dan melibatkan apa yang disebut sebagai *Reactive Oxygen Species* (ROS) (Suryohudoyo, 2000).

2.4. *Reactive Oxygen Species* (ROS)

Reactive Oxygen Species sesuai dengan namanya merupakan senyawa yang berasal dari oksigen (O_2) yang digunakan oleh organisme dalam reaksi

metabolisme untuk menghasilkan energi dalam bentuk adenosin trifosfat (ATP) yaitu melalui fosforilasi oksidatif yang terjadi di mitokondria. Proses tersebut secara sederhana dapat digambarkan sebagai berikut (Suryohudoyo, 2000).



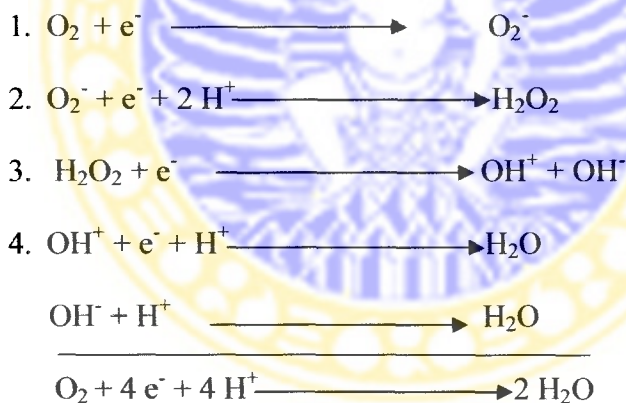
Keterangan :

NADH = Bentuk tereduksi dari NAD

ADP = Adenosin difosfat

P = Fosfat

Pada proses selanjutnya oksigen di metabolisme menjadi 2 molekul H_2O dengan penambahan 4 buah elektron yang disertai dengan 4 buah atom hidrogen (H) melalui suatu reaksi sekuensial sebagai berikut (Siregar, 1992). Langkah :



Pada setiap penambahan elektron kepada molekul O_2 akan dihasilkan senyawa yang sangat reaktif. Penambahan satu elektron pertama kepada molekul O_2 menyebabkan terbentuknya anion radikal superoksida (O_2^-). Penambahan elektron kedua menghasilkan hidrogen peroksida (H_2O_2) dan penambahan elektron yang ketiga menghasilkan hidroksi radikal (OH^+) (Siregar, 1992).

Dalam keadaan tertentu transfer elektron berjalan kurang sempurna sehingga terbentuk senyawa-senyawa oksigen reaktif yang sangat berbahaya, karena dapat mengakibatkan kerusakan sel jika tidak diredam (Suryohudoyo, 2000). Selain berasal dari proses respirasi dalam mitokondria, ROS juga dapat dihasilkan oleh sel atau organel lainnya seperti yang tercantum pada tabel 2.1.

Tabel 2.1. Sumber ROS (Bottje *et al.*, 2000)

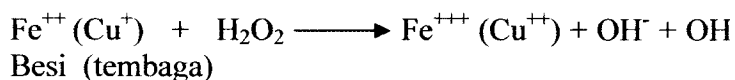
Jenis	Singkatan	Sumber
Radikal superoksida	O_2^-	Mitokondria, oksidase (contoh: xanthin oksidase)
Radikal hidroksil	OH^-	Sitokrom P450, reaksi antara H_2O_2 dengan ion logam
Hidrogen peroksida	H_2O_2	Mitokondria
Radikal peroksil	OOH^-	Membran, metabolisme prostaglandin
Asam hipoklorit	$HClO$	Sel darah putih

Reactive Oxygen Species sebagian bersifat radikal dan sebagian lagi bukan radikal. Senyawa oksigen reaktif yang bersifat radikal antara lain radikal hidroksil (OH^-), radikal peroksil (OOH^-) dan radikal superoksida, sedangkan yang bukan radikal yaitu singlet oksigen (O_2^{\cdot}), hidrogen peroksida dan ion hipoklorit (ClO^-) (Suryohudoyo, 2000).

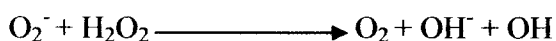
Radikal hidroksil adalah oksidan yang sangat reaktif dan tidak stabil. Radikal hidroksil dapat bereaksi dengan hampir semua substrat biologis. Karena sifatnya yang sangat reaktif, efek radikal hanya berlangsung di daerah dekat dengan tempat terbentuknya, dan dalam kondisi fisiologis normal tidak ditemukan radikal hidroksil dalam kadar yang tinggi (Gitawati, 1995). Diantara semua ROS, radikal hidroksil adalah yang paling reaktif. Oleh karena itu radikal hidroksil paling berbahaya diantara radikal bebas yang lain. Radikal hidroksil bukan merupakan

produk primer dalam proses biologis, tetapi berasal dari H_2O_2 dan O_2^- melalui reaksi fenton dan reaksi Haber-weiss sebagai berikut (Suryohudoyo, 2000):

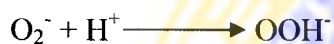
Reaksi fenton



Reaksi Haber-weiss



Radikal peroksil terbentuk dari hasil reaksi antara ion superoksida dengan ion hidrogen (Suryohudoyo, 2000).



Sedangkan radikal superoksida adalah radikal yang terbentuk dari O_2 bebas dengan pemberian satu elektron. Reaktivitas superoksida sangat terbatas karena adanya dismutase spontan yang membentuk H_2O_2 dan O_2 . Terbatasnya reaktivitas superoksida menyebabkan radikal ini dapat berdifusi dan bereaksi dengan substratnya dalam jarak yang relatif lebih jauh dari tempatnya, meskipun superoksida dapat bereaksi dengan berbagai substrat biologis (Gitawati, 1995).

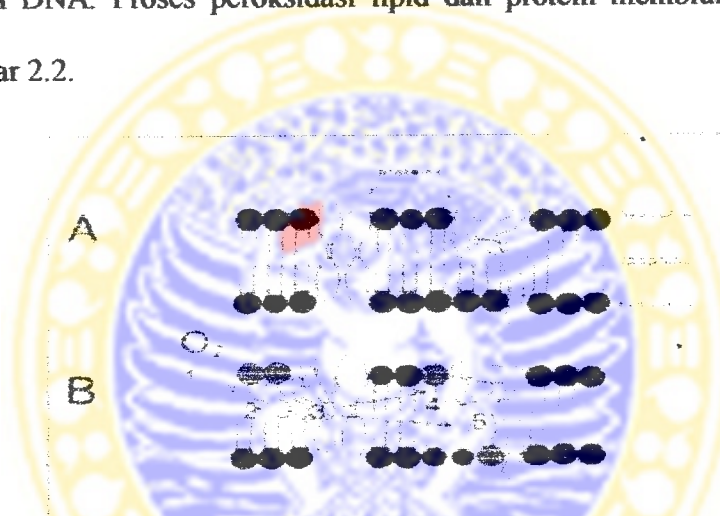
Singlet oksigen merupakan bentuk oksigen yang jauh lebih reaktif dibanding oksigen biasa. Singlet oksigen dapat terbentuk dari reaksi-reaksi yang dikatalisis oleh enzim-enzim tertentu, antara lain (Suryohudoyo, 2000):

- a. Enzim mono-oksigenase yang menggunakan sitokrom p450. jika enzim tersebut menggunakan suatu peroksida sebagai substrat.



pertumbuhan sel, menginduksi hiperaktivasi, kapasitasi dan reaksi akrosom spermatozoa (Sanocka dan Kurpisz, 2004).

Senyawa oksigen reaktif ROS dapat merusak komponen sel yang penting untuk mempertahankan integritas dan kehidupan sel. Hal ini disebabkan oleh daya reaktifitasnya yang tinggi (Suryohudoyo, 2000). McGee *et al.*, (2003) menyebutkan bahwa ROS dapat mengoksidasi asam lemak dari membran sel, protein dan DNA. Proses peroksidasi lipid dan protein membran dapat dilihat pada gambar 2.2.



Gambar 2.2. Proses terjadinya peroksidasi lipid dan protein membran sel (Bottje *et al.*, 2000).

- A. Struktur lipid bilayer dan asosiasi protein dengan membran.
- B. Urutan kejadian peroksidasi lipid akibat ROS.
 1. Senyawa ROS menarik elektron dari molekul lipid.
 2. Radikal peroksil lipid yang terbentuk menarik elektron dari molekul lipid di sebelahnya.
 - 3 dan 4. Fungsi protein membran terganggu akibat perubahan bentuk membran akibat oksidasi protein.
 5. Radikal yang terbentuk mengakibatkan reaksi berantai.

2.5. Antioksidan

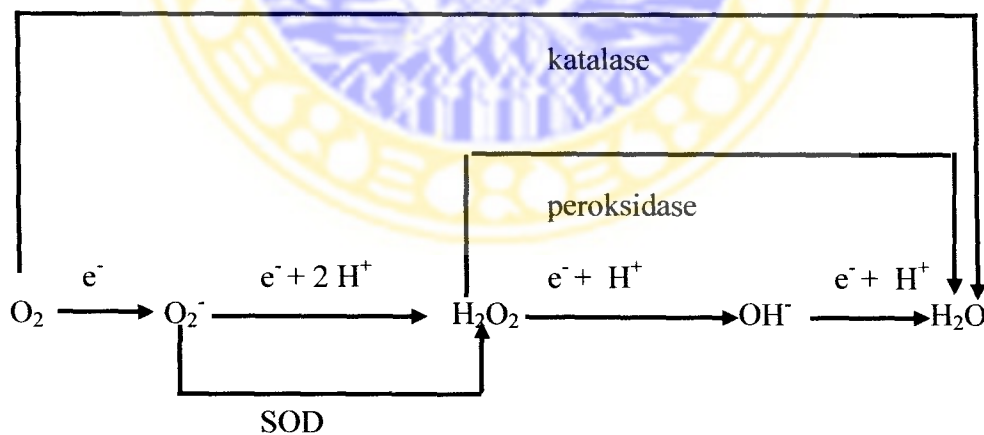
Senyawa-senyawa oksigen reaktif ROS terjadi akibat proses biologis normal, namun apabila aktifitas ROS tidak diredam maka oksigen yang

merupakan kebutuhan utama organisme aerobik dapat menjadi suatu bahan yang mematikan bagi organisme aerobik itu sendiri. Organisme aerobik mempunyai kemampuan untuk meredam dampak negatif oksidan, yaitu dengan antioksidan (Suryohudoyo, 2000).

Antioksidan adalah senyawa yang dapat bereaksi dengan oksidan dan berfungsi menetralkan oksidan tersebut (Gitawati, 1995). Berdasarkan mekanisme pencegahannya terhadap dampak negatif oksidan, antioksidan dibagi menjadi 2 kelompok, yaitu (Suryohudoyo, 2000) :

a) Antioksidan pencegah (*Preventive anti-oxidants*)

Bertujuan untuk mencegah terhimpunnya senyawa oksidan yang berlebih. Beberapa antioksidan yang bertindak sebagai pencegah adalah enzim katalase, peroksidase dan superoksida dismutase (SOD). Mekanisme kerja ketiga enzim tersebut dapat dilihat pada gambar 2.3.



Gambar.2.3 Skema enzim mikrosom hati (katalase, peroksidase dan superoksida dismutase (SOD) secara fisiologis menetralkan radikal bebas (Gitawati, 1995).

b) Antioksidan pemutus reaksi rantai.

Beberapa antioksidan yang termasuk dalam kelompok ini adalah vitamin E (tokoferol), vitamin C, β -karoten, glutathion dan sistein (Suryohudoyo, 2000).

Antioksidan pencegah dapat disebut juga sebagai antioksidan enzimatik, sedangkan antioksidan pemutus rantai disebut sebagai antioksidan nonenzimatik.

Tabel 2.2. Macam-macam antioksidan (Bottje *et al.*, 2000)

Jenis antioksidan	Jaringan	Kerja
I. Nonenzimatik		
-Vitamin E (tocopherol)	Membran dan cairan ekstraselular	Merubah O_2^- , OH dan radikal lipid peroksil menjadi senyawa yang kurang reaktif Antioksidan pemutus reaksi rantai
-Vitamin A (β -karoten)	Membran	Menetralkan O_2^- , interaksi secara langsung dengan radikal peroksil
-Vitamin C (asam askorbat)	Cairan ekstraselular dan intraselular	Berinteraksi secara langsung dengan O_2^- dan OH. Menetralkan ROS yang dihasilkan oleh leukosit. Meregenerasi vitamin E dari bentuk radikal.
-Glutathion	Terutama pada cairan intraselular	Berinteraksi secara langsung dengan O_2^- , OH, dan lipid hidroperoksida. Sebagai substrat untuk recycling enzim GSH.
-Asam urat	Terdistribusi di seluruh jaringan	Berikatan dengan logam transisi; berinteraksi dengan O_2^- , OH, dan radikal peroksil; mencegah oksidasi asam askorbat.

II. Enzimatik		
-SOD	Sitosol dan mitokondria	Merubah O_2^- menjadi H_2O_2 melalui reaksi dismutasi
-Sistem recycling GSH	Sitosol dan mitokondria	Mereduksi H_2O_2 dan hidroperoksida lain.
-GSH peroksidase	Sitosol dan mitokondria	Berfungsi dalam metabolisme normal.
-GSH reduktase		Mereduksi disulfida dengan berat molekul rendah ($GSSG \rightarrow GSH$) menggunakan NAD(P)H.
-Katalase (CAT)	Peroksisom	Mereduksi H_2O_2 , terutama dalam keadaan sakit.

2.6. ROS dan sperma

Sperma adalah cairan yang keluar dari genetalia jantan waktu ejakulasi yang terdiri dari bagian padat dan bagian cair. Bagian padat adalah spermatozoa dan bagian cair adalah plasma sperma (Yatim, 1990). Spermatozoa mammalia dalam keadaan normal menghasilkan ROS secara spontan setelah dilepaskan dari kauda epididimis (Fisher dan Aitken, 1997 *dalam* Aitken, 2000). Spermatozoa dari semua bagian epididimis dapat menghasilkan anion superoksida, namun hanya spermatozoa kauda epididimis yang berkompeten menghasilkan hidrogen peroksida.

Anion superoksida yang dihasilkan oleh spermatozoa secara enzimatik berdismutase menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2). Reaktifitas O_2^- yang rendah dan paruh waktu yang pendek (1 milidetik) menyebabkan O_2^- tidak berbahaya (Lamirande *et al.*, 1997).

Pada konsentrasi rendah, ROS berfungsi untuk menginduksi hiperaktivasi, kapasitas dan reaksi akrosom. Inkubasi spermatozoa dengan H_2O_2 dalam konsentrasi rendah merangsang kapasitas, hiperaktivasi, reaksi akrosom dan fusi oosit (Sanocka dan Kurpisz., 2004). Sedangkan pada konsentrasi tinggi, ROS spermatozoa dapat menyebabkan peroksidasi lipid. Hal ini disebabkan oleh membran spermatozoa memiliki kandungan asam lemak tak jenuh yang tinggi dan sangat sensitif terhadap ROS (Sharma *et al.*, 1999).

Peroksidasi lipid yang terjadi pada spermatozoa menyebabkan berbagai kondisi patologis, termasuk infertilitas. Karena peroksidasi lipid menyebabkan rusaknya fungsi membran, penurunan fluiditas membran dan membran menjadi tidak spesifik terhadap ion tertentu (Sanocka dan Kurpisz, 2004).

Pada seminal plasma individu yang sehat mengandung antioksidan yang berfungsi untuk menetralkan efek berbahaya dari ROS. Namun pada seminal plasma pria infertil jumlah antioksidannya sangat rendah (Sharma *et al.*, 1999). Hal ini mengakibatkan kadar ROS sperma menjadi tinggi dan menyebabkan suatu keadaan yang disebut stress oksidatif (Anonimus, 2005). Stress oksidatif adalah kondisi yang tidak seimbang antara produksi ROS oleh spermatozoa dengan kapasitas antioksidan pada seminal plasma. Stress oksidatif dapat menyebabkan infertilitas pada pria (Sharma *et al.*, 1999).

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Pemeliharaan dan perlakuan terhadap tikus putih dilakukan di rumah hewan percobaan jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Airlangga, Surabaya. Pengukuran kadar ROS dilakukan di Laboratorium Magmal Bagian Radiologi, RSU Dr. Soetomo, Surabaya. Penghitungan jumlah spermatozoa dilakukan di Laboratorium Biologi Reproduksi, FMIPA Universitas Airlangga, Surabaya. Penelitian ini dilakukan selama bulan 6 bulan (September 2005-Februari 2006).

3.2 Bahan dan Alat Penelitian

3.2.1 Hewan coba

Hewan coba yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan strain Wistar sebanyak 30 ekor, berumur 12 minggu dengan berat badan antara 120-150 gram. Tikus putih diperoleh dari bagian Pemeliharaan Fakultas Farmasi, Universitas Airlangga, Surabaya.

3.2.2 Bahan penelitian

Bahan yang diperlukan dalam penelitian ini adalah larutan garam fisiologis, larutan 2-ME murni produksi Wako Co Japan, aquades, suspensi sperma, medium *Earl's* (terdiri dari 4 mg/ml Bovine Serum Albumin, 30 µg pyruvat, dan 4 mM EGTA) produksi Life Technology.Inc, luminol [25 mM dalam

DMSO (*dimethyl sulfoxide*) dengan konsentrasi akhir 250 μ l], FMLP (*N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine*) dan *Horseradish peroksidase* (2 mg/ml larutan garam fisiologis).

3.2.3 Alat penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi : alat-alat pemeliharaan berupa bak plastik dengan ukuran 40x30x10cm yang dilengkapi dengan penutup dari kawat kasa dan botol minuman, timbangan, alat-alat untuk perlakuan berupa botol-botol kecil tempat larutan yang akan dicobakan, *disposable syringe* 1 ml, alat bedah, bak bedah, botol untuk membius, mikroskop, pinset, gelas ukur, cawan petri, pipet tetes, pipet mikro, tabung ependorf, vortex hemositometer (improved Neubauer) dan β -counter (Rackbeta 1209).

3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian eksperimental ini dilakukan dengan menggunakan rancangan acak lengkap. Pengambilan hewan coba dilakukan secara acak tanpa memberikan kriteria khusus pada kelompok tertentu.

3.4 Variabel Penelitian

Variabel-variabel penelitian yang diamati dalam penelitian ini adalah :

1. Variabel terikat (*dependent variable*), yaitu kadar ROS sperma dan jumlah spermatozoa tikus putih (*Rattus norvegicus*).

2. Variabel bebas (*independent variable*), yaitu lama waktu pemberian 2-ME.
3. Variabel terkendali, yaitu dosis pemberian 2-ME, strain, umur dan berat badan hewan coba, pakan, minum, suhu dan kelembaban ruangan.

3.5 Tahap Perlakuan

3.5.1 Pembuatan larutan 2-methoxyethanol

Penelitian ini menggunakan larutan 2-ME dengan dosis 200mg/kg bb (Wang *et al.*, 2000 dalam Rumanta *et al.*, 2001). Larutan ini dibuat dengan melarutkan 2-ME murni kedalam aquades steril. Cara pembuatan 2-ME dosis 200mg/kg bb dengan berat jenis air 1,00 g/ml dan berat jenis 2-ME 0,965 g/ml yaitu, berat jenis air : berat jenis 2-ME = 1,00 : 0,96 = 1,036, sehingga untuk per gram berat badan diberikan 2-ME sebesar = $200 \text{ mg}/1000 \text{ g} \times 1,04 = 0,207 \text{ mg/g}$ bb.

Berat tikus yang digunakan dalam penelitian ini antara 120-150 gram. Misal berat tikus yang digunakan 150 g, maka berat 2-ME yang diperlukan = $150 \text{ g} \times 0,207 \text{ mg/g bb} = 31,05 \text{ mg}$, sehingga larutan 2-ME yang diperlukan adalah $965/1 : 31,05/x = 0,03 \text{ ml}$. Banyaknya larutan 2-ME yang disuntikkan ke tikus sebesar 0,2 ml, jadi aquades yang diperlukan adalah 0,17 ml.

3.5.2 Pengelompokan dan perlakuan hewan percobaan

Tikus putih jantan dipelihara dalam kandang, diberi minum air PDAM dan pakan pelet Hi-Pro-Vite, medicated, 594 produksi PT. Charoen Phokphand

Indonesia secara *ed libitum*. Tikus dikelompokkan menjadi 6 perlakuan. Masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor hewan coba. Sebelum diberi perlakuan, hewan coba diaklimasi terlebih dahulu selama 1 minggu dalam rumah hewan Jurusan Biologi FMIPA UNAIR. Setelah itu semua hewan coba diberi perlakuan sesuai dengan kelompok perlakuan. Perlakuan dilakukan dengan memberikan suntikan larutan 2-ME melalui subkutan pada tiap anggota kelompok.

Kelompok perlakuan tersebut adalah :

- K_1 = Di injeksi 0,2 ml larutan garam fisiologis melalui subkutan satu kali sehari selama 1 hari.
- K_2 = Di injeksi 0,2 ml larutan garam fisiologis melalui subkutan satu kali sehari selama 3 hari.
- K_3 = Di injeksi 0,2 ml larutan garam fisiologis melalui subkutan satu kali sehari selama 6 hari.
- P_1 = Di injeksi 0,2 ml 2-ME dosis 200 mg/kg bb melalui subkutan satu kali sehari selama 1 hari.
- P_2 = Di injeksi 0,2 ml 2-ME dosis 200 mg/kg bb melalui subkutan satu kali sehari selama 3 hari.
- P_3 = Di injeksi 0,2 ml 2-ME dosis 200 mg/kg bb melalui subkutan satu kali sehari selama 6 hari.

3.6 Pengambilan Spermatozoa

Pengambilan spermatozoa dilakukan setelah hewan coba dikorbankan, yaitu dengan membius tikus menggunakan khloroform hingga pingsan terlebih

dahulu. Kemudian tikus dibedah dibagian bawah abdomen dan diambil testisnya beserta epididimis dan vas deferens. Epididimis bagian kauda (1,4 cm) dan vas deferens (2 cm) dipisahkan dari testis dan dibersihkan dari lemak yang melekat sampai bersih, kemudian diletakkan dalam cawan petri berisi larutan garam fisiologis 1 ml. Epididimis dan vas deferens dipotong menjadi 2 bagian dan di *flushing* dengan larutan garam fisiologis sebanyak 3 ml sampai terbentuk suspensi sperma.

3.7 Pemeriksaan Kadar ROS Sperma

Sperma yang di uji kadar ROSnya berasal bagian kauda epididimis dan vas deferens. Sperma yang akan diuji sebanyak 250 μ l ditambah dengan 238,9 μ l medium *Earls*, 2 μ l luminol (25 mM dalam DMSO (*dimethyl sulfoxide*) dengan konsentrasi akhir 25 μ l), 8 μ l *horseradish peroksidase* (2 mg/ml dalam larutan garam fisiologis), dan 1,1 μ l FMLP kemudian diamati khemiluminisennya dengan menggunakan β -counter (*cpm*/jumlah spermatozoa) selama 5 menit (Aitken, 1992 dalam Sudjarwo, 1999).

3.8 Penghitungan Jumlah Spermatozoa

Jumlah spermatozoa di hitung dengan menggunakan kamar hitung *improved Neubauer* (hemositometer). Dengan menggunakan pipet leukosit, suspensi sperma dihisap dan diencerkan 10 kali dengan larutan garam fisiologis, kemudian dikocok-kocok agar homogen. Selanjutnya cairan sperma yang terdapat di dalam pipet dituangkan pada hemositometer dan ditutup dengan gelas penutupnya

selanjutnya diamati dibawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 400 kali. Spermatozoa yang dihitung adalah spermatozoa yang terletak pada bujur sangkar besar (terdiri dari 16 bujur sangkar kecil) yang terdapat pada setiap sudut. Jumlah spermatozoa yang terhitung kemudian dikonversikan kedalam satuan per ml, dengan cara perhitungan sebagai berikut : Jumlah bujur sangkar yang dihitung adalah 64 kali (16 bujur sangkar kecil x 4), volume setiap bujur sangkar adalah $1/160 \text{ mm}^3$, sperma diencerkan sebanyak 10 kali, volume suspensi sperma sebanyak 4 ml. Jika rata-rata jumlah spermatozoa yang dihitung dari bujur sangkar besar dilambangkan dengan huruf L dan 1 mm^3 sama dengan 10^{-3} ml , maka jumlah spermatozoa dalam 4 ml suspensi sperma adalah : $L/64 \times 160 \times 10 \times 4 \times 10^3$ atau $L \times 10^5$ (Soehadi dan Arsyad, 1982).

3.9 Analisis Data

Data yang diperoleh adalah nilai rata-rata kadar ROS sperma dan jumlah spermatozoa untuk setiap kelompok perlakuan. Selanjutnya dilakukan analisis dengan : analisis variansi (ANOVA) satu arah dan beda nyata terkecil (BNT) untuk mengetahui adanya perbedaan rata-rata antara kelompok, uji T untuk membandingkan data dari masing-masing kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan, dan Regresi linier untuk mengetahui hubungan antara kadar ROS dengan jumlah spermatozoa (Hartono, 2004).

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. HASIL

4.1.1. Efek Lama Waktu Pemberian 2-ME Terhadap Kadar ROS Sperma

Pengukuran kadar ROS sperma dilakukan dengan mengambil suspensi sperma dan menambahnya dengan medium *Earl's*, luminol, *horseradish peroksidase* dan FMLP kemudian diamati secara khemiluminisen selama 5 menit dengan menggunakan β -counter. Hasil pengukuran kadar ROS sperma disajikan pada lampiran 2. Sedangkan data hasil perhitungan rerata kadar ROS sperma disajikan pada tabel 4.1. dan 4.2.

Tabel 4.1. Rerata kadar ROS sperma tikus putih pada kelompok kontrol

Kelompok	Lama waktu (hari)	Rerata kadar ROS sperma ($cpm/10^7$ spermatozoa)
Kontrol	1	2,4920 \pm 0,5030
	3	2,4420 \pm 0,1207
	6	2,4680 \pm 0,2264

Tabel 4.2. Rerata kadar ROS sperma tikus putih pada kelompok perlakuan

Kelompok	Lama waktu (hari)	Rerata kadar ROS sperma ($cpm/10^7$ spermatozoa)
Perlakuan	1	3,7040 \pm 0,3270
	3	4,9720 \pm 0,9246
	6	5,7720 \pm 0,7889

Untuk mengetahui apakah lama waktu pemberian 2-ME berpengaruh terhadap kadar ROS sperma dilakukan uji t dan ANOVA, sedangkan untuk mengetahui perbedaan antar pasangan perlakuan dilakukan uji BNT. Perlakuan dinyatakan berpengaruh terhadap kadar ROS sperma jika nilai $p < \alpha 0,05$.

4.1.2. Efek Lama Waktu Pemberian 2-ME Terhadap Kadar ROS Sperma Pada Kelompok Kontrol

Kadar ROS sperma tikus diantara masing-masing kelompok kontrol dapat dinyatakan berbeda atau tidak setelah melihat hasil uji ANOVA. Hasil uji yang dilakukan disajikan pada tabel 4.3. Sedangkan analisis lengkapnya dapat dilihat pada lampiran 3.

Tabel 4.3. Rangkuman hasil uji ANOVA satu arah untuk kadar ROS sperma kelompok kontrol

	Kuadrat dari jumlah	df	Rerata kuadrat	F	Sig
Diantara kelompok	0,933	2	0,467	0,298	0,748
Di dalam kelompok	18,800	12	1,567		
Total	19,733	14			

Dari tabel diatas dapat diketahui bahwa nilai probabilitas pada kelompok kontrol jauh lebih besar dari 0,05 yaitu 0,748. Hal ini sesuai dengan harapan bahwa pada kelompok kontrol rata-rata kadar ROS sperma antara masing-masing kelompok tidak berbeda karena tidak ada pengaruh dari 2-ME.

4.1.3. Efek Lama Waktu Pemberian 2-ME Terhadap Kadar ROS Sperma Pada Kelompok Perlakuan

Rangkuman hasil uji ANOVA terhadap kadar ROS sperma kelompok perlakuan disajikan pada tabel 4.4. Sedangkan analisis lengkapnya dapat dilihat pada lampiran 3.

Tabel 4.4. Rangkuman hasil uji ANOVA satu arah untuk kadar ROS sperma kelompok perlakuan

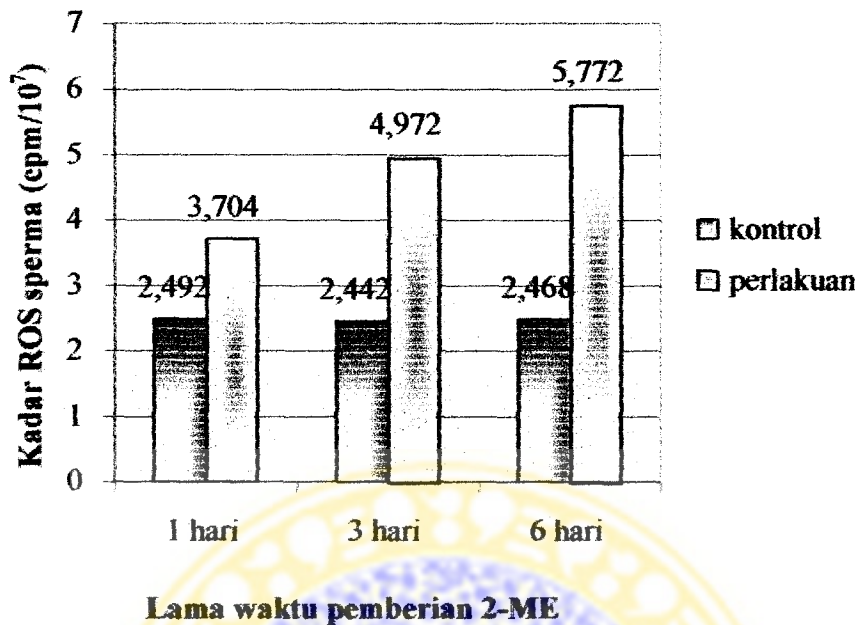
	Kuadrat dari jumlah	df	Rerata kuadrat	F	Sig
Diantara kelompok	10,874	2	5,437	10,296	0,002
Di dalam kelompok	6,337	12	0,528		
Total	17,21	14			

Hasil uji kelompok perlakuan ini nilai probabilitasnya $< 0,05$ yaitu 0,002. Ini membuktikan bahwa $H_{0(1)}$ ditolak dan berarti bahwa lama waktu pemberian 2-ME berpengaruh terhadap rata-rata kadar ROS sperma tikus putih. Oleh karena itu untuk mengetahui bermakna tidaknya perbedaan antara masing-masing kelompok perlakuan tersebut maka dilakukan uji BNT. Rangkuman hasil uji BNT terhadap kadar ROS sperma disajikan pada tabel 4.5. Sedangkan analisis lengkapnya dapat dilihat pada lampiran 3.

Tabel 4.5. Rangkuman hasil uji BNT terhadap kadar ROS sperma tikus kelompok perlakuan

Kelompok	Kesimpulan
P ₁ -P ₂	Signifikan
P ₁ -P ₃	Signifikan
P ₂ -P ₃	Tidak signifikan

Dari tabel tersebut terlihat bahwa terdapat perbedaan kadar ROS sperma yang bermakna pada masing-masing kelompok perlakuan kecuali antara kelompok P₂ dengan P₃. Untuk lebih jelasnya dapat dilihat pada gambar 4.1. Diagram tersebut menunjukkan bahwa semakin lama waktu pemberian 2-ME maka kadar ROS spermanya semakin meningkat hanya saja peningkatan antara kelompok P₂ dengan P₃ tidak berbeda jauh.



Gambar 4.1. Diagram rerata kadar ROS kelompok kontrol dan perlakuan

4.1.4. Kadar ROS Sperma Pada Kelompok Kontrol dan Perlakuan Dengan Variasi Lama Waktu Pemberian

Untuk mengetahui apakah pemberian 2-ME selama 1, 3 dan 6 hari telah berpengaruh terhadap kadar ROS sperma tikus putih, maka dilakukan pengujian dengan uji t pada ketiga kelompok tersebut. Rangkuman hasil pengujian disajikan pada tabel 4.6. Sedangkan hasil pengujiannya dapat dilihat pada lampiran 4.

Tabel 4.6. Rangkuman hasil uji T terhadap kadar ROS sperma dengan waktu pemberian selama 1, 3 dan 6 hari

Kelompok	Levene's test for quality of means		t-test for quality of means			
	F	Sig	t	Mean difference	df	Sig (2-tailed)
K ₁ -P ₁	4,032	0,080	-4,517	-1,2120	8	0,002
K ₂ -P ₂	3,832	0,086	-6,067	-2,5300	8	0,000
K ₃ -P ₃	2,490	0,153	-9,001	-3,304	8	0,000

Dari tabel tersebut diatas dapat diketahui bahwa nilai probabilitas pada ketiga pasangan kelompok $<0,05$. Pada pasangan K_1-P_1 nilai probabilitasnya sebesar 0,002 sedangkan pasangan K_2-P_2 dan K_3-P_3 nilai probabilitasnya 0,000. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian 2-ME selama 1, 3 dan 6 hari kepada tikus putih mampu meningkatkan kadar ROS spermanya secara nyata.

4.1.5. Efek Lama Waktu Pemberian 2-ME Terhadap Jumlah Spermatozoa

Penghitungan jumlah spermatozoa dilakukan dengan menggunakan *hemositometer*. Hasil penghitungan jumlah spermatozoa disajikan pada lampiran 2. Sedangkan data hasil perhitungan rerata kadar ROS sperma disajikan pada tabel 4.7. dan 4.8.

Tabel 4.7. Rerata jumlah spermatozoa tikus putih pada kelompok kontrol

Kelompok	Lama waktu	Rerata jumlah spermatozoa ($10^7/ml$)
Kontrol	1	$0,9720 \pm 0,03834$
	3	$1,0040 \pm 0,16165$
	6	$0,9740 \pm 0,15994$

Tabel 4.8. Rerata kadar jumlah spermatozoa tikus putih pada kelompok perlakuan

Kelompok	Lama waktu (hari)	Rerata jumlah spermatozoa ($10^7/ml$)
Perlakuan	1	$0,9380 \pm 0,03701$
	3	$1,0400 \pm 0,08246$
	6	$0,7440 \pm 0,25215$

Untuk mengetahui apakah lama waktu pemberian 2-ME berpengaruh terhadap jumlah spermatozoa dilakukan uji t dan ANOVA, sedangkan untuk

mengetahui perbedaan antar pasangan perlakuan dilakukan uji BNT. Taraf signifikansi yang digunakan adalah 0,05.

4.1.6. Efek Lama Waktu Pemberian 2-ME Terhadap Jumlah Spermatozoa Pada Kelompok Kontrol

Untuk mengetahui apakah jumlah spermatozoa diantara masing-masing kelompok kontrol berbeda atau tidak maka dilakukan uji ANOVA. Hasil pengujiannya dapat dilihat pada lampiran 5. Sedangkan rangkuman hasil ujinya disajikan pada tabel 4.9.

Tabel 4.9. Rangkuman hasil uji ANOVA satu arah untuk jumlah spermatozoa kelompok kontrol

	Kuadrat dari jumlah	df	Rerata kuadrat	F	Sig
Diantara kelompok	0,003	2	0,002	0,091	0,914
Di dalam kelompok	1,213	12	0,018		
Total	1,216	14			

Tabel diatas menunjukkan bahwa pada kelompok kontrol memiliki nilai probabilitas yang lebih besar dari 0,05. Ini berarti bahwa tikus yang hanya diberi larutan fisiologis selama 1, 3 dan 6 hari tidak terpengaruh jumlah spermatozoanya.

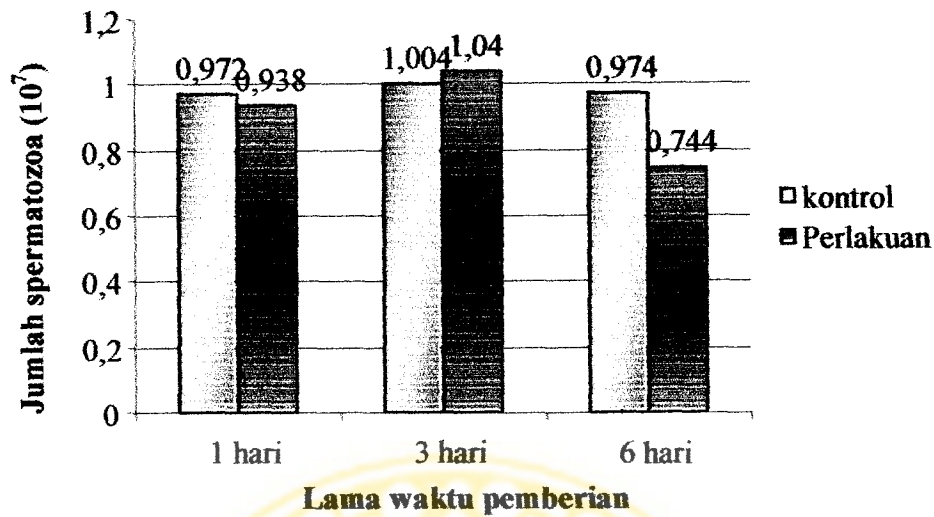
4.1.7. Efek Lama Waktu Pemberian 2-ME Terhadap Jumlah Spermatozoa Pada Kelompok Perlakuan

Rangkuman hasil uji ANOVA terhadap jumlah spermatozoa pada kelompok perlakuan disajikan pada tabel 4.10. Sedangkan hasil pengujiannya dapat dilihat pada lampiran 5.

Tabel 4.10. Rangkuman hasil uji ANOVA satu arah untuk jumlah spermatozoa kelompok perlakuan

	Kuadrat dari jumlah	df	Rerata kuadrat	F	Sig
Diantara kelompok	0,226	2	0,113	2,043	0,172
Di dalam kelompok	0,664	12	0,055		
Total	0,890	14			

Jika dilihat dari nilai probabilitasnya yang melebihi 0,05 maka dapat disimpulkan bahwa H_0 pada pengujian ini diterima. Hal ini berarti bahwa pemberian 2-ME selama 1, 3 dan 6 hari kurang berpengaruh terhadap jumlah spermatozoa. Perbandingan rerata jumlah spermatozoa antara kelompok kontrol dan perlakuan dapat dilihat pada gambar 4.2.



Gambar 4.2. Diagram rerata jumlah spermatozoa kelompok kontrol dan perlakuan

Dari diagram tersebut dapat diketahui bahwa pemberian 2-ME selama 1, 3 dan 6 hari pada tikus putih tidak mempengaruhi jumlah spermatozoa secara nyata. Hanya pada kelompok 6 hari saja terlihat jelas penurunan rerata jumlah spermatozoanya.

4.1.8. Jumlah Spermatozoa Pada Kelompok Kontrol dan Perlakuan Dengan Variasi Lama Waktu pemberian

Menurut Rumanta *et al.*, (2001) pemberian MAA pada mencit jantan dapat menurunkan jumlah spermatozoa epididimis kauda. Maka untuk mengetahui apakah MAA hasil metabolit dari 2-ME yang diberikan pada tikus putih dapat mempengaruhi jumlah spermatozoanya dilakukan pengujian dengan uji t. Hasil pengujiannya seperti yang tercantum pada lampiran 6. Sedangkan rangkuman hasil ujinya pada perlakuan selama 1 hari disajikan pada tabel 4.11.

Tabel 4.11. Rangkuman hasil uji T terhadap jumlah spermatozoa dengan waktu pemberian selama 1, 3 dan 6 hari

Kelompok	Levene's test for quality of means		t-test for quality of means			
	F	Sig	t	Mean difference	df	Sig (2-tailed)
K ₁ -P ₁	0,240	0,637	1,427	3,400E-2	8	0,192
K ₂ -P ₂	1,068	0,332	-0,444	600E-2	8	0,669
K ₃ -P ₃	1,645	0,235	1,201	0,2300	8	0,264

Dari tabel tersebut menunjukkan bahwa pemberian 2-ME selama 1, 3 dan 6 hari tidak berpengaruh secara signifikan terhadap jumlah spermatozoa. Hal ini diketahui dari nilai probabilitas ketiganya yang jauh lebih besar dari 0,05.

4.1.9. Hubungan Antara Kadar ROS Sperma Dengan Jumlah Spermatozoa Tikus Putih

Untuk mengetahui apakah kadar ROS berpengaruh terhadap jumlah spermatozoa tikus putih setelah diberi 2-ME digunakan pengujian dengan uji korelasi. Selanjutnya untuk mengetahui sebesar apa hubungan tersebut, maka dilakukan uji regresi linier. Hasil pengujian dapat dilihat pada lampiran 7. Rangkuman hasil pengujian korelasi disajikan pada tabel 4.12.

Tabel 4.12. Rangkuman hasil uji korelasi antara kadar ROS dengan jumlah spermatozoa

Kelompok	N	Korelasi pearson	Signifikansi (2-tailed)
Kontrol	15	0,000	0,999
Perlakuan	15	-0,008	0,978

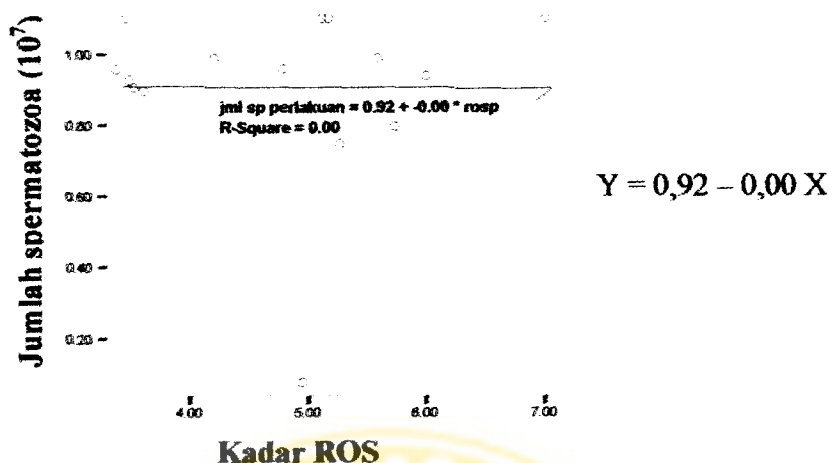
Dari rangkuman hasil pengujian tersebut diketahui bahwa kadar ROS sperma dengan jumlah spermatozoa berkorelasi negatif. Artinya semakin tinggi kadar ROS sperma maka jumlah spermatozoanya semakin berkurang. Namun hubungan tersebut sangat lemah karena nilai korelasinya sangat kecil yaitu sebesar -0,008 dengan nilai signifikansi jauh lebih besar dari 0,05.

Untuk mengetahui sejauh mana hubungan antara kadar ROS dengan jumlah spermatozoa dilakukan uji regresi dengan rangkuman hasil uji seperti pada tabel 4.13.

Tabel 4.13. Rangkuman hasil uji ANOVA regresi terhadap kadar ROS dan jumlah spermatozoa

Model	Kuadrat jumlah	Df	Rerata kuadrat jumlah	F	Sig
Regresi	0,000	1	0,000	0,001	0,978
Residu	0,890	13	0,68		
Total	0,890	14	-		

Dari tabel tersebut terlihat bahwa probabilitas pengujiannya sangat jauh lebih besar dari 0,05. Oleh karena itu H_0 uji ini diterima, yang berarti bahwa kadar ROS sperma tidak berpengaruh terhadap jumlah spermatozoa tikus putih. Selain nilai signifikansinya yang kurang dari 0,05 nilai R^2 juga sangat kecil yaitu 0,000 dengan persamaan $Y = 0,92 - 0,00 X$, seperti yang ditunjukkan pada gambar 4.3. Dari sini dapat disimpulkan keragaman jumlah spermatozoa tidak dipengaruhi oleh kadar ROS spermanya.



Gambar 4.3. Grafik regresi linier antara kadar ROS perma dengan jumlah spermatozoa

4.2. PEMBAHASAN

Pada penelitian ini pemberian senyawa 2-ME menyebabkan peningkatan kadar ROS sperma. Hal ini tampak pada kelompok P₁, P₂, dan P₃ dengan kadar ROS spermanya yang semakin meningkat, ini membuktikan bahwa semakin lama waktu pemberian 2-ME pada tikus maka kadar ROS spermanya juga semakin meningkat. Peningkatan kadar ROS terjadi karena di dalam tubuh 2-ME mengalami oksidasi menjadi MAA. Senyawa MAA ini bersifat toksik, oleh darah didistribusikan ke organ-organ yang sensitif atas keberadaannya didalam tubuh (Priyandoko, 2003). Salah satunya adalah testis, sehingga MAA juga dapat menginduksi sel spermatogonium yang berada didalamnya (Anonimus, 2002).

Sebenarnya sel spermatogonium pada testis memiliki sistem pelindung agar tidak berhubungan langsung dengan materi yang dibawa oleh darah. Sistem pelindung tersebut adalah *blood testis barrier* yang disusun oleh sel-sel Sertoli. Sel Sertoli ini terdapat pada bagian dasar bersama sel spermatogonium dan berfungsi

sebagai pelindung sel spermatogonium pada tahap spermatogenesis (Junqueira *et al.*, 1995). Akan tetapi MAA yang terdapat dalam darah dapat menginduksi sel spermatogonium pada tahap spermatogenesis, terutama spermatosit *pachiten* dengan cara merusak sel Sertoli. Hal ini dibuktikan dengan terjadinya vakuolisasi sel sertoli pada testis mencit yang diberi MAA (Rumanta *et al.*, 2001).

Keberadaan MAA didalam testis dapat menginduksi terbentuknya senyawa oksigen reaktif (ROS) selama proses respirasi sel spermatozoa, yaitu pada saat reaksi oksidasi (Rumanta *et al.*, 2001). Pembentukan ROS terjadi karena MAA dapat menyebabkan proses tersebut berjalan tidak normal. Hal ini terjadi karena MAA dapat masuk ke dalam siklus krebs dan mengganggu beberapa enzim yang terlibat di dalamnya. Diantara enzim tersebut adalah sitokrom c-oksidadase, translokase dan akonitase. Selain itu, MAA juga dapat menjadi substrat awal dari siklus krebs menggantikan asetil-coA, yaitu dengan membentuk metoksiasetil-coA (Priyandoko, 2003). Apabila substrat awal yang dipergunakan salah maka hasil akhir dari proses respirasi juga salah, sehingga mengakibatkan berkurangnya jumlah ATP yang dihasilkan serta mengganggu proses transport elektron. Terganggunya proses transport elektron tersebut dapat mengakibatkan peningkatan kadar ROS dalam sperma.

Sel spermatozoa tikus dapat menghasilkan ROS melalui dua sistem, yaitu sistem enzimatik yang berlangsung pada membran plasma spermatozoa dengan menggunakan NADPH sebagai substratnya dan sistem yang melibatkan rangkaian transport elektron pada mitokondria. Senyawa ROS terbentuk jika

terjadi kesalahan transport elektron dari mitokondria spermatozoa atau NADPH oksidase (Vernet *et al.*, 2001).

Selain dihasilkan oleh sel spermatozoa, senyawa ROS dalam sperma juga dihasilkan oleh sel leukosit. Sel leukosit yang terdapat didalam epididimis adalah limfosit dan makrofag. Sedangkan granulosit banyak terdapat pada kelenjar prostat dan vesikula seminalis. Secara normal sel leukosit dalam sperma berfungsi untuk fagositosis sel spermatozoa yang rusak atau yang tidak disekresikan (Sharma *et al.*, 2001). Pembentukan ROS pada leukosit terjadi jika ada rangsangan berupa agen infeksi melalui suatu peristiwa yang disebut sebagai *burst respiration* selama proses fagositosis. Senyawa ROS dihasilkan melalui suatu sistem NADPH oksidase (Vernet *et al.*, 2001). Dalam proses tersebut NADPH digunakan sebagai sumber elektron untuk mengubah O_2 menjadi O_2^- yang dalam perjalanan selanjutnya akan diubah menjadi senyawa ROS lain seperti H_2O_2 , OH^- , $HOCl$, dan senyawa radikal bebas lainnya (Marks *et al.*, 2000). Epididimis sebagai tempat penyimpanan spermatozoa juga mengandung leukosit yang dapat berinteraksi langsung dengan sel spermatozoa. Maka keberadaan leukosit dalam sperma dapat mempengaruhi peningkatan kadar ROS dan kelangsungan hidup spermatozoa (Vicari, 1999). Hal ini dibuktikan oleh penelitian Sharma *et al.* (2001) yang menyatakan bahwa kontaminasi leukosit dalam sperma berpengaruh terhadap kadar ROS sperma serta berkorelasi positif dengan stress oksidatif. Oleh karena itu pada penelitian ini selain menggunakan *horseradish peroxidase* juga menggunakan FMLP untuk merangsang produksi ROS oleh sel leukosit.

Kadar ROS yang tinggi dalam sperma dapat mengakibatkan terjadinya peroksidasi lipid membran spermatozoa. Peristiwa ini dapat terjadi karena ROS dapat mengoksidasi lipid membran spermatozoa yang kaya akan asam lemak tak jenuh, baik pada membran selular maupun interselular. Senyawa ROS juga menyebabkan kerusakan protein membran serta kerusakan DNA spermatozoa (Balercia *et al.*, 2003). Jika membran spermatozoa mengalami peroksidasi lipid maka struktur vital dan fungsinya akan berubah. Hal ini disebabkan oleh hilangnya pengaturan Ca^{2+} intraseluler oleh Ca^{2+} ATP-ase (Bottje *et al.*, 2000). Hilangnya pengaturan Ca^{2+} intraseluler ini terjadi karena permeabilitas membran sel meningkat seiring dengan kerusakan membran akibat peroksidasi lipid sehingga influks Ca^{2+} menjadi berlebih (Ca^{2+} Overload). Melimpahnya Ca^{2+} di dalam sel akan menghambat fosforilasi oksidatif, sehingga perolehan ATP berkurang karena digunakan untuk memompa Ca^{2+} yang berlebih. Disamping itu melimpahnya Ca^{2+} juga mengaktifkan enzim protease dan fosfolipase yang dapat mendegradasi protein-protein sitoskeleton penyusun struktur sel. Terjadinya peristiwa tersebut menimbulkan terjadinya apoptosis (Rumanta *et al.*, 2001). Jika keadaan ini berlangsung terus menerus maka akan sangat berpengaruh terhadap jumlah spermatozoanya yang merupakan salah satu parameter penting dalam menentukan infertilitas pria atau hewan jantan. Selain itu berkurangnya jumlah spermatozoa juga dapat terjadi karena degenerasi sel spermatosit pakhiten yang merupakan sel target utama dari MAA (Rumanta *et al.*, 2001).

Dari hasil pengujian didapatkan bahwa, meskipun pemberian 2-ME selama 1, 3 dan 6 hari berpengaruh terhadap kadar ROS sperma tikus tetapi tidak

berpengaruh terhadap jumlah spermatozoanya. Pada kelompok P₃ (6 hari) penurunan jumlah spermatozoa tampak lebih besar dibanding dengan kedua kelompok sebelumnya P₁ dan P₂ (1 dan 3 hari) jika dibandingkan dengan kontrol. Hal ini dapat disebabkan karena pengaruh pemberian 2-ME selama 1, 3 dan 6 hari masih belum mampu merusak komponen sel Sertoli secara nyata sehingga sel spermatozoa masih dapat bertahan. Penurunan jumlah spermatozoa akan tampak nyata jika sel Sertoli telah rusak parah hingga tidak ada lagi pelindung bagi sel spermatogonium maupun spermatisit (Rumanta *et al.*, 2001).

Penyebab lain yang dapat terjadi adalah kadar ROS yang terbentuk dalam sperma telah mampu merusak komponen membran sel spermatozoa hingga spermatozoanya mati tetapi belum difagositosis oleh leukosit. Oleh karena itu jumlahnya tidak berkurang saat dihitung. Pada penelitian ini jumlah spermatozoa yang dihitung adalah jumlah keseluruhan yang tampak pada hemositometer tanpa membedakan apakah spermatozoa tersebut masih hidup atau telah mati. Meskipun demikian jika tubuh terpapar 2-ME secara terus menerus yang menyebabkan kadar ROS spermanya meningkat akan meningkatkan peroksidasi lipid membran sperma hingga mengakibatkan azoospermia yang berakibat terjadinya infertilitas.

Penelitian ini membuktikan bahwa paparan 2-ME dalam jangka pendek telah mampu meningkatkan kadar ROS sperma secara signifikan. Apalagi jika paparan tersebut berlangsung dalam jangka waktu lama seperti para pekerja pabrik atau buruh yang menggunakan bahan yang mengandung 2-ME dalam kegiatan sehari-harinya, maka akan sangat berbahaya bagi kesehatan reproduksinya.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan, dapat disimpulkan sebagai berikut :

1. Lama waktu pemberian 2-ME dosis 200 mg/kg berat badan mempengaruhi peningkatan kadar ROS sperma tikus putih. Peningkatan ROS mulai tampak pada hari ke-1 setelah pemberian 2-ME.
2. Lama waktu pemberian 2-ME dosis 200 mg/kg berat badan sampai hari ke-6 tidak berpengaruh terhadap jumlah spermatozoa tikus putih.
3. Tidak terdapat korelasi antara kadar ROS sperma dengan jumlah spermatozoa tikus putih setelah pemberian 2-ME.

5.2. Saran

1. Bagi para pekerja yang kegiatan sehari-harinya berhubungan dengan bahan yang mengandung 2-ME, disarankan agar menggunakan alat pelindung bagi tubuh seperti sarung tangan, masker dan pakaian lengan panjang serta mengkonsumsi vitamin dan sayuran yang mengandung antioksidan.
2. Dari hasil penelitian ini diharapkan dapat dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai efek 2-ME terhadap kadar ROS sperma dalam hubungannya dengan jumlah leukosit dan jumlah spermatozoa dalam jangka panjang.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonimus, 2002, **2-Methoxyethanol**, Hazardous Substance Fact Sheet, New Jersey Department of Health and Senior Services, USA.
- Anonimus, 2005, **Male Infertility**, Glickman Urological Institut and Department Of Obstreticts-Gynecology Clinic Foundation, USA.
- Aitken R.J, 2000, Possible Redox Regulation Of Sperm Motility Activation, **Journal of andrology**, 21 (4): 491-496.
- Balercia.G, Armeni.T, Mantero.F, Principato.G, Regoli .F, 2003, Total Oxyradical Scavenging Capacity Toward Different Reactive Oxygen Species In Seminal White Plasma and Sperm Cells, **Clinical Chemistry Laboratory Medical**, 41(1):13-19.
- Bottje .W, Enkvetchakul .B, dan Wideman .R.F, 2000, **Antioxydants, Hypoxia And Lipid Peroxidation Involvement in Pulmonary Hypertention Syndrome (Ascites)**, Department of Poultry Science, University of Arkansas.
- Delmann H.D dan Brown .E.M, 1992, **Buku teks Histologi Veteriner**, Edisi ketiga, Penerbit UI Press, Jakarta.
- Frandsen .R.D, 1992, **Anatomi dan Fisiologi Ternak**, Gajah Mada University Press, Yogyakarta.
- Gitawati .R, 1995, Radikal Bebas–Sifat dan Peran Dalam Menimbulkan Kerusakan / Kematian Sel, **Cermin Dunia Kedokteran** No. 102: 33-35.
- Guyton. A.C dan Hall . J.E, 1997, **Buku Ajar Fisiologi Kedokteran**, Edisi 9, Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta.
- Hartono, 2004, **Statistik Untuk Penelitian**, Lembaga Studi Filsafat Kemasyarakatan, Kependidikan dan Perempuan, Yogyakarta.
- Hayati. A, Darmanto .W, dan Winarni .D, 2004, Efek 2-methoxyethanol terhadap morfologi dan motilitas spermatozoa mencit (*Mus musculus*), **Berkala Penelitian Hayati**, PBI Jatim, Surabaya Vol:10, No:1, Hal: 7-12.
- Johanson .G, 2000, Toxicity Review Of Ethylene Glycol Monomethyl Ether and its Acetate Ester, **Critical Reviews in Toxicology**, 30 (3) : 307-345.

- Junquiera .L.C, Carneiro . J, Kelley .R.O, 1995, **Basic Histology**, Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta.
- Lamirande.E.D, Jiang.H, Zini.A, Kodama.H, dan Gagnon. C, 1997, Reactive Oxygen Species and Sperm Physiology, **Urology Research**, Canada, 2 : 48-54.
- Li L.H, Wine R.N, Miller D.S, Reece J.M, Smith M, dan Chapin R.E, 1997, Protection Against Methoxyacetic Acid Induced Spermatoocyte Apoptosis With Calcium Chanel Blocker in Cultured Rat Seminiferous Tubule : Possible Mechanism. **Toxicology Applied Pharmacology**, 144 (1) : 105-119.
- Marks D.B, Marks A.D, dan Smith C.M, 2000, **Biokimia Kedokteran Dasar**, Penerbit Buku Kedokteran : EGC, Jakarta.
- McGee.S.A, Wiggins.S.A, dan Pierce.J.D, 2003, What Advanced Practice Nurses Need To Know About Free Radicals, **The Internet Journal of Advanced Nursing Practice**, Vol.6, No.1.
- Moslen M.TM Lata K, Harihan B, Young-Mey Y, dan William W.A, 1995, Species Differences In Testicular and Hepatic Biotransformation of 2-Methoxyethanol, **Journal of Toxicology**, 96 (3): 217-224.
- Park.N.C, Park.H.J, Lee.K.M, dan Shin.D.G, 2004, Free radical Scavenger Effect Of Rebamipide and Cryopreservation, **Asian Journal Of Andrology**, 5: 195-201.
- Poernomo.B, Mafruchati.M, Widjiati, Luqman.E.M, Masitah.E.D, dan Mukti.A.T, 2004, **Penuntun Embriologi**, Pustaka Melati, Surabaya.
- Potts.R.J, Jefferies.T.M, dan Notarianni.L.J, 1999, Antioxidant Capacity Of The Epididymis, **Human Reproduction**, Vol.14, No.10, 2513-2516.
- Priyandoko.D, 2003, Efek Asam Metoksiasetat Terhadap Jumlah Sel Indeks Mitosis Dan Plioditas Sel Penyusun Blastokista Mencit (Mus musculus) Swiss Webster, **Chimera**, tahun 8, No.2, 106
- Rumanta M, Tien W.S, dan Sri S, 2001, Pengaruh Asam Metoksiasetat Terhadap Organ Reproduksi Mencit (Mus musculus) Swiss Webster Jantan, **Prosiding Institut Teknologi Bandung**, Bandung, vol 33: No 2.
- Saleh.R.A dan Agarwal.A, 2002, Oxidative Stress and Male Infertility : From Research Bench to Clinical Practice, **Journal Of Andrology**, vol.23, No.6.

- Sanocka .D, dan Kurpisz .M, 2004, Reactive Oxygen Species and Sperm Cells, **Reproductive Biology and Endocrinology**, vol 2, No 12, Hal.1-19.
- Sharma.R.K, Pasqualotto .F.F, Nelson .D.R, Thomas A.J, dan Agarwal .A, 1999, The Reactive Oxygen Species-Total Antioxidant Capacity Score is A New Measure of Oxidative Stress to Predict Male Infertility, **Human Reproduction** 14 (11), 2801-2807.
- Sharma.R.K, Pasqualotto .F.F, Nelson .D.R, Thomas A.J, dan Agarwal .A, 2001, Relationship Between Seminal White Blood Cell Counts and Oxidative Stress in Men Treated at an Infertility Clinic, **Journal of Andrology**, Vol.22, No.4, Hal.575-583.
- Sikka.S.C, 1996, **Oxidative Stress and Role Of Antioxidant in Normal and Abnormal Sperm Function**, Department Of Urology, USA.
- Siregar .P, 1992, Metabolit Oksigen Radikal Bebas dan Kerusakan Jaringan, **Cermin Dunia Kedokteran**, Edisi khusus No.80, Hal.112-115.
- Soehadi.K. dan Arsyad.K.M, 1982, **Analisa Sperma**, Airlangga University Press, Surabaya, Hal : 23-24.
- Sudjarwo, 1999, **Pemeriksaan Radikal Bebas dan DNA Mitokondria (mtDNA) Sperma**, Penerbit : Fakultas Farmasi UNAIR, Surabaya.
- Suyono .J, dan Wijaya .C, 1995, **Deteksi Dini Penyakit Akibat Kerja**, Penerbit Buku Kedokteran : EGC, Jakarta.
- Suryohudoyo .P, 2000, **Kapita Selekta Ilmu Kedokteran Molekuler**, Sagung seto, Jakarta, Halaman : 31-37.
- Vernet .P, Fulton .N, Wallace .C, Aitken .R.J, 2001, Analysis Of Reactive Oxygen Species Generating System in Rat Epididymal Spermatozoa, **Biology of Reproduction** 65, 1102-1113.
- Vicari .E, 1999, Seminal Leucocyte Concentration and Related Specific Reactive Oxygen Species Production in Patient With Male Accessory Gland Infection, **Human Reproduction**, Vol.14, No.8, 2025-2030.
- Yatim.W, 1990, **Reproduksi dan Embriologi**, Penerbit: Tarsito, Bandung.

Lampiran 1

Tabel Hasil Pengaruh Lama Waktu Pemberian 2-ME Terhadap Kadar ROS Sperma Tikus Putih

Waktu (hari)	Replikasi	Kadar ROS ($cpm/10^7$ spermatozoa)	
		Kontrol	Perlakuan
1	1	2,17	3,44
	2	2,17	3,59
	3	2,04	3,67
	4	3,04	4,27
	5	3,04	3,55
3	1	2,53	5,24
	2	2,26	3,52
	3	2,56	4,86
	4	2,47	6,06
	5	2,39	5,18
6	1	2,49	5,33
	2	2,72	7,07
	3	2,10	5,80
	4	2,54	5,00
	5	2,49	5,66

Tabel Hasil Pengaruh Lama Waktu Pemberian 2-ME Terhadap Jumlah Spermatozoa Tikus Putih

Waktu (hari)	Replikasi	Jumlah spermatozoa ($10^7/ml$)	
		Kontrol	Perlakuan
1	1	0,93	0,96
	2	0,93	0,91
	3	1,00	0,90
	4	1,00	0,99
	5	1,00	0,93
3	1	0,99	1,10
	2	1,10	1,10
	3	0,96	0,96
	4	1,20	0,94
	5	0,77	1,10
6	1	0,96	0,75
	2	0,75	1,10
	3	0,96	0,80
	4	1,20	0,08
	5	1,00	0,99

Lampiran 2

Hasil Uji ANOVA dan BNT Untuk Kadar ROS Sperma Tikus Putih

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
kdr ROS kontrol	15	2,4673	,30260	2,04	3,04
kdr ROS perlakuan	15	4,8160	1,10877	3,44	7,07

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		kdr ROS kontrol	kdr ROS perlakuan
N		15	15
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	2,4673	4,8160
	Std. Deviation	,30260	1,10877
Most Extreme Differences	Absolute	,180	,183
	Positive	,180	,183
	Negative	-,104	-,116
Kolmogorov-Smirnov Z		,696	,707
Asymp. Sig. (2-tailed)		,718	,699

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

kdr ROS kontrol

Descriptives

Lama waktu (hari)	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1	5	2,4920	,50306	,22498	1,8674	3,1166	2,04	3,04
3	5	2,4420	,12071	,05398	2,2921	2,5919	2,26	2,56
6	5	2,4680	,22643	,10126	2,1869	2,7491	2,10	2,72
Total	15	2,4673	,30260	,07813	2,2998	2,6349	2,04	3,04

Test of Homogeneity of Variances

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3,192	2	12	,077

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,933	2	,467	,298	,748
Within Groups	18,800	12	1,567		
Total	19,733	14			

Oneway

kdr ROS perlakuan

Descriptives

Lama waktu (hari)	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1	5	3,7040	,32708	,14627	3,2979	4,1101	3,44	4,27
3	5	4,9720	,92462	,41350	3,8239	6,1201	3,52	6,06
6	5	5,7720	,78890	,35281	4,7924	6,7516	5,00	7,07
Total	15	4,8160	1,10877	,28628	4,2020	5,4300	3,44	7,07

Test of Homogeneity of Variances

kdr ROS perlakuan

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
,960	2	12	,410

ANOVA

kdr ROS perlakuan

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	10,874	2	5,437	10,296	,002
Within Groups	6,337	12	,528		
Total	17,211	14			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: kdr ROS perlakuan

LSD

(I) lama waktu (hari)	(J) lama waktu (hari)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	3	-1,26800	,45960	,017	-2,2694	-,2666
	6	-2,06800	,45960	,001	-3,0694	-1,0666
3	1	1,26800	,45960	,017	,2666	2,2694
	6	-,80000	,45960	,107	-1,8014	,2014
6	1	2,06800	,45960	,001	1,0666	3,0694
	3	,80000	,45960	,107	-,2014	1,8014

*. The mean difference is significant at the .05 level.



Lampiran 3

Hasil Uji T Kadar ROS Sperma Tikus Putih

K₁-P₁

Group Statistics

kelompok	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
kadar ROS sperma K1	5	2,4920	,5031	,2250
P1	5	3,7040	,3271	,1463

Independent Samples Test

	Levene's Test for quality of Variance	t-test for Equality of Means								
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
kadar ROS sperma	Equal variance assumed	4,032	,080	-4,517	8	,002	-1,2120	,2683	-1,8308	-,5932
	Equal variance not assumed			-4,517	6,869	,003	-1,2120	,2683	-1,8490	-,5750

K₂-P₂

Group Statistics

kelompok	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
kadar ROS sperma K2	5	2,4420	,1207	5,398E-02
P2	5	4,9720	,9246	,4135

Independent Samples Test

	Levene's Test for quality of Variance	t-test for Equality of Means								
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
kadar ROS sperma	Equal variance assumed	3,832	,086	-6,067	8	,000	-2,5300	,4170	-3,4916	-1,5684
	Equal variance not assumed			-6,067	4,136	,003	-2,5300	,4170	-3,6729	-1,3871

K₃-P₃

Group Statistics

	kelompok	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
kadar ROS sperma	K3	5	2,4680	,2264	,1013
	P3	5	5,7720	,7889	,3528

Independent Samples Test

		Levene's Test for quality of Variance		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
kadar ROS spe	Equal varianc assumed	2,490	,153	-9,001	8	,000	-3,3040	,3671	-4,1504	-2,4576
	Equal varianc not assumed			-9,001	4,655	,000	-3,3040	,3671	-4,2690	-2,3390



Lampiran 4

Hasil Uji ANOVA Jumlah Spermatozoa Tikus Putih

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
jumlah sp perlakuan	15	,9073	,25215	,08	1,10
jumlah sp kontrol	15	,9833	,12419	,75	1,20

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		jumlah sp perlakuan	jumlah sp kontrol
N		15	15
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	,9073	,9833
	Std. Deviation	,25215	,12419
Most Extreme Differences	Absolute	,288	,247
	Positive	,222	,247
	Negative	-,288	-,200
Kolmogorov-Smirnov Z		1,117	,955
Asymp. Sig. (2-tailed)		,165	,321

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Descriptives

Lama waktu (hari)	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1	5	,9720	,03834	,01715	,9244	1,0196	,93	1,00
3	5	1,0040	,16165	,07229	,8033	1,2047	,77	1,20
6	5	,9740	,15994	,07153	,7754	1,1726	,75	1,20
Total	15	,9833	,12419	,03207	,9146	1,0521	,75	1,20

Test of Homogeneity of Variances

jumlah sp kontrol				
Levene Statistic	df1	df2	Sig.	
1,328	2	12	,301	

ANOVA

jumlah sp kontrol

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,003	2	,002	,091	,914
Within Groups	,213	12	,018		
Total	,216	14			

Oneway

jumlah sp perlakuan

Descriptives

Lama waktu (hari)	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1	5	,9380	,03701	,01655	,8920	,9840	,90	,99
3	5	1,0400	,08246	,03688	,9376	1,1424	,94	1,10
6	5	,7440	,39728	,17767	,2507	1,2373	,08	1,10
Total	15	,9073	,25215	,06510	,7677	1,0470	,08	1,10

Test of Homogeneity of Variances

jumlah sp perlakuan

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3,380	2	12	,068

ANOVA

jumlah sp perlakuan

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,226	2	,113	2,043	,172
Within Groups	,664	12	,055		
Total	,890	14			

Lampiran 5

Hasil Uji T Jumlah Spermatozoa Tikus Putih

K₁-P₁

Group Statistics

	kelompok	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
jumlah spermatozoa	K1	5	,9720	3,834E-02	1,715E-02
	P1	5	,9380	3,701E-02	1,655E-02

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
jumlah spermatozoa	Equal variances assumed	,240	,637	1,427	8	,192	3,400E-02	2,383E-02	-2,10E-02	8,896E-02
	Equal variances not assumed			1,427	7,990	,192	3,400E-02	2,383E-02	-2,10E-02	8,897E-02

K₂-P₂

Group Statistics

	kelompok	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
jumlah spermatozoa	K2	5	1,0040	,1616	7,229E-02
	P2	5	1,0400	8,246E-02	3,688E-02

Independent Samples Test

		Levene's Test for quality of Variance		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
jumlah spermat	Equal varianc assumed	1,068	,332	-,444	8	,669	600E-02	115E-02	-,2231	,1511
	Equal varianc not assumed			-,444	5,950	,673	600E-02	115E-02	-,2350	,1630

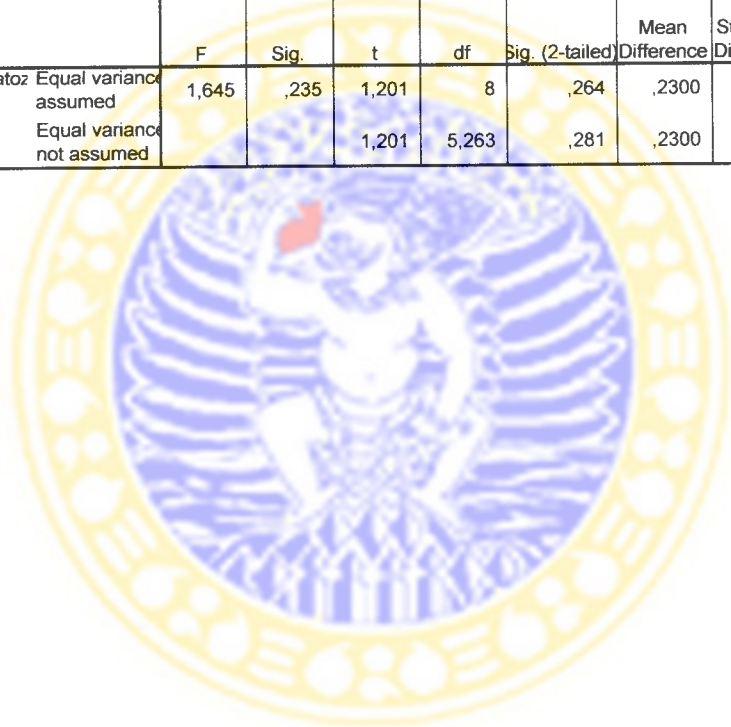
K₃-P₃

Group Statistics

	kelompok	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
jumlah spermatozoa	K3	5	,9740	,1599	7,153E-02
	P3	5	,7440	,3973	,1777

Independent Samples Test

	Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means							
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference		
								Lower	Upper	
jumlah spermatozoa	Equal variances assumed	1,645	,235	1,201	8	,264	,2300	,1915	-,2117	,6717
	Equal variances not assumed			1,201	5,263	,281	,2300	,1915	-,2550	,7150



Lampiran 6

Hasil Uji Korelasi dan Regresi Kadar ROS Sperma dengan Jumlah Spermatozoa Tikus Putih

Correlations

Correlations

		kadar ROS perlakuan	jml sp perlakuan
kadar ROS perlakuan	Pearson Correlation	1.000	-.008
	Sig. (2-tailed)	.	.978
	N	15	15
jml sp perlakuan	Pearson Correlation	-.008	1.000
	Sig. (2-tailed)	.978	.
	N	15	15

Regresi

Variables Entered/Removed^b

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	kdr ROS perlakuan ^a	.	Enter

a. All requested variables entered.

b. Dependent Variable: jumlah sp perlakuan

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	,008 ^a	,000	-,077	,26166

a. Predictors: (Constant), kdr ROS perlakuan

ANOVA^b

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	,000	1	,000	,001	,978 ^a
	Residual	,890	13	,068		
	Total	,890	14			

a. Predictors: (Constant), kdr ROS perlakuan

b. Dependent Variable: jumlah sp perlakuan

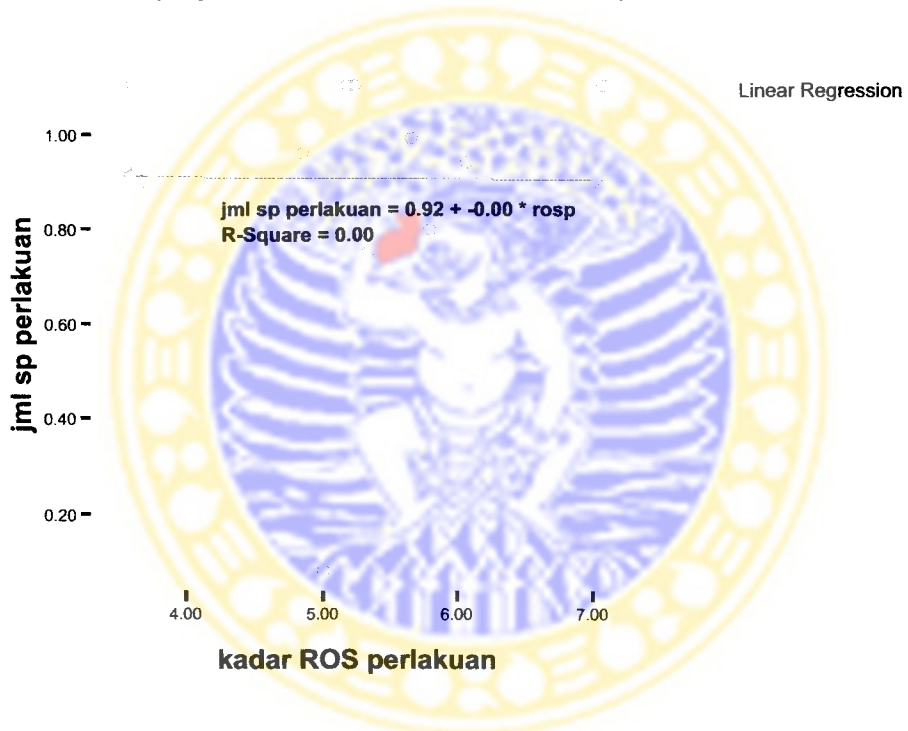
Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	,916	,311		2,944	,011
	kdr ROS perlakuan	-,002	,063	-,008	-,028	,978

a. Dependent Variable: jumlah sp perlakuan

SCATTERPLOT

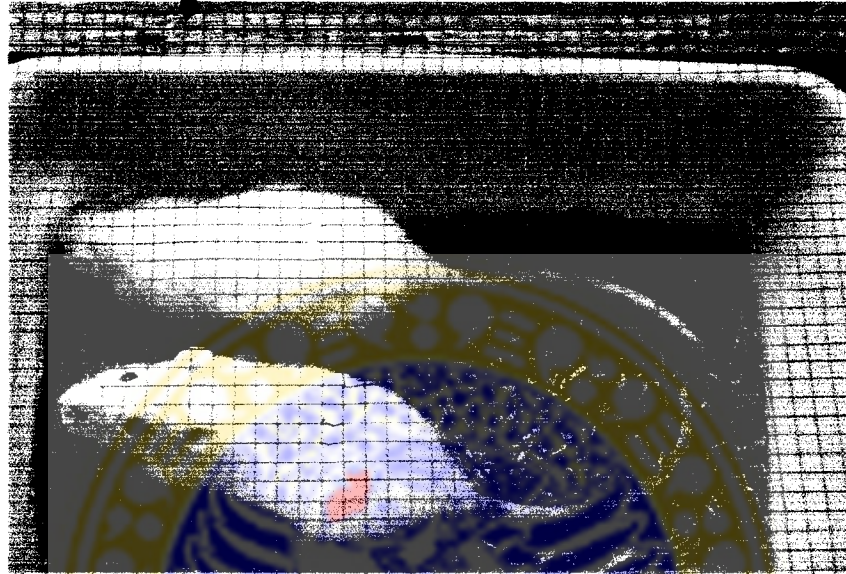
HUBUNGAN KADAR ROS SPERMA DENGAN JUMLAH SPERMATOZOA



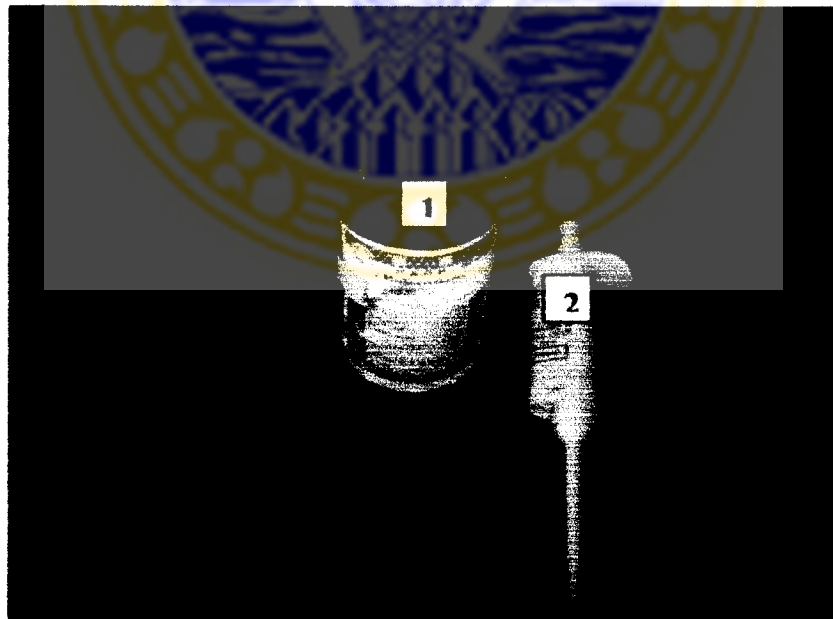
SETELAH PEMBERIAN 2-ME

Lampiran 7

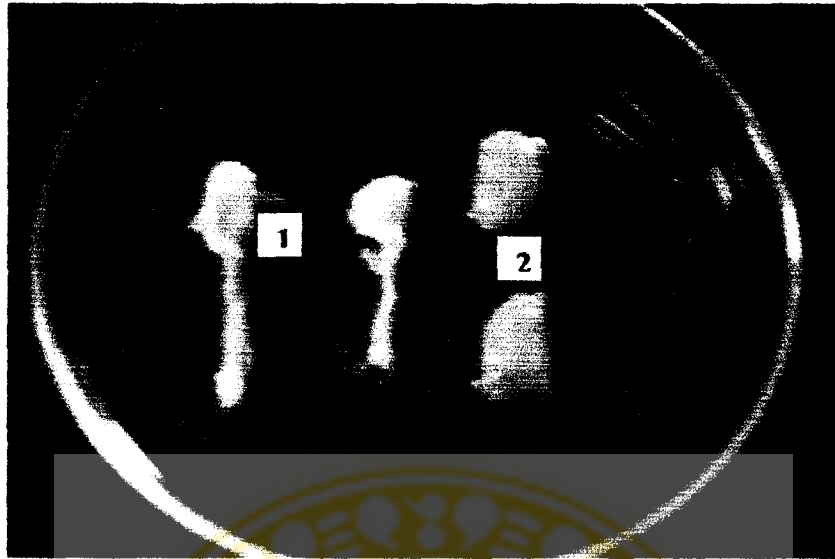
DOKUMENTASI PENELITIAN



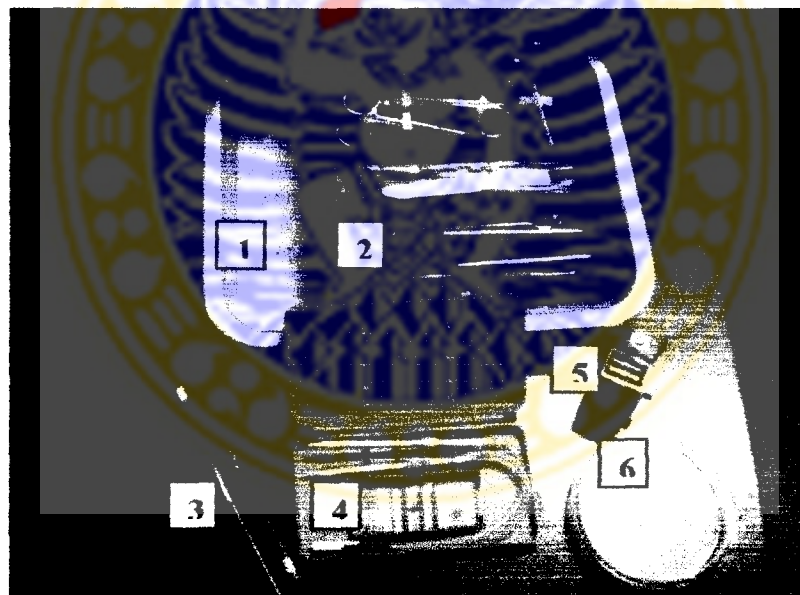
Gambar 1. Tikus putih (*Rattus norvegicus*)



Gambar 2. 1. Larutan 2-ME, 2. Mikropipet



Gambar 3. 1.Epididimis dan vas deferens, 2. Testis



Gambar 4. 1. Bak bedah, 2. Dissecting set, 3. Pipet tetes, 4. Hemositometer, 5. Digi counter, 6. Cawan petri