

TESIS

**KERUSAKAN SEL-SEL REPRODUKSI  
DAN PENURUNAN JUMLAH ANAK  
TIKUS PUTIH JANTAN GALUR SWISS  
AKIBAT PAPARAN TIMAH HITAM PER ORAL**

**PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIK**



**MOCH. AGUS SUPRIJONO**

**NIM. G4A 097 003**

**PROGRAM MAGISTER ILMU BIOMEDIK  
PROGRAM PASCA SARJANA UNIVERSITAS DIPONEGORO  
SEMARANG**

**1999**

619.9  
SUP  
K c1

**KERUSAKAN SEL-SEL REPRODUKSI  
DAN PENURUNAN JUMLAH ANAK  
TIKUS PUTIH JANTAN GALUR SWISS  
AKIBAT PAPARAN TIMAH HITAM PER ORAL**

**PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIK**

**TESIS  
UNTUK MEMPEROLEH GELAR MAGISTER  
PROGRAM STUDI ILMU BIOMEDIK  
PROGRAM PASCA SARJANA UNIVERSITAS DIPONEGORO**

Oleh :  
**MOCH. AGUS SUPRIJONO  
NIM. G4A 097 003**

**PROGRAM MAGISTER ILMU BIOMEDIK  
PROGRAM PASCA SARJANA UNIVERSITAS DIPONEGORO  
SEMARANG  
1999**

# LEMBAR PENGESAHAN

TESIS INI TELAH DISETUJUI

Tanggal Desember 1999

Oleh

Pembimbing I



**Prof. DR. dr. H. Tjahjono, SpPA, FIAC.**

**NIP. 130 368 076**

Pembimbing II



**dr. Parno Widjoto, SpFK.**

**NIP. 130 354 873**

Mengetahui

Ketua Program Studi Ilmu Biomedik  
Program Pasca Sarjana Universitas Diponegoro



**Prof. DR. dr. H. Tjahjono, SpPA, FIAC.**

**NIP. 130 368 076**

Telah diuji pada

Tanggal : 8 Desember 1999

---

**PANITIA PENGUJI TESIS**

( SK. Rektor Universitas Diponegoro No. 191 / SK / J07.4 / 1999 )

**Ketua** : Prof DR. dr. Soeharyo Hadisaputro, SpPD.

**Anggota** : Prof. dr. Nurdjaman.

Prof DR. dr. H. Tjahjono, SpPA, FIAC.

dr. Parno Widjojo, SpFK.

DR. dr. Susilo Wibowo, MS Med, SpAnd.

dr. Tjahjati DM, SpPK.

dr. Wahyu Rochadi, MSc.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Syukur Alhamdulillah saya panjatkan kehadiran Allah SWT, bahwa hanya karena taufiq dan hidayahnya saya dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan tesis ini. Namun demikian penelitian dan penulisan tesis ini tidak akan dapat selesai dengan sempurna tanpa bantuan, bimbingan dan pengarahan berbagai pihak. Oleh karena itu bersama ini saya sampaikan rasa terima kasih saya kepada :

Bapak Rektor UNISSULA, dr. H. Machfoed Ibawi, Sp. THT dan bapak Dekan Fakultas Kedokteran UNISSULA Semarang, dr. H. Muktasim Billah, Sp.S, beserta staf yang telah memberi izin, kesempatan dan fasilitas kepada saya untuk mengikuti program magister di Universitas Diponegoro Semarang.

Prof. DR. dr. H. Tjahjono, Sp.PA, FIAC dan dr. Parno Widjojo, Sp.FK, sebagai pembimbing yang tak pernah bosan memberikan bimbingan, petunjuk, pengarahan dan motivasi kepada saya dengan penuh kesabaran, sehingga penelitian dan penulisan tesis ini dapat saya selesaikan.

DR. dr. Susilo Wibowo, MS Med, Sp.And, konsultan pada penelitian tesis ini yang dengan tulus ikhlas memberikan bimbingan, pengarahan, petunjuk dan masukan-masukan dalam menyelesaikan tesis ini.

Direktur Program Pasca Sarjana Universitas Diponegoro, Prof. DR. dr. Soeharyo Hadisaputro, Sp.PD, saya sampaikan banyak terima kasih atas kesempatan dan pemberian bantuan beasiswa (BPPS) selama menempuh pendidikan magister.

Kepada seluruh karyawan Program Pascasarjana Universitas Diponegoro, saya ucapkan banyak terima kasih atas segala bantuan dan pelayanannya selama ini.

Ketua Program Magister Ilmu Biomedik, Prof. DR. dr. H. Tjahjono, Sp.PA, FIAC, yang telah memberikan kesempatan, petunjuk dan saran-saran yang sangat berharga kepada saya selama menempuh pendidikan magister ini. Juga kepada seluruh staf pengajar Program Magister Ilmu Biomedik yang telah banyak memberikan tambahan ilmu kepada saya sehingga dapat menyelesaikan pendidikan ini dengan lancar dan baik.

Rektor Universitas Diponegoro, Prof. Ir. H. Eko Boedihardjo, MSc., yang memberikan kesempatan dan fasilitas kepada saya untuk mengikuti dan menyelesaikan Program magister ini.

Bapak Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, dr. Anggoro DB. Sahro, Sp.A (K) dan Ketua Bagian Patologi Anatomi dan Histologi yang telah memberikan izin dan fasilitas untuk selesainya penelitian ini. Kepada staf dan karyawan Laboratorium Patologi Anatomi dan Histologi yang telah membantu berlangsungnya penelitian ini hingga selesai saya sampaikan terima kasih.

Akhirnya saya sampaikan banyak terima kasih kepada bapak dan ibu kandung saya yang telah membesarkan dan mendidik dengan penuh kasih sayang; istri dan kedua anak saya yang dengan penuh pengorbanan memberikan doa restu, motivasi, semangat, dorongan baik moril maupun materiil, sehingga saya dapat menyelesaikan pendidikan Program magister ini. Amien.

Penulis

## RINGKASAN

Pencemaran lingkungan hidup yang disebabkan logam berat cukup banyak, salah satunya adalah timah hitam atau *Pb*. *Pb* sebagai bahan pencemar lingkungan hidup bisa berasal dari hasil limbah industri, sisa pembakaran bahan bakar minyak, dan tangki air, atau jaringan pipa air minum yang mengandung *Pb*. *Pb* merupakan logam yang tidak mudah teroksidasi oleh udara, sehingga banyak digunakan untuk melapisi besi, tembaga dan alat dapur. Jika absorpsi *Pb* terjadi dan kandungan *Pb* di dalam darah tinggi akan berpengaruh terhadap kesehatan manusia. Terutama pada kondisi tertentu dapat menimbulkan kerusakan pada saraf, ginjal, sistim reproduksi, sistim pernapasan, sistim endokrin dan jantung. Salah satu pengaruh *Pb* yang dikhawatirkan orang adalah kerusakan pada sistim reproduksi sehingga dapat mempengaruhi jumlah anak dan kecacatan. Tujuan penelitian ini adalah untuk menganalisis kerusakan sel reproduksi dan penurunan jumlah serta normalitas anak tikus putih jantan yang diberi *Pb* nitrat per oral sebagai perlakuan.

Jenis penelitian ini adalah eksperimental laboratorium dengan rancangan penelitian *post test randomized control group design*. Tiga puluh tikus putih jantan galur Swiss umur 8 - 10 minggu diperoleh dari Laboratorium Biologi Institut Teknologi Bandung secara acak dibagi tiga kelompok. Tiap kelompok ditambah 3 ekor tikus untuk pemeriksaan kandungan *Pb* dalam jaringan testis sebelum dilakukan dekapitasi. Pemeriksaan kadar *Pb* dilakukan dengan metoda AAS. Kemudian masing-masing kelompok diberi larutan *Pb* nitrat 800 ppm, 400 ppm dan 0 ppm (kelompok

kontrol) dengan cara dicekok memakai semprit 1 ml dengan jarum atraumatis (tumpul) setiap pagi sebanyak 0,5 ml larutan per ekor. Lama perlakuan 10 minggu. Pada akhir minggu ke 10 tikus jantan dikawinkan dengan tikus betina *fertil* dan tikus betina ditunggu hingga beranak. Setelah kawin tikus jantan didekapitasi untuk dibuat sediaan testis secara histopatologi dan diambil spermanya pada *duktus defferen*.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa :

1. Pemberian *Pb* nitrat pada tikus jantan dengan konsentrasi 800 ppm menyebabkan kerusakan sel-sel reproduksi dan penurunan jumlah anak sekelahiran secara bermakna ( $p < 0.05$ ) dibanding kelompok II atau kontrol.
2. Pemberian *Pb* nitrat pada tikus jantan dengan konsentrasi 400 ppm menyebabkan kerusakan ringan sel-sel reproduksi dan penurunan jumlah anak sekelahiran secara bermakna ( $p < 0.05$ ) dibanding kelompok kontrol.

Simpulan dari hasil penelitian adalah bahwa pemberian larutan *Pb* nitrat 800 ppm per oral menyebabkan kerusakan sel-sel reproduksi dan penurunan jumlah anak sekelahiran secara bermakna, dibandingkan dengan pemberian larutan *Pb* nitrat 400 ppm maupun kelompok kontrol. Meskipun tidak didapatkan anak tikus yang cacat. Demikian pula didapat hasil secara bermakna yang diperoleh pada pemberian larutan *Pb* nitrat 400 ppm dibanding dengan kelompok kontrol.

## ABSTRACT

Black lead or *Pb* is one of environmental pollutant that may caused damage of nerve, kidney, reproductive, respiration, endocrine system as well as heart diseases. Reproductive system damage could affect on number and quality by means of normality of the offspring. Therefore the objectives of this study are to analyze the damage of reproduction cells and evaluate the reduction number of male white-rat offspring after exposed to different concentration of *Pb* nitrate solution orally .

Thirty of eight to ten weeks of healthy male white rats (Swiss strain) obtained from Biology Laboratory of Bandung Institute of Technology were divided randomly into three groups. In addition of each group, three rats were sacrificed in order to check the *Pb* contents on their testicle using AAS methods.

Post test randomized control group design of experimental animal research was applied. Every morning each group were treated for 10 weeks with 0.5 ml distilled water of 800 ppm, 400 ppm and 0 ppm of *Pb* nitrate as a control group using 1 ml *sondage* syringe respectively. At the end of treatment, the male rats were mated with fertile female rats and the number and quality of the offspring were evaluated thereafter. Subsequently, the male rats were decapitated and their testicles were mounted for histopathological evaluation while the vas deferens (from the ampulla through 2 cm length were cut and squeezed to obtain motile sperm for further analysis.

The result of this study indicate that the number of intact seminiferous tubule and the number of Sertoli cell were decreased significantly ( $P < 0.05$ ) inline with the Pb nitrate concentration treatment. Further, the quantity (number) and quality (motility) of sperm were also decreased significantly ( $P < 0.05$ ) in accordance with Pb nitrate concentration treatment compared to those of control group. The mentioned result seem also strongly support the final observation to mate the treated male group with fertile female which indicate that treated groups were significantly ( $P < 0.05$ ) less fertile (less offspring) compared to those of control group. However, there is no abnormality found in the offspring.

This study confirm that Pb nitrate is a toxic substance on reproductive system. On the concentration of 800 ppm orally given for ten weeks cause damage the seminiferous tubules, Sertoli cells, decrease number and motility of the sperm. Although there is no abnormality of the offspring could found, the mentioned laboratory finding were validated with mating result that shows reduction number of offspring significantly on the treatment group.

*Key words : Pb nitrate, white-rats male strain Swiss, Seminiferous tubule necrosis, decrease Sertoli cells, decrease motile/total sperm count, decrease number of offspring.*

# DAFTAR ISI

	<b>Halaman</b>
Halaman Judul .....	i
Lembar Pengesahan .....	ii
Daftar Isi .....	iv
<b>1. PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
1.1. LATAR BELAKANG .....	1
1.2. RUMUSAN MASALAH .....	3
1.3. TUJUAN PENELITIAN .....	3
1.3.1. Tujuan Umum .....	3
1.3.2. Tujuan Khusus .....	4
1.4. MANFAAT PENELITIAN .....	4
<b>2. TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>5</b>
2.1. LANDASAN TEORI .....	5
2.1.1. Timah Hitam .....	5
2.1.2. Sifat Kimia dan Fisika Pb .....	6
2.1.3. Sumber Pb .....	6
2.1.4. Pb sebagai sumber pencemaran lingkungan .....	7

2.1.5. Penyerapan Pb .....	7
2.1.6. Metabolisme Pb .....	8
2.1.7. Distribusi Pb .....	9
2.1.8. Pengaruh Pb pada Fungsi Reproduksi Jantan .....	10
2.1.9. Pengaruh Pb terhadap Darah .....	10
2.1.10. Pengaruh Pb pada Binatang .....	11
2.2. TINJAUAN HISTOLOGI TESTIS .....	12
2.3. LANDASAN EMPIRIS .....	13
2.4. KERANGKA TEORI .....	14
<b>3. KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN .....</b>	<b>17</b>
3.1. KERANGKA KONSEPTUAL .....	17
3.2. ASUMSI PENELITIAN .....	17
3.3. HIPOTESIS PENELITIAN .....	18
<b>4. METODOLOGI PENELITIAN .....</b>	<b>19</b>
4.1. JENIS PENELITIAN .....	19
4.2. BINATANG PERCOBAAN .....	19
4.3. BESAR SAMPEL .....	19
4.4. BAHAN PENELITIAN .....	20
4.5. CARA PENELITIAN .....	20
4.6. ALAT PENELITIAN .....	21
4.7. WAKTU DAN TEMPAT PENELITIAN .....	21

4.8. VARIABEL PENELITIAN .....	21
4.9. METODE PENELITIAN .....	22
4.9.1 Kerusakan sel reproduksi .....	23
4.9.2 Penilaian jumlah sel leydig .....	24
4.9.3 Penilaian nekrosis tubulus seminiferus .....	25
4.9.4 Penilaian jumlah sel sertoli .....	25
4.9.5 Penilaian jumlah sel spermatogenesis .....	25
4.9.6 Penilaian jumlah sperma .....	26
4.9.7 Penilaian jumlah anak sekelahiran .....	27
4.10. PRINSIP DASAR PENELITIAN .....	27
4.11. ANALISIS DATA PENELITIAN .....	27
5. HASIL DAN ANALISIS .....	29
5.1. PEMERIKSAAN AAS .....	30
5.2. PEMERIKSAAN POTONGAN JARINGAN TESTIS .....	30
5.3. JUMLAH SEL LEYDIG .....	32
5.4. NEKROSIS TUBULUS SEMINIFERUS .....	33
5.5. JUMLAH SEL SERTOLI .....	34
5.6. JUMLAH SEL SPERMATOGENESIS .....	35
5.7. JUMLAH SPERMA .....	36
5.8. JUMLAH ANAK SEKELAHIRAN .....	37

<b>6. PEMBAHASAN</b> .....	<b>44</b>
6.1. PEMERIKSAAN AAS .....	44
6.2. PEMERIKSAAN POTONGAN JARINGAN TESTIS .....	45
6.3. JUMLAH SEL LEYDIG .....	46
6.4. NEKROSIS TUBULUS SEMINIFERUS .....	46
6.5. JUMLAH SEL SERTOLI .....	47
6.6. JUMLAH SEL SPERMATOGENESIS .....	48
6.7. JUMLAH SPERMA .....	50
6.8. JUMLAH ANAK SEKELAHIRAN .....	51
6.9. PEMBAHASAN UMUM .....	52
<b>7. SIMPULAN DAN SARAN</b> .....	<b>53</b>
7.1. SIMPULAN .....	53
7.2. SARAN .....	53
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	<b>55</b>
<b>LAMPIRAN-LAMPIRAN</b> .....	<b>59</b>

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 1	Konsentrasi <i>Pb</i> pada jaringan testis tikus putih yang diberi <i>Pb</i> nitrat	29
Gambar 2	Pofongan jaringan testis tikus putih yang diberi perlakuan <i>Pb</i> nitrat 800 ppm, pembesaran 400x	39
Gambar 3	Potongan jaringan testis tikus putih yang diberi perlakuan <i>Pb</i> nitrat 400 ppm, pembesaran 400x	39
Gambar 4	Potongan jaringan testis tikus putih yang diberi perlakuan <i>Pb</i> nitrat 0 ppm (aquadest / kontrol), pembesaran 400x	40
Gambar 5	Kepadatan sel spermatogenesis didalam tubulus seminiferus tikus putih yang diberi perlakuan <i>Pb</i> nitrat 800 ppm, pembesaran 400x	40
Gambar 6	Kepadatan sel spermatogenesis didalam tubulus seminiferus tikus putih yang diberi perlakuan <i>Pb</i> nitrat 400 ppm, pembesaran 400x	41
Gambar 7	Kepadatan sel spermatogenesis didalam tubulus seminiferus tikus putih yang diberi perlakuan <i>Pb</i> nitrat 0 ppm (aquadest / kontrol), pembesaran 400x	41
Gambar 8	Jumlah sperma tikus putih yang diberi perlakuan <i>Pb</i> nitrat 800 ppm, pembesaran 400x	42
Gambar 9	Jumlah sperma tikus putih yang diberi perlakuan <i>Pb</i> nitrat 400 ppm, pembesaran 400x	42
Gambar 10	Jumlah sperma tikus putih yang diberi perlakuan <i>Pb</i> nitrat 0 ppm (aquadest / kontrol), pembesaran 400x	43

## DAFTAR TABEL

Tabel 1	Rata-rata kerusakan jaringan testis kanan dan kiri tikus putih yang diberi <i>Pb</i> nitrat (skor Johnsen)	31
Tabel 2	Rata-rata jumlah sel leydig jaringan testis kanan dan kiri tikus putih yang diberi <i>Pb</i> nitrat (10 tubulus per lapang pandang)	32
Tabel 3	Rata-rata jumlah tubulus seminiferus jaringan testis kanan dan kiri tikus putih yang diberi <i>Pb</i> nitrat (10 tubulus per lapang pandang)	33
Tabel 4	Rata-rata jumlah sel sertoli jaringan testis kanan dan kiri tikus putih yang diberi <i>Pb</i> nitrat (10 tubulus per lapang pandang)	34
Tabel 5	Rata-rata jumlah sel spermatogenesis jaringan testis kanan dan kiri tikus putih yang diberi <i>Pb</i> nitrat (10 tubulus per lapang pandang)	35
Tabel 6	Rata-rata jumlah sperma hidup dan mati tikus putih yang diberi <i>Pb</i> nitrat	36
Tabel 7	Rata-rata jumlah anak tikus dari tikus putih yang diberi <i>Pb</i> nitrat	37
Tabel 8	Rata-rata jumlah anak tikus dan kecacatan yang diberi <i>Pb</i> nitrat	38

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Susunan makanan binatang percobaan	59
Lampiran 2	Konsentrasi Pb didalam jaringan testis dengan metode AAS	60
Lampiran 3	Pembuatan sediaan histologi	61
Lampiran 4	Larutan Bouin's dan pengecatan Papanicolaou	64
Lampiran 5	Cara penghitungan jumlah sperma	66
Lampiran 6	Data statistik pemeriksaan AAS	67
Lampiran 7	Data statistik potongan jaringan testis (skor Johnsen)	69
Lampiran 8	Data statistik jumlah sel leydig	71
Lampiran 9	Data statistik nekrosis tubulus seminiferus	73
Lampiran 10	Data statistik jumlah sel sertoli	75
Lampiran 11	Data statistik jumlah sel spermatogenesis	77
Lampiran 12	Data statistik jumlah sel sperma	79
Lampiran 13	Data statistik jumlah anak sekelahiran	81

# BAB 1

## PENDAHULUAN

### 1.1 LATAR BELAKANG MASALAH

Pencemaran lingkungan hidup disebabkan oleh limbah industri yang mengandung logam berat cukup banyak, salah satunya adalah TIMAH HITAM (*PLUMBUM* = *Pb* = timbal). Logam ini di alam terdapat sebagai senyawa karbonat  $\{Pb(CO_3)_2\}$ , nitrat  $\{Pb(NO_3)_2\}$ , sulfat ( $PbSO_4$ ), dan sulfit ( $PbS$ ) (1).

Hasil limbah industri pada umumnya dibagi tiga macam yaitu limbah padat, cair dan gas. Yang terbuang ke tanah, air dan udara. Apabila jumlah limbah yang terbuang sedikit dan lingkungan masih mampu menetralkan maka belum akan membahayakan lingkungan. Akan tetapi bila jumlah limbah *Pb* sudah di atas nilai ambang batas yang ditetapkan oleh *American Standart Technical Methode* (ASTM, *Pb* = 283,3 nm) maka akan membahayakan dan merugikan kesehatan manusia serta lingkungan sekitarnya.

*Pb* merupakan logam yang tidak mudah teroksidasi oleh udara, sehingga banyak digunakan untuk melapisi besi, tembaga, dan alat dapur (2). Kandungan *Pb* yang tinggi di lingkungan sangat berpengaruh terhadap kesehatan manusia. Pemakaian *Pb* sebagai bahan *additive* bahan bakar dalam bentuk *Pb-tetraethyl* dan *Pb-tetramethyl* mempercepat penyebaran *Pb* ke lingkungan.

Kadar *Pb* di udara kota besar yang padat lalu lintasnya mencapai 2 - 4  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ , di luar kota kurang dari 0,2  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  dan di pedesaan kecil (3). Kadar *Pb* dalam air minum pada umumnya kurang dari 10  $\mu\text{g}/\text{liter}$ . Pada beberapa daerah yang mempunyai kandungan magnesium dan kalsium rendah serta menggunakan tangki air dan jaringan pipa air minum yang mengandung *Pb*, kadar *Pb* dapat mencapai 2000 - 3000  $\mu\text{g}/\text{liter}$  (4). *Pb* masuk kedalam tubuh manusia melalui saluran pernafasan, kulit, makanan dan minuman diperkirakan  $\pm 100 \mu\text{g}/\text{hari}$ . Semua bahan yang masuk ke dalam tubuh mempunyai efek samping baik positif maupun negatif yang dapat mempengaruhi fungsi organ tubuh. *Pb* mempunyai pengaruh terhadap fungsi reproduksi (testis) (5). Dalam bidang pengobatan modern *Pb* tidak pernah digunakan. *Pb* mempunyai afinitas dengan sulfur, *invitro* dapat bergabung dengan gugus-SH sedangkan *invivo* selain dengan gugus-SH dapat juga terikat dengan senyawa lain (2,3). Logam *Pb* dalam segala bentuk bersifat racun yang berbahaya bagi kesehatan. Oleh karena keracunan *Pb* dapat berpengaruh buruk terhadap organ tertentu. Organ tubuh yang banyak terkena akibat keracunan *Pb* adalah syaraf, ginjal, sistim reproduksi atau testis, sistim pernafasan, sistim endokrin dan jantung yang masing-masing akan memberikan efek yang berbeda (6). Para pekerja yang berhubungan dengan *Pb* selama bekerja misal pekerja pada bengkel las dan kenteng, pompa bensin, jalan tol, polisi lalu lintas, sopir maupun pekerja pabrik yang menggunakan bahan dasar *Pb* (pabrik *accu*) termasuk paling tinggi tingkat kontaminasinya. Yaitu dengan cara terhirup melalui saluran pernafasan (7). Konsentrasi *Pb* di udara pada lingkungan kerja peleburan timah dan pabrik *accu* sekitar 1000  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ .

Untuk mengetahui dampak negatif logam *Pb* terhadap fungsi reproduksi atau testis, maka dilakukan penelitian yang terencana, terarah dan bertahap. Binatang percobaan yang baik untuk penelitian adalah tikus putih, mencit atau kelinci. Sedangkan tikus putih yang pernah dipakai pada percobaan terdahulu adalah dari galur Swiss karena mudah didapatkan.

## 1.2 RUMUSAN MASALAH

Penelitian ini dilakukan untuk menjawab permasalahan : Apakah pemberian timah hitam per oral ( dalam hal ini dipakai larutan *Pb* nitrat ) dapat menyebabkan kerusakan sel reproduksi dan penurunan jumlah anak tikus putih jantan galur Swiss ?

## 1.3 TUJUAN PENELITIAN

### 1.3.1 Tujuan Umum

Untuk mengetahui pengaruh pemberian larutan *Pb* nitrat dengan konsentrasi 800 ppm, 400 ppm dan 0 ppm (kontrol) terhadap testis tikus putih galur Swiss.

### 1.3.2 Tujuan Khusus

Untuk mengetahui efek pemberian larutan *Pb* nitrat yang berbeda konsentrasi pada fungsi testis tikus putih dengan cara menganalisis :

1. Kerusakan sel-sel reproduksi ( sel leydig, tubulus seminiferus, sel sertoli dan sel spermatogenesis),
2. Penurunan jumlah sperma,
3. Penurunan jumlah anak sekelahiran.

#### 1.4 MANFAAT PENELITIAN

Dari hasil penelitian ini diharapkan dapat dipakai sebagai acuan :

- (1) Untuk mengetahui berapa konsentrasi larutan *Pb* nitrat yang memberikan dampak negatif pada fungsi testis tikus putih jantan galur Swiss.
- (2) Untuk mengetahui apakah terjadi kerusakan pada sel-sel reproduksi (sel leydig, tubulus seminiferus, sel sertoli dan sel spermatogenesis) serta penurunan jumlah anak sekelahiran.
- (3) Untuk mengetahui apakah berpengaruh pula pada sistim reproduksi (testis) bila penelitian ini dilakukan pada manusia.

## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 LANDASAN TEORI

##### 2.1.1 Timah Hitam

Timah hitam disebut juga timbal atau *Plumbum (Pb)*. Di alam terdapat 4 macam isotop *Pb*, yaitu :

- $^{204}\text{Pb}$  : dengan prosentase 1,48 %
- $^{206}\text{Pb}$  : dengan prosentase 23,6 %
- $^{207}\text{Pb}$  : dengan prosentase 22,6 %
- $^{208}\text{Pb}$  : dengan prosentase 52,32%

*Pb* merupakan logam lunak yang mudah dibentuk, mempunyai kerapatan yang besar, tahan terhadap karat, sebagai penghantar listrik yang baik dan cukup banyak di alam (6). *Pb* yang berlebihan sangat membahayakan kesehatan manusia, oleh karena dapat menyebabkan keracunan. *Pb* juga digunakan untuk membuat pipa air, perabot makan dan alat-alat dapur karena mudah dibentuk (8). *Pb* merupakan salah satu logam berat yang dapat menimbulkan pencemaran lingkungan misalnya pada perusahaan peleburan pemurnian *Pb*, limbah dari

pabrik *accu*, pembakaran bahan bakar minyak yang mengandung *additive Pb*, pembakaran batu bara dan sebagainya (4).

### 2.1.2 Sifat Kimia dan Fisika *Pb*

*Pb* merupakan logam lunak berwarna perak abu-abu atau kebiru-biruan, dengan berat atom 207,9 ; berat jenis 11,34 ; titik lebur 327,5°C dan titik didih 1740°C pada tekanan atmosfer.

*Pb* anorganik dapat berupa garam nitrat :  $Pb(NO_3)_2$ ; garam carbonat :  $Pb(CO_3)_2$  dan garam sulfat :  $(Pb SO_4)$ .

*Pb* organik bersifat stabil, misal : *Pb* tetraethyl =  $Pb (C_2H_5)_4$  dan *Pb* tetramethyl =  $Pb (CH_3)_4$  dipakai sebagai *additive* bahan bakar kendaraan bermotor dan keduanya merupakan cairan yang tidak berwarna (4).

### 2.1.3 Sumber *Pb*

- Sumber alami : berasal dari batu-batuan, tanah, air, udara dan juga dari tumbuh-tumbuhan.
- Berasal dari pabrik : tambang, peleburan dan pemurnian untuk menghasilkan *Pb* kepingan dan pabrik *accu* (4).
- Berasal dari lingkungan : merupakan limbah bengkel las kenteng kendaraan bermotor, hasil sisa pemakaian bahan bakar : bensin, oli, solar.

#### 2.1.4 *Pb* sebagai sumber pencemaran lingkungan

Berasal dari pembakaran *Pb additive* (*Pb* organik) pada bahan bakar kendaraan bermotor. Derajat pencemaran *Pb* tergantung dari kepadatan lalu lintas, sehingga berbeda antara satu kota dengan kota lain, terbanyak pada jalan raya yang padat arus lalu lintasnya. Pada perusahaan batu *battery* dan pabrik *accu* pencemarannya sangat tinggi yaitu melalui limbah industri yang terbuang secara tidak sempurna. Pencemaran lingkungan dapat pula ditimbulkan dari tanah dan debu di sekitar rumah yang dicat dengan cat yang mengandung *Pb*. Kontaminasi makanan dan minuman yang dihasilkan dari pipa yang mengandung *Pb*, pipa PVC, kaleng makanan yang dilapisi *Pb* sehingga tidak mudah berkarat. Bengkel las dan kenteng kendaraan bermotor baik roda 2 maupun roda 4, serta sisa hasil industri yang produknya banyak berhubungan dengan *Pb* juga merupakan sumber pencemaran lingkungan (4).

#### 2.1.5 Penyerapan *Pb*

##### (1) Melalui Saluran Pernafasan

*Pb* yang terhirup melalui saluran pernafasan sebagian besar masuk ke dalam pembuluh darah paru, kemudian diedarkan ke seluruh jaringan dan organ tubuh, lebih dari 90% *Pb* yang terserap oleh darah berikatan dengan sel-sel darah merah (6). Banyaknya *Pb* yang diserap tergantung oleh ukuran partikel dan volume udara yang terhirup. Kurang lebih 35% partikel *Pb* dengan diameter

antara 0,1 - 1,0 mm terhirup dan akan mengendap di *alveoli* paru. Untuk partikel yang lebih besar pengendapan lebih banyak terjadi pada *nasopharynx*.

### (2) Melalui Kulit

Senyawa *Pb*-tetraethyl dan *Pb*-tetramethyl merupakan senyawa *Pb* organik. Juga dapat diserap melalui kulit. Hal ini disebabkan oleh karena kedua senyawa tersebut dapat larut dalam lemak atau minyak. Senyawa *Pb*-tetraethyl dapat menyebabkan keracunan akut pada sistim syaraf pusat (SSP).

### (3) Melalui Saluran Pencernaan

*Pb* yang masuk melalui makanan dan minuman rata-rata setiap harinya sekitar 300 µg. Penyerapan sebagian besar terjadi dalam usus halus, dalam colon hanya sedikit, dalam lambung tidak ada penyerapan sama sekali. Kandungan *Pb* secara alami pada makanan kurang lebih 0,01 µg/gram. Ekskresi *Pb* melalui urin setiap harinya rata-rata 10 % dari pemasukan melalui makanan dan minuman. Hal ini menunjukkan banyaknya penyerapan *Pb* melalui saluran pencernaan.

### 2.1.6 Metabolisme *Pb*

Proses metabolisme dari *Pb* melalui proses *biotransformasi* yang masuk ke dalam tubuh akan mengalami peningkatan ataupun penurunan daya racun yang dimiliki. Pada keadaan ini enzim memegang peranan penting sebagai zat perangsang untuk mempercepat proses metabolisme.

Menurut Palar (1994) proses ini dibagi menjadi :

- (1) Transformasi yang bersifat destruktif, yaitu berhubungan dengan penghancuran atau perubahan bentuk persenyawaan suatu unsur menjadi bentuk lain tanpa menghilangkan unsur tersebut.
- (2) Konjugasi melibatkan senyawa karbohidrat, asam amino, gugus acetil dan gugus sulfhidril (-SH). Reaksi ini berfungsi dalam penurunan daya racun suatu zat yang masuk ke dalam tubuh.
- (3) Transformasi yang bersifat menginduksi enzim. Enzim sebagai aktifator atau biokatalisator akan mempercepat reaksi sampai  $10^8$  sampai  $10^{11}$  lebih cepat dibandingkan reaksi tanpa enzim.

#### 2.1.7 Distribusi *Pb*

Senyawa *Pb* organik relatif lebih mudah diserap tubuh melalui lapisan kulit atau selaput lendir, bila dibandingkan senyawa *Pb* anorganik. 5% - 10% dari jumlah *Pb* yang masuk tubuh melalui saluran pernafasan. Dari jumlah tersebut, hanya sebesar 15% yang mengendap pada jaringan tubuh; sedangkan sisanya dibuang bersama-sama dengan hasil sisa metabolisme lainnya melalui urine dan feses. Distribusi *Pb* pada manusia tidak dapat diketahui secara langsung. Pada otopsi *Pb* terlokalisir pada tulang. Akumulasi *Pb* dimulai sejak janin dalam kandungan, distribusi pada jaringan fetus serupa dengan distribusi orang dewasa. Konsentrasi *Pb* dalam darah janin sama dengan ibunya, hal ini menunjukkan antara ibu dan anak terjadi proses keseimbangan (9, 10).

### 2.1.8 Pengaruh *Pb* pada Fungsi Reproduksi Jantan

Pemberian *Pb* dosis tinggi pada pria akan melemahkan fungsi reproduksi, hal ini dibuktikan dengan bertambahnya frekuensi asthenospermia, hipospermia dan teratospermia (11). Pembentukan sperma dikenal dengan proses spermatogenesis yaitu suatu proses perkembangan dan pemasakan cellulae spermatogenicae secara berurutan menjadi spermatozoon yang sebagian besar terjadi di dalam tubulus seminiferus convolutus (12). Waktu yang diperlukan untuk pembentukan sperma sampai diejakulasikan, pada manusia kurang lebih 83 hari, pada tikus 52 hari dan pada mencit 41 hari (13).

Pengaruh dari suatu bahan beracun pada alat reproduksi jantan terutama pada tingkat spermatogenesis yaitu spermatosit, spermatid atau spermatozoa, sehingga tidak terjadi kematangan sperma. Juga berpengaruh langsung pada kerusakan sel reproduksi, sel leydig, sel sertoli dan adenohipofise yang dapat mengakibatkan azoospermia (13, 14).

### 2.1.9 Pengaruh *Pb* terhadap darah

Tingginya kadar *Pb* dalam darah akan mempengaruhi aktifitas enzim delta ALAD (Asam amino levulonat dehidratase) dalam pembentukan hemoglobin di butir darah merah. Terganggunya enzim delta ALAD dalam memproduksi hemoglobin dapat mengakibatkan pengurangan sel-sel darah merah, penurunan sintesis hemoglobin dan penghambatan sintesis heme yang dapat menyebabkan anemia. Secara umum mekanisme timbulnya anemia akibat *Pb* dijelaskan oleh Soedigdo (15) yaitu akibat terbentuknya senyawa *Pb* dengan enzim. Komplek

yang terbentuk menjadi tidak aktif, yang berakibat terhambatnya sintesis darah merah (Hemoglobin) dan menimbulkan anemia, dengan reaksi :



Jadi *Pb* berpengaruh terhadap darah melalui 2 cara yaitu :

- (1) Penundaan pematangan sel-sel darah merah dalam sumsum tulang dan dapat menimbulkan bercak basofilik dalam eritrosit (dengan pengecatan Giemsa).
- (2) Menghambat sintesis hemoglobin oleh gangguan *Pb* pada dua zat penting untuk membentuk hemoglobin yaitu asam amino delta levulanat dan koproporfirin (16, 17, 18).

#### 2.1.10 Pengaruh *Pb* pada Binatang

Pengaruh *Pb* pada binatang percobaan pada umumnya ditentukan oleh onset dan paparan harian masing-masing binatang percobaan tersebut; makin besar paparan yang diberikan, maka makin besar pula pengaruh dan akibatnya atau efek sampingnya. Hampir sebagian besar *Pb* yang diabsorpsi oleh mamalia ditimbun dalam jaringan tulang. Pada pemberian *Pb* dengan dosis tertentu per oral pada binatang percobaan akan diikuti dengan peningkatan konsentrasi *Pb* pada jaringan yang kemudian akan turun kembali dengan cepat. Hal ini disebabkan adanya perpindahan *Pb* ke dalam tulang (19). Sedangkan kecepatan pelepasan *Pb* dari tulang sangat lambat dibandingkan dengan jaringan yang lainnya. *Pb* yang masuk ke dalam jaringan lunak sebelumnya diikat oleh gugus sulfhidril dari masing-masing membran

jaringan tersebut, dan oleh karena senyawa *Pb* dapat larut di dalam lemak atau minyak maka *Pb* dapat masuk ke dalam jaringan lunak tersebut, termasuk ke dalam testis.

Pengaruh *Pb* terhadap sel-sel darah merah akan memperpendek umur sel dan akan menyebabkan anemia, sehingga binatang percobaan yang keracunan *Pb* akan tampak lemah dan lesu. Hal ini dimungkinkan dengan adanya anemia dan gejala keracunan *Pb*.

## 2.2 TINJAUAN HISTOLOGI TESTIS

Kelenjar kelamin jantan yang utama adalah testis, mempunyai fungsi ganda, pertama testis menghasilkan sel kelamin jantan atau gamet yaitu spermatozoa, dan kedua testis menghasilkan hormon kelamin jantan testoteron, yang merangsang organ kelamin aksesori dan menyebabkan perkembangan ciri kelamin jantan ekstragenital. Testis beserta salurannya : duktus epididimis, duktus deferens dan kelenjar kelamin aksesori : vesikula seminalis, kelenjar prostat dan kelenjar bulbouretralis merupakan organ genitalia jantan interna. Sedangkan organ genitalia jantan eksterna terdiri atas penis dan skrotum.

Testis dikelilingi oleh suatu kapsula jaringan ikat yang tebal yaitu tunika albuginea, yang mana membentuk massa jaringan ikat yang berbentuk kerucut masuk kedalam testis sebagai mediastinum testis. Sebelah dalam mediastinum ada septa jaringan fibrosa yang halus yaitu septula testis, berjalan radier ke arah tunika albuginea. Septula membagi perenkim menjadi lobuli-lobuli testis

berbentuk kerucut, yang saling berhubungan disebelah perifer karena septula tidak sempurna di dekat tunika albuginea.

Tiap lobulus berisi 1-4 tubulus yang berkelok-kelok yaitu tubulus seminiferus merupakan bagian dari testis yang menghasilkan spermatozoa, sebagai kelenjar tubulosa komplek. Tiap tubulus seminiferus selanjutnya dekat mediastinum menjadi tubulus yang lurus yaitu tubulus rektus, yang merupakan bagian pertama sistem saluran keluar. Tubulus rektus selanjutnya menuju ke rete testis, sistem ruang-ruang rumit dimediastinum.

Di sebelah luar tunika albuginea dibungkus oleh lapisan serosa yang membentuk lapisan viseralis tunika vaginalis propria testis. Di sebelah dalam tunika albuginea melanjutkan diri menjadi suatu jaringan ikat vaskular yaitu jaringan interstisial, yang mengelilingi tubulus seminiferus dan mengisi lobulus. Jaringan ini terdiri atas sel-sel epiteloid, disebut sel-sel interstisial atau sel leydig, yang mempunyai fungsi endokrin (20).

### 2.3 LANDASAN EMPIRIS

Menurut Cernochova dan Kamarad (1992) (21) menerangkan bahwa pemberian *Pb* nitrat pada air minum dengan konsentrasi akhir sampai 0,05 gram/liter terhadap binatang percobaan (mencit jantan) memberikan gambaran penambahan volume jaringan interstisial, terjadi perubahan ephitelum germinativum tubulus seminiferus, setelah pemberian selama 2 (dua) minggu.

Menurut Mc Murry et al., (1995) (22) menyatakan bahwa pengaruh pemberian *Pb* di dalam air minum dengan konsentrasi 0 ppm, 100 ppm dan

1000 ppm yang diberikan pada mencit jantan selama tujuh minggu, maka akan terjadi pengecilan hepar, vesikula seminalis, duktus epididimis dan pengurangan jumlah sperma binatang percobaan. Kerusakan akan terlihat semakin jelas lagi apabila konsentrasi *Pb* pada air minum dan lamanya waktu pemberian ditingkatkan, sehingga perubahan-perubahan histopatologi pada testis akan tampak lebih nyata.

Menurut Rasile et al., (1995) (23) yang meneliti pengaruh pemberian *Pb* asetat dengan kadar 0,5 % dalam air minum binatang percobaan, menunjukkan hasil perpanjangan waktu pembukaan kelopak mata pada anak binatang percobaan, dan terjadi penurunan berat badan apabila dibandingkan dengan kontrol, sehingga pertumbuhannya menjadi lambat.

Menurut Stowe dan Goyer (1971) (24) yang melakukan penelitian dengan kelinci sebagai binatang percobaan dan merupakan penelitian pertama yang memberikan efek paternal keracunan *Pb*, banyaknya anak sekelahiran dari kelinci jantan yang diberi perlakuan *Pb* lebih sedikit jumlahnya dibandingkan dengan yang tidak diberi *Pb*.

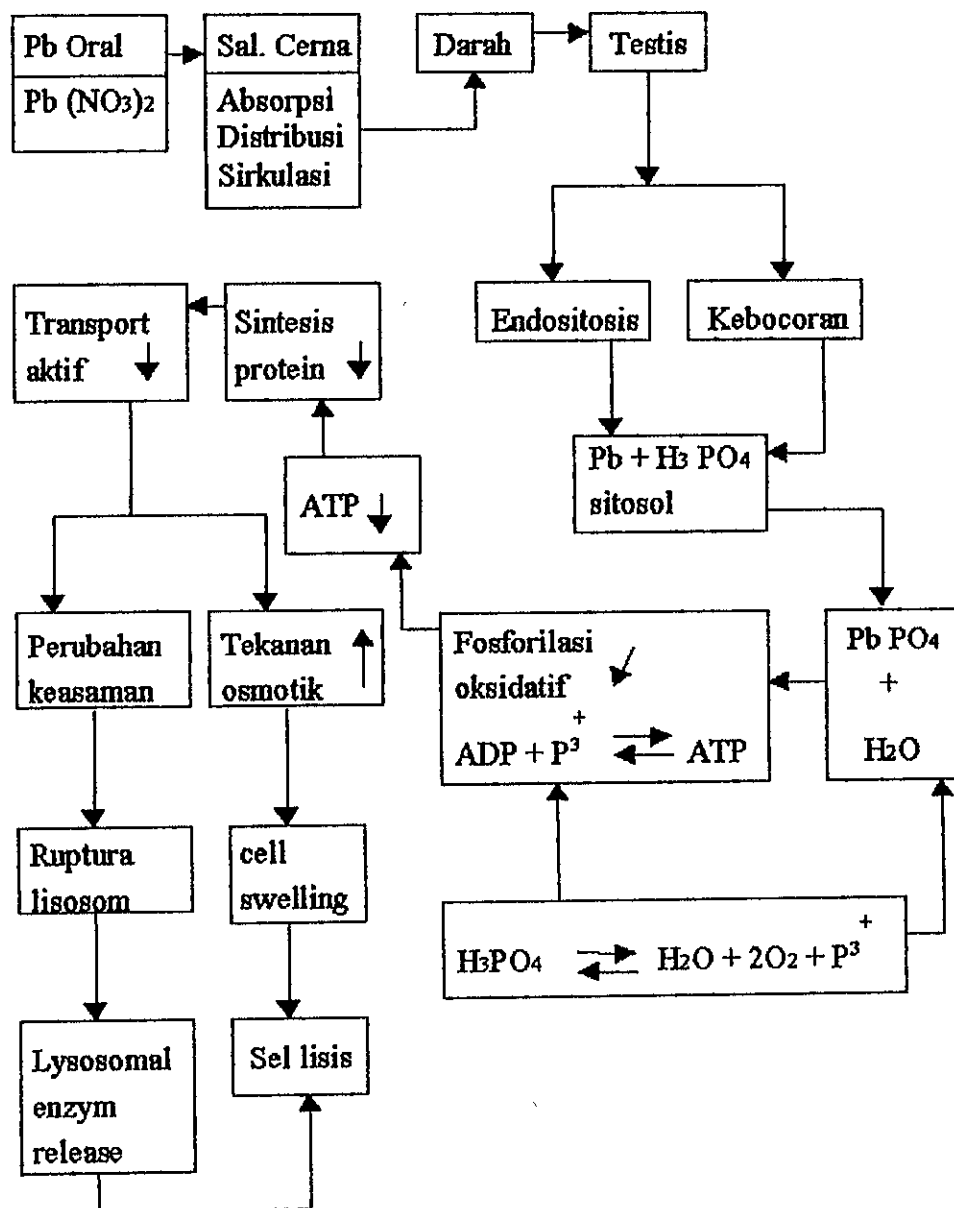
## 2.4 KERANGKA TEORI

*Pb* per oral masuk ke dalam tubuh melalui saluran pencernaan terutama pada usus halus, disini akan mengalami penyerapan (absorpsi) kemudian didistribusikan dan diedarkan lewat pembuluh darah ke berbagai organ di dalam tubuh, salah satunya adalah alat reproduksi (testis). Di dalam masing-masing

organ ini, maka *Pb* yang masuk akan berikatan dengan gugus *sulfhidril* (-SH) dan akan mengendap di dalam membran sel organ tersebut.

*Pb* yang masuk ke dalam testis akan berikatan dengan gugus -SH dan akan mengendap atau ditimbun di dalam sel leydig (25). Mekanisme selanjutnya *Pb* yang mengendap di dalam sel leydig akan mengalami endositosis dan juga terjadi kebocoran-kebocoran, sehingga *Pb* akan bereaksi dengan asam fosfat ( $H_3 PO_4$ ) di dalam sitosol, dan akan menghasilkan *Pb* fosfat dan air. *Pb* fosfat ini bersama-sama dengan asam fosfat dari jaringan akan mempengaruhi proses oksidative fosforilasi menjadi turun. Juga akan berpengaruh pada pembentukan Adenosin Trifosfat (ATP) yang berasal dari reaksi ADP dengan fosfat juga menurun. Akibat dari ATP yang menurun, maka sintesis protein juga menurun, begitu pula transport aktif menjadi menurun. Hal ini berpengaruh terjadinya perubahan keasaman yang mengakibatkan lisosom menjadi ruptur dan terjadi pelepasan enzim lisosomal. Akibat lain dari peristiwa ini adalah peningkatan tekanan osmotik, yang menyebabkan sel menjadi bengkak dan akhirnya sel akan lisis (26).

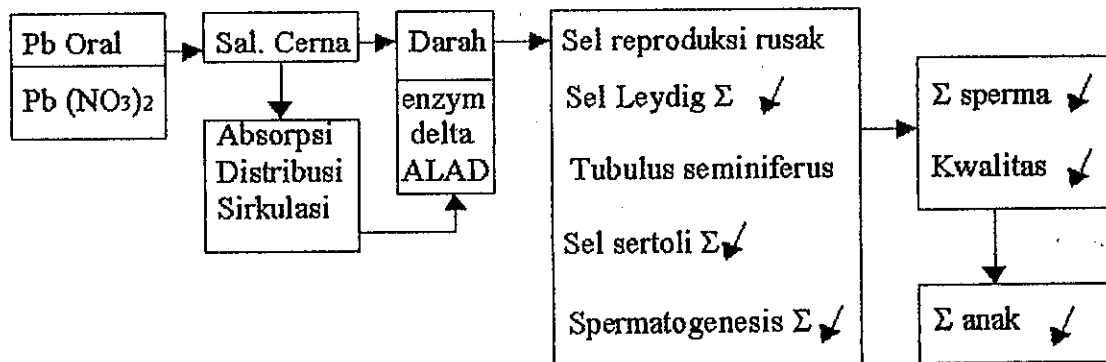
## KERANGKA TEORI



## BAB 3

# KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

### 3.1 KERANGKA KONSEPTUAL



### 3.2 ASUMSI PENELITIAN

Testis merupakan organ utama dari sistem reproduksi jantan. Testis normal memproduksi spermatozoa dan hormon reproduksi jantan. Walaupun *Pb* yang diabsorpsi tubuh hanya sedikit akan tetapi logam ini sangat berbahaya oleh karena mempunyai toksisitas atau efek racun sangat tinggi terhadap berbagai fungsi organ(6). *Pb* merupakan salah satu bahan beracun yang dapat menimbulkan beberapa efek negatif, antara lain pada janin dan fungsi reproduksi (testis)(5).

Tingginya kadar *Pb* dalam darah akan mempengaruhi aktivitas enzim delta ALAD dalam pembentukan hemoglobin pada butir-butir darah merah. Akibat terganggunya enzim ini akan terjadi penurunan jumlah sel darah merah, penurunan sintesis hemoglobin dan penghambatan sintesis heme yang dapat menyebabkan anemia (15).

Berdasarkan pada asumsi tersebut di atas, maka pemberian larutan *Pb* nitrat per oral dengan dosis tertentu pada tikus putih jantan akan berpengaruh pada metabolisme dan sintesa organ tubuh (salah satunya adalah testis), sehingga dapat menimbulkan gangguan struktur maupun fungsi organ tersebut.

### 3.3 HIPOTESIS PENELITIAN

Atas dasar kerangka konseptual dan asumsi tersebut di atas, maka hipotesis penelitian sebagai berikut :

Pemberian larutan *Pb* nitrat per oral dengan dosis 800 ppm, 400 ppm dan 0 ppm (*aquadest* / kontrol) pada tikus putih jantan akan menyebabkan :

1. Kerusakan sel reproduksi.
2. Penurunan jumlah sel leydig.
3. Necrosis sel tubulus seminiferus.
4. Penurunan jumlah sel sertoli.
5. Penurunan jumlah sel spermatogenesis.
6. Penurunan jumlah sperma.
7. Penurunan jumlah anak.

## BAB 4

### METODOLOGI PENELITIAN

#### 4.1 JENIS PENELITIAN :

Eksperimental Laboratorium dengan desain penelitian adalah "Post Test Randomized Control Group Design."

#### 4.2 BINATANG PERCOBAAN :

Binatang percobaan yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus putih jantan, umur 8 - 10 minggu galur Swiss sebanyak 39 ekor yang di peroleh dari Laboratorium Biologi Institut Teknologi Bandung. Tikus jantan ini ditempatkan didalam kandang yang dilengkapi dengan tempat makan dan minum. Makanan yang diberikan adalah makanan tikus yang dapat diperoleh dari toko makanan ternak.

#### 4.3 BESAR SAMPEL :

Perhitungan jumlah sampel berdasarkan Rumus  $(t-1)(n-1) \geq 15$ , dimana  $t =$  jumlah perlakuan dan  $n =$  jumlah sampel. Pada penelitian ini ada 3 kelompok,

$$\text{maka : } (3 - 1)(n - 1) \geq 15$$

$$2n - 2 \geq 15$$

$$n \geq 9$$

#### 4.4 BAHAN PENELITIAN

- *Pb* yang digunakan dalam bentuk *Pb* nitrat produksi Merck Jerman dengan nomor kode 1.07398, yang dibeli dari toko bahan kimia.
- *Pb* nitrat dilarutkan dalam *aquadest* dengan konsentrasi harian 800 ppm, 400 ppm dan 0 ppm (*aquadest* / kontrol).
- Bahan Kimia : Na Cl fisiologis, alkohol, xylol, parafin, *aquadest*, Papanicolaou, Kanada balsam, Boin's / Zenker solution, EBSS = *Eavl's Balance Salt Solution*.

#### 4.5 ALAT PENELITIAN

Alat-alat yang dipergunakan adalah :

- Kandang tikus jumlah 6 buah berukuran 45 x 30 x 15 cm<sup>3</sup> yang dibuat dari bak plastik dan kawat ram dengan ukuran lobang 0,6 Cm untuk 30 ekor.
- Timbangan miligram Mettler untuk menimbang *Pb* nitrat.
- Gunting bedah, pisau mikrotom, pinset anatomi, skalpel, bak lilin, parafin blok, spuit 1 ml, slang sonde, kaca obyek, deck glass, mikroskop cahaya, "eyepiece mikrometer", alat fotografi dan film, gelas ukur, kamar hitung *Improve Neubauer*, pipet leukosit, slang penyedot, klem *mousquito*.
- Alat-alat untuk pemeriksaan AAS :
  - Timbangan Mettler, gelas ukur, gelas kimia, tabung reaksi, mortir + alu.
  - Alat pemanas dalam kamar asap.
  - Alat *spectrophotometer*.

## 4.6 CARA PENELITIAN

Tikus putih jantan galur Swiss dikelompokkan secara acak menjadi 3 kelompok masing-masing kelompok terdiri atas 13 ekor.

Kelompok I : diberi larutan *Pb* nitrat 800 ppm.

Kelompok II : diberi larutan *Pb* nitrat 400 ppm.

Kelompok III : diberi larutan *Pb* nitrat 0 ppm (*aquadest* / kontrol).

Masing-masing larutan diberikan dengan cara sonde sebanyak 0,5 ml dengan memakai spuit 1 ml selama penelitian 10 minggu.

## 4.7 WAKTU DAN TEMPAT PENELITIAN

- Waktu pelaksanaan penelitian selama : 10 minggu.
- Tempat penelitian dilakukan di laboratorium Histologi dan Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran UNDIP.

## 4.8 VARIABEL PENELITIAN

- Variabel bebas (*Independent variable*) : larutan *Pb*-nitrat dengan konsentrasi 800 ppm, 400 ppm dan 0 ppm (*aquadest* / kontrol).
- Variabel terpapar kerusakan sel reproduksi ( sel leydig, tubulus seminiferus, sel sertoli, sel spermatogenesis ).
- Variabel kontrol : jenis tikus, umur, perlakuan dan sanitasi kandang.

#### 4.9 METODE PENELITIAN

Binatang percobaan terdiri atas 30 ekor tikus putih jantan yang dipilih secara acak dan dibagi dalam 3 kelompok. Masing-masing kelompok ditambah 3 ekor tikus untuk pemeriksaan AAS dan diberi perlakuan sendiri-sendiri setiap hari dengan pemberian Pb nitrat 800 ppm, 400 ppm dan 0 ppm sesuai dengan cara kerja dan waktu penelitian.

Pada akhir percobaan yaitu  $\pm$  minggu ke 10 tikus jantan didekapitasi untuk diambil testis dan spermanya. Sebelum dilakukan dekapitasi dan pengambilan testis, tikus jantan dikawinkan terlebih dahulu dengan tikus betina *fertil* untuk mengetahui jumlah anak sekelahiran. Pengambilan sperma dengan cara memotong *duktus defferen* mulai dari *ampula duktus defferen* sepanjang 2 cm, diukur dengan *calipet* kemudian diurut dengan *mousquito clamp* sebanyak 3x dan diletakkan pada kaca obyèk cekung yang telah ditetesi 1 tetes larutan EBSS, kemudian dihisap dengan pipet leukosit sampai tanda 0,5 dan diencerkan dengan larutan EBSS sampai 20x. Teteskan pada kamar hitung *Improve Neubauer* (kotak leukosit) (*n*) dibawah mikroskop dan dihitung jumlah sperma.

Testis diambil, dicuci dengan Na Cl fisiologis, kemudian dimasukkan ke dalam Bouin's solution (28) dan dibuat sediaan histopatologi dengan pewarnaan Papanicolaou. Pemotongan jaringan testis dengan pisau mikrotom setebal  $\pm$  5 mikron secara *obliq*. Untuk keperluan pembuatan preparat diambil pada tiap-tiap pemotongan yang ke 12 sesuai dengan prosedur yang berlaku umum, kemudian dilihat perubahan yang terjadi pada sel leydig, tubulus seminiferus, sel sertoli dan sel-sel spermatogenesis dengan mikroskop cahaya pembesaran 400x.

Untuk mengetahui secara pasti terdapatnya Pb di dalam testis binatang coba dilakukan pemeriksaan dengan metoda AAS (*Atomic Absorption Spectrophotometer*) (29).

Prosedur AAS : testis binatang percobaan yang diduga telah terpapar Pb dimaserasi (dihancurkan) sampai halus, kemudian diencerkan 10x *aquadest*.

- + 2 ml larutan buffer acetat      → digojog,
- + 2 ml larutan APDC 10%      → digojog,
- + 25 ml ± larutan MIBK      → digojog 1 menit,
- dipisahkan, diambil larutan organiknya,
- didestruksi dengan HClO<sub>3</sub> 1 ml      → digojog 2 menit
- + *aquadest* 9 ml
- kemudian diperiksa dengan alat *spectrophotometer*.

Pada pembacaan hasil : apabila didapatkan Pb pada pemeriksaan, maka dapat dipastikan telah terjadi penimbunan Pb di dalam testis binatang percobaan (hasil positif).

#### 4.9.1 Kerusakan sel reproduksi :

Untuk menilai kerusakan sel reproduksi ( sel leydig, tubulus seminiferus, sel sertoli, sel-sel spermatogenesis ) menggunakan kriteria Johnsen (30, 31) yang berdasarkan perhitungan kuantitas dengan penilaian 1 sampai dengan 10, yaitu :

Nilai 10 : Kriteria spermatogenesis lengkap dan teratur dengan spermatozoa lebih dari sepuluh dan epitel tubulus seminiferus normal, lumen tubulus seminiferus terbuka .

- Nilai 9 : Spermatozoa lebih dari sepuluh, tetapi epitel tubulus seminiferus tidak teratur, tampak bagian epitel tubulus seminiferus yang lepas (sloughing), lumen tubulus seminiferus tertutup.
- Nilai 8 : Jumlah spermatozoa dalam tubulus seminiferus, kurang dari sepuluh.
- Nilai 7 : Tidak tampak spermatozoa dalam tubulus seminiferus, tetapi jumlah spermatid lebih dari sepuluh.
- Nilai 6 : Tidak terdapat spermatozoa, dan jumlah spermatid dalam tubulus seminiferus kurang dari sepuluh.
- Nilai 5 : Tidak terdapat spermatozoa dan spermatid dalam tubulus seminiferus, tetapi jumlah spermatosit lebih dari lima.
- Nilai 4 : Tidak ada spermatozoa dalam tubulus seminiferus dan jumlah spermatosit kurang dari lima.
- Nilai 3 : Sel kelamin dalam tubulus hanya terdiri atas spermatogonia.
- Nilai 2 : Dalam tubulus seminiferus tidak terdapat sel reproduksi, hanya sel sertoli.
- Nilai 1 : Dalam tubulus seminiferus tidak terdapat sel sama sekali.

#### 4.9.2 Penilaian jumlah sel leydig

Penilaian jumlah sel leydig pada potongan jaringan testis tikus putih secara histopatologi dengan pemberian Pb nitrat 800 ppm, 400 ppm dan kelompok kontrol selama perlakuan 10 minggu dilakukan dengan cara menghitung 10 tubulus seminiferus per lapang pandang untuk testis kanan maupun testis kiri. Sel leydig yang terletak diantara tubulus seminiferus dihitung satu persatu,

sehingga didapatkan perbedaan hasil antara kelompok I dengan kelompok II dan kelompok kontrol, dan kelompok II dengan kelompok kontrol.

#### **4.9.3 Penilaian nekrosis tubulus seminiferus**

Penilaian nekrosis tubulus seminiferus jaringan testis kanan dan kiri secara histopatologi pada pemberian *Pb* nitrat 800 ppm, 400 ppm dan kelompok kontrol selama perlakuan 10 minggu dilakukan dengan menghitung 10 tubulus yang masih intak (tidak mengalami nekrosis) per lapang pandang, maka akan didapat perbedaan hasil rata-rata antara kelompok I dengan kelompok II dan kelompok kontrol maupun kelompok II dan kelompok kontrol.

#### **4.9.4 Penilaian jumlah sel sertoli**

Penilaian jumlah sel sertoli pada potongan jaringan testis tikus putih yang diberi *Pb* nitrat 800 ppm, 400 ppm dan kelompok kontrol selama perlakuan 10 minggu dengan menghitung 10 tubulus per lapang pandang baik untuk testis kanan maupun testis kiri. Sel sertoli yang terletak di dalam tubulus seminiferus dihitung seluruhnya, sehingga didapatkan perbedaan jumlah antara kelompok I dengan kelompok II dan kelompok kontrol maupun kelompok II dengan kelompok kontrol.

#### **4.9.5 Penilaian jumlah sel spermatogenesis**

Penilaian jumlah sel spermatogenesis dilakukan dengan cara menghitung sel spermatogenesis pada tubulus seminiferus per lapang pandang, maka akan didapatkan

perbedaan jumlah rata-rata pemberian *Pb* nitrat 800 ppm dengan 400 ppm dan kelompok kontrol, maupun pada pemberian *Pb* nitrat 400 ppm dengan kelompok kontrol baik testis kanan dan testis kiri.

#### 4.9.6 Penilaian jumlah sperma

Penilaian jumlah sperma dilakukan dengan menghitung sperma secara langsung dari *duktus deferens*. Pengambilan sperma dilakukan dengan cara memotong *duktus deferens* mulai dari *ampula duktus deferens* sepanjang 2 cm, diukur dengan *calipet* kemudian diurut dengan *mousquito clamp* sebanyak 3x letakkan pada kaca obyek cekung yang telah ditetesi 1 tetes larutan EBSS. Cairan kemudian dihisap dengan pipet leukosit sampai tanda 0.5 dan diencerkan dengan larutan EBSS sampai angka 11 (pengenceran 20x). Teteskan pada kamar hitung *Improve Neubauer* (kotak leukosit) dibawah mikroskop dan dihitung jumlah sperma yang tidak bergerak. Sisanya dipanaskan pada suhu sekitar 40°C selama 10 menit sehingga semua sperma menjadi tidak bergerak, didapatkan jumlah sperma total. Untuk mengetahui jumlah sperma yang bergerak diperoleh dari penghitungan jumlah sperma total dikurangi jumlah sperma yang tidak bergerak. Maka akan didapatkan jumlah sperma total, jumlah sperma bergerak dan jumlah sperma tidak bergerak. Perbedaan jumlah sperma antara kelompok I, kelompok II dan kelompok kontrol yang diberi perlakuan *Pb* nitrat dianalisis dengan *one way Anova*.

#### 4.9.7 Penilaian jumlah anak sekelahiran

Penilaian jumlah anak sekelahiran dilakukan dengan cara mengawinkan tikus putih jantan yang telah diberi perlakuan *Pb* nitrat selama 10 minggu dengan tikus betina *fertil*. Setelah dipastikan sudah terjadi kehamilan ditunggu sampai melahirkan sekitar 28 hari, maka akan didapatkan perbedaan jumlah anak sekelahiran antara kelompok I yang diberi perlakuan *Pb* nitrat 800 ppm dengan kelompok II dan kelompok kontrol, maupun perbedaan antara kelompok II yang diberi perlakuan *Pb* nitrat 400 ppm dengan kelompok kontrol.

#### 4.10 PRINSIP DASAR PENELITIAN

Pemberian larutan *Pb* nitrat, 800 ppm, 400 ppm, dan 0 ppm (*aquadest* / kontrol) pada tikus putih jantan yang berumur 8 minggu sampai umur 10 minggu dengan pertimbangan proses spermatogenesis berlangsung kurang lebih 50 hari - 58 hari. Pemberian dilakukan per *oral* yaitu melalui kerongkongan dengan menggunakan *sonde* memakai semprit 1 ml sebanyak 0,5 ml *Pb* nitrat. Diberikan setiap pagi hari sesuai dengan konsentrasi harian masing-masing selama 10 minggu. Hal ini dilakukan dengan pertimbangan untuk menghindari atau memperkecil adanya penyimpangan perlakuan.

#### 4.11 ANALISIS DATA PENELITIAN

Analisis perbedaan jumlah sperma akibat pemberian *Pb* dan penurunan jumlah anak langsung dihitung. Sedangkan data kerusakan sel *leydig*, tubulus seminiferus, sel *sertoli*, sel spermatogenesis dilakukan pengujian secara *One way*

*Anova (analysis of variance)*, perbedaan rata-rata antar kelompok menggunakan *Lavene Significant Different (LSD)* test dengan batas kemaknaan 0.05 (32, 33, 34).

Data yang diperoleh dari penelitian ini adalah data interval dan rasio.

Analisis beda :

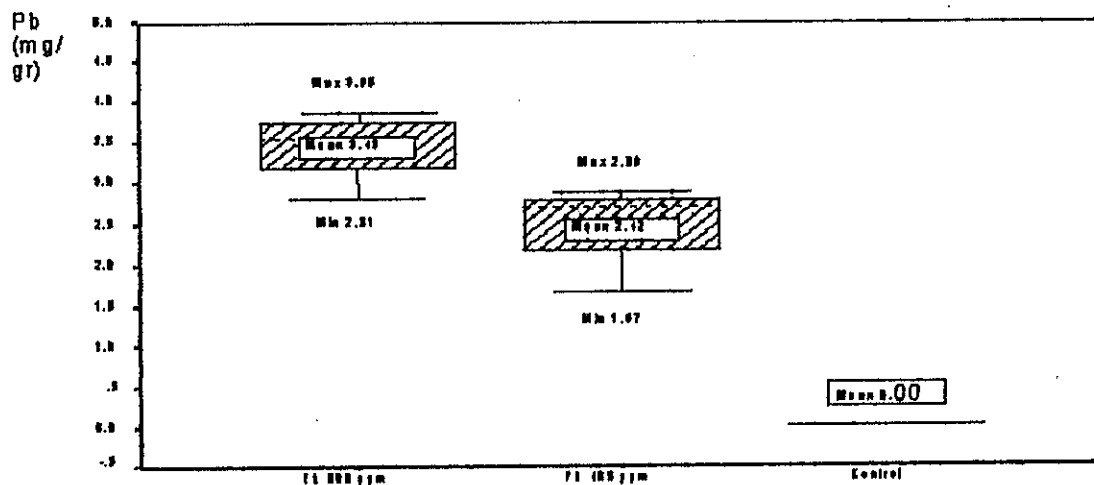
- Kerusakan sel reproduksi dihitung dengan skor Johnsen sehingga diperoleh data interval.
- Kerusakan pada sel leydig, tubulus seminiferus, sel sertoli dan sel spermatogenesis, yang dilihat secara histopatologi (35) akan diperoleh data rasio, perubahan ini dianalisis dengan Anova satu arah.
- Penurunan jumlah sperma dan jumlah anak sekelahiran langsung dihitung.

## BAB 5

### HASIL DAN ANALISIS

#### HASIL PENELITIAN

Tiga puluh sembilan tikus putih jantan, umur antara 8 mg sampai 10 mg, galur Swiss, terpilih sebagai sampel penelitian. Secara acak dibagi menjadi tiga kelompok, kelompok I terdiri 13 ekor tikus diberi paparan yang mengandung *Pb* nitrat 800 ppm, kelompok II terdiri 13 ekor tikus diberi paparan *Pb* nitrat 400 ppm, dan 13 ekor tikus pada kelompok III sebagai kontrol. Pada minggu ke 10 tiap-tiap kelompok secara acak dipilih 3 ekor tikus untuk diperiksa konsentrasi *Pb* di jaringan testis dengan metode AAS. Konsentrasi *Pb* di jaringan tersebut dapat dilihat pada gambar 1.



Gambar 1. Rata-rata konsentrasi *Pb* pada jaringan testis tikus putih yang diberi *Pb* nitrat.

## 5.1 PEMERIKSAAN AAS

Kadar rata-rata *Pb* pada jaringan testis tikus kelompok I (*Pb* 800 ppm) adalah  $3.43 \pm 0.58$  mg/gram testis, dengan konsentrasi terendah 2.81 mg/gram testis dan konsentrasi tertinggi 3.95 mg/gram testis. Konsentrasi rata-rata tersebut lebih tinggi secara bermakna dibanding konsentrasi *Pb* di jaringan testis pada kelompok II (*Pb* 400 ppm) dan kelompok kontrol. Konsentrasi rata-rata *Pb* di jaringan testis tikus kelompok II adalah  $2.42 \pm 0.66$  mg/gram testis dengan konsentrasi terendah 1.67 mg/gram testis dan konsentrasi tertinggi 2.90 mg/gram testis. Konsentrasi rata-rata tersebut juga lebih tinggi secara bermakna dibanding pada kelompok kontrol. Pada kelompok kontrol konsentrasi *Pb* pada jaringan testis relatif tidak terdapat. Dari gambaran tersebut diatas menunjukkan bahwa tikus yang diberi perlakuan *Pb* nitrat konsentrasi tinggi maka konsentrasi *Pb* pada jaringan testis juga meninggi, sedangkan bila tidak terpapar *Pb* nitrat, konsentrasi *Pb* pada jaringan testis relatif tidak terdapat.

## 5.2 PEMERIKSAAN POTONGAN JARINGAN TESTIS

Kerusakan jaringan testis dianalisis pada 10 tubulus per lapang pandang, kemudian dihitung nilai rata-rata.

Tabel 1. Rata-rata kerusakan jaringan testis kanan dan kiri tikus putih yang diberi *Pb* nitrat (skor Johnsen).

Kelompok	Skor Johnsen							
	Testis kanan				Testis kiri			
	Mean	SD	Min	Max	Mean	SD	Min	Max
I. <i>Pb</i> 800 ppm	6.25	0.76	5.00	7.20	6.13	0.71	5.00	7.00
II. <i>Pb</i> 400 ppm	8.60	0.37	8.10	9.00	8.59	0.33	8.10	9.00
III. Kontrol	9.80	0.42	9.00	10.00	9.70	0.48	9.00	10.00
F Anova	109.7103				118.4346			
Significance (p)	0.000				0.000			

Rata-rata kerusakan jaringan testis yang tercemar *Pb* baik jaringan testis kanan maupun kiri pada kelompok I terdapat perbedaan secara bermakna ( $p < 0.05$ ) dibanding kelompok II dan III. Begitu pula rata-rata skor Johnsen pada kelompok II juga terdapat perbedaan secara bermakna dibanding kelompok kontrol. Kelompok I yang terdiri tikus putih yang diberi *Pb* nitrat 800 ppm, rata-rata skor Johnsen baik testis kanan maupun kiri dibawah nilai 7, hal ini menunjukkan bahwa didalam tubulus seminiferus tidak ditemui spermatozoa. Sedangkan pada kelompok II, tikus putih yang diberi *Pb* nitrat 400 ppm rata-rata skor Johnsen baik testis kanan maupun kiri nilainya sekitar 8, yang berarti menunjukkan bahwa spermatozoa yang ditemukan di dalam tubulus seminiferus sedikit.

### 5.3 JUMLAH SEL LEYDIG

Tabel 2. Rata-rata jumlah sel Leydig jaringan testis kanan dan kiri tikus putih yang diberi *Pb* nitrat (10 tubulus per lapang pandang).

Kelompok	Jumlah sel leydig							
	Testis kanan				Testis kiri			
	Mean	SD	Min	Max	Mean	SD	Min	Max
I. <i>Pb</i> 800 ppm	881.0	40.6	812	931	886.0	36.5	826	964
II. <i>Pb</i> 400 ppm	1080.0	35.5	1016	1112	1058.0	40.9	1001	1107
III. Kontrol	1195.0	34.8	1140	1242	1190.0	29.3	1118	1224
F Anova	183.4346				180.2689			
Significance (p)	0.000				0.000			

Rata-rata jumlah sel Leydig baik jaringan testis kanan maupun kiri pada kelompok I lebih rendah secara bermakna ( $p < 0.05$ ) dibanding kelompok II dan III. Begitu pula rata-rata jumlah sel Leydig pada kelompok II, juga lebih rendah secara bermakna dibanding kelompok kontrol. Kelompok I yang diberi *Pb* nitrat 800 ppm, rata-rata jumlah sel Leydig baik testis kanan maupun kiri hanya berkisar 74% - 75% dari jumlah kelompok kontrol, hal ini menunjukkan bahwa adanya cemaran *Pb* sebesar 800 ppm dapat menurunkan sel-sel Leydig hingga 25%. Sedangkan pada kelompok II, tikus putih yang diberi *Pb* nitrat 400 ppm rata-rata jumlah sel Leydig baik testis kanan maupun kiri kurang lebih 90% dari jumlah kelompok kontrol, yang

berarti menunjukkan sekitar 10% sel Leydig akan turun jumlahnya bila tikus putih mengkonsumsi *Pb* nitrat sebanyak 400 ppm.

#### 5.4 NEKROSIS TUBULUS SEMINIFERUS

Evaluasi jumlah tubulus seminiferus yang mengalami nekrosis dilakukan dengan menghitung jumlah tubulus yang masih intak (tidak mengalami nekrosis).

Tabel 3. Rata-rata jumlah tubulus seminiferus yang intak pada jaringan testis kanan dan kiri tikus putih yang diberi *Pb* nitrat (10 tubulus per lapang pandang).

Kelompok	Jumlah tubulus seminiferus yang intak							
	Testis kanan				Testis kiri			
	Mean	SD	Min	Max	Mean	SD	Min	Max
I. <i>Pb</i> 800 ppm	7.70	0.82	7.00	9.00	7.90	0.74	7.00	9.00
II. <i>Pb</i> 400 ppm	9.70	0.48	9.00	10.00	9.80	0.42	9.00	10.00
III. Kontrol	10.00	0.00	10.00	10.00	10.00	0.00	10.00	10.00
F Anova	51.4756				55.8000			
Significance (p)	0.000				0.000			

Tabel 3 menunjukkan bahwa pada kelompok kontrol sama sekali tidak terjadi nekrosis tubulus seminiferus. Rata-rata jumlah tubulus seminiferus jaringan testis kanan maupun kiri yang intak pada kelompok I berbeda secara bermakna ( $p < 0.05$ ) dibanding kelompok II dan III. Begitu pula rata-rata jumlah tubulus seminiferus yang intak pada kelompok II, juga berbeda secara bermakna dibanding kelompok kontrol. Kelompok I yang diberi *Pb* nitrat 800 ppm, rata-rata jumlah tubulus seminiferus yang intak pada testis kanan maupun kiri berkisar 70% - 79% dibanding jumlah kelompok kontrol. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian *Pb* sebesar 800 ppm dapat menyebabkan nekrosis tubulus seminiferus hingga 30%.

Sedangkan pada kelompok II, tikus putih yang diberi *Pb* nitrat 400 ppm rata-rata jumlah tubulus seminiferus baik testis kanan maupun kiri kurang lebih 90% - 98% dari jumlah kelompok kontrol, yang berarti menunjukkan sekitar 10% sel tubulus seminiferus akan nekrosis bila tikus putih mengkonsumsi *Pb* nitrat sebanyak 400 ppm.

## 5.5 JUMLAH SEL SERTOLI

Tabel 4. Rata-rata jumlah sel sertoli jaringan testis kanan dan kiri tikus putih yang diberi *Pb* nitrat (10 tubulus per lapang pandang).

Kelompok	Jumlah sel sertoli							
	Testis kanan				Testis kiri			
	Mean	SD	Min	Max	Mean	SD	Min	Max
I. <i>Pb</i> 800 ppm	202.0	8.10	193	217	204.8	7.61	193	217
II. <i>Pb</i> 400 ppm	216.4	7.92	204	226	218.8	7.11	206	225
III. Kontrol	227.9	3.48	223	233	226.8	3.67	222	232
F Anova	35.9922				30.4696			
Significance (p)	0.000				0.000			

Pemberian *Pb* nitrat nampaknya akan menurunkan jumlah sel sertoli pada testis tikus putih. Pada tabel 4 diatas, kelompok tikus yang diberi *Pb* nitrat 800 ppm, rata-rata jumlah sel sertoli baik pada testis kanan maupun testis kiri lebih rendah secara bermakna ( $p < 0.05$ ) dibanding kelompok tikus yang diberi *Pb* nitrat 400 ppm dan kelompok kontrol. Tikus

kelompok kontrol yang tidak diberi *Pb* nitrat, jumlah sel sertoli pada testis kanan maupun kiri sekitar 222 - 232. Dengan demikian pada tikus kelompok I yang diberi *Pb* nitrat 800 ppm, jumlah sel sertolinya rata-rata lebih rendah 13.1% dari kelompok kontrol, sedang pada kelompok tikus yang diberi *Pb* nitrat 400 ppm, jumlah sel sertolinya rata-rata lebih rendah 8% dibanding kelompok kontrol. Disimpulkan bahwa pemberian *Pb* nitrat dengan konsentrasi yang lebih tinggi, jumlah sel sertolinya akan berkurang lebih banyak bila dibanding dengan konsentrasi *Pb* nitrat yang lebih rendah.

## 5.6 JUMLAH SEL SPERMATOGENESIS

Tabel 5. Rata-rata jumlah sel spermatogenesis jaringan testis kanan dan kiri tikus putih yang diberi *Pb* nitrat (10 tubulus per lapang pandang).

Kelompok	Jumlah sel spermatogenesis							
	Testis kanan				Testis kiri			
	Mean	SD	Min	Max	Mean	SD	Min	Max
I. <i>Pb</i> 800 ppm	2024.4	80.5	1939	2176	2051.2	77.9	1931	2165
II. <i>Pb</i> 400 ppm	2337.0	181.7	2062	2479	2365.0	167.7	2038	2486
III. Kontrol	2481.0	30.3	2435	2523	2468.0	29.1	2426	2512
F Anova	40.4628				39.5827			
Significance (p)	0.000				0.000			

Rata-rata jumlah sel spermatogenesis di jaringan testis kanan maupun kiri pada kelompok I lebih rendah secara bermakna ( $p < 0.05$ ) dibanding

kelompok II dan III. Begitu pula rata-rata jumlah sel spermatogenesis pada kelompok II, juga lebih rendah secara bermakna dibanding kelompok kontrol. Kelompok I yang diberi *Pb* nitrat 800 ppm, rata-rata jumlah sel spermatogenesis di jaringan testis baik kanan maupun kiri sekitar 2000, atau hanya berkisar 81% - 83% dari jumlah kelompok kontrol, hal ini menunjukkan bahwa adanya cemaran *Pb* sebesar 800 ppm dapat menyebabkan jumlah sel spermatogenesis berkurang hingga 19% - 17%. Sedangkan pada kelompok II, tikus putih yang diberi *Pb* nitrat 400 ppm rata-rata jumlah sperma baik testis kanan maupun kiri kurang lebih 94% - 96% dari jumlah kelompok kontrol, yang berarti menunjukkan bahwa sel spermatogenesis akan berkurang sekitar 4% - 6%.

## 5.7 JUMLAH SPERMA

Tabel 6. Rata-rata jumlah sperma total dan bergerak pada tikus putih yang diberi *Pb* nitrat

Kelompok	Jumlah sperma							
	Total				Bergerak			
	Mean	SD	Min	Max	Mean	SD	Min	Max
I. <i>Pb</i> 800 ppm	44806	376.2	44080	45420	33606	283.4	33060	34110
II. <i>Pb</i> 400 ppm	46264	345.7	45720	46680	34707	253.2	34290	35010
III. Kontrol	60705	680.7	59850	61750	60705	680.7	59850	61750
F Anova	3202.6958				2907.5886			
Significance (p)	0.000				0.000			

Berbeda dengan tabel 5 sebelumnya, pada tabel 6 diatas memperlihatkan jumlah sperma yang diproduksi baik dari testis kanan maupun kiri dan jumlah total maupun yang bergerak. Rata-rata jumlah sperma tikus kelompok kontrol adalah  $60705 \pm 680.7$  buah sperma, dari jumlah tersebut semua sperma tampak bergerak. Pada kelompok tikus putih yang diberi *Pb* nitrat 400 ppm (II), rata-rata jumlah sperma total adalah  $46264 \pm 345.7$  buah sperma dan jumlah sperma yang bergerak rata-ratanya adalah  $34707 \pm 253.2$  buah sperma. Perbedaan jumlah sperma total dan yang bergerak antara tikus kelompok II dan kelompok kontrol bermakna ( $p < 0.05$ ). Sedangkan kelompok tikus putih yang diberi *Pb* nitrat 800 ppm, rata-rata jumlah sperma total lebih rendah lagi yaitu sekitar  $44806 \pm 376.2$  buah sperma, perbedaan tersebut bermakna secara statistik ( $p < 0.05$ ), sedangkan rata-rata jumlah sperma yang bergerak yaitu sekitar  $33606 \pm 283.4$  buah sperma.

## 5.8 JUMLAH ANAK SEKELAHIRAN

Tabel 7. Rata-rata jumlah anak tikus dari tikus putih yang diberi *Pb* nitrat.

Kelompok	Jumlah anak			
	Mean	SD	Minimum	Maksimum
I. <i>Pb</i> 800 ppm	5.60	2.06	0.00	7.00
II. <i>Pb</i> 400 ppm	7.20	0.79	6.00	8.00
III. Kontrol	8.50	0.53	8.00	9.00
F Anova	12.2516			
Significance (p)	0.000			

Pemberian *Pb* nitrat akan menurunkan jumlah anak sekelahiran tikus putih. Pada tabel 7 diatas, kelompok tikus yang diberi *Pb* nitrat 800 ppm, rata-rata jumlah anak lebih rendah secara bermakna ( $p < 0.05$ ) dibanding kelompok tikus yang diberi *Pb* nitrat 400 ppm dan kelompok kontrol. Pada kelompok I (diberi *Pb* nitrat 800 ppm) rata-rata jumlah anak sekelahiran  $5.60 \pm 2.06$ . Pada kelompok II (diberi *Pb* nitrat 400 ppm) rata-rata jumlah anak  $7.20 \pm 0.79$ , dan pada kelompok III (kontrol) rata-rata jumlah anak  $8.50 \pm 0.53$ . Dari gambaran tersebut diatas menunjukkan bahwa tikus yang terpapar *Pb* nitrat dengan konsentrasi tinggi akan melahirkan anak lebih sedikit dibandingkan dengan tikus yang terpapar *Pb* nitrat dengan konsentrasi rendah maupun dengan tikus yang tidak terpapar *Pb* nitrat (kontrol).

Tabel 8. Rata-rata jumlah anak tikus dan kecacatan yang diberi *Pb* nitrat.

Kelompok	Jumlah anak				Kecacatan
	Mean	SD	Min.	Maks.	
I. <i>Pb</i> 800 ppm	5.60	2.06	0.00	7.00	0
II. <i>Pb</i> 400 ppm	7.20	0.79	6.00	8.00	0
III. Kontrol	8.50	0.53	8.00	9.00	0

Ternyata pada pemberian *Pb* nitrat dengan konsentrasi 800 ppm, 400 ppm dan kelompok kontrol tidak menimbulkan kecacatan pada anak tikus yang dilahirkan.

## BAB 6

### PEMBAHASAN

#### 6.1 PEMERIKSAAN AAS

Dari hasil pemeriksaan AAS pada jaringan testis tikus putih yang diberi paparan yang mengandung *Pb* nitrat 800 ppm (kelompok I), *Pb* nitrat 400 ppm (kelompok II) dan kelompok kontrol, selama perlakuan 10 minggu (Gambar 1), maka diperoleh hasil rata-rata konsentrasi *Pb* pada jaringan testis tikus putih adalah :  $3.43 \pm 0.58$  mg/gr testis;  $2.42 \pm 0.66$  mg/gr testis dan  $0.002 \pm 0.00$  mg/gr testis.

Dari gambaran tersebut diatas menunjukkan bahwa kelompok tikus yang terpapar *Pb* nitrat dengan konsentrasi tinggi, maka konsentrasi *Pb* pada jaringan testis juga meninggi bila dibandingkan dengan kelompok tikus yang terpapar *Pb* nitrat dengan konsentrasi rendah maupun kelompok tikus yang tidak terpapar *Pb* nitrat. Dengan kata lain terdapat perbedaan secara bermakna ( $p < 0.05$ ) antara kelompok I dengan kelompok II dan kelompok III.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa semua bahan yang masuk kedalam tubuh mempunyai efek samping baik positif maupun negatif yang dapat mempengaruhi fungsi organ tubuh, salah satunya adalah organ testis (sel-sel reproduksi). Logam *Pb* dalam segala bentuk bersifat racun yang berbahaya bagi kesehatan, oleh karena keracunan *Pb* dapat berpengaruh buruk

terhadap organ-organ tertentu yang masing-masing akan memberikan efek yang berbeda, sesuai dengan banyak sedikitnya paparan yang diberikan dan berat ringannya tingkat keracunan (5).

## 6.2 PEMERIKSAAN POTONGAN JARINGAN TESTIS

Dari hasil pemeriksaan potongan jaringan testis secara histopatologi dengan Skor Johnsen untuk menilai sel leydig, tubulus seminiferus, sel sertoli dan sel spermatogenesis tikus putih yang diberi paparan *Pb* nitrat 800 ppm (kelompok I), *Pb* nitrat 400 ppm (kelompok II) dan kelompok kontrol (kelompok III) selama perlakuan 10 minggu (Tabel 1), diperoleh hasil rata-rata testis kanan kelompok I adalah :  $6.25 \pm 0.76$  lebih rendah secara bermakna ( $p < 0.05$ ) dibanding kelompok II yaitu :  $8.60 \pm 0.37$ . Begitu pula terhadap kelompok III (kontrol) :  $9.80 \pm 0.42$ . Hasil serupa juga terjadi pada testis kiri, dimana terdapat perbedaan secara bermakna.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian *Pb* nitrat dengan konsentrasi sampai mencapai 800 ppm selama perlakuan 10 minggu dapat menyebabkan kerusakan pada jaringan testis tikus putih, sehingga dapat mengakibatkan tidak adanya spermatozoa didalam tubulus seminiferus, sedangkan pada paparan *Pb* nitrat 400 ppm baik pada testis kanan maupun testis kiri, spermatozoa masih ada namun jumlahnya sedikit. Pada kelompok kontrol tidak terjadi perubahan sama sekali dan jaringan testis tampak masih dalam keadaan normal (30).

### 6.3 JUMLAH SEL LEYDIG

Dari hasil penghitungan jumlah sel leydig pada potongan jaringan testis tikus putih secara histopatologi dengan pemberian *Pb* nitrat 800 ppm (kelompok I), *Pb* nitrat 400 ppm (kelompok II) dan kelompok III (kontrol) selama perlakuan 10 minggu (Tabel 2) diperoleh hasil rata-rata testis kanan kelompok I adalah :  $881.0 \pm 40.6$ ; kelompok II :  $1080.0 \pm 35.5$  dan kelompok III :  $1195.0 \pm 34.8$ , dimana kelompok I lebih sedikit secara bermakna ( $p < 0.05$ ) dibanding kelompok II dan kelompok III. Begitu pula rata-rata jumlah sel leydig pada kelompok II juga lebih sedikit secara bermakna dibanding kelompok kontrol. Hasil yang sama juga terjadi pada testis kiri.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian *Pb* nitrat dengan konsentrasi sampai 800 ppm selama perlakuan 10 minggu dapat menyebabkan penurunan jumlah sel leydig. Hasil ini sesuai dengan teori dan penelitian terdahulu yang menyatakan bahwa pengaruh suatu bahan beracun pada alat reproduksi jantan akan menyebabkan kerusakan secara langsung pada sel interstitiel, sel leydig, sel sertoli dan adenohipofise yang dapat mengakibatkan *azoospermia* dan berpengaruh pula pada penurunan jumlah sel leydig (13).

### 6.4 NEKROSIS TUBULUS SEMINIFERUS

Dari hasil penghitungan jumlah tubulus seminiferus yang nekrosis pada potongan jaringan testis tikus putih secara histopatologi dengan pemberian *Pb* nitrat 800 ppm (kelompok I), *Pb* nitrat 400 ppm (kelompok II) dan kelompok III (kontrol) selama perlakuan 10 minggu (Tabel 3) diperoleh hasil

rata-rata testis kanan kelompok I adalah :  $7.70 \pm 0.82$ ; kelompok II :  $9.70 \pm 0.48$  dan kelompok III :  $10.0 \pm 0.00$ , dimana pada kelompok I lebih sedikit secara bermakna ( $p < 0.05$ ) bila dibandingkan dengan kelompok II dan kelompok III. Begitu pula rata-rata jumlah nekrosis tubulus seminiferus pada kelompok II juga lebih sedikit secara bermakna dibanding kelompok kontrol. Hasil serupa juga terjadi pada testis kiri.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian *Pb* nitrat dengan konsentrasi sampai 800 ppm selama 10 minggu dapat menyebabkan terjadinya nekrosis tubulus seminiferus. Hal ini sesuai dengan percobaan terdahulu yang menerangkan bahwa pemberian *Pb* nitrat pada air minum dengan konsentrasi akhir sampai 0,05 gram/liter terhadap binatang percobaan mencit jantan memberikan gambaran penambahan volume jaringan interstitiel, terjadi perubahan pada epithelium germinalivum tubulus seminiferus setelah pemberian selama 2 minggu (21).

## 6.5 JUMLAH SEL SERTOLI

Dari hasil penghitungan jumlah sel sertoli pada potongan jaringan testis tikus putih secara histopatologi dengan pemberian *Pb* nitrat 800 ppm (kelompok I), *Pb* nitrat 400 ppm (kelompok II) dan kelompok III (kontrol) selama perlakuan 10 minggu (Tabel 4) diperoleh hasil angka rata-rata pada testis kanan kelompok I :  $202.0 \pm 8.10$ ; kelompok II :  $216.4 \pm 7.92$  dan kelompok III :  $227.9 \pm 3.48$ , dimana hasil dari kelompok I lebih rendah secara bermakna ( $p < 0.05$ ) dibandingkan dengan kelompok tikus yang

diberi *Pb* nitrat 400 ppm dan kelompok kontrol. Demikian pula hasil rata-rata jumlah sel sertoli pada kelompok II lebih rendah secara bermakna dibanding kelompok kontrol. Hasil serupa juga terjadi penurunan jumlah sel sertoli pada testis kiri.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian *Pb* nitrat dengan konsentrasi sampai 800 ppm selama perlakuan 10 minggu dapat mengakibatkan penurunan jumlah sel sertoli. Hasil ini juga sesuai dengan penelitian terdahulu yang menyatakan bahwa pengaruh dari suatu bahan beracun pada alat reproduksi jantan akan berpengaruh langsung pada kerusakan sel interstitiel, sel leydig, sel sertoli dan adenohipophise (13). Berdasarkan uraian diatas dapat disimpulkan bahwa pemberian *Pb* nitrat dengan konsentrasi yang lebih tinggi, maka jumlah sel sertolinya akan berkurang lebih banyak dibanding dengan konsentrasi *Pb* nitrat yang lebih rendah..

## 6.6 JUMLAH SEL SPERMATOGENESIS

Dari hasil penghitungan jumlah sel spermatogenesis pada potongan jaringan testis tikus putih secara histopatologi dengan pemberian *Pb* nitrat 800 ppm (kelompok I), *Pb* nitrat 400 ppm (kelompok II) dan kelompok III (kontrol) selama perlakuan 10 minggu (Tabel 5) diperoleh hasil angka rata-rata dari testis kanan kelompok I adalah :  $2024.4 \pm 80.5$ ; kelompok II :  $2337.0 \pm 181.7$  dan kelompok III :  $2481.0 \pm 30.3$ , dimana hasil rata-rata dari kelompok I lebih rendah secara bermakna ( $p < 0.05$ ) dibandingkan dengan kelompok II dan kelompok III. Begitu pula rata-rata jumlah sel

spermatogenesis pada kelompok II, juga lebih rendah secara bermakna dibanding kelompok kontrol. Hal yang sama juga terjadi pada testis kiri, dimana terjadi penurunan sel spermatogenesis.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian *Pb* nitrat dengan konsentrasi sampai 800 ppm selama perlakuan 10 minggu akan menyebabkan penurunan jumlah sel spermatogenesis. Menurut penelitian yang pernah dilakukan dengan pemberian *Pb* dosis tinggi pada pria akan melemahkan fungsi reproduksi, hal ini dibuktikan dengan bertambahnya frekuensi asthenospermia, hipospermia dan teratospermia, sehingga jumlah sel spermatogenesis menjadi turun (4) (11). Teori lain mengatakan bahwa pembentukan sperma dikenal dengan proses spermatogenesis yaitu suatu proses perkembangan dan pemasakan *cellulae spermatogenicae* secara berurutan menjadi spermatozoa yang sebagian besar terjadi didalam tubulus seminiferus, apabila terjadi keracunan *Pb* maka proses ini akan terganggu (12). Disamping itu ada teori yang menyatakan bahwa pengaruh dari suatu bahan beracun pada alat reproduksi jantan terutama pada tingkat spermatogenesis (spermatosit, spermatid atau spermatozoa), sehingga akan terjadi kerusakan pada sel-sel tersebut dan tidak terjadi kematangan sperma (13). Atas dasar teori dan penelitian yang pernah dilakukan tersebut, maka hasil penelitian ini sudah sesuai dengan apa yang diharapkan yaitu terjadi penurunan jumlah sel spermatogenesis.

## 6.7 JUMLAH SPERMA

Dari hasil penghitungan jumlah sperma secara mikroskopis dimana sperma diperoleh dari proses pengurutan *duktus defferen*, bukan dari potongan jaringan testis; setelah tikus putih diberi perlakuan dengan *Pb* nitrat 800 ppm (kelompok I), *Pb* nitrat 400 ppm (kelompok II) dan kelompok kontrol selama perlakuan 10 minggu (Tabel 6) maka diperoleh hasil angka rata-rata jumlah sperma total kelompok kontrol adalah :  $60705 \pm 680.7$  buah sperma, dari jumlah tersebut tidak tampak sperma yang tak bergerak. Pada kelompok tikus putih yang diberi *Pb* nitrat 400 ppm (kelompok II) rata-rata jumlah sperma total adalah :  $46264 \pm 345.7$  buah sperma. Sedangkan kelompok tikus yang diberi *Pb* nitrat 800 ppm, rata-rata jumlah sperma total lebih rendah lagi yaitu :  $44806 \pm 376.2$  buah sperma. Dari data tersebut diatas maka diperoleh perbedaan jumlah sperma total dan bergerak antara tikus putih kelompok I dengan kelompok II dan kelompok kontrol secara statistik berbeda secara bermakna ( $p < 0.05$ ) demikian pula antara kelompok II dan kontrol.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian *Pb* nitrat dengan konsentrasi sampai 800 ppm selama 10 minggu dapat menyebabkan penurunan jumlah sperma. Menurut penelitian yang pernah dilakukan menyatakan bahwa pengaruh pemberian *Pb* didalam air minum 0 ppm, 100 ppm dan 1000 ppm yang diberikan pada mencit jantan selama 7 minggu, maka akan terjadi kerusakan hepar, vesikula seminalis, duktus epididimis dan penurunan jumlah sperma binatang percobaan. Kerusakan akan terlihat

semakin jelas lagi apabila konsentrasi *Pb* pada air minum dan lamanya waktu pemberian ditingkatkan (22).

## 6.8 JUMLAH ANAK SEKELAHIRAN

Dari hasil penghitungan jumlah anak sekelahiran tikus putih jantan yang diberi paparan *Pb* nitrat 800 ppm (kelompok I), *Pb* nitrat 400 ppm (kelompok II) dan kelompok kontrol selama perlakuan 10 minggu (Tabel 7), diperoleh hasil angka rata-rata jumlah anak tikus kelompok I :  $5.60 \pm 2.06$  ekor, kelompok II :  $7.20 \pm 0.79$  ekor dan kelompok kontrol :  $8.50 \pm 0.53$  ekor; dimana hasil rata-rata dari kelompok I lebih rendah secara bermakna ( $p < 0.05$ ) dibanding dengan kelompok tikus yang diberi paparan *Pb* nitrat 400 ppm dan kelompok kontrol.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian *Pb* nitrat dengan konsentrasi sampai 800 ppm selama perlakuan 10 minggu dapat menyebabkan penurunan jumlah anak sekelahiran. Menurut penelitian terdahulu yang melakukan penelitian dengan kelinci sebagai binatang percobaan dan merupakan penelitian pertama yang memberikan efek paternal keracunan *Pb*, diperoleh hasil banyaknya anak sekelahiran dari kelinci jantan yang diberi perlakuan *Pb* dengan konsentrasi tinggi, akan lebih sedikit jumlahnya dibandingkan dengan kelompok yang diberi *Pb* dengan konsentrasi rendah maupun kelompok yang tidak terpapar *Pb* (24).

Berdasarkan hasil penelitian diatas maka dapat disimpulkan bahwa pemberian *Pb* nitrat dengan konsentrasi tinggi, akan diperoleh jumlah anak

tikus lebih sedikit dibandingkan dengan pemberian *Pb* nitrat dengan konsentrasi lebih rendah.

## 6.9 Pembahasan Umum

Hasil akhir daripada penelitian ini menyatakan bahwa pemberian *Pb* nitrat pada tikus putih jantan dengan konsentrasi sampai 800 ppm selama perlakuan 10 minggu memberikan hasil yang bermakna / berbeda nyata terhadap kerusakan sel-sel reproduksi, hal ini dapat dilihat dengan terjadinya penurunan jumlah sel leydig, nekrosis tubulus seminiferus, penurunan jumlah sel sertoli, penurunan jumlah sel spermatogenesis, penurunan jumlah sperma dan penurunan jumlah anak sekelahiran. Sedangkan perbedaan hasil yang diperoleh dari penelitian-penelitian terdahulu kemungkinan disebabkan oleh jenis *Pb* yang diberikan berbeda, baik dosis yang diberikan, cara pemberian, jangka waktu pemberian dan jenis binatang percobaan.

Dari hasil data yang diperoleh pada penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian *Pb* nitrat dengan berbagai konsentrasi dan dalam jangka waktu tertentu menyebabkan terjadinya kerusakan sel-sel reproduksi dan penurunan jumlah anak sekelahiran dari tikus betina fertil yang dikawinkan dengan tikus jantan yang telah diberi perlakuan *Pb* nitrat. Pengaruh *Pb* terhadap kerusakan sel-sel reproduksi ini disebabkan oleh karena terjadi proses reaksi didalam tubuh yang dapat mempengaruhi proses metabolisme tubuh (sesuai dengan kerangka teori), sedangkan pengaruh negatif dari *Pb* terhadap berbagai macam organ tubuh lainnya telah banyak diteliti oleh para peneliti terdahulu.

## BAB 7

### SIMPULAN DAN SARAN

#### 7.1 SIMPULAN

Berdasarkan dari hasil penelitian dan pembahasan ternyata bahwa pemberian *Pb* nitrat dengan konsentrasi sampai 800 ppm pada tikus putih jantan selama perlakuan 10 minggu terdapat perbedaan secara bermakna terhadap kerusakan sel-sel reproduksi dan penurunan jumlah anak sekelahiran bila dibandingkan dengan pemberian *Pb* nitrat 400 ppm dan 0 ppm (*aquadest* / kontrol).

Pada pemberian *Pb* nitrat dengan konsentrasi 400 ppm pada tikus putih jantan selama perlakuan 10 minggu juga terdapat perbedaan nyata terhadap kerusakan sel-sel reproduksi dan penurunan jumlah anak sekelahiran bila dibandingkan dengan kontrol, sedangkan pemberian *Pb* nitrat dengan konsentrasi 0 ppm (*aquadest* / kontrol) sama sekali tidak berpengaruh terhadap kerusakan sel-sel reproduksi dan penurunan jumlah anak tikus putih jantan selama perlakuan 10 minggu.

#### 7.2 SARAN

Kerusakan sel-sel reproduksi dan penurunan jumlah anak tikus putih jantan sudah tampak kelihatan secara nyata pada pemberian *Pb* nitrat

dengan konsentrasi sampai 800 ppm, maka sebaiknya apabila akan melakukan penelitian lebih lanjut dipergunakan konsentrasi minimal diatas 800 ppm.

Kerusakan sel-sel reproduksi dan penurunan jumlah anak tikus putih jantan disini masih perlu diteliti lebih lanjut apakah bersifat sementara atau menetap, bila bersifat sementara maka perlu diperhitungkan jangka waktu untuk kembali menjadi normal.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Darmono. Beberapa senyawa logam berat dan hubungannya dengan keracunan pada ternak, Wartazoa, Vol. 1, Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan Bogor, 1983.
2. Adiwisastro A. Keracunan, sumber, bahaya, serta penanggulangannya, Penerbit Angkasa, Bandung, 1987.
3. Djuangsih. Aspek toksikologi lingkungan, Kursus analisis dampak lingkungan, Lembaga Ekologi UNPAD, Bandung, 1992.
4. WHO. Inorganic Lead, Environmental Health Criteria 165, World Health Organization, Geneva, pp. 33 - 129, 1995.
5. Loomis TA. Essential of toxicologi, Henri Kimpton Publisher, London, pp. 225 - 256, 1978.
6. Palar H. Pencemaran dan toxicologi logam berat, PT. Rineka Cipta, Jakarta, 1994.
7. Fergusson JE. The heavy elements chemistry environmental impact and health effect, Pergamon Press, 1991.
8. Kendall RJ. Toxic substances in the environment, 2<sup>nd</sup> Edition, Kendall / Hunt Publishing Company, Dubuque, Iowa, 1983.
9. Barltrop D. Transfer of lead to the human fetus, Philadelphia, Davis Co. Inc., pp. 135 - 151, 1969.

10. Goyer RA, Krall K. Ultrastructural transformation in mitochondria isolated from kidneys of normal and lead intoxicated rats, *J. Cell. Biol.*, 41 : 393 - 400, 1969.
11. WHO. Lead environmental aspect, *Environmental Health Criteria 85*, World Health Organization, Geneva, pp. 14 - 79, 1989.
12. Franchimont P. Inhibin and gonadal parahormones possible contraceptive agents, dalam Gelar I. Zatuchni, Alfredo Goldsmith, John J. Sciarra (eds) : *Male contraception advances and future prospects*, pp : 408 - 416, Northwestern University Illinois, 1986.
13. Caserett LJ, Doull J. *Toxicology : The basic science of poisons*, 2<sup>nd</sup> edition, New York, Mac Millan Publishing Co. Inc., pp. 332 - 354, 1980.
14. Bardin CW. The neuro endocrinology of male reproduction, *Hosp. Pract.*, 14 : 65 - 75, 1979.
15. Soedigdo. *Permasalahan kimia masa kini*, SPS Dept., Kimia ITB Bandung, 1981.
16. Waldbott GL. *Health effect of environmental pollutants* edition, Saint Louis, The CV. Mosby Company, 1978.
17. Carl AB, Edward RA. *Tietz Fundamental of Clinical Chemistry*, Fourth Edition, Saunders Company, Philadelphia, pp. 451 - 452, 1996.
18. Darmawan, Hoffbrand, Pettit. *Essential Hematology*, Five Edition, Jakarta, EGC, pp. 9, 43, 1992.
19. Hammond PB. The Effects of chelating agents on the tissue distribution and excretion of lead, *Toxicol. Pharmacol.*, 18 : 296 - 310, 1971.
20. Finn Geneser. *Histology*, 2<sup>nd</sup> Edition, Jakarta, Bina Rupa Aksara, pp. 310 - 327, 1994.

21. Cernochova D, Kamarad V. Toxic effects of lead of mice testicles after its administration with drinking water, *Acta. Univ. Palacki, Olomuc, Fac. Med.*, 1992.
22. Mc. Murry ST, et al. Sensitivity of selected immunological, hematological, and reproductive parameters in the cotton rat to subchronic lead exposure, *Journal of Wildlife Diseases*, 31 : 2, April 1995.
23. Rasile DA, et al. Cross generation lead ingestion : behavioral and physiological effects in mice, *Brain Research Bulletin* 36 : 5, 1995.
24. Stowe HD, Goyer RA. The Reproductive ability and progeny of lead toxic rats. *Fertil. Steril*, 22 : No. 11. 755 - 760, 1971.
25. Sokol RZ, et al. Lead exposure in vivo alters the fertility potential of sperm in vitro, *Toxicology and applied pharmacology*, 1994.
26. Paris Constantinides. *General Pathobiology*, Appleton & Lange, Norwalk, Connecticut, 1994.
27. Gandasoebrata. *Penuntun Laboratorium Klinik*, Dian Rakyat, Jakarta, 1995.
28. Hafez. *Techniques of Human Andrologi*, Elsevier / North-Holland Biomedical Press, 1977.
29. Soemaryono. *Basic theory of AAS*, Puslitbang Kimia Terapan, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, 1997.
30. Johnsen SG. *Testicular biopsy score count A method for registration of spermatogenesis in human testis hormones*, 1970.
31. Mariano di Fiore. *Atlas of Human Histology*, Five Edition, EGC, pp 208-209, 1986.

32. Purnawan Junadi. Pengantar Analisis Data, Rineka Cipta, Jakarta, 1995.
33. Box GEP, Hunter W.G, Hunter J.S. Statistic for Experimenters, John Wiley & Sons, Inc. New York, 1978.
34. Paryono P. Mengolah Data Statistik dengan SPSS / PC+, Penerbit Andi Offset, Yogyakarta, 1996.
35. Humason GL. Animal tissue technique, 3<sup>rd</sup> Ed.W.H. Freeman and Co, San Fransisco, 1972.