



**PENGARUH VITAMIN E TERHADAP KUALITAS SPERMA TIKUS
PUTIH YANG DIPAPAR TIMBAL**

**skripsi
disusun sebagai salah satu syarat
untuk memperoleh gelar Sarjana Sain Biologi**

Oleh
Rezha Alfy Yulianto
4450408005

JURUSAN BIOLOGI

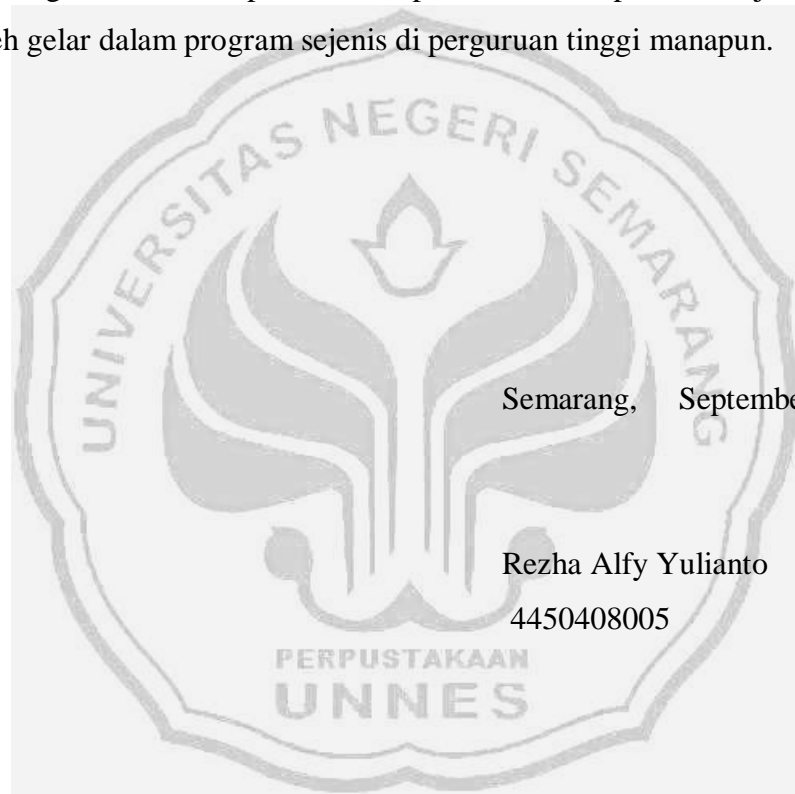
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

UNIVERSITAS NEGERI SEMARANG

2013

PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Saya menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa skripsi saya yang berjudul “Pengaruh pemberian vitamin E terhadap kualitas sperma tikus putih yang dipapar timbal” disusun berdasarkan hasil penelitian saya dengan arahan dosen pembimbing. Sumber informasi atau kutipan yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka di bagian akhir skripsi ini. Skripsi ini belum pernah diajukan untuk memperoleh gelar dalam program sejenis di perguruan tinggi manapun.



Semarang, September 2013

Rezha Alfy Yulianto

4450408005

PENGESAHAN

Skripsi yang berjudul :

Pengaruh pemberian vitamin E terhadap kualitas sperma tikus putih yang dipapar timbal

disusun oleh

nama : Rezha Alfya Yulianto

NIM : 4450408005

telah dipertahankan di hadapan sidang Panitia Ujian Skripsi FMIPA Unnes pada tanggal 20 Agustus 2013.

Panitia:

Ketua

Prof. Dr. Wiyanto, M.Si
NIP. 19631012 198803 1 001

Sekretaris

Andin Irsadi, S.Pd, M.Si
NIP. 197403102000031001

Penguji Utama

drh. Wulan Chrintijanti, M. Si
NIP. 196809111996032001

Anggota Penguji/

Pembimbing I

Dra. Wiwi Isnaeni, MS
NIP. 195808021985032001

Anggota Penguji/

Pembimbing II

Dr. drh. R. Susanti, MP
NIP. 196903231997032001

ABSTRAK

Yulianto, Rezha Alfy. 2013. Pengaruh Vitamin E Terhadap Kualitas Sperma Tikus Putih Yang Dipapar Timbal. Skripsi, Jurusan Biologi FMIPA Universitas Negeri Semarang. Dra. Wiwi Isnaeni, MS dan Dr. drh. R. Susanti, MP.

Timbal merupakan logam berat yang berbahaya bagi tubuh manusia. Pemaparan timbal bisa melalui makanan, minuman, inhalasi, dan, Timbal dapat menyebabkan efek buruk pada organ tubuh salah satunya testis dengan menginduksi terjadinya stres oksidatif pada hewan percobaan, yang ditandai dengan naiknya *Lipid Peroxidation Potensial* (LPP) didalam jaringan testis. Apabila terjadi kerusakan testis maka kualitas sperma akan menurun. Vitamin E merupakan antioksidan yang berperan sebagai pereduksi radikal bebas dan dapat langsung bereaksi dengan peroksidasi lipid. Tujuan penelitian ini adalah untuk menguji pengaruh pemberian vitamin E terhadap kualitas sperma tikus putih yang dipapar timbal.

Penelitian ini menggunakan *post test randomized control group design*. Populasi yang digunakan adalah tikus jantan (*Rattus norvegicus*) galur wistar. Sampel yang digunakan yaitu 20 tikus jantan yang dibagi menjadi 4 kelompok yaitu kelompok I sebagai placebo, II dengan perlakuan timbal 0,35 g/ tikus, III Vitamin E 1,44 mg/ tikus dan timbal 0,35 g/ tikus, IV Vitamin E 2,16 mg/ tikus dan timbal 0,35 g/ tikus. Perlakuan diberikan selama 14 hari. Pengambilan sperma pada hari ke- 15 kemudian dilakukan perhitungan sperma. Data jumlah, viabilitas, dan abnormalitas sperma dianalisis dengan ANAVA satu arah dan dilanjutkan dengan uji BNT, selanjutnya morfologi sperma diuji secara deskriptif.

Hasil ANAVA satu arah menunjukkan bahwa pemberian vitamin E berpengaruh signifikan pada jumlah, viabilitas, dan abnormalitas sperma ($p < 0,05$) tikus putih. Ini menunjukkan bahwa vitamin E berpengaruh terhadap kualitas sperma yang dipapar timbal. Hasil uji BNT menunjukkan bahwa jumlah, viabilitas, dan normalitas sperma masing-masing perlakuan menunjukkan adanya perbedaan yang nyata kecuali pada kelompok III dan IV. Dari hasil penelitian dapat di simpulkan bahwa pemberian vitamin E berpengaruh mempertahankan kualitas sperma tikus putih galur wistar yang dipapar timbal.

Kata kunci : Vitamin E, Kualitas sperma, Timbal.

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah SWT atas segala limpahan rahmat, taufik serta hidayah-Nya dan setelah berjuang keras, berusaha sehingga skripsi yang berjudul “Pengaruh pemberian vitamin E terhadap kualitas sperma tikus putih yang dipapar timbal” ini dapat diselesaikan dengan baik.

Dalam penyusunan skripsi ini penulis telah mendapatkan bantuan, bimbingan, motivasi, dan pengalaman dari berbagai pihak. Oleh karena itu, dengan segala kerendahan hati, penulis mengucapkan terima kasih kepada :

1. Rektor Universitas Negeri Semarang yang telah memberikan segala fasilitas dan kesempatan sehingga penulis dapat menyelesaikan studinya..
2. Dekan FMIPA Unnes yang telah memberi kemudahan dan perijinan dalam penelitian.
3. Ketua jurusan Biologi FMIPA Unnes yang telah memberikan kemudahan administrasi dalam menyelesaikan skripsi ini.
4. Dr.drh. R. Susanti, M.P, Dosen wali yang telah membimbing dan memotivasi.
5. Dra. Wiwi Isnaeni, MS dan Dr. drh. R. Susanti, M.P selaku Dosen Pembimbing I dan II yang telah memberikan pengarahan dan bimbingan dengan penuh kesabaran.
6. drh. Wulan Christijanti, M.Si sebagai dosen penguji yang telah memberikan saran dan masukan yang sangat berguna untuk penyempurnaan skripsi ini.
7. Ibuku Jumini, Alm., yang selalu menyayangi, memberi doa dan harapan, serta dukungan hingga akhir menutup mata.
8. Bapakku Agus Yulianto dan Adik Reynaldi Alfy Yulianto yang selalu memberi doa, bantuan, dukungan serta semangat.
9. Rekan tim yang ikut membantu penelitian (Kartika W, S.pd, Wulandari, dan Aziz).
10. Keluarga besar Biologi Murni '08 “BIPANNES” dan “Manihot FC” beserta sahabat saya Adi, Afdol, dan Sinyo yang selalu memberi dukungan, semangat, dan bantuan dalam menyelesaikan skripsi ini.

11. Wulandari dan keluarga yang selalu membantu, menemani, memberi saran dan memberikan semangat kedua dalam menyelesaikan skripsi ini, dan

12. Semua pihak yang telah membantu penulis dalam menyelesaikan skripsi.

Namun demikian penulis menyadari bahwa dalam penyusunan Skripsi ini masih ada beberapa kekurangan. Oleh karena itu, segala saran dan masukan dari semua pihak selalu diharapkan untuk perbaikan dan penyempurnaannya. Penulis berharap semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi kita semua.

Semarang, september 2013

Penulis



DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI	ii
PENGESAHAN	iii
ABSTRAK	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
BAB I PENDAHULUAN	
A. Latar Belakang	1
B. Rumusan Masalah	3
C. Penegasan Istilah	3
D. Tujuan	4
E. Manfaat	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA DAN HIPOTESIS	
A. Tinjauan Pustaka	5
1. Timbal	5
2. Metabolisme timbal didalam tubuh	6
3. Spermatogenesis	9
4. Vitamin E	13
B. Kerangka Berfikir	15
C. Hipotesis	15
BAB III METODE PENELITIAN	
A. Lokasi dan Waktu Penelitian	16
B. Populasi dan Sampel	16
C. Variabel Penelitian	16
D. Jenis dan Rancangan Penelitian	16
E. Alat dan Bahan	17

F. Prosedur Penelitian	17
G. Metode Pengumpulan Data	19
H. Metode Analisis Data	20
BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	
A. Hasil Penelitian	21
B. Pembahasan	24
BAB V SIMPULAN DAN SARAN	
A. Simpulan	30
B. Saran	30
DAFTAR PUSTAKA	31
LAMPIRAN-LAMPIRAN	35



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Tabel Penelitian	16
2. Hasil ANAVA satu arah dan uji BNT jumlah sperma tikus	21
3. Hasil ANAVA satu arah dan uji BNT normalitas sperma tikus	22
4. Hasil ANAVA satu arah dan uji BNT viabilitas sperma tikus	23



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Gambar skematis Metabolisme timbal di dalam tubuh.....	7
2. Bentuk-bentuk kepala sperma pada tikus.....	11
3. Struktur kimia α - tokoferol.....	13
4. Bagan rancangan penelitian.....	19
5. Kelainan morfologi sperma	24



DAFTAR LAMPIRAN

Tabel	Halaman
I. Hasil perhitungan data	35
II. Perhitungan ANAVA satu jalan jumlah spermatozoa	36
III. Perhitungan Uji BNT jumlah spermatozoa.....	37
IV. Perhitungan ANAVA satu jalan abnormalitas sperma	38
V. Perhitungan Uji BNT abnormalitas sperma	39
VI. Perhitungan ANAVA satu jalan viabilitas sperma	40
VII. Perhitungan Uji BNT viabilitas sperma.....	41
VIII. Surat keterangan telah melakukan penelitian.....	42
IX. Dokumentasi penelitian.....	43



BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Di era modern ini perkembangan bidang industri sangat pesat. Pesatnya perkembangan industri berdampak negatif terhadap lingkungan sekitar akibat buangan limbah pabrik. Semakin banyaknya pabrik-pabrik dibangun, menyebabkan peningkatan limbah industri, sehingga limbah yang dibuang ke lingkungan juga semakin banyak. Kemampuan alam untuk menerima beban limbah sangat terbatas, sehingga dapat dipastikan bahwa *self purification* saat ini telah terlampaui (Hidayatulloh *et al.* 2002). Salah satu bahan limbah yang terbuang di lingkungan adalah logam berat yang terkandung dalam asap pabrik.

Salah satu logam berat pencemar lingkungan adalah timbal (Pb). Timbal berupa serbuk berwarna abu-abu gelap, dapat digunakan sebagai bahan produksi baterai dan amunisi, komponen pembuatan cat, pabrik tekstil, pelindung radiasi, lapisan pipa, pembungkus kabel, gelas keramik, barang-barang elektronik, juga dalam proses mematri. Pemaparan timbal dapat terjadi melalui makanan, minuman, dan inhalasi (terhirup partikel-partikel timbal) serta melalui permukaan kulit (Darmono 2001).

Sebagian besar timbal dapat masuk ke dalam tubuh melalui pernafasan sampai paru-paru, kemudian menembus dinding alveoli dan masuk ke dalam sirkulasi darah. Timbal yang masuk tubuh melalui saluran cerna akan didistribusikan ke tulang (60%), hati (25%), ginjal (4%), dinding usus (3%) dan jaringan lainnya. Setelah melalui hati dan ginjal, timbal dapat diekskresikan melalui feses, keringat, dan urin (Venugopal & Lukkey 1978; Sudarmaji *et al.* 2006).

Komisi Penghapusan Bensin Bertimbal (KPBB) melaporkan bahwa konsentrasi 1 ug/m³ timbal di udara berdampak pada peningkatan kadar timbal dalam darah sebesar 2,5-5,3 ug/dl. Kadar timbal dalam darah sebesar 40 ug/dl berdampak pada menurunnya jumlah sperma dan gerak sperma, yang dapat berakibat timbulnya gejala kemandulan (KPBB 2006). Selain itu timbal dapat

menginduksi terjadinya stres oksidatif pada hewan percobaan, yang ditandai dengan naiknya *Lipid Peroxidation Potensial* (LPP) didalam jaringan. Pemberian timbal asetat dengan dosis 200/mg/kg BB melalui injeksi selama 4minggu dapat meningkatkan LPP di jaringan testis (Acharya *et al.* 2003).

Massanyi *et al.* (2007) menyatakan bahwa pemberian Pb 50 mg/KgBB secara intraperitoneal pada tikus percobaan menyebabkan dilatasi pembuluh darah kapiler di interstitium, undulasi pada membran basalis dan terjadi apoptosis pada tahap spermatogenesis. Pemberian Pb asetat sebanyak 100 mg/KgBB selama 42 hari secara oral dapat berpengaruh terhadap berat testis, diameter serta tebal epitel tubulus seminiferus testis, serta mempengaruhi sel spermatogenik dan sel sertoli menciit pada hewan coba (Danial 2005). Beberapa penelitian menunjukkan bahwa keracunan timbal dapat mengakibatkan penurunan jumlah spermatozoa, sehingga menyebabkan gejala kemandulan (Antonio *et al.* 2004)

Kemandulan dapat dicegah dengan cara banyak mengkonsumsi vitamin E. Vitamin E merupakan senyawa organik yang diperlukan sebagai antioksidan, pelarut lemak dan memelihara fertilitas. Kekurangan vitamin E dapat mengakibatkan hemolisis sel-sel darah merah dan anemia, penuaan dini, kulit keriput dan kemandulan. Senyawa turunan vitamin E sangat beraneka ragam, namun yang memiliki aktivitas antioksidan tinggi adalah α -tokoferol (Milczarek 2005).

Vitamin E berperan sebagai antioksidan dan dapat melindungi kerusakan membran biologis akibat radikal bebas. Vitamin E dapat menetralsir gugus hidroksil, superoksida, dan radikal hidrogen peroksida, serta mencegah aglutinasi sperma (Aggarwal *et al.* 2005). Menurut Linder (2006), vitamin E merupakan agen pendorong/pemacu fertilitas, karena dapat menormalkan epitel tubuli seminiferi.

Pemberian vitamin E dosis 4,4 IU/kg tidak menimbulkan efek pada sel sertoli dan jumlah sperma, tetapi jika pemberian vitamin E ditingkatkan menjadi 220 IU/kg dapat menurunkan konsentrasi prostaglandin pada prostat dan kematangan vesikel glandula seminal pada babi hutan (Guzman *et al.* 2000). Pemberian vitamin E dosis 100 mg/kg/hari tidak hanya berefek pada peningkatan

berat testis, jumlah sperma, motilitas sperma, dan produksi estrogen, tetapi juga meningkatkan kelangsungan hidup dan perkembangan sperma tikus (Momeni *et al.* 2009).

Berdasarkan uraian di atas, diduga timbal dapat menyebabkan kerusakan testis karena berdampak negatif bagi organ reproduksi seperti berat testis, diameter serta tebal epitel tubulus seminiferus testis, serta mempengaruhi sel spermatogenik dan sel sertoli sehingga sperma menjadi abnormal dan vitamin E berperan sebagai antioksidan dan dapat melindungi kerusakan membran biologis akibat radikal bebas, serta berpotensi sebagai bahan pelindung sperma dari pengaruh timbal. Dari uraian latar belakang tersebut, maka perlu dilakukan penelitian tentang pengaruh pemberian vitamin E terhadap kualitas sperma tikus putih yang terpapar timbal.

B. Rumusan Masalah

Dari uraian latar belakang dapat dirumuskan permasalahan “bagaimana pengaruh pemberian vitamin E terhadap kualitas sperma tikus putih yang dipapar timbal ?”

C. Penegasan Istilah

Untuk menghindari salah penafsiran terhadap penelitian perlu ditegaskan istilah-istilah terkait sebagai berikut.

1. Timbal

Timbal adalah suatu logam berat berwarna kelabu kebiruan dengan titik leleh 327°C dan titik didih 1740°C (Anies 2005). Penelitian ini menggunakan timbal asetat sebanyak 0,35 gram/liter yang dilarutkan dalam akuades yang dimasukan langsung ke lambung menggunakan kanul bengkok.

2. Kualitas Sperma

Sperma adalah sel kelamin laki-laki. Dalam penelitian ini kualitas sperma yang diuji adalah jumlah, abnormalitas, dan viabilitas sperma.

3. Vitamin E

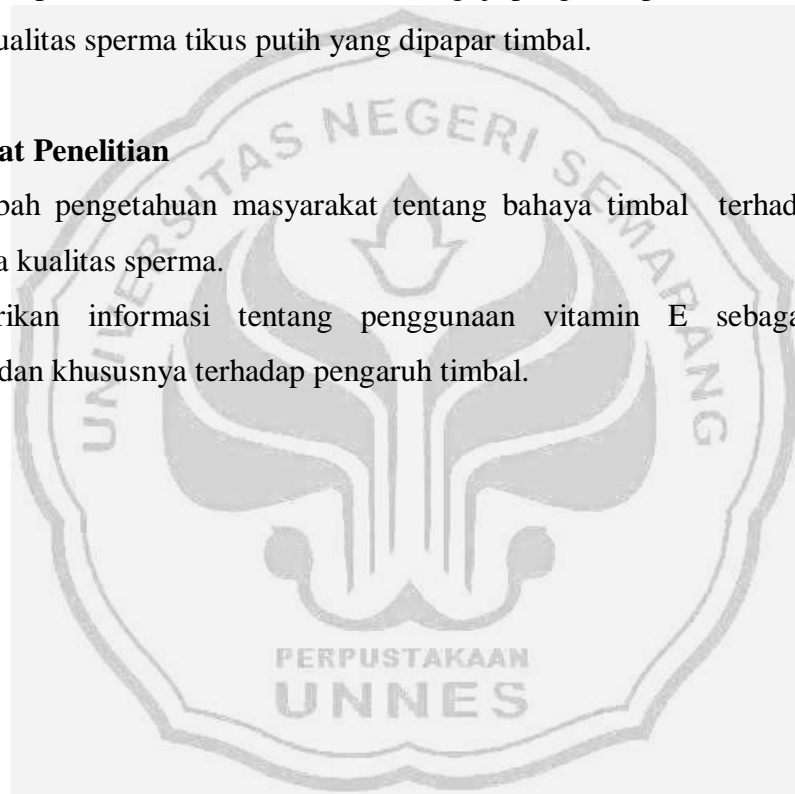
Vitamin E merupakan vitamin yang larut dalam lemak, terdiri dari campuran tokoferol (a, b, g, dan d) dan tokotrienol (a, b, g, dan d). Pada manusia a-tokoferol merupakan vitamin E yang paling penting untuk aktifitas biologi tubuh (Linder 2006). Dalam penelitian ini, vitamin E yang digunakan adalah vitamin E tokoferol dalam bentuk serbuk dalam jumlah 1,44 mg/hari dan 2,16 mg/hari yang dilarutkan dalam 2 ml olive oil.

D. Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah untuk menguji pengaruh pemberian vitamin E terhadap kualitas sperma tikus putih yang dipapar timbal.

E. Manfaat Penelitian

1. Menambah pengetahuan masyarakat tentang bahaya timbal terhadap tubuh terutama kualitas sperma.
2. Memberikan informasi tentang penggunaan vitamin E sebagai bahan antioksidan khususnya terhadap pengaruh timbal.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA DAN HIPOTESIS

A. Tinjauan Pustaka

1. Timbal

Timbal adalah suatu logam berat berwarna kelabu kebiruan dengan titik leleh 327°C dan titik didih 1740°C (Anies 2005). Timbal menguap dan bereaksi dengan oksigen dalam udara membentuk timbal oksida. Bentuk oksida yang paling umum adalah timbal (II) dan senyawa organometalik yang terpenting adalah timbal tetraetil, timbal tetrametil dan timbal stereat (WHO 1995). Logam ini termasuk ke dalam kelompok logam-logam golongan IV-A dengan nomor atom 82 dan bobot 207,2 (Palar 2004).

Timbal dan persenyawaannya digunakan dalam industri baterai sebagai bahan aktif dalam pengaliran arus elektron. Timbal dapat digunakan sebagai bahan tambahan dalam bahan bakar dan pigmen dalam cat sehingga merupakan penyebab utama peningkatan kadar timbal di lingkungan (Darmono 1995). Hampir 10% dari total produksi tambang timbal digunakan untuk pembuatan *tetraethyl lead* (TEL) yang dibutuhkan dalam produksi bahan bakar bensin karena dapat mendongkrak nilai oktan bahan bakar sekaligus berfungsi sebagai *antiknocking* untuk mencegah terjadinya ledakan saat pembakaran dalam mesin (Darmono 2001).

Timbal lebih tersebar luas dibanding logam toksik lainnya. Timbal dalam lingkungan meningkat karena penambangan, peleburan, pembersihan, dan berbagai penggunaannya dalam industri. Timbal terdapat secara universal dalam jumlah kecil pada batu-batuan, tanah, dan tumbuhan. Logam timbal juga terdapat di perairan baik secara alamiah ataupun sebagai dampak dari aktivitas manusia. Logam ini masuk ke perairan melalui pengkristalan timbal di udara dengan bantuan air hujan. Di samping itu, proses korofikasi batuan mineral akibat hempasan gelombang dan angin, juga merupakan salah satu jalur sumber timbal yang akan masuk ke dalam perairan (Palar 2004).

Besarnya kadar timbal di tanah berkisar 5-25 mg/kg. Kadar timbal di air tanah berkisar 1-60 $\mu\text{g/l}$ dan tidak lebih rendah dari kadar timbal dalam air dipermukaan alam. Kadar timbal di udara dibawah 1 $\mu\text{g/m}^3$, tetapi dapat jauh lebih tinggi di tempat kerja tertentu dan di daerah yang lalu lintasnya padat. Salah satu hasil emisi gas buang yang berbahaya adalah unsur timbal. Unsur timbal ini sendiri sebenarnya sudah ada di dalam bahan bakar bensin. Oleh karena itu mesin kendaraan tidak sempurna proses pembuangannya, sehingga timbal terlepas bebas di udara (Riyadina 1997).

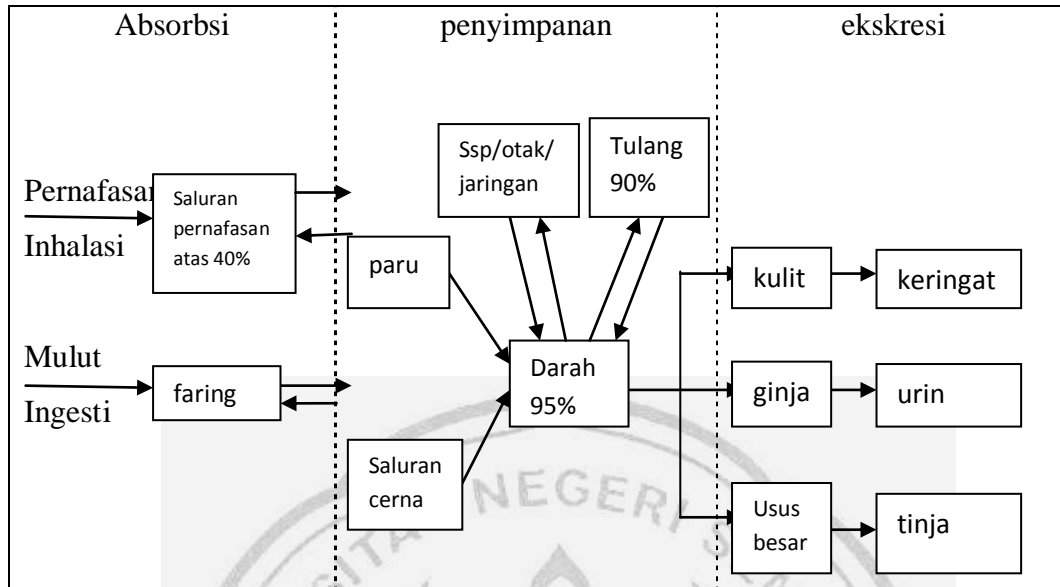
Tingginya kandungan timbal di lingkungan sangat berpengaruh pada kesehatan manusia. Terdapat 3 macam limbah industri yaitu limbah padat, cair, dan gas. Jika jumlah timbal yang terbang hanya sedikit, belum akan membahayakan lingkungan. Apabila jumlah limbah timbal sudah di atas nilai ambang batas yang ditetapkan oleh *American Standard Technical Method* (ASTM) yaitu 283,3 nm, akan membahayakan dan merugikan kesehatan manusia serta lingkungan sekitar (Naria 2005).

2. Metabolisme timbal di dalam tubuh

Timbal masuk ke dalam tubuh manusia melalui saluran pernafasan dan saluran pencernaan, terutama pada anak-anak dan orang dewasa dengan kebersihan perorangan yang kurang baik. Absorpsi timbal udara pada saluran pernafasan 40% dan pada saluran pencernaan 5-10%. Kemudian timbal didistribusikan ke dalam darah, 95% terikat pada sel darah merah dan 5% terikat pada plasma. Sebagian timbal disimpan pada jaringan lunak dan tulang. Ekskresi timbal terutama melalui ginjal dan saluran pencernaan (Palar 2004). Gambaran tentang proses absorpsi, penyimpanan dan ekskresi timbal disajikan Gambar 1.

Absorpsi timbal melalui saluran pernafasan dipengaruhi oleh tiga proses yaitu deposisi, pembersihan mukosiliar, dan pembersihan alveolar. Deposisi terjadi di nasofaring, saluran trakeobronkhial, dan alveolus. Deposisi tergantung pada ukuran partikel timbal, volume pernafasan dan daya larut. Partikel yang lebih besar banyak dideposit pada saluran pernafasan bagian atas dibanding

partikel yang lebih kecil. Pembersihan mukosiliar membawa partikel dari saluran pernafasan bagian atas ke nasofaring kemudian ditelan (Darmono 2001).



Gambar 1 Metabolisme timbal di dalam tubuh (Palar 2004).

Rata-rata 10-30% timbal yang terinhalasi diabsorbsi melalui paru-paru dan 5-10% timbal yang tertelan diabsorbsi melalui saluran cerna. Fungsi pembersihan alveolar adalah membawa partikel ke eskalator mukosiliar, menembus lapisan jaringan paru kemudian menuju kelenjar limfe dan aliran darah. Sebanyak 30-40% timbal yang diabsorbsi melalui saluran pernafasan akan masuk ke aliran darah. Masuknya timbal ke aliran darah tergantung pada ukuran partikel daya larut, volume pernafasan dan variasi faal antar individu (Palar 2004).

Timbal diekskresikan melalui kemih (75-80%) dan feses (15%). Bahkan setelah absorpsi sedang, timbal dapat dengan cepat muncul di kemih. Dalam keadaan normal, tubuh bisa menyeimbangkan antara absorpsi dan ekskresi, dimana jumlah timbal yang diekskresikan dalam kemih, feses, empedu, keringat, rambut, dan kuku sama dengan timbal yang diabsorbsi. Ekskresi timbal melalui saluran cerna dipengaruhi oleh saluran aktif dan pasif kelenjar saliva, pankreas dan kelenjar lainnya di dinding usus, regenerasi sel epitel, dan ekskresi empedu. Proses eksresi timbal melalui ginjal melalui filtrasi glomerulus (Panggabean *et al.* 2003). Pada jaringan lunak, sebagian timbal disimpan dalam aorta, hati, ginjal, otak, dan kulit, sehingga sangat berbahaya bagi kesehatan (Darmono 2001).

Keracunan timbal akut memang jarang terjadi. Keracunan timbal akut yang pernah terjadi secara tidak sengaja adalah timbal asetat. Keracunan biasanya terjadi karena masuknya senyawa timbal yang larut dalam asam atau inhalasi uap timbal. Efeknya menimbulkan rasa haus dan rasa logam disertai rasa terbakar pada mulut. Gejala lain yang sering muncul adalah mual dan muntah dengan muntahan berwarna putih seperti susu dan rasa sakit perut yang hebat. Pada gusi terdapat garis biru sebagai hasil dekomposisi protein yang bereaksi dengan gas hidrogen sulfida. Tinja penderita keracunan timbal berwarna hitam karena mengandung timbal sulfida, dapat disertai diare atau konstipasi. Keracunan timbal juga mempengaruhi sistem syaraf pusat, dengan gejala ringan berupa vertigo, dan gejala berat berupa paralisis beberapa kelompok otot sehingga menyebabkan pergelangan tangan terkulai (*wrist drop*) dan pergelangan kaki terkulai (*foot drop*) (Slamet 2009).

Bahaya kesehatan yang ditimbulkan oleh timbal di udara berkaitan dengan ukuran partikelnya. Partikel timbal yang berukuran 10 mikrometer dapat tertahan di paru-paru, sedangkan yang berukuran besar dari 10 mikrometer mengendap di saluran nafas bagian atas. Timbal yang diabsorpsi diangkut oleh darah ke organ-organ lain (Anies 2005). Pada orang dewasa, kadar timbal dalam darah 10 μ /dL dapat mempengaruhi perkembangan sel darah, kadar timbal 40 μ /dL mempengaruhi pembentukan hemoglobin dan gangguan sistem saraf (gejala kelelahan, iritabilitas, kehilangan ingatan, dan reaksi lambat). Timbal juga menyebabkan penyakit ginjal kronis dan gagal ginjal, sedangkan pada sistem reproduksi mengakibatkan berkurangnya jumlah sperma atau meningkatnya jumlah sperma yang abnormal. Pada wanita hamil, jumlah timbal yang sangat tinggi akan mengakibatkan keguguran. Kadar timbal yang tinggi dalam darah dapat menaikkan tekanan darah (Shannon 1998).

Fruktosa merupakan sumber energi utama untuk pergerakan sperma, dan timbal mengganggu proses fruktolisis. Volume semen dan viskositas yang rendah, deviasi kadar fruktosa, kolesterol, dan protein cairan semen menunjukkan adanya gangguan aktivitas sekresi vesikula seminalis dan prostat setelah terkena timbal. Pada kelompok pekerja di India yang terkena timbal menunjukkan motilitas

sperma yang memburuk dengan bentuk kepala sperma abnormal. Selain itu, konsentrasi timbal yang tinggi dalam darah dan semen menurunkan kualitas sperma dan kesuburan sebanyak 40% pekerja mengalami masalah kesuburan, tanpa mempengaruhi kadar FSH, LH, dan testosteron (Naha & Chowdury 2005).

Cernochova dan Kamarad (1992) menyatakan bahwa pemberian timbal nitrat 0,05 gram/liter secara oral pada mencit selama 2 minggu dapat berdampak pada bertambahnya volume jaringan interstisial dan perubahan epitelium germinal tubulus seminiferus. Selain itu timbal dapat menginduksi terjadinya stres oksidatif pada hewan percobaan, yang ditandai dengan naiknya LPP dalam jaringan. Pemberian timbal asetat dosis 200/mg/kg BB melalui injeksi selama 4 minggu dapat meningkatkan LPP di dalam jaringan testis. LPP dapat ditentukan dengan mengukur molekul *malondialdehyde* (MDA) (Acharya *et al.* 2003).

Pengukuran MDA banyak dilakukan sebagai parameter terjadinya peroksidasi lipid. Peroksidasi yang tinggi ternyata memiliki hubungan dengan berbagai penyakit. Penelitian Zarghami & Khosrowbetgi (2005) menunjukkan bahwa pria yang mengalami *asthenozoospermic* kadar MDA di dalam semennya mengalami peningkatan dibanding pria yang *normozoospermic*.

Paparan timbal dalam jangka waktu lama akan meningkatkan konsentrasi timbal dalam tubuh, meningkatkan jumlah sperma abnormal, kerusakan pada epitel germinal, dan perubahan spermatogenesis. Pengaruh timbal pada sistem reproduksi dapat menyebabkan sterilitas pada pria, mencakup oligozoospermia, astenozoospermia maupun teratozoospermia (Fauzi 2008).

3. Spermatogenesis

Spermatogenesis merupakan proses perkembangan sel-sel spermatogenik, terdiri dari 3 tahap yaitu spermatositogenesis atau proliferasi, meiosis dan spermiogenesis (Gupta *et al.* 2005). Spermatositogenesis merupakan proliferasi sel induk spermatogonia yang membelah secara mitosis menghasilkan spermatosit primer. Spermatosit primer mengalami pembelahan meiosis I menjadi spermatosit sekunder. Pembelahan meiosis I terdiri dari profase, metafase, anafase dan telofase. Profase dari spermatosit primer dibedakan menjadi leptoten, zigoten,

pakiten, diploten dan diakinesis. Spermatisit pakiten merupakan sel yang mudah diamati karena memiliki kromatid tebal, memendek, dan ukuran relatif besar dibandingkan sel spermatogenik lainnya. Pada pembelahan meiosis II spermatisit sekunder membelah menjadi spermatid (Hafez 2000). Spermatisit mengalami perubahan morfologi dari bentuk bulat menjadi oval dan berekor yaitu spermatozoa melalui proses spermiogenesis (Pineda & Faulkner 2003).

Berlangsungnya spermatogenesis pada tubulus seminiferus melibatkan poros hipotalamus, hipofisis dan testis. *Gonadotropin Releasing Hormon (GnRH)* hipotalamus merangsang hipofisis anterior untuk mensekresikan *Luteinizing Hormon (LH)* dan *Follicle Stimulating Hormon (FSH)*. LH mempengaruhi spermatogenesis melalui testosteron yang dihasilkan oleh sel Leydig. FSH berpengaruh langsung terhadap sel sertoli dalam tubulus seminiferus. FSH meningkatkan sintesis protein pengikat hormon *androgen binding protein (ABP)*. ABP merupakan glikoprotein yang mengikat testosteron. ABP disekresikan ke dalam lumen tubulus seminiferus dan dalam proses ini testosteron yang dihasilkan oleh sel Leydig diangkut dengan konsentrasi yang tinggi ke tubulus seminiferus (Mc Lachland *et al.* 1996).

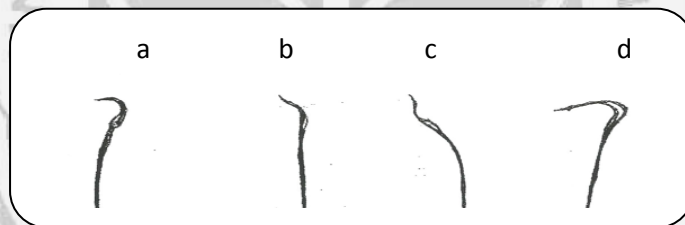
Ilyas (2007) melaporkan bahwa kepala spermatozoa berasal dari kondensasi nukleus spermatid. Kondensasi tersebut meliputi perubahan-perubahan kromatid menjadi lebih ringkas, pematangan membran luar menjadi kuat dan pembentukan akrosom. Akrosom merupakan suatu kantung kecil yang mengandung enzim–enzim yang sangat penting untuk menembus dinding sel telur pada saat pembuahan. Enzim *hialuronidase* berfungsi membuka dinding luar telur. Bagian leher spermatozoa merupakan bagian yang menghubungkan kepala dan ekor.

Kepala spermatozoa terdiri atas sel berinti padat dengan sedikit sitoplasma dan lapisan membran sel di sekitar permukaannya. Di bagian luar, dua pertiga anterior terdapat selubung tebal disebut akrosom yang terutama dibentuk oleh badan Golgi. Selubung ini mengandung sejumlah enzim serupa dengan enzim yang ditemukan pada lisosom sel-sel tertentu, termasuk hialuronidase, dimana selubung tersebut dapat mencerna filamen proteoglikan dari jaringan, dan enzim

proteolitik yang sangat kuat. Enzim-enzim tersebut mempunyai peranan penting yang memungkinkan sperma dapat membuahi ovum. Ekor spermatozoa, yang disebut flagellum, memiliki 3 komponen utama yaitu rangka pusat, membran sel, dan sekelompok mitokondria yang terdapat pada proximal (Guyton & Hall 2005).

Bagian ekor spermatozoa terdiri dari leher (*neck piece*), pangkal (*middle piece*), ekor utama (*principal piece*), dan ujung ekor (*end piece*) (Schatten & Constantinescu 2007). Pada bagian pangkal (*middle piece*) terdapat mitokondria yang berfungsi dalam metabolisme spermatozoa untuk menghasilkan energi berupa ATP (*Adenosin Tri Phosphate*) melalui proses respirasi. Bagian ujung (*end piece*) berfungsi sebagai alat mekanik untuk pergerakan spermatozoa (Manandhar & Sutovsky 2007).

Bentuk spermatozoa abnormal dapat diklasifikasikan berdasarkan bentuk kepala dan ekornya. Menurut Hayati *et al.* (2006), sperma tikus abnormal terdiri dari bentuk kepala seperti pisang, tidak beraturan (*amorphous*), terlalu membengkok dan lipatan ekor yang abnormal. Bentuk kepala sperma tikus dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2 Bentuk-bentuk kepala sperma pada tikus. a. bentuk kepala sperma normal; b. bentuk kepala seperti pisang; c. bentuk kepala tidak beraturan (*amorphous*); d. bentuk kepala terlalu membengkok (Hayati *et al.* 1983).

Penilaian kualitas spermatozoa meliputi motilitas, viabilitas, abnormalitas primer, dan gerakan massa spermatozoa. Menurut Toelihere (2003), penilaian motilitas spermatozoa dilakukan dengan pemberian nilai 0-5. Nilai 0 diberikan bila spermatozoa imotil atau tidak bergerak. Nilai 1 bila gerakan berputar di tempat. Nilai 2 bila gerakan spermatozoa berayun atau melingkar (kurang dari 50% bergerak progresif dan tidak ada gelombang). Nilai 3 bila spermatozoa bergerak progresif dan menghasilkan gerakan massa (50-80%). Nilai 4 bila gerakan progresif, gesit dan segera membentuk gelombang dengan 90% sperma

motil. Nilai 5 bila gerakan spermatozoa terjadi sangat progresif, gelombang sangat cepat dan spermatozoa menunjukkan 100% motil aktif. Perhitungan motilitas dapat juga dilakukan dengan menaksir spermatozoa yang bergerak progresif (maju) dari keseluruhan lapangan pandang yaitu dengan cara mengalikan daerah taksir dengan 100% (Partodiharjo 1992)

Abnormalitas bentuk spermatozoa meliputi kelainan pada kepala, badan dan ekor spermatozoa (Toelihere 2003). Abnormalitas spermatozoa dibedakan menjadi abnormalitas primer dan sekunder. Bentuk abnormalitas primer berasal dari gangguan pada testis dan abnormalitas sekunder berasal dari kesalahan perlakuan setelah semen dikeluarkan dari testis (karena goncangan yang keras, dikeringkan terlalu cepat, dipanaskan terlalu tinggi, atau kesalahan dalam membuat preparat ulas). Abnormalitas spermatozoa primer meliputi kepala kecil, besar, miring, bulat, kepala dua, ekor dua, akrosom salah bentuk, dan leher besar, sedangkan abnormalitas sekunder meliputi leher patah, leher ekor kusut, ekor patah, ekor bergulung dan kepala terpisah dari leher (Partodiharjo 1992). Toelihere (2003) menambahkan spermatozoa yang mengalami kelainan morfologi (abnormalitas) kurang dari 20% masih dianggap normal.

Kelainan spermatogenesis dipengaruhi oleh faktor endogen dan eksogen. Faktor endogen meliputi hormonal, psikologis, dan genetik. Faktor eksogen dapat berupa bahan kimia, obat-obatan, logam berat, suhu, radiasi sinar X, getaran ultrasonik, vitamin, gizi, trauma, dan peradangan (Gupta *et al.* 2005). Efek logam berat seperti timbal juga mempengaruhi proses spermatogenesis sehingga terjadi penurunan kualitas semen dalam jumlah, morfologi, motilitas dan bentuk abnormal spermatozoa (Adnan 2001).

Menurut Mc Murry (1995) pemberian timbal dalam air minum dengan konsentrasi 0 ppm, 100 ppm, dan 1000 ppm selama tujuh minggu, menyebabkan pengecilan hepar, vesikula seminalis, duktus epididimis, dan pengurangan jumlah sperma normal mencit. Kerusakan akan terlihat semakin jelas dengan peningkatan konsentrasi timbal dan lamanya waktu pemberian, dengan perubahan hispatologi testis lebih nyata. Jumlah sperma juga dapat dipengaruhi oleh faktor eksogen, salah satunya dengan mengkonsumsi vitamin E (Guzman *et al.* 2000). Pemberian

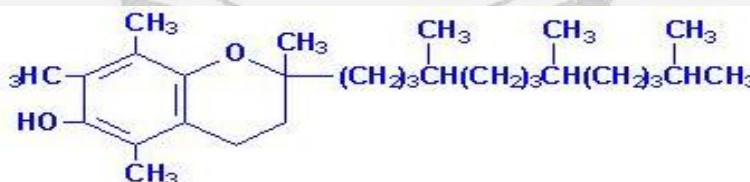
vitamin E 1,44 mg/hari dapat meningkatkan motilitas dan viabilitas spermatozoa yang terkena radikal bebas (Iswara 2009).

4. Vitamin E

Vitamin E merupakan vitamin larut dalam lemak, terdiri dari campuran tokoferol (a, b, g, dan d) dan tokotrienol (a, b, g, dan d). Vitamin E merupakan pemutus rantai peroksida lemak pada membran dan *Low Density Lipoprotein* (LDL). Menurut Dutta-Roy *et al.* (1994), diacu dalam Hariyatmi (2004) vitamin E merupakan antioksidan yang melindungi *polyunsaturated fatty acid's* (PUFAs) dan komponen sel serta membran sel dari oksidasi radikal bebas.

Vitamin E berperan sebagai antioksidan dan dapat melindungi aksi kerusakan membran biologis akibat radikal bebas. Vitamin E melindungi asam lemak tidak jenuh pada membran fosfolipid. Radikal peroksi bereaksi 1000 kali lebih cepat dengan vitamin E daripada asam lemak tidak jenuh, dan membentuk radikal tokoferoksil (Gunawan 2007). Selanjutnya radikal tokoferoksil berinteraksi dengan antioksidan lain seperti vitamin C, yang akan membentuk tokoferol kembali.

Vitamin E juga berfungsi mencegah penyakit hati, mengurangi kelelahan, dan membantu memperlambat penuaan karena vitamin E berperan dalam suplai oksigen ke darah dan ke seluruh organ tubuh. Vitamin E dapat menguatkan dinding pembuluh kapiler darah dan mencegah kerusakan sel darah merah akibat racun (Mostafa *et al.* 2010). Vitamin E membantu mencegah sterilitas dan destrofi otot. Struktur kimia vitamin E α -tokoferol dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Struktur kimia α -tokoferol (Goodman & Gilman 2007).

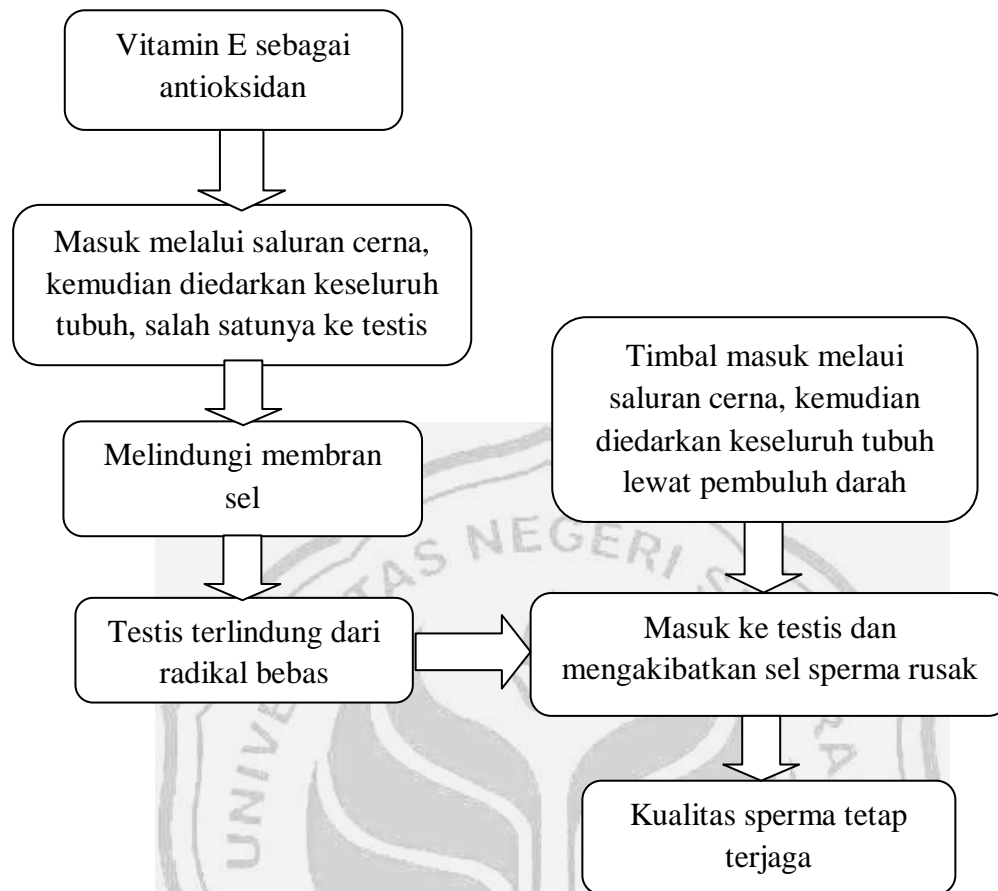
Fungsi utama vitamin E di dalam tubuh adalah sebagai antioksidan alami yang membuang radikal bebas dan senyawa oksigen. Secara partikular, vitamin E juga penting dalam mencegah peroksidasi membran asam lemak tak jenuh (Lyn 2006). Vitamin E dan C berhubungan dengan efektifitas antioksidan masing-

masing. α -tokoferol yang aktif dapat diregenerasi oleh interaksi dengan vitamin C yang menghambat oksidasi radikal bebas peroksi. Alternatif lain, α -tokoferol dapat membuang dua radikal bebas peroksi dan mengkonjugasinya menjadi glukuronat ketika ekskresi di ginjal (Hariyatmi 2004).

Antioksidan nonenzimatik seperti vitamin E diperlukan untuk dapat mengatasi stress oksidatif dalam tubuh (Quratul'ainy 2006). Kelebihan vitamin E dalam tubuh akan disimpan dalam beberapa organ, antara lain hati, jaringan adiposa, otak dan lipoprotein. Vitamin E diekskresikan dari tubuh bersama empedu melalui feses, sebagian lagi melalui urin setelah diubah menjadi asam tokoferonat dan tokoferonalakton yang berkonjugasi dengan glukoronat. Hariyatmi (2004) dalam penelitiannya menyatakan bahwa vitamin E memiliki kemampuan untuk menghentikan lipid peroksida dengan cara menyumbangkan satu atom hidrogennya dari gugus OH kepada lipid peroksida yang bersifat radikal sehingga menjadi vitamin E yang kurang reaktif dan tidak merusak.

Vitamin E dapat menetralkan gugus hidroksil, superoksida, dan radikal hidrogen peroksida, serta mencegah aglutinasi sperma (Aggarwal *et al.* 2005). Pemberian vitamin E dosis 4,4 IU/kg tidak menimbulkan efek pada sel sertoli dan jumlah sperma, tetapi jika pemberian vitamin E ditingkatkan menjadi 220 IU/kg dapat menurunkan konsentrasi prostaglandin pada prostat dan kematangan vesikel glandula seminal pada babi hutan (Guzman *et al.* 2000). Pemberian vitamin E dosis 100 mg/kg/hari tidak hanya berefek pada peningkatan berat testis, jumlah sperma, motilitas sperma, dan produksi estrogen, tetapi juga meningkatkan kelangsungan hidup dan perkembangan sperma tikus yang dipapar timbal (Momeni *et al.* 2009).

B. Kerangka Berpikir



C. Hipotesis

Hipotesis penelitian ini adalah pemberian vitamin E berpengaruh melindungi sel sperma akibat radikal bebas dengan cara menghentikan pembentukan lipid peroksidasi pada sperma tikus putih dari kerusakan akibat dipapar timbal.

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Jurusan Biologi FMIPA Universitas Negeri Semarang selama 7 bulan.

B. Populasi dan sampel penelitian

Populasi yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur wistar. Sampel yang digunakan adalah 20 ekor tikus putih strain wistar jantan umur 2-3 bulan dengan berat badan 150-180 gram, diperoleh dari Laboratorium Jurusan Biologi Universitas Negeri Semarang.

C. Variabel

1. Variabel bebas berupa pemberian timbal dan vitamin E secara peroral.
2. Variabel tergantung berupa kualitas sperma, yaitu jumlah sperma, morfologi sperma, dan viabilitas sperma.
3. Variabel kendali berupa umur, berat badan, strain tikus putih, suhu ruang dan pakan.

D. Jenis dan rancangan penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental laboratorium dengan rancangan “*post test randomized control group design*”. Tabel penelitian disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Tabel Penelitian

Kelompok	Perlakuan
I	Sebagai placebo diberi akuades/ekor
II	Timbal asetat 0,35 g/liter/ekor
III	Vit E 1,14 mg/ekor dan Timbal Asetat 0,35 g/liter/ekor
IV	Vit E 2,16 mg/ekor dan Timbal Asetat 0,35 g/liter/ekor

Keterangan : Timbal asetat dan vitamin E diberikan selama 15 hari, pada kelompok III dan IV timbal asetat diberikan satu jam setelah pemberian vitamin E karena diharapkan dapat menjadi proteksi dari radikal bebas.

E. Alat dan Bahan Penelitian

1. Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

- a. Timbangan elektrik untuk menimbang tikus.
- b. Kandang tikus khusus dengan pakan dan minum.
- c. Seperangkat alat bedah dan papan bedah.
- d. Hand counter untuk menghitung jumlah spermatozoa
- e. Mikroskop untuk melihat spermatozoa.
- f. Alat gelas untuk membuat apusan spermatozoa.
- g. Sonde oral.
- h. Hemositometer.

2. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

- a. Serbuk timbal asetat diperoleh dari laboratorium Biologi Unnes
- b. Akuades
- c. NaCl fisiologis
- d. Serbuk vitamin E murni diperoleh dari laboratorium gizi UGM.
- e. Tikus putih jantan galur wistar umur 2-3 bulan.
- f. Giemsa untuk mewarnai sperma.
- g. Olive oil untuk melutkan vitamin E.
- h. Pur untuk pakan tikus

F. Prosedur penelitian

1. Persiapan penelitian

- a. menyiapkan kandang tikus putih lengkap dengan tempat pakan dan minum.
- b. Menyiapkan larutan timbal asetat dan vitamin E.

2. Penentuan Dosis Timbal Asetat dan Vitamin E

a. Dosis Timbal Asetat

Menurut Cernochova dan Kamarad (1992) pemberian timbal nitrat 0,05 gram/liter secara oral pada mencit jantan selama 2 minggu berdampak bertambahnya volume jaringan interstisial, dan perubahan epitelium germinal pada tubulus seminiferus. Konversi dari mencit ke tikus menjadi $0,05 \times 7 = 0,35$ gram/liter.

b. Dosis Vitamin E

Vitamin E yang digunakan adalah vitamin E murni dalam bentuk serbuk.

1 mg = 1,49 IU (Linder dalam Iswara, 2009)

1 IU = $1/1,49$ = 0,67 mg

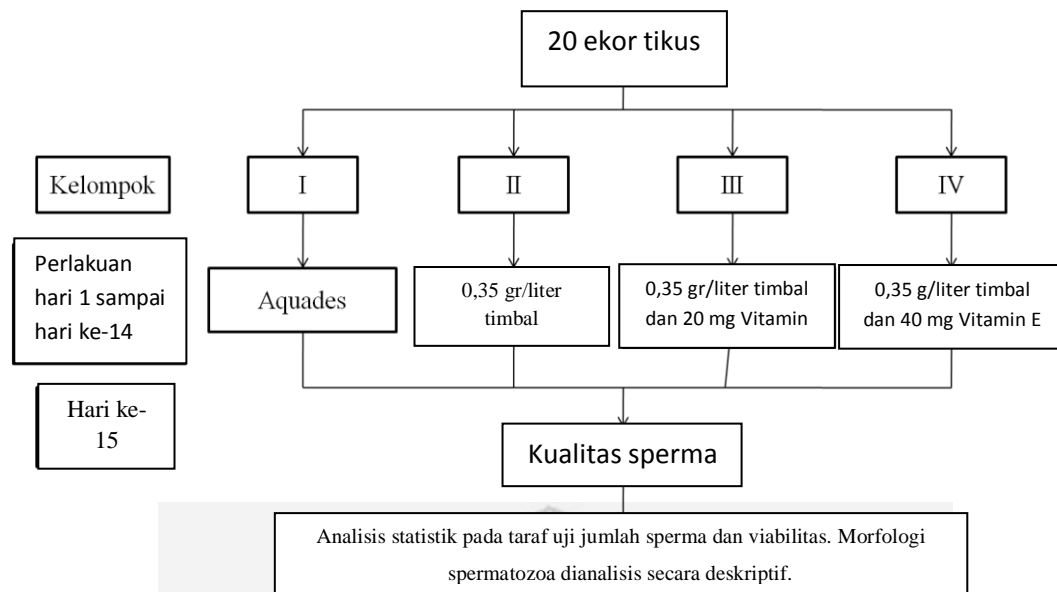
Manusia = 120 IU/ hari = 80 mg/hari (Hariyatmi 2004)

Tikus = $0,018 \times 80$ mg = 1,44 mg/hari dilarutkan dalam 2 ml olive oil.

Vitamin E dibuat larutan stok, untuk dosis 1,44 mg/ tikus/ hari $\times 5 \times 21$ = 151,2 mg dilarutkan dalam 420 ml olive oil, sedangkan untuk dosis 2,16 mg/ tikus/ hari $\times 5 \times 21$ = 226,8 mg dilarutkan dalam 420 ml olive oil kemudian di sondekan 2 ml untuk tiap ekor tikus.

Pelaksanaan penelitian

- a. 20 ekor tikus putih dibagi menjadi dalam 4 kelompok yang masing-masing terdiri dari 5 ekor.
- b. Berat badan awal tikus ditimbang dan tikus putih ditandai dengan asam pikrat.
- c. Penelitian dilaksanakan sesuai dengan Gambar 4.
- d. Pemberian timbal asetat dilakukan dalam selang waktu satu jam setelah pemberian vitamin E secara per oral. Diharapkan setelah satu jam vitamin E dapat dimetabolisme oleh tubuh dan memproteksi dari radikal bebas.
- e. Perlakuan diberikan selama 14 hari karena menurut Chernochova dan Kamarad (1992), pemberian timbal nitrat 0,05 gram/liter secara oral terhadap mencit jantan selama 2 minggu dapat memberikan dampak bertambahnya volume jaringan interstisial, dan terjadi perubahan epitelium germinal pada tubulus seminiferus.



Gambar 4. Bagan rancangan penelitian

G. Metode Pengumpulan Data

Pengambilan sperma tikus dilakukan dengan cara tikus dibius menggunakan kloroform, kemudian dibedah organ reproduksinya. Setelah itu organ vas deferens pada tikus dipotong. Vas deferens diambil dan diletakan pada cawan petri, kemudian ditumbuk dengan ditambahkan larutan NaCl 0,9% sebanyak 1 ml agar sperma yang ada di vas deferens keluar dan tidak mati. Menurut Soehadi dan Arsyad (1983) untuk mengetahui kualitas spermatozoa digunakan parameter berikut :

1. Jumlah spermatozoa dihitung dengan cara larutan stok sperma dihisap memakai pipet hisap hemositometer sampai tanda 0,5 lalu larutan NaCl fisiologis dihisap sampai tanda 101, dan pipet dikocok. Dibuang beberapa tetes pada kertas tisu, kemudian diteteskan pada bilik hitung yang sudah ditutup dengan kaca penutup dan sudah disiapkan di mikroskop, kemudian diperiksa di bawah mikroskop. Dihitung dengan menggunakan rumus jumlah spermatozoa terhitung (s) x pengenceran x 1 ml NaCl = s x 20.000 =juta/mm³.
2. Menghitung abnormalitas dengan cara melihat 100 sel sperma yang dijumpai dan dihitung persentase normal dan abnormalnya.
3. Viabilitas sperma dihitung dengan cara membuat preparat apus dari larutan stok kemudian diwarnai dengan giemsa. Pengamatan dilakukan dengan cara

menghitung jumlah sperma sampai 100 sel sperma (mati dan hidup) setiap bidang pandang, kemudian dihitung menjadi persen, kemudian pada tiap bidang pandang dijumlah dan dirata-rata. Nilai viabilitas spermatozoa dinyatakan dalam persen.

H. Metode Analisis Data

Data jumlah spermatozoa, abnormalitas, dan viabilitas spermatozoa yang hidup dianalisis statistik menggunakan ANAVA satu arah pada taraf uji kesalahan 5 %. Bila terdapat perbedaan akan dilanjutkan dengan uji BNT (Beda Nyata Terkecil) untuk melihat perbedaan antar kelompok perlakuan.



BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Penelitian

Data yang diambil dari penelitian adalah jumlah, abnormalitas, dan viabilitas, sperma tikus setelah dipapar timbal serta vitamin E selama 14 hari.

1. Jumlah sperma

Hasil perhitungan ANAVA satu arah terhadap jumlah sperma menunjukkan bahwa F_{hit} (758,81) lebih besar daripada F_{tab} (3,49). Hal ini menunjukkan bahwa pemberian vitamin E berpengaruh terhadap jumlah sperma yang dipapar timbal. Untuk mengetahui kelompok yang berbeda perlakuan dilakukan uji BNT pada taraf uji 5 % yang hasilnya dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil ANAVA satu arah dan uji BNT jumlah sperma tikus yang diberi timbal per oral dan vitamin E

Kelompok	ulangan (juta/mm ³)					Rerata
	1	2	3	4	5	
I	16	16	15	13	15	15,0 x10 ⁶ /ml±1,22 ^a
II	10	13	13	11	12	11,8 x10 ⁶ /ml ±1,303 ^b
III	12	14	14	13	13	13,2 x10 ⁶ /ml ±0,83 ^{cb}
IV	16	15	13	14	14	14,4 x10 ⁶ /ml ±1,14 ^{ac}

Huruf yang berbeda menunjukkan berbeda nyata pada taraf kesalahan 5 % (Lampiran 1. Hal. 37)

Hasil uji lanjut BNT jumlah sperma menunjukkan bahwa jumlah sperma kelompok I berbeda nyata dengan kelompok II, dan III. Jumlah sperma kelompok I dan IV tidak berbeda nyata. Jumlah sperma kelompok II tidak berbeda nyata dengan kelompok III, tetapi kelompok II berbeda nyata dengan kelompok IV. Jumlah sperma kelompok III dengan kelompok IV tidak berbeda nyata. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian vitamin E 2,16 mg hasilnya lebih berpengaruh dalam menangkal radikal bebas dari timbal, daripada vitamin E dosis 1,44 mg. Sehingga jumlah sperma tikus dapat dipertahankan.

2. Abnormalitas Sperma

Hasil perhitungan ANAVA satu arah pada viabilitas sperma menunjukkan bahwa F_{hit} (714,967) lebih besar daripada F_{tab} (3,49). Hal ini menunjukkan bahwa

pemberian vitamin E berpengaruh terhadap abnormalitas sperma yang dipapar timbal. Selanjutnya untuk mengetahui perbedaan antar kelompok perlakuan dilakukan uji BNT pada taraf uji 5 % yang hasilnya dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil ANAVA satu arah dan uji BNT abnormalitas sperma yang diberi vitamin E dan timbal pIer oral

Kelompok	ulangan %					Rerata
	1	2	3	4	5	
I	8	7,33	9	7	5,67	7,4 ± 1,23 a
II	37,33	31,33	34,67	34,33	30,33	33,598 ± 2,803 b
III	15	18,33	17	14,33	12	15,332 ± 2,44 c
IV	8,33	12,67	9,33	13	16,67	12 ± 3,31 cd

Huruf yang berbeda menunjukkan berbeda nyata pada taraf kesalahan 5 % (Lampiran 1. Hal. 39)

Hasil uji BNT menunjukkan bahwa abnormalitas sperma kelompok I berbeda nyata dengan kelompok II, III, dan IV. Kelompok II berbeda nyata dengan kelompok III dan IV. Kelompok III tidak berbeda nyata dengan kelompok IV. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian vitamin E berpengaruh dalam menangkal radikal bebas dari timbal, tetapi belum mendekati kelompok I (kontrol), sehingga normalitas sperma dapat dipertahankan.

3. Viabilitas Sperma

Hasil perhitungan ANAVA satu arah pada viabilitas sperma menunjukkan bahwa F_{hit} (714,967) lebih besar daripada F_{tab} (3,49). Hal ini menunjukkan bahwa pemberian vitamin E berpengaruh terhadap viabilitas sperma yang dipapar timbal. Selanjutnya untuk mengetahui perbedaan antar kelompok perlakuan dilakukan uji BNT pada taraf uji 5 % yang hasilnya dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Hasil ANAVA satu arah dan uji BNT viabilitas sperma yang diberi vitamin E dan timbal per oral

Kelompok	ulangan (%)					Rerata
	1	2	3	4	5	
I	98	91	96	93	95	94,6 % ± 2,71 ^a
II	77	86	83	79	87	82,4 % ± 4,33 ^b
III	87	94	82	83	91	87,4 % ± 5,13 ^{cb}
IV	89	96	93	90	92	92 % ± 2,74 ^{ac}

Huruf yang berbeda menunjukkan berbeda nyata pada taraf kesalahan 5 % (Lampiran 1. Hal. 41)

Hasil uji BNT menunjukkan bahwa viabilitas sperma kelompok I berbeda nyata dengan kelompok II dan III, tetapi tidak berbeda nyata dengan kelompok IV. Viabilitas sperma kelompok II tidak berbeda nyata dengan kelompok III, tetapi kelompok II berbeda nyata dengan kelompok IV. Viabilitas sperma kelompok III tidak berbeda nyata dengan kelompok IV. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian vitamin E 2,16 mg lebih efektif dalam menangkal radikal bebas dari timbal daripada penambahan vitamin E dosis 1,44 mg, sehingga viabilitas sperma tikus dapat dipertahankan.

B. Pembahasan

Pemberian timbal 0,35 g/hari/ekor/BB (kelompok II) selama 14 hari menunjukkan rerata kualitas sperma tikus (jumlah, abnormalitas, dan viabilitas sperma) lebih rendah dibandingkan kelompok I (kontrol), kelompok III (diberi timbal 0,35 g + vitamin E 1,44 g/hari/ekor/BB), dan kelompok IV (diberi timbal 0,35 g + vitamin E 2,16 g/hari/ekor/BB). Hal ini menunjukkan bahwa pemberian timbal dapat menyebabkan menurunnya kualitas sperma tikus.

Sperma merupakan sel yang dihasilkan oleh fungsi reproduksi pria. Sel tersebut mempunyai bentuk khas yaitu mempunyai kepala, leher dan ekor. Spermatozoa merupakan sel hasil maturasi dari sel epitel germinal yang disebut spermatogonia. Spermatogonia terletak dalam dua sampai tiga lapisan sepanjang batas luar epitel tubulus. Proses perkembangan spermatogonia menjadi sperma disebut spermatogenesis (Guyton 2005). Jika proses spermatogenesis terganggu, maka hasil dari spermatogenesis juga akan terganggu. Salah satu penyebab kerusakan sel ataupun jaringan adalah akibat pembentukan radikal bebas.

Radikal bebas merupakan salah satu bentuk *Reactive Oxygen Species* (ROS). ROS juga mampu secara langsung merusak DNA sperma dengan menyerang basa purin dan pirimidin. ROS juga dapat menginisiasi terjadinya apoptosis dalam sperma, menyebabkan aktifnya enzim-enzim *caspase* untuk mendegradasi DNA sperma (Hayati *et al.* 2006). Beberapa sumber radikal bebas antara lain sumber eksternal yaitu: rokok, polutan lingkungan, radiasi, obat-obatan, sedangkan yang berasal dari sumber internal yaitu: mitokondria, fagosit,

xantin oksidase, arachidonat pathway, olah raga, peradangan, iskemia/reperfusi reaksi yang melibatkan besi dan logam transisi lainnya, salah satunya adalah timbal (Percival 1998).

Timbal merupakan suatu logam berat berwarna kelabu kebiruan dengan titik leleh 327°C dan titik didih 1740°C (Anies 2005). Efek toksik timbal pada fungsi reproduksi laki laki yaitu mempengaruhi proses spermatogenesis sehingga terjadi penurunan kualitas semen dalam jumlah, morfologi, motilitas dan bentuk abnormal spermatozoa (Adnan, 2001). Beberapa penelitian pada hewan percobaan menunjukkan bahwa keracunan Pb dapat mengakibatkan penurunan berat testis dan kerusakan tubulus seminiferus testis tikus putih (Hariono 2006).

Timbal juga dapat menginduksi terjadinya oksidasi lipid, terutama pada rantai asam lemak tidak jenuh. Lipid yang mengalami oksidasi ini akan menjalani reaksi lanjutan secara berantai membentuk produk radikal seperti radikal bebas peroksil, radikal bebas PUFA, dan radikal bebas superoksida. Peningkatan jumlah radikal ini akan mengakibatkan terjadinya dekomposisi asam lemak tidak jenuh menjadi lipid peroksida yang sangat tidak stabil. Peroksidasi lipid juga dapat terdekomposisi oleh senyawa radikal bebas menjadi senyawa malondialdehyde (MDA) (Acharya *et al.* 2003). Peroksidasi lipid akan menyebabkan kerusakan struktur dan terganggunya metabolisme spermatozoa yang berakibat spermatozoa mati. Plumbum asetat yang diberikan secara oral ternyata juga dapat meningkatkan kadar MDA testis, serta menyebabkan perubahan pada gambaran histologi jaringan testis dimana terlihat eksudasi interstisial, degenerasi dan nekrosis sel spermatogenik, sehingga jumlah sperma, motilitas, dan viabilitas terganggu (Zarghami *et al.* 2005).

Pada penghitungan jumlah spermatozoa menunjukkan bahwa hasil uji lanjut BNT jumlah sperma antara kelompok II berbeda nyata dengan kelompok I. Ini menunjukkan bahwa timbal berpengaruh terhadap penurunan jumlah sperma. Penurunan kualitas sperma akibat paparan timbal dikarenakan timbal dapat menembus/melewati *blood testis barrier* maupun secara tidak langsung mempengaruhi kelenjar seks aksesoris (Naha & Chowdury 2005).

Pada perhitungan abnormalitas sperma didapatkan abnormalitas sperma kelompok II berbeda nyata dengan kelompok I, III, dan IV. Terjadi penurunan sperma normal pada kelompok II, karena terpapar oleh timbal. Ini didukung oleh penelitian Acharya *et al.* (2002) dengan menggunakan 30 ekor mencit galur Swiss, 6 mencit sebagai control disuntik dengan akuabides intraperitoneal, 24 ekor mencit diberi dosis tunggal Pb-asetat (200 mg/kg bb) secara intraperitoneal. Setiap minggu 6 ekor tikus yang diberi perlakuan Pb-asetat di matikan dan diambil testisnya untuk diteliti, dari minggu pertama sampai minggu keempat, terbukti terjadi penurunan berat testis dengan peningkatan kejadian abnormalitas spermatozoa dan penurunan jumlah spermatozoa setiap minggu secara konstan.

Pada perhitungan viabilitas sperma didapatkan viabilitas sperma kelompok II tidak berbeda nyata dengan kelompok III, tetapi kelompok II berbeda nyata dengan kelompok I dan IV. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian timbal dapat menurunkan viabilitas sperma tikus. Dalam testis terdapat sel Leydig dimana P450scc memulai tahap enzimatik awal pada steroidogenesis. Setelah itu *pregnenolone* menuju retikulum endoplasma halus yang kemudian dikonversi menjadi progesteron oleh 3β -HSD. *Pregnenolone* dikatalisis oleh P450 17α untuk membentuk *17-hydroxyprogesterone* dan *androstenedione* yang selanjutnya diubah menjadi testosteron oleh 17β -HSD (Iswara 2009). Bila tahapan di atas terganggu dengan adanya radikal bebas dari timbal maka tahapan selanjutnya dalam spermatogenesis dan spermiogenesis sampai menjadi sperma akan terganggu pula, bila terganggu maka viabilitas sperma yang dihasilkan juga tidak akan sempurna.

Adapun mekanisme akibat paparan timbal yang memberikan efek berupa penurunan konsentrasi sperma diantaranya adalah sebagai berikut: a) timbal diduga dapat menghambat Na^+K^- -ATP *pump*, yang akan berdampak terhadap membran sel dan mitokondria dan selanjutnya akan meningkatkan fragilitas sel (bisa lisis). Timbal akan berinteraksi dengan HP2 (*Human Protamine 2*). Selama proses spermatogenesis secara normal, histon akan digantikan oleh protamin yang akan memadatkan dan melindungi DNA sperma. Pada manusia, *zinc* berperan pada stabilitas kromatin sperma dan berikatan dengan HP2. Timbal mempunyai

kemampuan berikatan dengan HP2 dengan cara bersaing dengan *zinc*, karena HP2 mempunyai afinitas yang hampir sama, akan tetapi HP2 juga mempunyai tempat pengikatan tambahan untuk timbal yang tidak berhubungan dengan *zinc*. Interaksi antara timbal dan HP2 akan menurunkan ikatan HP2-DNA melalui beberapa cara, yaitu perubahan langsung pada molekul protein, interaksi langsung dengan DNA, atau memindahkan HP2 dari tempat pengikatannya dengan DNA. Hal tersebut mengakibatkan gangguan pada kondensasi kromatin sperma dan meningkatkan kerusakan DNA, dengan begitu kesuburan akan menurun (Panggabean *et al.* 2008).

Reaksi peroksidasi lipid dapat dihambat dengan penambahan antioksidan, yakni suatu zat yang dapat mengikat senyawa radikal bebas (Wijaya 1996). Salah satu antioksidan yang telah digunakan adalah vitamin E atau tokoferol. Vitamin E mempunyai kemampuan memutuskan berbagai rantai reaksi radikal bebas sebagai akibat kemampuannya memindahkan hidrogen fenolat pada radikal bebas dari asam lemak tidak jenuh ganda yang telah mengalami peroksidasi (Hariyatmi 2006). Verma *et al.* (2001) mendapatkan pemberian vitamin E 2 mg/hari per oral selama 45 hari mampu meningkatkan aktivitas enzim *superoxide dismutase*, *glutathione peroxidase*, dan *catalase*, serta menurunkan kadar MDA testis mencit yang dipaparkan aflatoksin 25 g/hari per oral selama 45 hari.

Vitamin E berperan sebagai antioksidan dan dapat melindungi kerusakan membran biologis akibat radikal bebas. Vitamin E melindungi asam lemak tidak jenuh pada membran fosfolipid (Gunawan 2007). Fungsi utama vitamin E di dalam tubuh adalah sebagai antioksidan alami yang membuang radikal bebas dan senyawa oksigen. Secara partikular, vitamin E juga penting dalam mencegah peroksidasi membran asam lemak tak jenuh (Lyn 2006). Menurut Linder (2006), vitamin E merupakan agen pendorong atau pemacu fertilitas, karena dapat menormalkan epitel tubuli seminiferi.

Berdasarkan hasil uji lanjut BNT menunjukkan bahwa jumlah sperma kelompok I berbeda nyata dengan kelompok III. Hal ini dikarenakan pada pemberian timbal dan vitamin E dosis 1,44 mg selama 14 hari belum mampu mempertahankan jumlah sperma secara signifikan. Jumlah sperma kelompok I

tidak berbeda nyata dengan kelompok IV, hal ini menunjukkan bahwa pemberian vitamin E dosis 2,16 mg mampu mempertahankan jumlah sperma yang dipapar oleh timbal. Pemberian vitamin E pada kelompok IV lebih efektif dalam mempertahankan jumlah sperma dibandingkan kelompok III.

Vitamin E memiliki kemampuan untuk menghentikan lipid peroksida dengan cara menyumbangkan satu atom hidrogennya dari gugus OH kepada lipid peroksil yang bersifat radikal sehingga menjadi vitamin E yang kurang reaktif dan tidak merusak (Hariyatmi 2004). Hal tersebut sesuai dengan pemberian vitamin E pada kelompok III dan IV, dimana pemberian vitamin E dengan dosis bertingkat dapat mempertahankan jumlah sperma tikus, meskipun dosis yang diberikan pada kelompok IV menunjukkan hasil yang lebih tinggi.

Berdasarkan uji BNT abnormalitas sperma menunjukkan kelompok IV tidak berbeda nyata dengan kelompok I dan III. Hal ini menunjukkan bahwa penambahan vitamin E dapat menangkal radikal bebas yang disebabkan oleh timbal. Linder (2006) menambahkan bahwa pemberian vitamin E dapat melindungi sperma dari radikal bebas, sehingga abnormalitas pada sperma dapat dicegah.

Saat terdapat radikal bebas, lipid peroksida meningkat karena adanya reaksi antara lipid dengan radikal bebas. Pada tahap awal reaksi terjadi pelepasan hidrogen dari asam lemak tidak jenuh secara homolitik sehingga terbentuk radikal alkil yang terjadi karena adanya inisiator (panas, oksigen aktif, logam atau cahaya). Pada keadaan normal radikal alkil cepat bereaksi dengan oksigen membentuk radikal peroksi dimana radikal peroksi ini bereaksi lebih lanjut dengan asam lemak tidak jenuh membentuk hidroproksida dengan radikal alkil, kemudian radikal alkil yang terbentuk ini bereaksi dengan oksigen. Dengan demikian reaksi otoksidasi adalah reaksi berantai radikal bebas. Oleh karena membran sel mitokondria kaya akan lipid yang peka terhadap serangan radikal bebas (Lyn 2006).

Pada perhitungan viabilitas sperma menunjukkan bahwa hasil uji lanjut BNT antara kelompok I berbeda nyata dengan kelompok III. Hal ini dikarenakan pemberian timbal dan vitamin E dosis 1,44 mg belum mampu mempertahankan

viabilitas sperma tikus yang dipapar timbal. Hal tersebut dikarenakan pemberian vitamin E hanya berlangsung selama 14 hari saja. Penghitungan viabilitas sperma kelompok I tidak berbeda nyata dengan kelompok IV, karena pemberian vitamin E dosis 2,16 g/hari/ekor/BB hasilnya lebih baik dalam menangkal radikal bebas dari timbal daripada pemberian vitamin E dosis 1,44 g/hari/ekor/BB. Sehingga viabilitas sperma tikus dapat dipertahankan.

Antioksidan vitamin E mampu menangkal radikal bebas dengan baik, sehingga memperlancar tahapan-tahapan spermatogenesis yang dimulai dari proses konversi testosteron yang bermula dari transfer kolesterol ke dalam membran mitokondria oleh PBR dan StAR sehingga berhasil dikonversi menjadi *pregnenolone* yang dikatalisis oleh P450_{scc} pada membran dalam mitokondria. Proses selanjutnya dalam testis terdapat sel Leydig dimana P450_{scc} memulai tahap enzimatis awal pada steroidogenesis. Setelah itu *pregnenolone* menuju retikulum endoplasma halus yang kemudian dikonversi menjadi progesteron oleh 3 β -HSD. *Pregnenolone* dikatalisis oleh P450 17 α untuk membentuk 17-*hydroxyprogesterone* dan *androstenedione* yang selanjutnya diubah menjadi testosteron oleh 17 β -HSD (Iswara 2009). Bila tahapan di atas terganggu dengan adanya radikal bebas dari timbal maka tahapan selanjutnya dalam spermatogenesis dan spermiogenesis sampai menjadi sperma akan terganggu pula, bila terganggu maka viabilitas sperma yang dihasilkan juga tidak akan sempurna. Sehingga dengan penambahan vitamin E maka viabilitas sperma yang dipapar timbal tetap terjaga.

Pemberian vitamin E dosis 100 mg/kg/hari tidak hanya berefek pada peningkatan berat testis, jumlah sperma, motilitas sperma, dan produksi estrogen, tetapi juga meningkatkan kelangsungan hidup dan perkembangan sperma tikus (Momeni *et al.* 2009). Hal yang sama dikemukakan oleh Lyn (2006) bahwa pemberian vitamin E akan mengakibatkan radikal bebas yang dibentuk akibat paparan timbal bisa distabilkan dan tidak reaktif sehingga jumlah, normalitas, dan viabilitas sperma dapat dipertahankan.

Paparan timbal per oral pada kelompok II selama 14 hari dapat menyebabkan berkurangnya kualitas sperma, dalam hal ini jumlah, abnormalitas,

dan viabilitas sperma. Untuk mempertahankan jumlah sperma, abnormalitas, dan viabilitas sperma, pemberian vitamin E 1,44 mg pada kelompok III mampu menangkal radikal bebas tetapi belum menunjukkan hasil yang signifikan. Pemberian vitamin E 2,16 mg/hari pada kelompok IV lebih efektif untuk menangkal radikal bebas daripada kelompok III untuk meningkatkan kualitas sperma. Hal ini menunjukkan bahwa vitamin E dengan dosis bertingkat menunjukkan hasil lebih baik untuk mencegah radikal bebas dari timbal karena vitamin E memiliki kemampuan menghentikan lipid peroksida dengan cara menyumbangkan satu atom hidrogennya dari gugus OH kepada lipid peroksil yang bersifat radikal sehingga menjadi lipid peroksida yang kurang reaktif dan tidak merusak.



BAB V

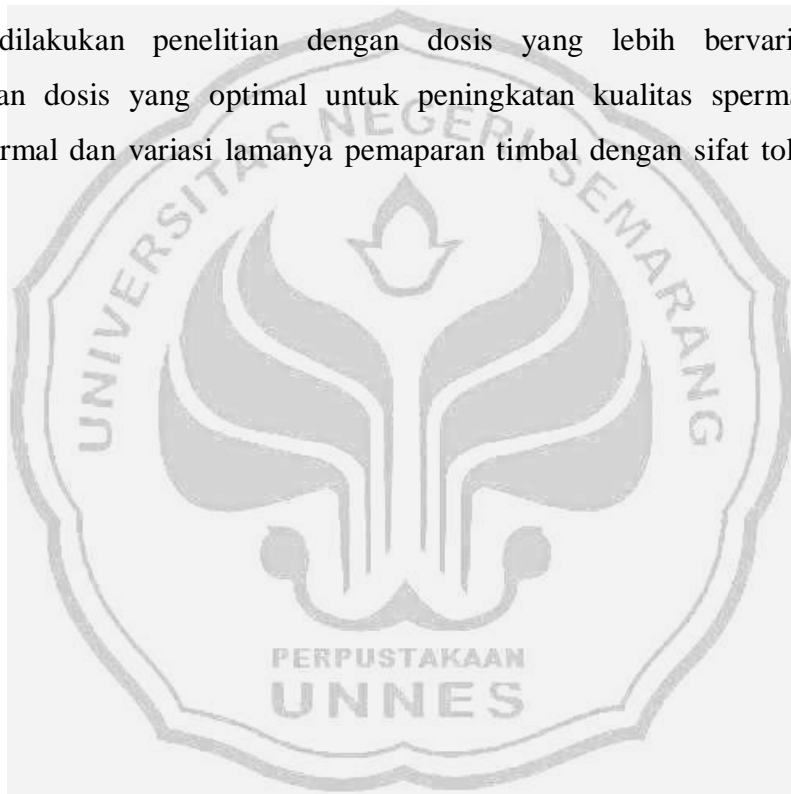
SIMPULAN DAN SARAN

A. Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan, dapat disimpulkan bahwa pemberian vitamin E berpengaruh mempertahankan kualitas sperma tikus putih galur wistar yang dipapar timbal.

B. Saran

Perlu dilakukan penelitian dengan dosis yang lebih bervariasi agar mendapatkan dosis yang optimal untuk peningkatan kualitas sperma sampai ambang normal dan variasi lamanya pemaparan timbal dengan sifat toksik yang berbeda.



Daftar Pustaka

- Acharya UR , Acharya S, & Mishra M. 2003. Lead acetate induce cytotoxicity in male germinal cells of swiss mice. *Industrial Health* 41:291-294
- Adnan S. 2001. Pengaruh pajanan timbal terhadap kesehatan dan kualitas semen pekerja laki-laki. *Majalah Kedokteran Indonesia* 51 (5):168-174.
- Aggarwal A, Prabakaran S, & Said TM. 2005. Oxidative stress and antioxidants in male infertility : a difficult balance. *Iranian J. Rep. Med* (3):1-8
- Anies. 2005. *Penyakit akibat kerja*. Jakarta : Elex Media Komputindo.
- _____ 2005. *Mewaspadaai penyakit lingkungan berbagai gangguan kesehatan akibat pengaruh lingkungan*. Jakarta : Elex Media Komputindo
- Antonio G, Joao RS, & Maria LP. 2004. Effect of lead clorida on spermatogenesis and sperm parameters in mice. *Asian J. Androl* 6 (3):237-241
- Hariono B. 2006. Efek pemberian plumbum (timah hitam) organik pada tikus putih (*Rattus norvegicus*). *J. Sain Vet.* 24 (1)
- Cernochova D & Kamarad V. 1992. Toxic effects of lead of mice testicles after its administration with drinking water. *Acta Olomue : Palacki University Medical Fac.* 133:9-13
- Darmono. 1995. *Logam dalam Sistem Biologi Makhluk Hidup*. UI Press : Jakarta.
- _____ 2001. *Lingkungan Hidup dan Pencemaran : Hubungannya dengan Toksikologi Senyawa Logam*. UI-Press : Jakarta.
- Dutta-Roy AK, Gorden MJ, Campbell FM, Duthie GG, & James WPT. 1994. Vitamin E Requirements, Transport, and Metabolism: Role of a-Tocoferol-Binding Proteins. *J Nutr Biochem* 5:562 – 570.
- Fauzi TM. 2008. Pengaruh Pemberian Timbal Asetat Dan Vitamin C Terhadap Kadar Malondialdehyde dan Spermatozoa Di Dalam Sekresi Epididimis Mencit Albino (*Mus mucus L*) Strain Balb/C (*Tesis*). Medan : Universitas Sumatra Utara
- Goodman A & Gilman H. 2007. *Dasar Farmakologi Terapi Edisi ke-10*. Jakarta: EGC
- Gunawan SG. 2007. *Farmakologi dan Terapi*, Edisi 5. FKUI. Jakarta. 786-787.

- Gupta S, Pandey R, Katyai R, Aggarwal HK, Aggarwal RP, & Aggarwal SK. 2005. Lipid peroxide levels and antioxidant status in alcoholic liver disease. *Ind J Clinic Biochem* 20 (1):67-71
- Guyton AC & Hall JE. 2005. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran Edisi ke-11*. Jakarta: EGC
- Guzman MJ, Mahan DC & Pate JL. 2000. Effect of dietary selenium and vitamin E on spermatogenic development in boars. *Journal of Animal Science* 78:1537-1543.
- Hafez ESE. 2000. *Reproduction in Farm Animals*. Ed ke-7. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Hariyatmi. 2004. Kemampuan vitamin E sebagai antioksidan terhadap radikal bebas pada usia lanjut. *Jurnal MIPA UMS* 14:52-60.
- Hayati A, Rahmaninta DA, Pidada IB. 2005. Spermatozoa motility and morphological recovery process in mice (*Mus musculus*) after the induction of 2-methoxyethanol. *J of Folia Medica Indonesiana* 41(2): 90-95
- _____, Mangkoewidjojo S, Hinting A, Moedjopawiro S. 2006. Hubungan kadar MDA spermatozoa dengan integritas membran spermatozoa tikus (*Rattus norvegicus* L) setelah pemaparan 2-methoxyethanol. *J Berk. Penel* 11: 151-154
- Hermawanto HH & Hadiwidjaja DB. 2000 *Analisis Sperma pada Infertilitas Pria*. Malang www.kompas.com/pus-3.htm
- Hidayatulloh S, Pranoto & Masykur A. 2002. Alternatif pemanfaatan karbon aktif bagasse untuk menurunkan kadar ion Pb^{2+} dan zat warna tekstil. *Jurnal Kimia Lingkungan* 4 (1):45-53.
- Ilyas S. 2007. Analysis Of Protein Fas Expression and Caspase 3 Activated At The Supression Phase to Sperm Quantity By Androgen/Progestin Combination. *Jurnal Biologi Sumatera*. 2(2): 45-47
- Iswara A. 2009. Pengaruh pemberian antioksidan vitamin C dan E terhadap kualitas spermatozoa tikus putih terpapar *allethrin* (Skripsi) . Semarang : Fakultas MIPA Universitas Negeri Semarang
- [KPBB] Komisi Penghapusan Bensin Bertimbal. 2006. Bahaya Bensin Bertimbal. On line at <http://www.kpbb.org/pengaruh-timbal-pada-jumlah-sperma/> [diakses tanggal 1 November 2012]

- Linder MC. 2006. Biokimia Nutrisi dan Metabolisme. Diterjemahkan oleh A. Parakkasi. UI Press, Jakarta.
- Lyn P. 2006. Lead toxicity part 2 : the role of free radical damage and the use of antioxidants in the pathology and treatment of lead toxicity. *Alternative Medicine Review* 11 (2):114-127.
- Massanyi P, Lucac N, Macarevich AV, Chrenech P, Forgach Z, Zakrzweski M, Stewart R. 2007. Lead Induced Alteration in rats Kidneys and Testes in Vivo. *J Environ Sci Health* 42 (5):671
- Mc. Murry ST. 1995. Sensitivity of selected immunologi, hemological, and reproductive parameters in the cotton rat to subchronic lead exposure, *journal of wildlife diseases*. 31:2
- Mc Lachland RL, Wreford NG, L O'Donnell, DM De Kretser, & DM Robertson. 1996. Endocrine Regulation of Spermatogenesis ; Independent Roles for Testosteron and FSH. *Journal of Endocrinology* 148:1-9
- Milczarek A. 2005. Vitamin E Disease Mechanism IV : Free Radical Damage an Antioxidant Drug.
- Momeni, Hamid R, Mehranjan, Malek S, Abnosi MH, Mahmoodi, & Monireh. 2009. Effects of vitamin E on sperm parameters and reproductive hormones in developing rats treated with para-nonylphenol. *Iranian Journal of Reproductive Medicine* 7 (3):111-116.
- Mostafa MH, Osfor, Hoda SI, Yousria AM, Seham MA, Amal S & Amany MH. 2010. Effect of alpha acid and vitamin e on heavy metals intoxication in male albino rats. *Journal of America Science*. 6 (8):56-63.
- Naha N & Chowdury AR. 2005. Toxic effect of lead on human spermatozoa: a study among pigment factory workers. *Indian Journal Of Occupational And Environmental Medicine*. 9(3):118-123.
- Naria E. 2005. Mewaspada Dampak Bahan Pencemar Timbal (Pb) di Lingkungan Terhadap Kesehatan. *jurnal komunikasi penelitian*. 17(4): 2
- Panggabean PCT, Sylvia S, & July I. 2008. Efek Pajanan Timbal terhadap Infertilitas Pria. *Jkm*. 8(1): 87 – 93
- Palar H. 2004. *Pencemaran dan Toksikologi Logam Berat*. Jakarta : Rineka Cipta
- Partodiharjo S. 1992. Ilmu Reproduksi Hewan. Jakarta : Mutiara Sumber Widya
- Percival M. 1998. Antioxidants. *J. Clinical Nutrition Insights* 31(10):1-4

- Pineda MH & Faulkner LC. 2003. The biology of sex. Di dalam McDonald LE, editor. *Veterinary Endocrinology And Reproduction*. London: Lea & Febiger, hlm: 208-234
- Quratul'ainy S. 2006. Pengaruh pemberian vitamin E terhadap jumlah spermatozoa mencit jantan strain balb/c yang diberi paparan asap rokok (*Skripsi*). Semarang : Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro
- Riyadina W. 1997. Pengaruh pencemaran plumbum terhadap kesehatan. Media Litbangkes. Balitbang Departemen Kesehatan RI. Jakarta
- Schatten H & Constantinescu GM. 2007. *Comparative Reproductive Biology*. Ames : Blackwell Publishing.
- Shannon MW. 1998. Lead : *clinical management of poisoning and drug overdose third edition*. Philadelphia : WB saunder. 767-784
- Slamet J S. 2009. *Kesehatan Lingkungan*. Yogyakarta : Gajah Mada University Press
- Soehadi K & Arsyad KM. 1983. *Analisis Sperma*. Surabaya : Airlangga University Press.
- Sudarmaji, Mukono J & Corie IP. 2006. Toksikologi Logam Berat B3 dan Dampaknya Terhadap Kesehatan. *jurnal kesehatan lingkungan*. 2(2): 129-142
- Toelihere MR. 2003. Fisiologi Reproduksi pada Ternak. Penerbit Angkasa. Bandung.
- Venugopal B & Lukkey TD. 1978. Metal Toxicity in Mammals. New York Plenum Pers 2:185-195.
- Wijaya, A. 1996. *Radikal Bebas dan Paramater Status Antioksidan*. Forum Diagnostikum no.1. Laboratorium Klinik Prodia. Jakarta
- World Health Organization. 1995. *Environmental health criteria its inorganic lead*. Geneva: The United Nation Environment Programe.
- Zarghami N & Khosrowbetgi A. 2005. Seminal plasma levels isoprostane, malondialdehyde and total homocysteine in normozoospermic and anthozoospermic males. *Ind J. Clinic. Biochem* 20 (2):86-91

LAMPIRAN 1**JUMLAH SPERMATOZOA**

perlakuan	ulangan (juta/ml)					total	rata-rata
	1	2	3	4	5		
A	16	16	15	13	15	75	15
B	10	13	13	11	12	59	11,8
C	12	14	14	13	13	66	13,2
D	16	15	13	14	14	72	14,4
Total						272	54,4

SPERMA ABNORMAL

Perlakuan	ulangan (juta/ml)					total	rata-rata
	1	2	3	4	5		
A	8	7,33	9	7	5,67	37	7,4
B	37,33	31,33	34,67	34,33	30,33	167,99	33,598
C	15	18,33	17	14,33	12	76,66	15,332
D	8,33	12,67	9,33	13	16,67	60	12
total						341,65	68,33

VIABILITAS SPERMATOZOA**a. Spermatozoa hidup**

perlakuan	ulangan (juta/ml)					total	rata-rata
	1	2	3	4	5		
A	98	91	96	93	95	473	94,6
B	77	86	83	79	87	412	82,4
C	87	94	82	83	91	437	87,4
D	89	96	93	90	92	460	92
Total						1782	356,4

1. PERHITUNGAN ANAVA SATU JALAN JUMLAH SPERMATOZOA

- Derajat kebebasan (db)
 - Db total = $(t \times r) - 1$
= 19
 - Db perlakuan = $(t - 1)$
= 3
 - Db galat = $t(r - 1)$
= 16

Keterangan : t= perlakuan
r= ulangan

- Faktor koreksi (FK)

$$FK = \frac{(\sum \sum X)^2}{n}$$

$$= \frac{(272)^2}{25} = 2959,36$$

n = jumlah seluruh pengamatan

- Jumlah kuadrat (JK)

$$JK \text{ total} = \sum \sum X^2 - FK$$

$$= (16^2 + 16^2 + 15^2 + 13^2 + \dots + 10^2) - 2959,36$$

$$= 3750 - 2959,36$$

$$= 790,64$$

$$JK \text{ perlakuan} = \frac{\sum (\sum X)^2}{r} - FK$$

$$= \left(\frac{75^2}{5} + \frac{59^2}{5} + \frac{66^2}{5} + \frac{72^2}{5} \right) - 2959,36$$

$$= 769,84$$

$$JK \text{ galat} = JK \text{ total} - JK \text{ perlakuan}$$

$$= 790,64 - 769,84$$

$$= 20,8$$

- Kuadrat tengah (KT)

$$KT \text{ perlakuan} = \frac{JK \text{ perlakuan}}{db \text{ perlakuan}}$$

$$= \frac{769,84}{3}$$

$$= 256,61$$

$$KT \text{ galat} = \frac{JK \text{ galat}}{db \text{ galat}}$$

$$= \frac{20,8}{16}$$

$$= 1,3$$

- F hitung

$$\begin{aligned}
 F \text{ hitung} &= \frac{KT_{perlakuan}}{KT_{galat}} \\
 &= \frac{256,61}{1,3} \\
 &= 197,39
 \end{aligned}$$

Tabel Ringkasan Anava

SK	Db	JK	KT	FH	FT 5%
Perlakuan	3	769,84			
Galat	16	20,8	256,61	197,39	3,49
Total	19	790,64	1,3		

F hitung (197,39) > F tabel (3,49), maka hipotesis diterima. Nilai ujinya dinyatakan ada pengaruh vitamin E terhadap jumlah spermatozoa

UJI LANJUT BNT JUMLAH SPERMATOZOA

$$\begin{aligned}
 BNT_{\alpha=5\%} = t_{1/2=5\%}, db &= \frac{\sqrt{2} \text{ KT Galat}}{r} \\
 &= 2,179 \times \frac{\sqrt{2 \times 1,3}}{5} \\
 &= 2,179 \times 0,7211 \\
 &= 1,5712
 \end{aligned}$$

- Perbandingan perlakuan A terhadap kelompok yang lain
 A-B = 15-11,8 = 3,2 > 1,5712 (berbeda nyata)
 A-C = 15-13,2 = 1,8 > 1,5712 (berbeda nyata)
 A-D = 15-14,4 = 0,6 < 1,5712 (tidak berbeda nyata)
- Perbandingan perlakuan B terhadap kelompok yang lain
 B-C = 11,8-13,2 = 1,4 < 1,5712 (tidak berbeda nyata)
 B-D = 11,8-14,4 = 2,6 > 1,5712 (berbeda nyata)
- Perbandingan perlakuan C terhadap kelompok yang lain
 C-D = 13,2-14,4 = 1,2 < 1,5712 (tidak berbeda nyata)

Tabel Uji BNT

Kelompok	Rerata	A	B	C	D
A	15±1,22				
B	11,8±1,303	3,2*			
C	13,2±0,83	1,8*	1,4**		
D	14,4±1,14	0,6**	2,6*	1,2**	

Keterangan : *berbeda nyata
 ** tidak berbeda nyata

2. PERHITUNGAN ANAVA SATU JALAN ABNORMALITAS SPERMA

- Derajat kebebasan (db)
 - Db total = $(t \times r) - 1$
= 19
 - Db perlakuan = $(t - 1)$
= 3
 - Db galat = $t(r - 1)$
= 16

Keterangan : t = perlakuan
r = ulangan

- Faktor koreksi (FK)

$$FK = \frac{(\sum \sum X)^2}{n}$$

$$= \frac{(341,65)^2}{25} = 4668,988$$

n = jumlah seluruh pengamatan

- Jumlah kuadrat (JK)

$$JK \text{ total} = \sum \sum X^2 - FK$$

$$= (8^2 + 7,33^2 + 9^2 + 7^2 + \dots + 16,67^2) - 4668,988$$

$$= 7918,617 - 4668,988$$

$$= 3249,629$$

$$JK \text{ perlakuan} = \frac{\sum (\sum X)^2}{r} - FK$$

$$= \left(\frac{37^2}{5} + \frac{167,99^2}{5} + \frac{76,66^2}{5} + \frac{60^2}{5} \right) - 4668,988$$

$$= 3144,338$$

$$JK \text{ galat} = JK \text{ total} - JK \text{ perlakuan}$$

$$= 3249,629 - 3144,291$$

$$= 105,338$$

- Kuadrat tengah (KT)

$$KT \text{ perlakuan} = \frac{JK \text{ perlakuan}}{db \text{ perlakuan}}$$

$$= \frac{3144,291}{3}$$

$$= 1048,097$$

$$KT \text{ galat} = \frac{JK \text{ galat}}{db \text{ galat}}$$

$$= \frac{105,338}{16}$$

$$= 6,583$$

- F hitung

$$F \text{ hitung} = \frac{KT \text{ perlakuan}}{KT \text{ galat}}$$

$$= \frac{1048,097}{6,583}$$

$$= 159,212$$

Tabel Ringkasan Anava

SK	Db	JK	KT	FH	FT 5%
Perlakuan	3	3249.629			
Galat	16	3144,291	1048,097	159,212	3,49
Total	19	105,338	6,583		

F hitung (159,212) > F tabel (3,49), maka hipotesis diterima. Nilai ujinya dinyatakan ada pengaruh vitamin E terhadap spermatozoa motil

UJI LANJUT BNT ABNORMALITAS SPERMA

$$BNT_{\alpha=5\%} = t_{1/2=5\%, db} = \frac{\sqrt{2 \text{ KT Galat}}}{r}$$

$$= 2,179 \times \frac{\sqrt{2 \times 6,583}}{5}$$

$$= 2,179 \times 1,6227$$

$$= 3,535$$

- Perbandingan perlakuan A terhadap kelompok yang lain
 $A - B = 7,4 - 33,598 = 26,198 > 3,53$ (berbeda nyata)
 $A - C = 7,4 - 15,332 = 7,932 > 3,53$ (berbeda nyata)
 $A - D = 7,4 - 12 = 4,6 > 3,53$ (tidak berbeda nyata)
- Perbandingan perlakuan B terhadap kelompok yang lain
 $B - C = 33,598 - 15,332 = 18,266 > 3,53$ (berbeda nyata)
 $B - D = 33,598 - 12 = 21,598 > 3,53$ (berbeda nyata)
- Perbandingan perlakuan C terhadap kelompok yang lain
 $C - D = 15,332 - 12 = 3,332 < 3,53$ (tidak berbeda nyata)

Tabel Uji BNT

Kelompok	rerata	A	B	C	D
A	7,4±1,23				
B	33,59±2,81	26,198*			
C	15,33±2,45	7,932*	18,266*		
D	12±3,31	4,6*	21,598*	3,332**	

Keterangan : *berbeda nyata
 ** tidak berbeda nyata

3. PERHITUNGAN ANAVA SATU JALAN VIABILITAS SPERMA Sperma Hidup

- Derajat kebebasan (db)

Db total	= (t x r)-1
	= 19
Db perlakuan	= (t - 1)
	= 3
Db galat	= t (r - 1)
	= 16

Keterangan : t = perlakuan
r = ulangan

- Faktor koreksi (FK)

$$FK = \frac{(\sum \sum X)^2}{n}$$

$$= \frac{(1782)^2}{25} = 127020,96$$

n = jumlah seluruh pengamatan

- Jumlah kuadrat (JK)

$$JK \text{ total} = \sum \sum X^2 - FK$$

$$= (98^2 + 91^2 + 96^2 + 93^2 + \dots + 92^2) - 127020,96$$

$$= 159448 - 127020,96$$

$$= 32427,04$$

$$JK \text{ perlakuan} = \frac{\sum (\sum X)^2}{r} - FK$$

$$= \left(\frac{473^2}{5} + \frac{412^2}{5} + \frac{437^2}{5} + \frac{460^2}{5} \right) - 127020,96$$

$$= 32186,84$$

$$JK \text{ galat} = JK \text{ total} - JK \text{ perlakuan}$$

$$= 32427,04 - 32186,94$$

$$= 240,1$$

- Kuadrat tengah (KT)

$$KT \text{ perlakuan} = \frac{JK \text{ perlakuan}}{db \text{ perlakuan}}$$

$$= \frac{32186,94}{3}$$

$$= 10728,98$$

$$KT \text{ galat} = \frac{JK \text{ galat}}{db \text{ galat}}$$

$$= \frac{240,1}{16}$$

$$= 15,006$$

- F hitung

$$F \text{ hitung} = \frac{KT \text{ perlakuan}}{KT \text{ galat}}$$

$$= \frac{10728,98}{15,006}$$

$$= 714,967$$

Tabel Ringkasan Anava

SK	Db	JK	KT	FH	FT 5%
Perlakuan	3	32186,94			
Galat	16	240,1	10728,98	714,967	3,49
Total	19	32427,04	15,006		

F hitung (714,967) > F tabel (3,49), maka hipotesis diterima. Nilai ujinya dinyatakan ada pengaruh vitamin E terhadap viabilitas sperma hidup.

UJI LANJUT BNT VIABILITAS SPERMA HIDUP

$$BNT_{\alpha=5\%} = t_{1/2=5\%, db} = \frac{\sqrt{2 \text{ KT Galat}}}{r}$$

$$= 2,179 \times \frac{\sqrt{2 \times 15,0062}}{5}$$

$$= 2,179 \times 2,45$$

$$= 5,338$$

- Perbandingan perlakuan A terhadap kelompok yang lain
 A – B = 94,6 – 82,4 = 12,2 > 5,338 (berbeda nyata)
 A – C = 94,6 – 87,4 = 7,2 > 5,338 (berbeda nyata)
 A – D = 94,6 – 92 = 2,6 < 5,338 (tidak berbeda nyata)
- Perbandingan perlakuan B terhadap kelompok yang lain
 B – C = 82,4 – 87,4 = 5 < 5,338 (tidak berbeda nyata)
 B – D = 82,4 – 92 = 9,6 > 5,338 (berbeda nyata)
- Perbandingan perlakuan C terhadap kelompok yang lain
 C – D = 87,4 – 92 = 4,6 < 5,338 (tidak berbeda nyata)

Tabel Uji BNT

kelompok	Rerata	A	B	C	D
A	94,6±2,71				
B	82,4±4,33	12,2*			
C	87,4±5,13	7,2*	5**		
D	92±2,74	2,6**	9,6*	4,6**	

Keterangan : *berbeda nyata

** tidak berbeda nyata

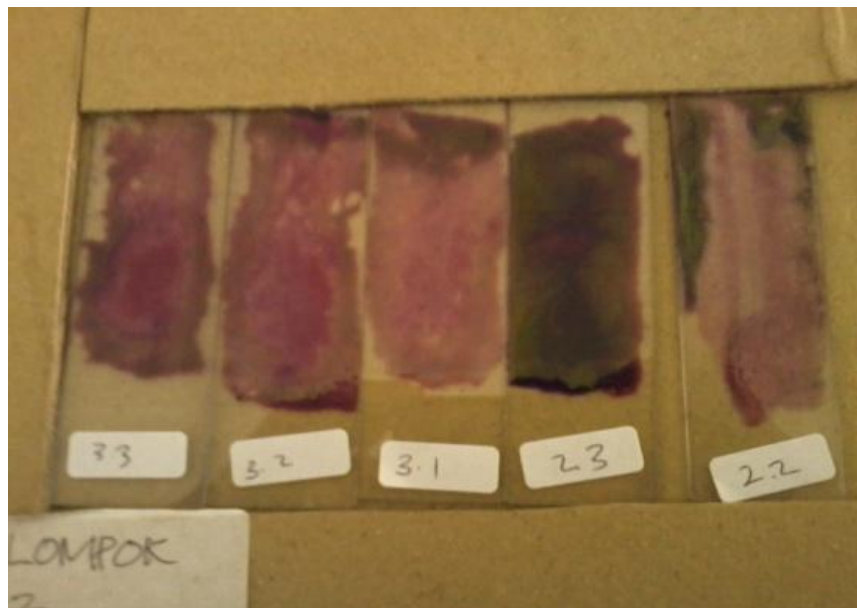
Lampiran 2. Dokumentasi penelitian



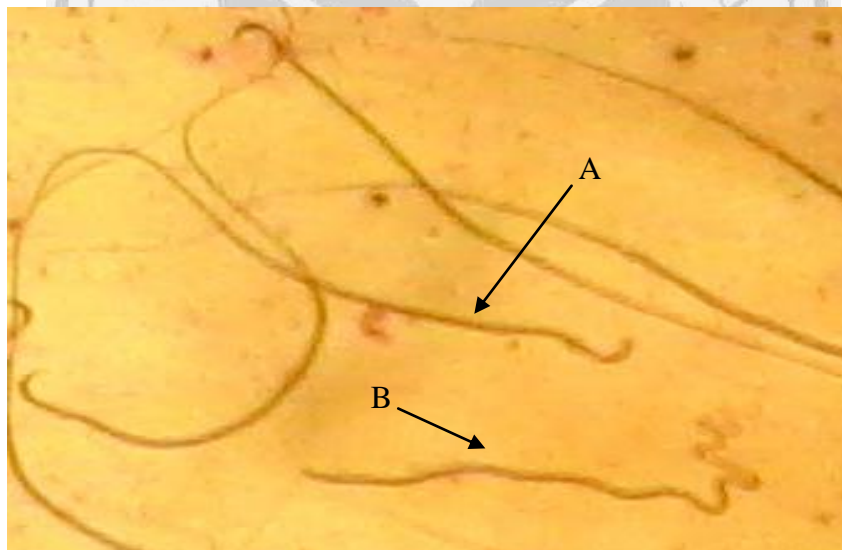
1. Hewan percobaan



2. Pengambilan sperma dari Vas deferens



3. Preparat apus sperma dengan pewarna giemsa



4. Morfologi sperma (A. Sperma normal, B. Sperma abnormal tanpa kepala dan berekor panjang)



5. Sperma tanpa badan (abnormal)



6. Sperma tanpa kepala (abnormal)