

**PENGARUH LAMA PAPARAN MERKURI PERORAL TERHADAP
KONSENTRASI SPERMATOZOA**

Studi Eksperimental terhadap Tikus Jantan Wistar

Skripsi

Untuk memenuhi sebagian persyaratan
Mencapai gelar Sarjana Kedokteran



Diajukan oleh :

Nur Khusnina Rukhaya

30101900147

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS ISLAM SULTAN AGUNG
SEMARANG**

2023

SKRIPSI
PENGARUH LAMA PAPARAN MERKURI PERORAL TERHADAP
KONSENTRASI SPERMATOZOA

Studi Eksperimental terhadap Tikus Jantan Wistar

Yang dipersiapkan dan disusun oleh:

Nur Khusnina Rukhaya

30101900147

Telah dipertahankan di depan Dewan Penguji

pada tanggal 31 Januari 2023

dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Susunan Tim Penguji

Pembimbing I



dr. Meidona Nurul Milla MCE

Anggota Tim Penguji



Dr. Drs. Israhnanto Isradji. M.Si

Pembimbing II



dr. Ulfah Dian Indrayani M.Sc



dr. Lusito Sp.PD - KGH

Semarang, 31 Januari 2023



Fakultas Kedokteran

Universitas Islam Sultan Agung

Dekan,



Dr. dr. Setyo Trisnadi, S.H., Sp.K

HALAMAN PENGESAHAN

**PENGARUH LAMA PAPARAN MERKURI PERORAL TERHADAP
KONSENTRASI SPERMATOZOA**

Studi Eksperimental terhadap Tikus Jantan Wistar

Yang dipersiapkan dan disusun oleh

Nur Khusnina Rukhaya

30101900147

Telah disetujui oleh:

Pembimbing I



dr. Meidona Nurul Milla, MCE

Tanggal : 26 Januari 2023

Pembimbing II



dr. Ulfah Dian Indrayani, M.Sc

Tanggal : 26 Januari 2023

SURAT PERNYATAAN

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama Mahasiswa : Nur Khusnina Rukhaya

NIM : 30101900147

Dengan ini menyatakan bahwa Skripsi yang berjudul:

“PENGARUH LAMA PAPARAN MERKURI PERORAL TERHADAP KONSENTRASI SPERMATOZOA

Studi Eksperimental terhadap Tikus Jantan Wistar”

Adalah benar hasil karya saya dan penuh kesadaran bahwa saya tidak melakukan tindakan plagiasi atau mengambil alih seluruh atau sebagian besar karya tulis orang lain tanpa menyebutkan sumbernya. Jika saya terbukti melakukan tindakan plagiasi, saya bersedia menerima sanksi sesuai dengan aturan yang berlaku.

Semarang, 28 Januari 2023



Nur Khusnina Rukhaya

PRAKATA

Assalamu'alaikum Warahmatullahi Wabarakatuh

Alhamdulillahirrabbi lalamin, puji syukur kehadiran Allah SWT atas semua anugerah dan rahmat-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan Skripsi dengan judul **“PENGARUH LAMA PAPARAN MERKURI PERORAL TERHADAP KONSENTRASI SPERMATOZOA Studi Eksperimental terhadap Tikus Jantan Wistar”**. Shalawat serta salam penulis haturkan pada junjungan Nabi Muhammad SAW yang senantiasa ikut membantu menegakkan sunnahnya.

Skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar sarjana kedokteran di Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang dengan pendanaan penelitian berasal dari Dana Internal 2022. Pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan ucapan banyak terima kasih kepada:

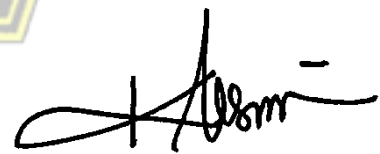
1. Dr. dr. Setyo Trisnadi, Sp.KF.,S.H., selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
2. dr. Meidona Nurul Milla, MCE dan dr. Ulfah Dian Indrayani, M. Sc., selaku dosen pembimbing I dan II yang telah dengan sabar meluangkan waktu dan pikiran untuk mengarahkan dan membimbing penulis hingga terselesaikannya Skripsi ini.
3. Dr. Drs. Israhnanto Isradji, M. Si dan dr. Lusito Sp.PD., selaku dosen penguji I dan II yang telah berkenan memberikan pengarahan dan bimbingan kepada penulis dalam penyelesaian Skripsi ini.

4. Kepala Integrated Biomedical Laboratory (IBL) dan staf pengurus Laboratorium Biologi dan Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang yang telah membantu dalam penelitian ini.
5. Ibunda Hj. Silfana Nurul Khikmah, S.E., dan Ayahanda Alm. H. Sururi, S.H. M.H., dan keluarga yang telah memberikan doa, semangat, dan dukungan dengan penuh kasih sayang dalam proses pengerjaan Skripsi ini.
6. Semua pihak yang telah banyak membantu dan mendukung selama penelitian hingga penyelesaian skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa Skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan. Oleh karena itu, penulis sangat berterimakasih atas kritik dan saran yang bersifat membangun. Besar harapan saya Skripsi ini dapat bermanfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan di masa depan serta bermanfaat bagi pembaca.

Wassalamu'alaikum Warahmatullahi Wabarakatuh

Semarang, 28 Januari 2023



Nur Khusnina Rukhaya

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PERSETUJUAN.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
SURAT PERNYATAAN	iv
PRAKATA.....	v
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xii
DAFTAR SINGKATAN DAN ISTILAH	xiii
INTISARI.....	xiv
BAB 1	1
PENDAHULUAN	1
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.....	3
1.4. Manfaat Penelitian.....	4
1.4.1. Manfaat Teoritis.....	4
1.4.2. Manfaat Praktis.....	4
BAB II	5
TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1. Spermatozoa.....	5
2.1.1. Definisi	5
2.1.2. Morfologi Spermatozoa	5
2.1.3. Spermatogenesis	6
2.1.4. Analisis Sperma	9
2.1.5. Konsentrasi Spermatozoa	9
2.1.6. Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Konsentrasi Spermatozoa	10

2.1.6.1.	Faktor Internal	10
2.1.6.2.	Faktor Eksternal	12
2.2.	Merkuri Klorida (HgCl ₂)	14
2.2.1.	Definisi	14
2.2.2.	Identifikasi Merkuri Klorida (Haynes <i>et al.</i> , 2017; NCBI, 2022) 15	
2.2.3.	Penggunaan Merkuri	15
2.2.4.	Jenis dan Sifat Merkuri	16
2.2.5.	Ambang Batas Paparan Merkuri	18
2.2.6.	Toksikokinetik Merkuri	19
2.3.	Pengaruh Merkuri terhadap Konsentrasi Spermatozoa	20
2.4.	Kerangka Teori	24
2.5.	Kerangka Konsep	25
2.6.	Hipotesis	25
BAB III		27
METODE PENELITIAN		27
3.1.	Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian	27
3.2.	Variabel dan Definisi Operasional	27
3.2.1.	Variabel	27
3.2.1.1.	Variabel Bebas	27
3.2.1.2.	Variabel Terikat	27
3.2.2.	Definisi Operasional	27
3.2.2.1.	Lama Paparan Merkuri Peroral	27
3.2.2.2.	Konsentrasi Spermatozoa	28
3.3.	Subjek Uji Penelitian	28
3.3.1.	Subjek Penelitian	28
3.3.2.	Besar Sampel	28
3.3.2.1.	Kriteria Inklusi	29
3.3.2.2.	Teknik Sampling	29
3.4.	Instrumen dan Bahan Penelitian	29
3.4.1.	Instrumen Penelitian	29
3.4.2.	Bahan Penelitian	30

3.5. Cara Penelitian	30
3.5.1. Persiapan Penelitian	30
3.5.2. Pelaksanaan Penelitian	31
3.5.2.1. Aklimatisasi	31
3.5.2.2. Pembagian Kelompok	31
3.5.2.3. Pengambilan Spermatozoa	32
3.5.2.4. Pemeriksaan Hitung Konsentrasi Sperma (World Health Organization, 2021)	33
3.6. Tempat dan Waktu	34
3.6.1. Tempat Penelitian	34
3.6.2. Waktu Penelitian	34
3.7. Alur Penelitian	35
3.8. Analisis Data	36
BAB IV	37
HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	37
4.1. Hasil Penelitian	37
4.2. Pembahasan	40
BAB V	43
KESIMPULAN DAN SARAN	43
5.1. Kesimpulan	43
5.2. Saran	43
DAFTAR PUSTAKA	44
LAMPIRAN	49

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2. 1 Morfologi spermatozoa (van der Horst et al., 2018).....	5
Gambar 2. 2 Tahap-tahap Spermatogenesis (Sherwood dan Ward, 2020)	7
Gambar 2.3 1 Efek merkuri pada neuron (Spiller, 2017).....	20
Gambar 2.3 2 Kontrol Fungsi Testis (Sherwood dan Ward, 2020)	21
Gambar 4. 1 Rata-rata konsentrasi spermatozoa antar kelompok.....	37



DAFTAR TABEL

Tabel 2. 1 Analisis Sperma Berdasarkan Kriteria WHO (Boitrelle et al., 2021; World Health Organization, 2021).....	9
Tabel 2. 2 Batas Ambang Paparan Merkuri (Menkes RI, 2016).....	18
Tabel 4. 1 Hasil analisis konsentrasi spermatozoa antar kelompok.....	38
Tabel 4. 2 Hasil Uji Post Hoc Bonferroni.....	39

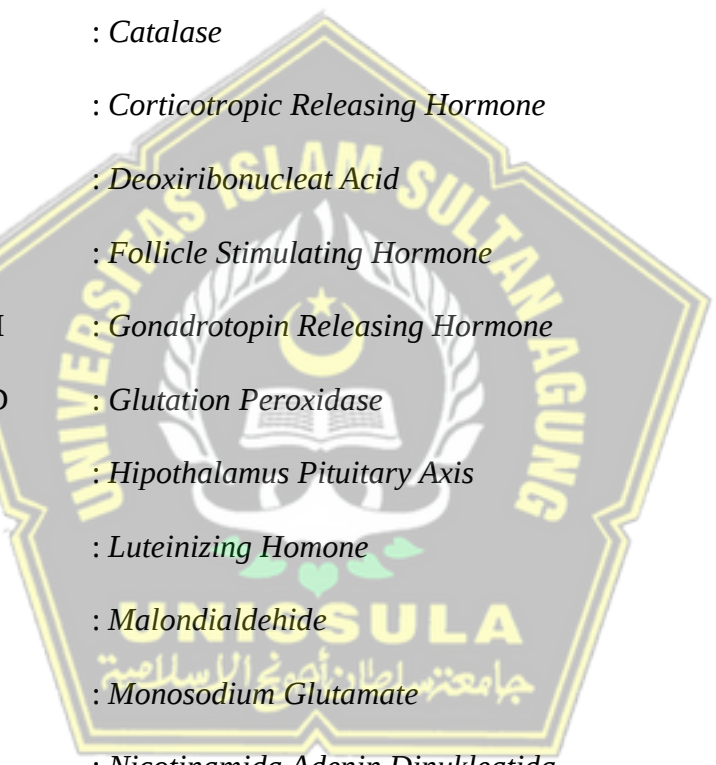


DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Lampiran Hasil Analisis Statistik Konsentrasi Spermatozoa tikus jantan Wistar	49
Lampiran 2 Ethical Clereance	52
Lampiran 3 Surat Ijin Penelitian Laboratorium Biologi	53
Lampiran 4 Surat Selesai Penelitian	54
Lampiran 5 Data Rerata Konsentrasi Spermatozoa	55
Lampiran 6 Dokumentasi Penelitian.....	57



DAFTAR SINGKATAN DAN ISTILAH



ABP	: <i>Androgen Binding Protein</i>
ASA	: <i>Antibodi Anti-Sperma</i>
ATP	: <i>Adenosin Triphosphate</i>
BBB	: <i>Blood Brain Barrier</i>
CAT	: <i>Catalase</i>
CRH	: <i>Corticotropic Releasing Hormone</i>
DNA	: <i>Deoxiribonucleat Acid</i>
FSH	: <i>Follicle Stimulating Hormone</i>
GnRH	: <i>Gonadotropin Releasing Hormone</i>
GPOD	: <i>Glutation Peroxidase</i>
HPA	: <i>Hipothalamus Pituitary Axis</i>
LH	: <i>Luteinizing Homone</i>
MDA	: <i>Malondialdehyde</i>
MSG	: <i>Monosodium Glutamate</i>
NAD	: <i>Nicotinamida Adenin Dinukleatida</i>
NMDA	: <i>N-Methyl D-Aspartate</i>
NO	: <i>Nitric Oxide</i>
PUFA	: <i>Polyunsaturated Fatty Acid</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
RNS	: <i>Reactive Nitrogene Species</i>
SOD	: <i>Superoxidedismutase</i>

INTISARI

Infertilitas menjadi isu global masalah kesehatan reproduksi, terutama di Indonesia sekitar 12-15% dari 40 juta pasangan usia subur. Indonesia menduduki peringkat kedua negara penyumbang terbesar peningkatan emisi merkuri dunia. Organ reproduksi yang terpapar oleh merkuri dalam waktu yang cukup lama akan menyebabkan peningkatan ROS diikuti penurunan antioksidan serta ketidakseimbangan hormon testosteron sehingga dapat mengganggu spermatogenesis dan berakibat pada penurunan konsentrasi spermatozoa. Penelitian ini bertujuan untuk melihat apakah lama paparan merkuri peroral mempengaruhi konsentrasi spermatozoa tikus jantan Wistar.

Penelitian eksperimental dengan desain “*post test only randomized controlled*” dengan subyek uji sebanyak 25 ekor tikus jantan Wistar, dibagi menjadi 5 kelompok secara acak. Kelompok 1 (kontrol), kelompok 2, 3, 4, dan 5 masing-masing diberi paparan merkuri klorida selama 7, 14, 21, dan 28 hari dengan dosis 0,4 mg/KgBB/hari. Data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan uji normalitas, homogenitas, *One Way Anova* dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Bonferroni*.

Rata-rata konsentrasi spermatozoa pada kelompok 1 ($49,5 \pm 15,01 \times 10^6/\text{cc}$), kelompok 2 ($45,9 \pm 17,61 \times 10^6/\text{cc}$), kelompok 3 ($20,5 \pm 16,28 \times 10^6/\text{cc}$), kelompok 4 ($18,8 \pm 17,43 \times 10^6/\text{cc}$), dan kelompok 5 ($11,2 \pm 9,16 \times 10^6/\text{cc}$). Hasil uji *One Way Anova* menunjukkan hasil signifikan 0,002 ($p < 0,05$). Uji *Post Hoc Bonferroni* menunjukkan terdapat perbedaan bermakna antara kelompok 1 terhadap kelompok 5 $p = 0,008$ ($p < 0,05$).

Berdasarkan hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa lama paparan merkuri peroral memiliki pengaruh terhadap konsentrasi spermatozoa tikus jantan Wistar.

Kata kunci : Merkuri peroral, Konsentrasi Spermatozoa

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Infertilitas menjadi isu global masalah kesehatan reproduksi sebanyak 22,3% pasangan sehingga perlu diperhatikan (Darmayanti *et al.*, 2021). Data konsensus 2019 menunjukkan bahwa sebesar 35% masalah infertilitas berasal dari pria meliputi motilitas, jumlah, dan morfologi sperma (Pasaribu *et al.*, 2019). Penurunan kualitas sperma salah satunya diakibatkan oleh faktor eksternal yaitu paparan bahan kimia seperti merkuri. *Global Mercury Assessment* 2018 menyatakan, emisi merkuri naik dua kali lipat sejak 2005. Indonesia menjadi negara tertinggi kedua penyumbang sebagian besar peningkatan emisi merkuri dunia (United Nations Environment, 2018). Pencemaran merkuri di Indonesia berasal dari lingkungan sekitar PESK dan pencemaran perairan akibat pembuangan limbah industri. Penelitian tahun 2019 dan 2020 menyebutkan pemberian merkuri peroral selama 28 hari dapat menurunkan kualitas spermatozoa tikus. Penelitian lain menunjukkan pemberian merkuri dengan dosis yang lebih kecil selama 7 hari sudah berdampak terhadap hepar dan ginjal, namun belum diketahui pengaruh pemberian merkuri dosis tersebut dalam waktu bertingkat terhadap konsentrasi spermatozoa.

Infertilitas adalah ketidakmampuan untuk menghamili setelah berhubungan seksual secara teratur selama satu tahun tanpa alat kontrasepsi atau setelah mengadopsi anak (Assidi, 2022). Berdasarkan data keseluruhan

kasus infertil, 5% diantaranya disebabkan oleh berkurangnya jumlah konsentrasi sperma (vander Borgh dan Wyns, 2018). *World Health Organization* memperkirakan sekitar 50-80 juta pasutri (1 dari 7 pasangan) memiliki masalah infertilitas. Infertilitas (ketidaksuburan) memengaruhi 8-12% pasangan di dunia dengan 40-50% kasus disebabkan oleh faktor laki-laki (Agarwal *et al.*, 2021). Di Indonesia sendiri kasus infertilitas mencapai 12-15% dari 40 juta pasangan usia subur (Mulyani *et al.*, 2021). Rata-rata konsentrasi sperma adalah 16 juta/ml (Boitrelle *et al.*, 2021; World Health Organization, 2021). Konsentrasi sperma harus dipertahankan untuk dapat memperkuat akrosom dalam mengalahkan sawar ovum sampai sperma mampu menembus ovum (Sherwood dan Ward, 2020).

Penelitian sebelumnya menyebutkan bahwa efek pemberian merkuri klorida peroral dengan dosis 40 mg/kgBB selama 28 hari menyebabkan penurunan jumlah sperma, motilitas sperma, degenerasi sel spermatogenik, oklusi lumen tubulus seminiferous dan hipertrofi tubulus seminiferous (Adelakun *et al.*, 2020). Penelitian berbeda menunjukkan bahwa pemberian merkuri klorida peroral dengan dosis 0,4 mg/kgBB selama 28 hari didapatkan hasil penurunan berat testis, penurunan gen ekspresi, penurunan kadar testosteron, LH dan FSH, peningkatan imunitas dan sel inflamasi testis serta terjadi apoptosis pada testis (Almeer *et al.*, 2020). Pada tahun 2017 menunjukkan bahwa pemberian merkuri klorida dengan dosis 10 mg/kgBB dan 20 mg/kgBB selama 14 hari terbukti terjadi kerusakan hepar bertingkat (Jonathan *et al.*, 2017). Hasil penelitian pengaruh pemberian merkuri klorida

peroral dengan dosis 0,4 mg/kgBB selama 7 hari terhadap tikus Wistar menyebabkan nekrosis hepar yang parah, hilangnya struktur lobulus hepar, pembengkakan, pucat, dan kongesti ginjal, beberapa lesi bahkan apoptosis sel ginjal (Othman *et al.*, 2014).

Berdasarkan penjelasan diatas, masih perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai pengaruh pemberian merkuri peroral dengan waktu paparan bertingkat terhadap perubahan konsentrasi spermatozoa.

1.2. Rumusan Masalah

Apakah lama paparan merkuri peroral berpengaruh terhadap penurunan konsentrasi spermatozoa tikus jantan Wistar?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Untuk mengetahui pengaruh lama paparan merkuri peroral terhadap konsentrasi spermatozoa tikus jantan Wistar

1.3.2. Tujuan Khusus

1.3.2.1. Untuk mengetahui rerata konsentrasi spermatozoa tikus jantan Wistar pada kelompok kontrol

1.3.2.2. Untuk mengetahui rerata konsentrasi spermatozoa tikus jantan Wistar yang diberi merkuri peroral selama 7, 14, 21, dan 28 hari

1.3.2.3. Untuk mengetahui perbedaan rerata konsentrasi spermatozoa tikus jantan Wistar yang diberi merkuri peroral pada berbagai kelompok perlakuan

1.4. Manfaat Penelitian

1.4.1. Manfaat Teoritis

Sebagai dasar penelitian selanjutnya mengenai pengaruh lama paparan merkuri peroral terhadap konsentrasi spermatozoa.

1.4.2. Manfaat Praktis

Untuk memberikan pengetahuan kepada masyarakat tentang pengaruh lama paparan merkuri peroral terhadap kualitas sperma yang berdampak pada infertilitas sehingga diharapkan masyarakat bisa mencegah maupun manajemen penatalaksanaan infertilitas pada pria.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Spermatozoa

2.1.1. Definisi

Spermatozoa adalah sel benih jantan matang yang dihasilkan testis, dibentuk dalam tubulus seminiferus, yang berasal dari spermatogonia pertama berkembang menjadi spermatosit, kemudian meiosis untuk menghasilkan spermatid lalu berdiferensiasi menjadi spermatozoa (Dorland, 2012). Spermatozoa berfungsi untuk fertilisasi ke sel ovum. Bentuk sperma yang sempurna terdiri dari kepala, badan, dan ekor (Sherwood dan Ward, 2020).

2.1.2. Morfologi Spermatozoa



Gambar 2. 1 Morfologi spermatozoa tikus (van der Horst et al., 2018)

1. Kepala

Kepala spermatozoa umumnya berbentuk oval dan tumpul, bagian ini mengandung kromatin DNA yang disebut *protamine sperma* (Susilawati, 2015). Pada bagian kepala terdapat selubung

tipis mengandung protein yang disebut akrosom yang melapisi bagian luarnya. Akrosom juga mengandung *hyaluronidase* dan enzim proteolitik yang berfungsi untuk penetrasi zona pelusida sel ovum (Sherwood dan Ward, 2020).

2. Badan

Bagian badan spermatozoa mengandung mitokondria yang akan menghasilkan ATP sehingga berfungsi untuk membantu pergerakan sperma (Sherwood dan Ward, 2020).

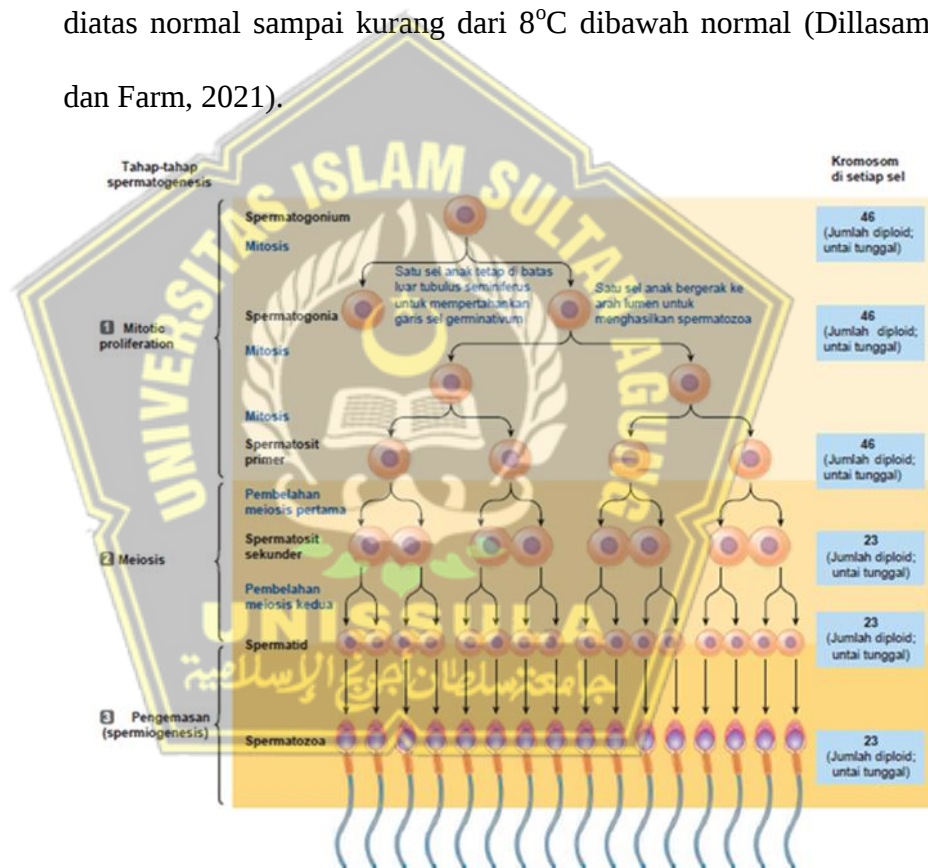
3. Ekor

Ekor spermatozoa memiliki tiga komponen yaitu akronema, membran penutup akronema dan mitokondria. Akronema bertanggung jawab dalam pergerakan spermatozoa (Susilawati, 2015). Ekor dapat dijadikan parameter kualitas sperma dengan melihat motilitas gerakan spermatozoa (Sherwood dan Ward, 2020).

2.1.3. Spermatogenesis

Spermatogenesis adalah proses pembentukan spermatozoa yang mencakup proses sel germinativum awal (spermatogonia) akan berdiferensiasi menjadi sperma matang yang disebut spermatozoa (Dorland, 2012). Proses ini memakan waktu 64 hari (Sherwood dan Ward, 2020). Spermatogenesis memiliki tiga tahap yaitu proliferasi mitotik, meiosis, dan pengemasan. Spermatogenesis tikus dalam satu siklus epitel seminiferus dapat berlangsung kurang lebih $8,63 \pm 0,25$

hari. Spermatogenesis tikus membutuhkan waktu kurang lebih 35,5 hari, dimulai dari perubahan sel spermatogonia A menjadi spermatosit primer selama 8 hari; dilanjutkan meiosis spermatosit primer dan sekunder selama 12,5 hari; fase spermatid 9,5 hari, dan terakhir fase pematangan selama 5,5 hari (Dillasamola dan Farm, 2021). Suhu yang dibutuhkan selama spermatogenesis yaitu suhu tubuh normal atau 2°C diatas normal sampai kurang dari 8°C dibawah normal (Dillasamola dan Farm, 2021).



Gambar 2. 2 Tahap-tahap Spermatogenesis (Sherwood dan Ward, 2020)

1. Proliferasi Mitotik

Tahap ini merupakan proses perubahan spermatogonium menjadi spermatosit primer. Spermatogonium yang berada dilapisan terluar tubulus seminiferus akan bermitosis menjadi dua spermatogonia. Satu spermatogonia akan tetap diluar, sedangkan satu lainnya akan masuk ke lumen untuk bermitosis menjadi dua sel anak. Kedua sel anak akan bermitosis kembali membentuk empat spermatosit primer yang akan masuk ke fase istirahat (Sherwood dan Ward, 2020).

2. Meiosis

Pada tahap ini terjadi dua proses meiosis. Meiosis pertama berawal dari spermatosit primer berkembang menjadi dua spermatosit sekunder. Dua spermatosit sekunder mengalami meiosis kedua untuk membentuk empat spermatid (Sherwood dan Ward, 2020).

3. Pengemasan

Pada tahap ini setiap spermatid akan mengalami *remodelling* atau pengemasan melalui proses spermiogenesis menjadi bentuk spesifik yaitu spermatozoa yang memiliki bagian kepala, badan, dan ekor (Sherwood dan Ward, 2020).

2.1.4. Analisis Sperma

Sperma dapat dianalisis baik secara makroskopis (warna, volume, bau, dan PH) dan secara mikroskopis (konsentrasi, morfologi, motilitas, dan viabilitas)

Tabel 2. 1 Analisis Sperma Berdasarkan Kriteria WHO (Boitrelle et al., 2021; World Health Organization, 2021)

Karakteristik semen	Nilai rujukan batas bawah
Volume (ml)	1,4 (1,3-1,5)
Konsentrasi sperma (10^6 per ml)	16 (15-18)
Jumlah sperm total (10^6 per ejakulasi)	39 (35-40)
Total Motilitas (PR+NP, %)	42 (40-43)
Motilitas Progresif (PR, %)	30 (29-31)
Viabilitas (spermatozoa hidup, %)	54 (50-56)
Morfologi normal (%)	4 (3,9-4,0)

2.1.5. Konsentrasi Spermatozoa

Konsentrasi spermatozoa merupakan jumlah sel spermatozoa permililiter semen. Menurut WHO 2021, nilai normal konsentrasi sperma adalah ± 16 juta/ml atau jumlah sperma total adalah ± 39 juta/ejakulat (World Health Organization, 2021). Apabila konsentrasi sperma dibawah ambang batas terbawah maka dikatakan *Oligospermatozoa*.

2.1.6. Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Konsentrasi Spermatozoa

2.1.6.1. Faktor Internal

1. Kelainan Anatomi

Undescendent testes atau yang sering disebut kriptorkidismus adalah kegagalan satu atau dua buah testis turun dari rongga abdomen ke skrotum (Hall, 2020). Testis yang tidak berada pada kantong skrotum mengakibatkan epitel tubulus seminiferus berdegenerasi sehingga terjadi penurunan produksi sperma atau bahkan tidak dapat memproduksi sperma sama sekali (Fawzy *et al.*, 2015).

2. Berat Badan

Seseorang yang mengalami berat badan berlebih atau obesitas akan terjadi peningkatan sel adiposa dan leptin, kadar leptin yang tinggi akan meningkatkan kadar estradiol sehingga akan menekan sekresi *Kisspeptin* dan *Gonadotropin Releasing Hormone* (GnRH) di hipotalamus akibatnya terjadi penurunan sekresi *Luteinizing Hormone* (LH) dan *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) yang berdampak pada penurunan inhibin B dan testosteron (Craig *et al.*, 2017). Kadar leptin yang tinggi juga dapat menginisiasi sitokin proinflamasi untuk membentuk ROS, ROS berlebih akan mengganggu proliferasi sel germinal dalam testis sehingga menyebabkan kerusakan spermatozoa (William, 2020).

3. Kurang Tidur

Kebiasaan begadang dan tidur yang kurang cukup dapat meningkatkan *Antibodi Anti-Sperma* (ASA). Penelitian pada hewan coba yang kurang tidur mengakibatkan peningkatan hormon *Corticotropic Releasing Hormone* (CRH) sehingga memicu kadar kortisol tinggi. Kadar kortisol yang tinggi akan menekan *Hypothalamus Pituitary Axis* (HPA) sehingga mempengaruhi sekresi *Luteinizing Hormone* (LH) dan *Follicle Stimulating Hormone* (FSH). Hal ini dapat menghambat kerja spermatogenesis dan produksi testosteron menurun (Wahyuni, 2015).

4. Stress

Stress dapat mengganggu regulasi fungsi neuroendokrin yaitu *Gonadotropin Releasing Hormone* (GnRH). Sehingga memengaruhi dan menekan sekresi *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) dan *Luteinizing Hormone* (LH) dalam produksi sperma (Wahyuni, 2015).

5. Usia

Seorang pria berusia lebih dari 35 tahun memiliki risiko infertilitas dua kali. Penelitian Jumiati tahun 2017, mengatakan sebesar 44,8% pasangan usia subur usia kurang dari 35 tahun berpeluang mengalami infertilitas. Hal ini disebabkan semakin bertambah umur maka kemungkinan kerusakan DNA sperma lebih signifikan (Akbar, 2020).

6. Penyakit

Penderita diabetes mellitus banyak mengalami infertilitas dikarenakan terganggunya metabolisme glukosa dalam proses spermatogenesis. Tidak hanya mengganggu motilitas, tetapi juga konsentrasi sperma (Bulqis *et al.*, 2020). Begitu juga penderita hipertensi, dan infeksi dapat meningkatkan insiden kejadian infertilitas (Akbar, 2020).

Pada penderita kanker, obat kemoterapi yaitu cisplatin, carboplatin dan doxorubicin dapat menimbulkan gangguan gonad. Radiasi ionisasi dari obat kemo dapat merusak gonad. Pemberian dosis lebih dari 7,5 Gy menyebabkan disfungsi sel Leydig dan rusaknya sel germinal. (Amelia dan Rahmanisa, 2019).

2.1.6.2. Faktor Eksternal

1. Rokok

Rokok mengandung *N-nitrosamine* yang bersifat karsinogenik dan membentuk *Nitrosamines Polycyclic Aromatic Hydrocarbons* yang dapat mengubah bentuk DNA sehingga menyebabkan mutasi dan perubahan bentuk sperma (Dai *et al.*, 2015). Selain itu, diketahui bahwa merokok dapat menyebabkan hipoksia, kekurangan oksigen pada korda spermatika testis dapat mempengaruhi fungsi sekresi sel sertoli dan sel leydig di testis, sehingga menyebabkan penurunan kualitas sperma (Harlev *et al.*, 2015).

2. Alkohol

Testis memiliki enzim untuk mengoksidasi alkohol yaitu *Nicotinamida Adenin Dinukleatida* (NAD). Enzim ini berguna untuk memproduksi testosteron, sehingga apabila seseorang banyak mengkonsumsi alkohol, sebagai akibatnya enzim ini akan mengoksidasi alkohol disertai penurunan enzim yang memproduksi testosteron (Idris and Hartamto, 2020). Alkohol juga dapat mengganggu sintesis *Nitric Oxide* (NO) oleh testis dengan bantuan enzim *NO-synthase*. Jika enzim ini dihambat maka akan mengurangi kadar testosteron. Kadar testosteron yang rendah mengakibatkan produksi fruktosa di vesika seminalis berkurang yang bertanggung jawab terhadap motilitas sperma (Idris dan Hartamto, 2020).

3. MSG

Monosodium Glutamate (MSG) terbukti dapat menurunkan jumlah sperma akibat kadar glutamate yang berlebih akan membuka kanal kalsium. MSG berlebih dapat merusak *nucleus arcuatus* dan *nucleus ventromedial* sehingga mengakibatkan penurunan *Gonadotrophin Releasing Hormone* (GnRH) yang mengakibatkan juga produksi *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) dan *Luteinizing Hormone* (LH) menjadi turun. Penurunan kedua hormon tersebut akan menekan produksi testosteron dalam produksi jumlah sperma (Nurhayati, 2014).

4. Paparan Bahan Kimia

Paparan bahan kimia seperti merkuri baik secara ingesti maupun inhalasi dapat meningkatkan *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang dapat merusak DNA sperma. Kerusakan DNA sperma dapat menyebabkan sperma mati sehingga jumlahnya akan menurun (Idris dan Hartamto, 2020).

2.2. Merkuri Klorida (HgCl_2)

2.2.1. Definisi

Merkuri Klorida merupakan logam berat yang berbahaya dan terdapat di alam sebagai akibat pengaruh dari iklim, air ataupun angin. Merkuri klorida (HgCl_2) merupakan jenis merkuri anorganik berbentuk bubuk, cepat dan mudah diabsorpsi dalam tubuh karena sifatnya larut air. Toksisitas merkuri dapat menyerang sistem saraf pusat, sistem reproduksi, sistem pernafasan, hematologi, endokrin dan banyak fungsi tubuh lainnya. Zat ini dapat masuk ke tubuh melalui inhalasi, oral, ataupun kulit. Merkuri klorida banyak digunakan sebagai bahan desinfektan, antiseptik, obat pencabar, dan banyak ditemukan dipermukaan tanah sebagai hasil pembuangan limbah. Merkuri klorida yang terakumulasi di sayuran, tanaman dalam tanah yang terkontaminasi ataupun di perairan bisa termakan oleh manusia sehingga menyebabkan merkuri akan tertelan dan keracunan jika diberikan secara akut (Menkes RI, 2016).

2.2.2. Identifikasi Merkuri Klorida (Haynes *et al.*, 2017; NCBI, 2022)

Nama	: Merkuri Klorida
Sinonim	: Dichloromercury Mercury(II) chloride Sublimate Mercury bichloride
Formula	: HgCl_2
Berat Atom	: 271.50
Berat Jenis	: 5.4 g/cm^3
Titik Didih	: 277°C

2.2.3. Penggunaan Merkuri

Penggunaan merkuri (GOLD-ISMIA *et al.*, 2020; Insiani *et al.*, 2020):

1. Merkuri digunakan sebagai bahan kosmetik baik itu krim wajah bahkan maskara
2. Merkuri digunakan sebagai bahan peralatan medis seperti termometer air raksa, barometer, manometer, sphygmomanometer, dan amalgam gigi. Penggunaan ini karena merkuri memiliki kepadatan yang tinggi dan ekspansi termal yang hampir linier
3. Merkuri digunakan sebagai pemisahan emas dari pertambangan dikarenakan sifatnya yang mudah melakukan amalgamasi dalam

dengan logam lain dalam mengekstraksi emas, perak, ataupun mineral lain

4. Merkuri juga digunakan sebagai beberapa peralatan rumah tangga seperti lampu neon, lampu papan iklan, lampu UV, lampu penerangan jalan, dan baterai
5. Merkuri anorganik banyak ditemukan di alam dan digunakan sebagai bahan antiseptik, desinfektan, obat pencakar serta dulu pernah digunakan sebagai obat cacing

2.2.4. Jenis dan Sifat Merkuri

1. Merkuri Elemental

Merkuri elemental merupakan logam perak, cair dan mudah menguap. Jenis merkuri ini paling banyak merusak organ target melalui inhalasi dikarenakan sifatnya yang mudah menguap. Hanya butuh beberapa menit merkuri yang terhirup terbawa ke sirkulasi darah. Bersifat lipofilik sehingga dapat berdifusi ke paru-paru, bersirkulasi ke pembuluh darah bahkan menembus *Blood Brain Barrier* (BBB) dan sawar plasenta (Menkes RI, 2016). Akibat sifat ini, merkuri elemental banyak terakumulasi di otak, ginjal, dan organ reproduksi terutama testis pada pria. Merkuri elemental dapat menyebabkan keracunan dengan paparan akut, biasanya banyak ditemukan pada pekerja industri yang tidak sengaja menghirup uap merkuri (Park dan Zheng, 2012). Uap merkuri dapat ditemukan pada kebocoran thermometer air raksa,

pecahnya lampu neon merkuri, atau pada penambang emas. Waktu paruh merkuri ini pada orang dewasa sekitar 60 hari. Menurut *American Conference of Governmental Industrial Hygienists* (ACGIH) ambang batas merkuri ini adalah 0.05 mg/m^3 selama 8 jam/hari atau sekitar 40 jam/minggu (Menkes RI, 2016).

2. Merkuri Organik

Merkuri organik tercipta ketika merkuri berikatan dengan karbon. Contoh yang sering ditemui dalam bentuk *methyl mercury* (MeHg). Bersifat lipofilik sehingga dapat menembus *Blood Brain Barrier* (BBB) dan sawar plasenta (Menkes RI, 2016). *Methyl mercury* banyak ditemukan pada mikroorganisme terutama biota laut. Oleh sebab itu, jenis merkuri ini akan mencemari makanan yang berasal dari perairan yang tercemar sehingga janin atau orang yang makan makanan yang tercemar merkuri ini akan mengalami *cerebral palsy* seperti pada kasus Minamata (Srimaulia, 2018). Waktu paruh merkuri ini sekitar 65 hari (Menkes RI, 2016)

3. Merkuri Anorganik

Merkuri anorganik tercipta ketika merkuri berikatan dengan unsur lain seperti klorin, oksigen, atau sulfur (Srimaulia, 2018). Disebut juga sebagai garam merkuri karena berbentuk bubuk seperti garam. Merkuri anorganik yang banyak dijumpai yaitu metil klorida (MeCl) dan merkuri klorida (HgCl_2). Penggunaan merkuri ini beragam mulai dari krim pemutih kulit, antiseptik,

kosmetik, hingga bidang medis. Bersifat hidrofilik tetapi paparan kronis dapat merusak dan terakumulasi di ginjal. Merkuri ini hanya diserap sekitar 7-15% dari dosis awal. Waktu paruh merkuri anorganik yaitu 40 hari (Menkes RI, 2016).

2.2.5. Ambang Batas Paparan Merkuri

Ambang batas adalah tingkat batasan yang masih bisa ditoleransi oleh tubuh. Pemberian merkuri peroralsangat berpengaruh terhadap akumulasi *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang dapat mengubah bentuk fisiologi dan histologi sperma. Perubahan bentuk ini dapat mempengaruhi produksi sperma.

Tabel 2. 2 Batas Ambang Paparan Merkuri (Menkes RI, 2016)

Batas yang ditentukan	Institusi terkait / dokumen	Tahun disahkan	Batas ambang pajanan
Paparan udara yang diperbolehkan	OSHA NOSH		0.05 mg Hg / m ³ / 8-h (organik)
			0.1 mg Hg / m ³ / 8-h (elemental)
			0.05 mg Hg / m ³ / 10-h (elemental)
Kriteria udara ambien	NAAQS-Clean Air Act (EPA)	1970 (rev 1990)	0.00006 mg Hg / m ³ Air
Ambang batas	ACGH		≤ 0.05 mg Hg/m ³ of air / 40-h
Kriteria kualitas air ambien	Clean Water Act (EPA)	1977 (rev 2000)	144 ng / L (ppt)
Beban badan total			20 - 30 mg
Produk makanan	FDA	1979	≤ 1 mg/kg (ppm)
(ikan dan biji-bijian)	EPA (rekomendasi yang diajukan)	1996	CH ₃ Hg ≤ 0.01 mg/kg

2.2.6. Toksikokinetik Merkuri

1. Absorpsi

Merkuri klorida (HgCl_2) secara peroral akan diabsorpsi sebesar 7-15% oleh saluran cerna. Merkuri klorida (HgCl_2) lebih cepat dan mudah diserap sehingga toksisitasnya lebih tinggi. Efek serius dari merkuri klorida adalah gastroenteritis (Zulaikhah *et al.*, 2020).

2. Distribusi

Merkuri klorida (HgCl_2) terakumulasi tertinggi pada ginjal. Kadar merkuri dalam darah menunjukkan paparan merkuri dalam jangka pendek dan baru terpapar, waktu paruh merkuri dalam darah hanya 3 hari. Kadar merkuri anorganik bisa dilihat dari biomarker urin. Biomarker rambut hanya digunakan untuk jangka panjang dan melihat tingkat atau jumlah merkuri di dalam tubuh (Putri, 2017).

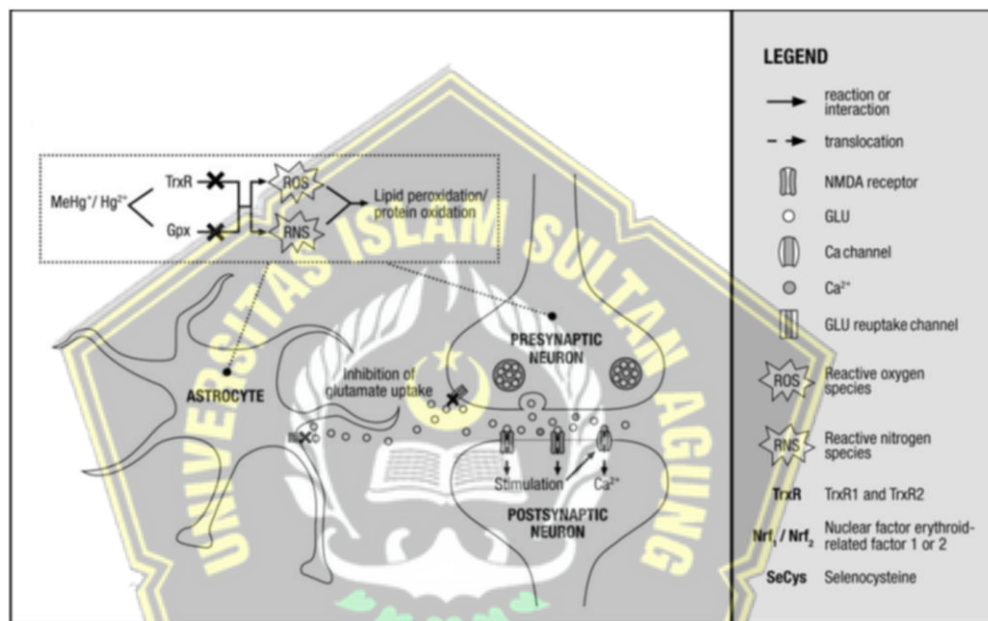
3. Metabolisme

Metabolisme merkuri dalam organ hati dan ginjal. 90% merkuri darah terdapat dalam eritrosit. *Methyl mercury* yang ada dalam saluran cerna juga akan dikonversi menjadi bentuk anorganik (Zulaikhah *et al.*, 2020).

4. Ekskresi

Pengeluaran merkuri ini dari tubuh hanya kurang dari 1% setiap hari. Pengeluaran merkuri anorganik melalui ekshalasi, liur, dan keringat (Putri, 2017).

2.3. Pengaruh Merkuri terhadap Konsentrasi Spermatozoa



Gambar 2.3 1 Efek merkuri pada neuron (Spiller, 2017)

Merkuri dapat masuk baik secara inhalasi, peroral atau kulit, beberapa merkuri bersifat lipofilik sehingga mudah terdistribusi ke seluruh tubuh, salah satunya mencapai otak. Merkuri anorganik lebih mudah dan cepat diabsorpsi sehingga toksisitasnya lebih tinggi. Hampir 90% merkuri masuk melalui makanan dan sisanya berdifusi melalui pernafasan. Merkuri klorida akan diubah menjadi *methyl mercury* yang bersifat lipofilik sehingga bisa menembus *Blood Brain Barrier* (BBB). Setelah terjebak di otak, merkuri segera diambil dan

diserap oleh astrosit. Akibatnya astrosit akan mensekresi glutamat secara besar-besaran, tetapi tidak diikuti kompensasi dengan penangkapan glutamat oleh reseptor NMDA (*N-methyl D-aspartate*) dikarenakan reseptornya dirusak oleh merkuri. Glutamat akan dipompa kembali ke sel glia akibat kelebihan glutamat. Kelebihan glutamat akan memicu kerusakan sel akibat peningkatan *Reactive Oxygen Species* (ROS) dan *Reactive Nitrogen Species* (RNS). (Spiller, 2017). Peningkatan ROS menyebabkan peroksidasi lipid meningkat serta menurunkan *glutathione* dan antioksidan. Penurunan antioksidan disertai dengan peningkatan ROS mengganggu kerja hipotalamus. Akibatnya fungsi hipotalamus-hipofisis akan terganggu, sehingga mempengaruhi sistem gonad (Zhu *et al.*, 2015).



Gambar 2.3 2 Kontrol Fungsi Testis (Sherwood dan Ward, 2020)

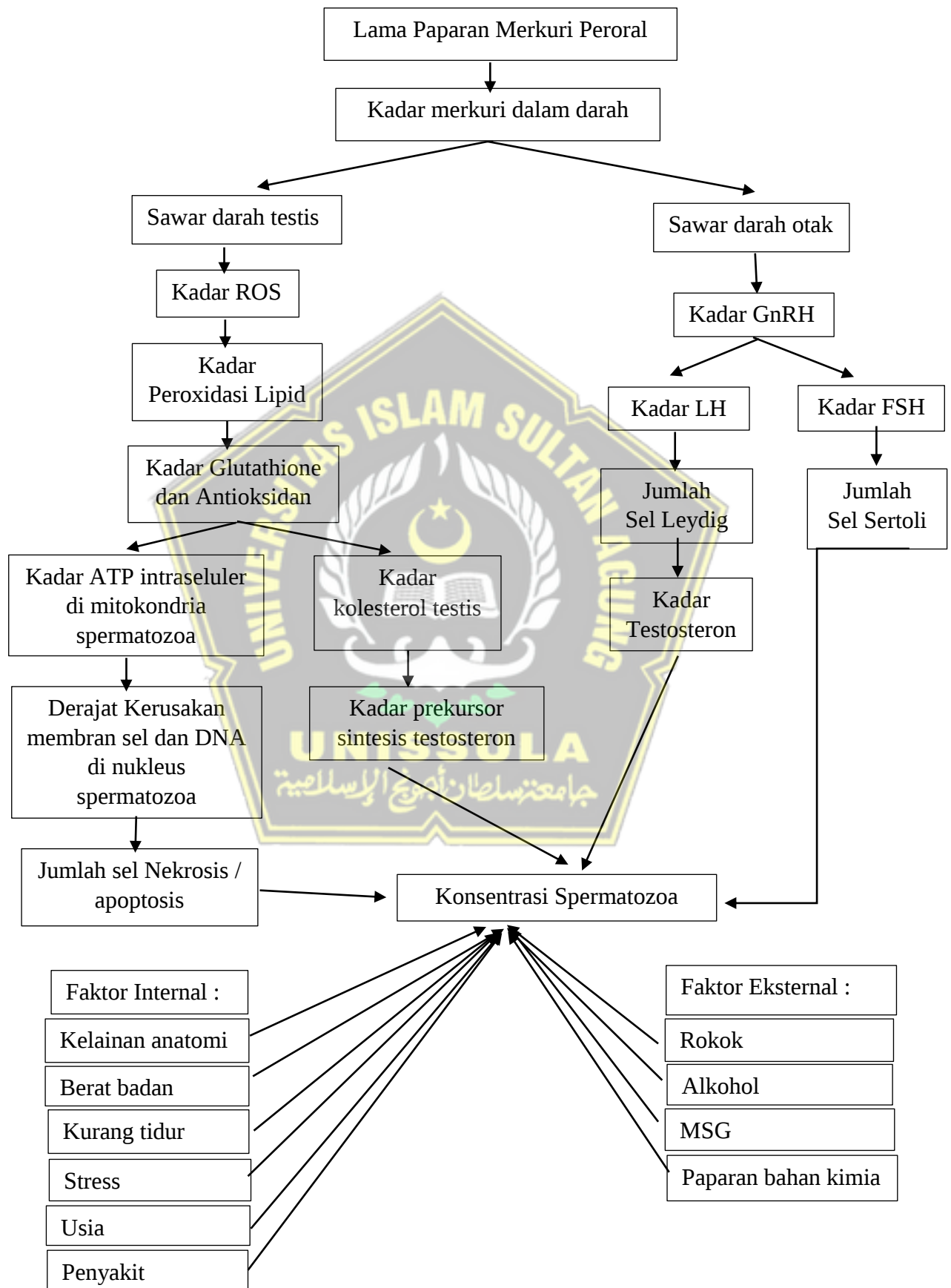
Sistem gonad berperan dalam kontrol fungsi testis. Terganggunya hipotalamus-hipofisis akan mempengaruhi sekresi *Gonadotrophin Releasing Hormone* (GnRH) sehingga sekresi *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) dan *Luteinizing Hormone* (LH) menurun. FSH dan LH berkontribusi dalam produksi spermatozoa dengan mensekresi testosteron yang berguna untuk merangsang perkembangan testis. FSH merangsang sel sertoli dan tubulus seminiferus, sedangkan LH bekerja merangsang sel leydig dimana kedua hormon bekerja sama untuk mensekresi testosteron (Sherwood dan Ward, 2020). Testosteron adalah hormon yang berperan dalam proses spermatogenesis. Paparan merkuri menyebabkan penurunan sekresi FSH dan LH sehingga terjadi penyusutan tubulus seminiferus di testis, diikuti dengan penurunan berat testis. *Androgen Binding Protein* (ABP) yang dibentuk sel sertoli merupakan reseptor pengikat testosteron bebas dalam darah, sedangkan *Luteinizing Hormone* (LH) merangsang sel leydig menghasilkan testosteron untuk proses spermatogenesis (Nurhayati, 2014).

Merkuri dapat melalui sawar darah testis sehingga mengganggu struktur membran sel menyebabkan lesi membran yang membunuh sperma dan menghambat perakitan mikrotubulus. Merkuri akan menonaktifkan enzim antioksidan seperti *Superoxidedismutase* (SOD), *Catalase* (CAT), dan *Glutation Peroxidase* (GPOD) (Wetipo *et al.*, 2019). Radikal bebas akan mencari pasangan untuk mencapai

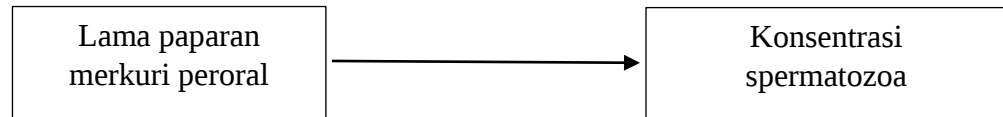
kestabilan. Oksigen (O_2) akan mudah menerima elektron bebas walaupun sudah stabil dikarenakan sifat akseptor electron yang dimilikinya untuk membentuk superoksida (O_2^-). Radikal bebas yang berikatan dengan Oksigen ini disebut *Reactive Oxidative Spesies* (ROS). Pembentukan ROS dapat merusak membran integritas sperma melalui kerusakan lipoprotein, dan membran sel fosfolipid (Wetipo *et al.*, 2019).

Stress oksidatif akan meningkatkan peroksidasi lipid pada testis yang berdampak terhadap pengurangan aktivitas enzim antioksidan testis. Kandungan asam lemak tak jenuh ganda (PUFA) dalam spermatozoa dapat mengalami degradasi oleh karena produksi aldehida sitosol yaitu *Malondialdehyde* (MDA) serta kehilangan integritas struktur sperma dengan cara kehilangan ATP intraseluler, kerusakan DNA sperma yang akhirnya nekrosis sel atau apoptosis. Penurunan testosteron terjadi karena penurunan aktivitas enzim atau penurunan kolesterol testis sebagai precursor sintesis testosteron. Sebagai konsekuensinya akan terjadi penekanan spermatogenesis dan turunnya jumlah sperma (Spiller, 2017).

2.4. Kerangka Teori



2.5. Kerangka Konsep



2.6. Hipotesis

Lama paparan merkuri peroral berpengaruh terhadap penurunan konsentrasi spermatozoa tikus jantan Wistar.



BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan ini adalah eksperimental dengan menggunakan rancangan *post-test only control group design*.

3.2. Variabel dan Definisi Operasional

3.2.1. Variabel

3.2.1.1. Variabel Bebas

Lama paparan merkuri peroral

3.2.1.2. Variabel Terikat

Konsentrasi spermatozoa tikus jantan Wistar

3.2.2. Definisi Operasional

3.2.2.1. Lama Paparan Merkuri Peroral

Lama paparan merkuri peroral adalah merkuri klorida dengan dosis 0,4 mg/kgBB/hari yang dilarutkan dalam cairan normal salin (NaCl 0,9%) yang diberikan kepada hewan coba melalui sonde selama 7, 14, 21 dan 28 hari

Skala pengukuran : Ordinal

3.2.2.2. Konsentrasi Spermatozoa

Konsentrasi sperma adalah jumlah spermatozoa permililiter semen pada hewan coba yang diberikan merkuri peroral pada kelompok perlakuan.

Skala pengukuran : Rasio

3.3. Subjek Uji Penelitian

3.3.1. Subjek Penelitian

Subjek uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus jantan Wistar yang memenuhi kriteria inklusi dan berasal dari Laboratorium Hewan Coba Fakultas Kedokteran Universitas Sultan Agung Semarang.

3.3.2. Besar Sampel

Jumlah sampel dari setiap kelompok dihitung menggunakan rumus Federer. Kelompok perlakuan yang diberi merkuri peroral berjumlah empat (7, 14, 21, dan 28 hari) dengan satu kelompok kontrol (28 hari tanpa pemberian merkuri).

Rumus Federer (W. T. Federer, 1967) :

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

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

$$4(n-1) \geq 15$$

$$n \geq 4,75 \rightarrow 5$$

Keterangan :

t = jumlah kelompok

n = jumlah sampel

Berdasarkan perhitungan tersebut, didapatkan jumlah sampel minimal yang diperlukan masing-masing kelompok adalah lima ekor tikus. Untuk mengantisipasi *drop out* maka peneliti menambahkan satu ekor tikus. Sehingga total subjek uji yang dibutuhkan adalah 25 ekor tikus.

3.3.2.1. Kriteria Inklusi

1. Umur 2-3 bulan
2. Berat Badan 150-200 gram
3. Sehat secara fisik luar

Tikus yang sakit atau mati selama penelitian berlangsung dihitung sebagai subjek uji *drop out*

3.3.2.2. Teknik Sampling

Teknik sampling yang digunakan adalah *random allocation* yaitu dengan memilih secara acak kemudian menentukan jumlah sampel yang akan diteliti dari populasi terjangkau.

3.4. Instrumen dan Bahan Penelitian

3.4.1. Instrumen Penelitian

1. Kandang tikus
2. Alat untuk pengambilan testis : gunting kecil, pinset sirurgis

3. Mikroskop cahaya dengan lensa okular pembesaran 10x dan lensa obyektif pembesaran 10x ,40x dan 100x
4. Gelas kaca
5. Cawan petri
6. Sarung tangan
7. Hemositometer
8. Deck glass
9. Gabus
10. Pentul

3.4.2. Bahan Penelitian

1. 25 ekor tikus Jantan Wistar sesuai kriteria inklusi
2. Merkuri klorida
3. NaCl 0,9%
4. Larutan George
5. Aquades
6. Makanan dan minuman tikus

3.5. Cara Penelitian

3.5.1. Persiapan Penelitian

Hewan coba tikus Jantan Wistar disiapkan sebanyak 25 ekor, kandang, makanan dan minuman untuk tikus standar, alat dan bahan untuk menilai konsentrasi spermatozoa.

3.5.2. Pelaksanaan Penelitian

3.5.2.1. Aklimatisasi

Aklimatisasi dari tikus selama 7 hari supaya tikus dapat menyesuaikan dengan kandang barunya.

3.5.2.2. Pembagian Kelompok

Tikus yang sudah termasuk kriteria inklusi kemudian di randomisasi atau diacak menjadi 5 kelompok, 1 kelompok kontrol yang berisi 5 ekor tikus dan 4 kelompok perlakuan yang berisi masing-masing 5 ekor tikus.

1. Kelompok 1: yaitu kelompok kontrol yang berisi 5 ekor tikus jantan Wistar dengan diberi pakan dan minum standar tanpa diberi merkuri peroral.
2. Kelompok 2: yaitu kelompok perlakuan yang berisi 5 ekor tikus jantan Wistar yang diberikan pakan dan minum standar dengan diberikan merkuri peroral dosis 0,4 mg/KgBB/hari selama 7 hari.
3. Kelompok 3: yaitu kelompok perlakuan yang berisi 5 ekor tikus jantan Wistar yang diberikan pakan dan minum standar dengan diberikan merkuri peroral dosis 0,4 mg/KgBB/hari selama 14 hari.
4. Kelompok 4: yaitu kelompok perlakuan yang berisi 5 ekor tikus jantan Wistar yang diberikan pakan dan

minum standar dengan diberikan merkuri peroral dosis 0,4 mg/KgBB/hari selama 21 hari.

5. Kelompok 5: yaitu kelompok perlakuan yang berisi 5 ekor tikus jantan Wistar yang diberikan pakan dan minum standar dengan diberikan merkuri peroral dosis 0,4 mg/KgBB/hari selama 28 hari.

3.5.2.3. Pengambilan Spermatozoa

Pengambilan sampel spermatozoa dilakukan sesuai dengan lama pemaparan, terdapat kelompok 1 sebagai kontrol lalu kelompok 2 sampai kelompok 5 sebagai kelompok perlakuan dilakukan selama 7, 14, 21 dan 28 hari. Pengambilan sampel dengan cara mematikan tikus Jantan Wistar dengan metode *dislocatio cervicalis*. Untuk mengambil spermatozoa dari tikus maka dilakukan pengambilan cauda epidimis dan vas deferens kemudian diurut menggunakan pinset sirugis lalu diletakkan di cawan petri yang sudah di beri NaCl dengan dosis 250 mikroliter menggunakan mikropipet. Lalu dihomogenkan dengan mikropipet dengan berulang kali meghisap cairannya dan di keluarkan kembali sampai terlihat homogen.

3.5.2.4. Pemeriksaan Hitung Konsentrasi Sperma (World Health Organization, 2021)

- Sperma diambil dengan pipet leukosit sampai angka 0,5
- Larutan george diambil dengan pipet leukosit sampai angka 11
- Homogenkan selama 3 menit
- Buang 3 tetes pertama kemudian teteskan ke bilik hitung
- Sperma yang sudah homogen ditutup *deck glass*
- Menghitung jumlah spermatozoa pada bidang seluas $1/5 \text{ mm}^2$
- Diamati dengan menggunakan mikroskop perbesaran 400x
- Diamati pada keempat bilik hitung leukosit
- Hasil penghitungan yang didapat dihitung menggunakan rumus

$$\text{Konsentrasi} = (n \times p) / V \text{ bilik hitung}$$

Keterangan :

n = jumlah spermatozoa

p = faktor pengenceran

V = volume

3.6. Tempat dan Waktu

3.6.1. Tempat Penelitian

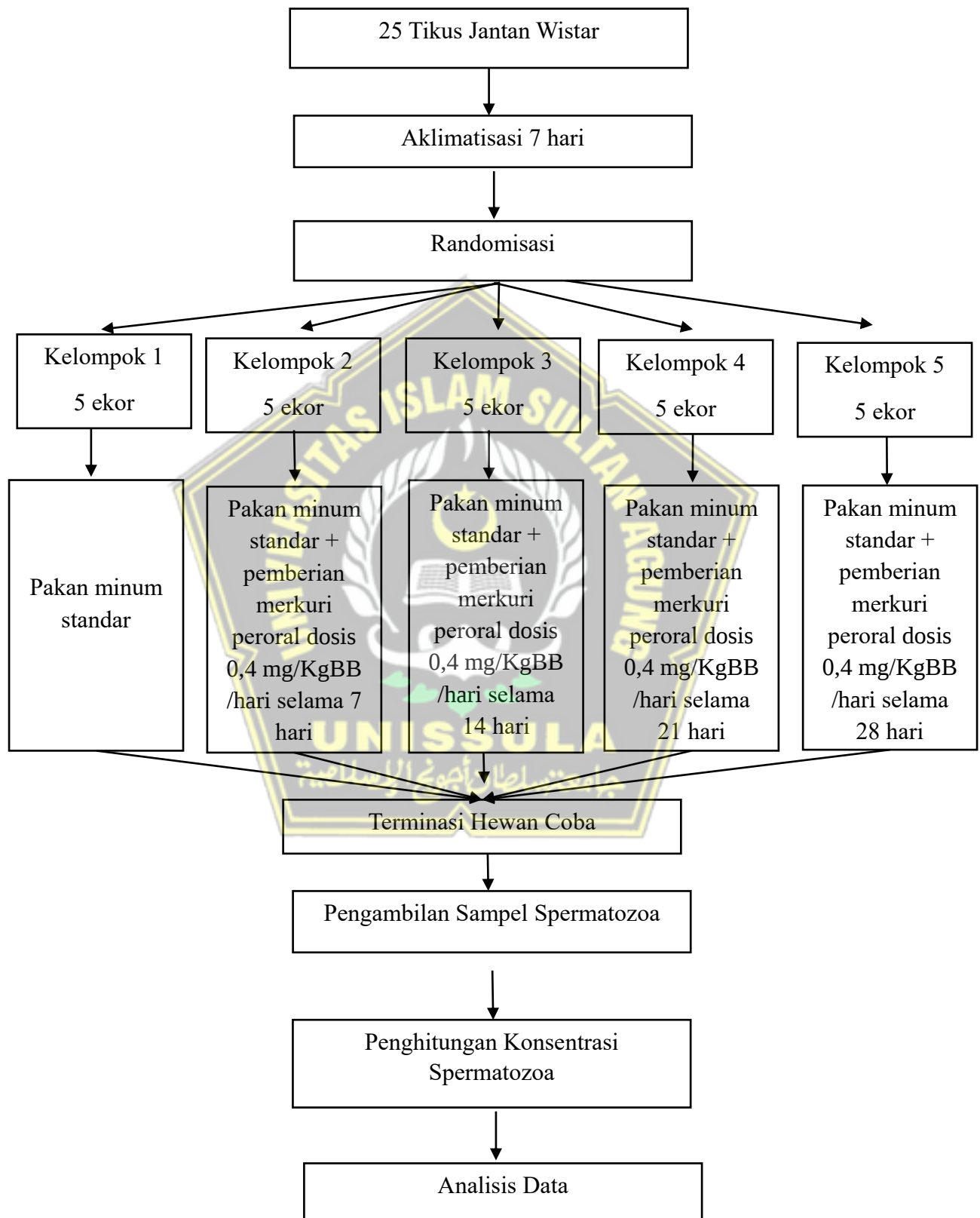
Penelitian dilakukan di Laboratorium Biologi FK UNISSULA dan Laboratorium hewan coba FK UNISSULA

3.6.2. Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan September - Oktober 2022

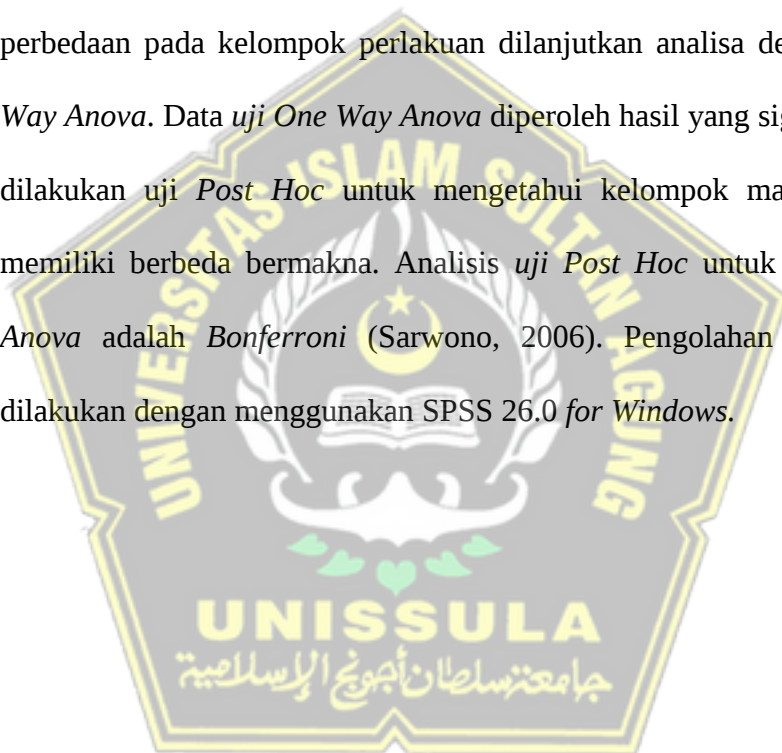


3.7. Alur Penelitian



3.8. Analisis Data

Analisis deskriptif disajikan dengan cara menghitung rerata prosentase jumlah normal konsentrasi spermatozoa pada masing-masing kelompok. Sampel berjumlah kurang dari 50, dilakukan uji *Shapiro-wilk* untuk mengetahui normalitas dan untuk homogenitas dilakukan uji *Leuvene statistic*. Didapatkan data normal dan homogen, maka untuk mengetahui perbedaan pada kelompok perlakuan dilanjutkan analisa dengan uji *One Way Anova*. Data uji *One Way Anova* diperoleh hasil yang signifikan maka dilakukan uji *Post Hoc* untuk mengetahui kelompok mana saja yang memiliki berbeda bermakna. Analisis uji *Post Hoc* untuk uji *One Way Anova* adalah *Bonferroni* (Sarwono, 2006). Pengolahan analisis data dilakukan dengan menggunakan SPSS 26.0 for Windows.

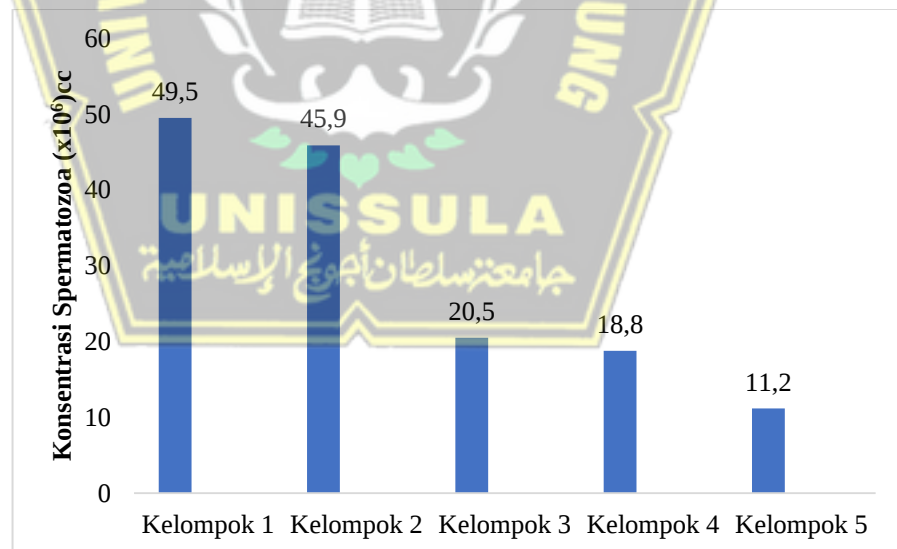


BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

4.1. Hasil Penelitian

Penelitian tentang pengaruh lama paparan merkuri peroral terhadap konsentrasi spermatozoa ini dilakukan pada 25 ekor tikus jantan Wistar yang dibagi menjadi 5 kelompok. Kelompok 1 merupakan kelompok kontrol yang hanya diberikan pakan standar, kelompok 2, 3, 4, dan 5 merupakan kelompok perlakuan yang diberi pakan standar dan paparan merkuri klorida peroral dengan dosis 0,4 mg/kgBB/hari selama 7, 14, 21, dan 28 hari secara berurutan tiap kelompok. Hasil pemeriksaan rerata konsentrasi spermatozoa pada kelima kelompok ditunjukkan sebagai berikut:



Gambar 4. 1 Rata-rata konsentrasi spermatozoa setiap kelompok

Berdasarkan gambar 4.1 dapat diketahui bahwa kelompok 1 menunjukkan konsentrasi spermatozoa tertinggi yaitu $49,5 \times 10^6$ cc;

sedangkan kelompok 5 menunjukkan konsentrasi spermatozoa terendah yaitu $11,2 \times 10^6$ cc.

Tabel 4. 1 Hasil analisis konsentrasi spermatozoa antar kelompok

Kelompok	Mean $\pm$ SD ($\times 10^6$)/cc	p-value		
		Shapiro Wilk	Levene	One way anova
1	49,5 $\pm$ 15,01	0,952		
2	45,9 $\pm$ 17,61	0,494		
3	20,5 $\pm$ 16,28	0,163	0,522	0,002
4	18,8 $\pm$ 17,43	0,115		
5	11,2 $\pm$ 9,16	0,178		

Berdasarkan tabel 4.1 uji normalitas data dengan *Shapiro Wilk* diketahui bahwa kelima kelompok memiliki nilai $p > 0,05$ sehingga dinyatakan bahwa kelima kelompok uji tersebut memiliki data konsentrasi spermatozoa yang terdistribusi normal. Berdasarkan hasil uji homogenitas varian dengan uji *Levene* diperoleh nilai $p = 0,522$ ($p > 0,05$) yang menunjukkan bahwa varian data konsentrasi spermatozoa antar kelima kelompok adalah homogen.

Distribusi data normal dan varian data yang homogen menunjukkan terpenuhinya syarat uji parametrik, sehingga untuk mengetahui bermakna atau tidaknya rata-rata konsentrasi spermatozoa antar kelima kelompok digunakan uji *One Way Anova*. Berdasarkan hasil uji *One Way Anova* diperoleh nilai p sebesar 0,002 dimana $p < 0,05$ yang artinya terdapat

perbedaan konsentrasi spermatozoa antar kelima kelompok, maka menunjukkan bahwa pemberian merkuri peroral berpengaruh terhadap konsentrasi spermatozoa pada tikus jantan Wistar dengan demikian berarti H_1 diterima dan H_0 ditolak.

Untuk mengetahui apakah perbedaan rata-rata konsentrasi spermatozoa antar dua kelompok bermakna atau tidak maka dilanjutkan uji *Post Hoc Bonferroni*.

Tabel 4. 2 Hasil Uji Post Hoc Bonferroni

Kelompok (I)	Kelompok (II)	p	Keterangan
Kelompok 1	Kelompok 2	1,000	tidak bermakna
	Kelompok 3	0,075	tidak bermakna
	Kelompok 4	0,051	tidak bermakna
	Kelompok 5	0,008	bermakna*
Kelompok 2	Kelompok 3	0,170	tidak bermakna
	Kelompok 4	0,116	tidak bermakna
	Kelompok 5	0,20	tidak bermakna
Kelompok 3	Kelompok 4	1,000	tidak bermakna
	Kelompok 5	1,000	tidak bermakna
Kelompok 4	Kelompok 5	1,000	tidak bermakna

Keterangan: * = perbedaan rerata antar dua kelompok mempunyai nilai yang signifikan ($p < 0,05$)

Berdasarkan tabel 4.2 diketahui hanya ada 1 pasang kelompok yang menunjukkan perbedaan rata-rata konsentrasi spermatozoa yang bermakna, yaitu antara kelompok 1 (kelompok kontrol) dengan kelompok 5 (perlakuan 28 hari). Rata-rata konsentrasi spermatozoa kelompok 5 secara bermakna lebih rendah daripada kelompok 1, menunjukkan bahwa semakin lama

paparan merkuri peroral menyebabkan penurunan konsentrasi spermatozoa ($p<0,05$). Sedangkan pada kelompok 1, 2, 3, dan 4 tidak didapatkan perbedaan rerata konsentrasi spermatozoa yang signifikan.

4.2. Pembahasan

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pengaruh lama paparan merkuri peroral terbukti dapat menurunkan konsentrasi spermatozoa pada tikus jantan Wistar. Hasil ini mendukung penelitian Adelakun *et al.*, (2020) bahwa pemberian merkuri klorida peroral selama 28 hari dapat menurunkan konsentrasi spermatozoa. Paparan merkuri peroral mempengaruhi penurunan kadar testosteron, LH dan FSH, dimana perubahan tersebut dapat memengaruhi kualitas sperma ditandai dengan penurunan konsentrasi spermatozoa (Almeer *et al.*, 2020).

Penurunan konsentrasi spermatozoa dimungkinkan bahwa lama paparan merkuri peroral dapat merusak sel leydig yang berfungsi menghasilkan hormon testosteron, serta penghambatan sitokrom P450 sehingga mengganggu regulasi androgen testis dengan cara menyebabkan penurunan E2 testis (17β -estradiol) (Boujbiha *et al.*, 2019). Penurunan estradiol dapat menghilangkan sel yang mengekspresikan enzim antioksidan sehingga sebagai konsekuensinya terjadi ketidakseimbangan prooksidan dan antioksidan *Superoxidedismutase* (SOD), *Catalase* (CAT), dan *Glutation Peroxidase* (GPOD) (Wetipo *et al.*, 2019). Penurunan enzim antioksidan mengakibatkan terbentuknya ROS yang berlebihan.

Pembentukan ROS bisa merusak mitokondria sperma sehingga menyebabkan peningkatan peroksidasi lipid testis. Akibat peningkatan peroksidasi lipid, sperma yang kaya akan asam lemak tak jenuh (PUFA) akan mengalami degradasi karena produksi aldehida sitosol yaitu *Malondialdehyde* (MDA) (Dutta *et al.*, 2019). Stress oksidatif juga berperan dalam menyebabkan kehilangan integritas struktur sperma dengan cara kehilangan ATP intrasel, merusak DNA sperma melalui *8-hydroxy-2'-deoxyguanosine* sebagai penanda kerusakan DNA sperma oksidatif (Boujbiha *et al.*, 2019). Pembentukan ROS yang berlebihan diketahui dapat memengaruhi proses *post-testicular* melalui defek maturasi. Perannya dalam menyebabkan kerusakan oksidatif membran lipid, protein sperma, dan DNA sperma. Kerusakan DNA sperma dan mutasi sperma akan menginduksi terjadinya apoptosis sel yang pada akhirnya menyebabkan penurunan konsentrasi spermatozoa (Fotios Dimitriadis *et al.*, 2017).

Kecenderungan hipospermatogenesis terdapat pada kelompok paparan yang semakin lama dengan hasil penurunan rerata konsentrasi spermatozoa. Perbedaan signifikan baru nampak pada kelompok paparan 28 hari (kelompok 5) dapat dibandingkan dengan kelompok kontrol. Paparan merkuri klorida peroral selama 7, 14, dan 21 hari memungkinkan kadar ROS yang masuk ke tubuh masih dalam jumlah yang belum mencukupi untuk menimbulkan kerusakan pada sel leydig, dan penurunan kadar antioksidan sehingga belum menimbulkan gangguan spermatogenesis yang signifikan. Perbedaan bermakna baru didapati pada kelompok dengan paparan 28 hari, dimana

kadar ROS yang terakumulasi memicu dampak ke konsentrasi spermatozoa (Harahap *et al.*, 2018).

Keterbatasan penelitian ini adalah ketidaksediaannya data kadar ROS dan antioksidan selama penelitian, sehingga dimungkinkan masih terdapat reaksi pertahanan yang berbeda dari antioksidan endogen sperma.



BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

5.1.1. Lama paparan merkuri peroral berpengaruh terhadap konsentrasi spermatozoa tikus jantan Wistar.

5.1.2. Rerata konsentrasi spermatozoa pada tikus jantan Wistar kelompok kontrol adalah sebesar $49,5 \pm 15,01 \times 10^6/\text{cc}$.

5.1.3. Rerata konsentrasi spermatozoa pada tikus jantan Wistar yang diberi paparan merkuri peroral selama 7, 14, 21, dan 28 hari adalah sebesar $45,9 \pm 17,61 \times 10^6/\text{cc}$; $20,5 \pm 16,28 \times 10^6/\text{cc}$; $18,8 \pm 17,43 \times 10^6/\text{cc}$; dan $11,2 \pm 9,16 \times 10^6/\text{cc}$.

5.1.4. Terdapat perbedaan rerata konsentrasi spermatozoa yang signifikan pada kelompok kontrol dengan kelompok yang diberi paparan merkuri peroral selama 28 hari.

5.2. Saran

Terkait dengan keterbatasan penelitian ini maka disarankan agar hasil penelitian ini ditindaklanjuti dengan mengukur pengaruh lama paparan merkuri terhadap kadar ROS dan kadar antioksidan testis.

DAFTAR PUSTAKA

- Adelakun, S.A., Ukwenya, V.O., Akingbade, G.T., Omotoso, O.D., Aniah, J.A. (2020) "Interventions of aqueous extract of *Solanum melongena* fruits (garden eggs) on mercury chloride induced testicular toxicity in adult male Wistar rats," *Biomedical Journal*, 43(2), pp. 174–182. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bj.2019.07.004>.
- Agarwal, A., Baskaran, S., Parekh, N., Cho, C. L., Henkel, R., Vij, S., Arafa, M., Panner Selvam, M. K., & Shah, R. (2021). Male infertility. In *The Lancet* (Vol. 397, Issue 10271, pp. 319–333). Lancet Publishing Group. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32667-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32667-2)
- Akbar, A. (2020) "Gambaran Faktor Penyebab Infertilitas Pria Di Indonesia : Meta Analisis," *Jurnal Pandu Husada*, 1(2), p. 66. Available at: <https://doi.org/10.30596/jph.v1i2.4433>.
- Almeer, R.S., Albasher, G., Kassab, R., Ibrahim, S., Alotibi, F., Alarifi, S., Ali, D., Alkahtani, S., Abdel, M.A. (2020) "Ziziphus spina-christi leaf extract attenuates mercury chloride-induced testicular dysfunction in rats," *Environmental Science and Pollution Research*, 27(3), pp. 3401–3412. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11356-019-07237-w>.
- Amelia, L. dan Rahmanisa, S. (2019) *Tinjauan Pustaka Evaluasi Dan Manajemen Infertilitas Pria, Jimki*.
- Assidi, M. (2022) "Infertility in Men: Advances towards a Comprehensive and Integrative Strategy for Precision Theranostics," *Cells*, 11(10), p. 1711. Available at: <https://doi.org/10.3390/cells11101711>.
- Bjørklund, G., Chirumbolo, S., Dadar, M., Pivina, L., Lindh, U., Butnariu, M., Aaseth, J., (2019) "Mercury exposure and its effects on fertility and pregnancy outcome," *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*. Blackwell Publishing Ltd, pp. 317–327. Available at: <https://doi.org/10.1111/bcpt.13264>.
- Boitrelle, F., Shah, R., Saleh, R., Henkel, R., Kandil, H., Chung, E., Vogiatzi, P., Zini, A., Arafa, M., Agarwal, A., (2021) "The Sixth Edition of the WHO Manual for Human Semen Analysis: A Critical Review and SWOT Analysis," *Life*. MDPI. Available at: <https://doi.org/10.3390/life11121368>.
- Boujbiha, M. A. M., Hamden, K., Guermazi, F., Bouslama, A., Omezzine, A., & el Feki, A. (2019). Impairment of spermatogenesis in rats by mercuric chloride: Involvement of low 17 β -estradiol level in induction of acute

- oxidative stress. *Biological Trace Element Research*, 142(3), 598–610. <https://doi.org/10.1007/s12011-010-8774-2>
- vander Borgh, M. dan Wyns, C. (2018) “Fertility and infertility: Definition and epidemiology,” *Clinical Biochemistry*. Elsevier Inc., pp. 2–10. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2018.03.012>.
- Bulqis, A.R., Ayu, N., Ermayanti, M., Wirasiti, N. (2020) *Simbiosis Viii (1):17-27 Perbedaan Kualitas Sperma Pada Pasien Penderita Diabetes Mellitus Tipe 1 Dan 2 Di Rsud. Lamadukelleng, Sengkang, Sulawesi Selatan* Difference In Sperm Quality In Patients With Type 1 And 2 Diabetes Mellitus In Rsud. Lamadukelleng, Sengkang, Sulawesi Selatan. Available at: <http://ojs.unud.ac.id/index.php/simbiosis>.
- Craig, J.R., Jenkins, T., Carrel, D., Hostaling, J. (2017) “Obesity, male infertility, and the sperm epigenome,” *Fertility and Sterility*. Elsevier Inc., pp. 848–859. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.02.115>.
- Dai, J.B., Wang, Z.X. and Qiao, Z.D. (2015) “The hazardous effects of tobacco smoking on male fertility,” *Asian Journal of Andrology*. Medknow Publications, pp. 954–960. Available at: <https://doi.org/10.4103/1008-682X.150847>.
- Darmayanti, F., Hakimi, M., & Anwar, M. (2021). Cost of Illness infertilitas di Indonesia. *Universitas Gadjah Mada*.
- Dillasamola, D. dan Farm, M. (2021) *Buku Infertilitas*. Available at: www.lppm.unand.ac.id.
- Dutta, S., Majzoub, A. dan Agarwal, A. (2019) ‘Oxidative stress and sperm function: A systematic review on evaluation and management’, *Arab Journal of Urology*. Taylor and Francis Ltd., pp. 87–97. Available at: <https://doi.org/10.1080/2090598X.2019.1599624>.
- Dorland, W.A.N. (2012) “kamus kedokteran dorland.”
- El-Desoky, G.E., Bashandy, S., Alhazza, I., Al-Othman, Z., Aboul-Soud, M., Yusuf, K. (2013) “Improvement of Mercuric Chloride-Induced Testis Injuries and Sperm Quality Deteriorations by *Spirulina platensis* in Rats,” *PLoS ONE*, 8(3). Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059177>.
- Fotios Dimitriadis, G. A. A. K. C. M. A. T. and N. S. (2017). Pre-Testicular, Testicular, and Post-Testicular Causes of Male Infertility. *Endocrinology of the Testis and Male Reproduction, Endocrinology 1*, 963–992.

- Fawzy, F., Hussein, A., Eid, M., Kashash, A., Salem, H. (2015) "Cryptorchidism and Fertility," *Clinical Medicine Insights: Reproductive Health*, 9, p. CMRH.S25056. Available at: <https://doi.org/10.4137/cmhr.s25056>.
- GOLD-ISMIA. (2020) *Kebijakan Pengurangan Dan Penghapusan Merkuri Di Indonesia*. Available at: www.goldismia.org.
- Hall, E.J. dan H.M.E. (2020) "Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology 14th," *Elsevier Health Sciences* [Preprint].
- Harahap, W. E., Sandora, N., dan Winarto. (2018). Pengaruh Pemberian Antioksidan Vitamin C dan E Terhadap Spermatozoa Mencit (*Mus Musculus*) yang Dipapar Asap Rokok.
- Harlev, A., Agarwal, A., Gunes, S., Shetty, A., du-Plessis, S., (2015) "Smoking and Male Infertility: An Evidence-Based Review," *The World Journal of Men's Health*, 33(3), p. 143. Available at: <https://doi.org/10.5534/wjmh.2015.33.3.143>.
- Haynes, W.M., Lide, D.R. and Bruno, T.J. (2017) *CRC Handbook of Chemistry and Physics 97th Edition*.
- Idris, R. dan Hartamto, H. (2020) *Obat-Obatan Sebagai Penyebab Infertilitas Pria, Jurnal Keperawatan Indonesia*.
- Insiani, Y. (2020) *Kebijakan Pengurangan Dan Penghapusan Merkuri Di Indonesia*. Available at: www.goldismia.org.
- Jonathan Jose Johan, Hadi dan Amarwati, S. (2017) "Pengaruh Pemberian Merkuri Per Oral Terhadap Gambaran Histopatologi Liver Tikus Wistar," 6(2), pp. 673–681.
- Menkes RI (2016) "Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 57 Tahun 2016 Tentang Rencana Aksi Nasional Pengendalian Dampak Kesehatan Akibat Paparan Merkuri Tahun 2016-2020," *Menteri Kesehatan Republik Indonesia*, pp. 1–10.
- Mulyani, umi, Sukarni, diah, & Sari, erma puspita. (2021). Faktor-faktor yang berhubungan dengan infertilitas primer pada pasangan usia subur di wilayah kerja UPTD puskesmas Lembak Kab. Muara Enim tahun 2021. *NUSANTARA: Jurnal Ilmu Pengetahuan Sosial*, 8 (8).
- NCBI (2022) *PubChem Compound Summary for CID 24085, Mercuric chloride, National Center fo Biotechnology Information*.
- Nurhayati (2014) "Pengaruh Monosodium Glutamate (MSG) terhadap Jumlah dan Morfologi Spermatozoa Tikus Jantan Dewasa (*Rattus norvegicus*)," *Jurnal Kesehatan Poltekkes Palembang*, 2(14), pp. 1–6.

- Othman, M.S., Aboulkhair, M., Abdel, M.A. (2014) "The potential effect of berberine in mercury-induced hepatorenal toxicity in albino rats," *Food and Chemical Toxicology*, 69, pp. 175–181. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.04.012>.
- Park, J.D. dan Zheng, W. (2012) "Human exposure and health effects of inorganic and elemental mercury," *Journal of Preventive Medicine and Public Health*, 45(6), pp. 344–352. Available at: <https://doi.org/10.3961/jpmph.2012.45.6.344>.
- Pasaribu, I.H., Rahayu, M.A. dan Marlina, R. (2019) *Faktor-Faktor Yang Mempengaruhi Infertilitas Pada Wanita Di Rumah Sakit Dewi Sri Karawang*.
- Putranto, T. T. (2021). *Pencemaran Logam Berat Merkuri (Hg) Pada Air tanah*. <https://www.researchgate.net/publication/277074245>
- Putri, D. (2017) *Hubungan Intake Mingguan Merkuri Dalam Beras Lokal*.
- Sarwono, J. (2006) 'Buku Metodologi Penelitian Kuantitatif dan Kualitatif'.
- Saturday, A. (2018) "Mercury and Its Associated Impact on Environment and Human Health," *Department of Environment and Natural Resources. Review Article* [Preprint].
- Sherwood, L. dan Ward, C. (2020) *Human physiology : from cells to systems*.
- Spiller, H.A. (2017) "Rethinking mercury: the role of selenium in the pathophysiology of mercury toxicity," *Clinical Toxicology*, 56(5), pp. 313–326. Available at: <https://doi.org/10.1080/15563650.2017.1400555>.
- Srimaulia, R. (2018) *Risk Analysis Of Mercury Exposure On Neuropsychological Effect In The Gold Processing Community At Krueng Kalee Village, Pasie Raja Subdistrict, Aceh Selatan Regency 2018*.
- Susilawati, T. (2015) *Spermatologi*. Malang.
- Tafari, S. et al. (2015) 'Reactive Oxygen Species (ROS) and Male Fertility', in *New Discoveries in Embryology*. InTech. Available at: <https://doi.org/10.5772/60632>.
- Tan, S.W., Meiller, J.C. dan Mahaffey, K.R. (2014) "The endocrine effects of mercury in humans and wildlife," *Critical Reviews in Toxicology*, pp. 228–269. Available at: <https://doi.org/10.1080/10408440802233259>.
- United Nations Environment dan Global Mercury Assessment (2018) *Global Mercury Assessment*.

- Van der Horst, G., Skosana, B., Legendre, A., Oyeyipo, P., & du Plessis, S. S. (2018). Cut-off values for normal sperm morphology and toxicology for automated analysis of rat sperm morphology and morphometry. *Biotechnic and Histochemistry*, 93(1), 49–58. <https://doi.org/10.1080/10520295.2017.1380842>
- W. T. Federer (1967) *Experimental design theory and application*. English: Oxford & IBH, Calcutta, 1967.
- Wahyuni, L.T. (2015) “Pengaruh Gangguan Tidur terhadap Kadar Hormon Testosteron dan Jumlah Spermatozoa pada Tikus Jantan Wistar,” *Jurnal Kesehatan Andalas*, 4(3).
- William (2020) “Efek Leptin Berlebih terhadap Fertilitas Laki-Laki,” *Syifa’ MEDIKA, Departemen Biologi Kedokteran Unika Atma Jaya*, 10 (No.2).
- Wetipo, Y.S. et al. (2019) *Produksi Ros Akibat Akumulasi Ion Logam Berat Dan Mekanisme Penangkal Dengan Antioksidan*.
- World Health Organization (2021) *WHO Laboratory manual for the examination and processing of human semen sixth edition*. Sixth edition. Edited by P. Askew Ian.
- Zulaikhah, S.T., Wahyuwibowo, J. dan Pratama, A.A. (2020) ‘Mercury and its effect on human health: A review of the literature’, *International Journal of Public Health Science*, 9(2), pp. 103–114. Available at: <https://doi.org/10.11591/ijphs.v9i2.20416>.
- Zhu, X., Kusaka, Y., Sato, K., Zhang, Q. (2015) “The endocrine disruptive effects of mercury,” *Environmental Health and Preventive Medicine*, 4(4), pp. 174–183. Available at: <https://doi.org/10.1007/BF02931255>