

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

Studi Eksperimental terhadap Tikus Jantan Wistar

Skripsi

untuk memenuhi sebagian persyaratan
mencapai gelar Sarjana Kedokteran



diajukan oleh:

Daffa' Afif Amaajid

30101900053

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS ISLAM SULTAN AGUNG
SEMARANG**

2023

SKRIPSI

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

Studi Eksperimental terhadap Tikus Jantan Wistar

Yang dipersiapkan dan disusun oleh

Daffa Afif Amaajid

30101900053

Telah diperthankan 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. Israhanto Isradji M.Si

Pembimbing II



dr. Ulfah Dian Indrayani, M.Sc

dr. Iwang Yusuf M.Si

Semarang, 09 Februari 2023

Fakultas Kedokteran

Universitas Islam Sultan Agung

Deskan,



DR. dr. Setyo Trisnadi, SH., Sp.KF

SURAT PERNYATAN

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama Mahasiswa : Daffa' Afif Amaajid

NIM : 30101900053

Dengan ini menyatakan bahwa Skripsi yang berjudul:

**“PENGARUH LAMA PAPARAN MERKURI PERORAL TERHADAP
MORFOLOGI 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, 25 Januari 2023



Daffa' Afif Amaajid

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 MORFOLOGI 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 yang 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. Iwang Yusuf M.Si., 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 (Bapak Mardi, Ibu Eva, Mbak Debi, Mbak Anita, dan Mas Wildan) yang telah membantu dalam penelitian ini serta dosen Laboratorium Biologi Ibu Dina Fatmawati S.Si, M.Sc yang sudah membimbing penelitian ini.
5. Ibunda Kasirah dan Ayahanda Tasman S.KM. M.Kes., 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 serta 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, 25 Januari 2023



Daffa' Afif Amaajid

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
SURAT PERNYATAN	iii
PRAKATA.....	iv
DAFTAR ISI.....	vi
DAFTAR TABEL.....	ix
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR LAMPIRAN.....	xi
DAFTAR SINGKATAN DAN ISTILAH.....	xii
INTISARI.....	xiii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Perumusan Masalah.....	4
1.3. Tujuan Penelitian.....	4
1.3.1. Tujuan Umum.....	4
1.3.2. Tujuan Khusus.....	4
1.4. Manfaat Penelitian.....	5
1.4.1. Manfaat Teoritis.....	5
1.4.2. Manfaat Praktis.....	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	6
2.1. Spermatogenesis	6
2.1.1. Spermatogenesis	6
2.1.2. Hormon yang Berperan Dalam Spermatogenesis.....	8
2.1.3. Proses Spermatogenesis	9
2.1.4. Faktor yang Memengaruhi Spermatogenesis	11
2.1.5. Analisa Morfologi Spermatozoa	14
2.2. Merkuri Klorida.....	17
2.2.1. Identifikasi Merkuri Klorida	17
2.2.2. Deskripsi Merkuri Klorida	17
2.2.3. Sumber Merkuri Klorida	18

2.2.4.	Efek Merkuri terhadap Tubuh	19
2.3.	Pengaruh Merkuri terhadap Morfologi Spermatozoa Tikus.....	20
2.4.	Kerangka Teori.....	23
2.5.	Kerangka Konsep	24
2.6.	Hipotesis	24
BAB III METODE PENELITIAN.....		25
3.1.	Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian.....	25
3.2.	Variabel dan Definisi Operasional	25
3.2.1.	Variabel	25
3.2.2.	Definisi Operasional.....	25
3.3.	Subjek Uji.....	26
3.3.1.	Subjek Penelitian	26
3.3.2.	Kriteria Inklusi.....	26
3.3.3.	Besar Sampel	26
3.3.4.	Teknik Sampling	27
3.4.	Instrumen dan Bahan Penelitian.....	27
3.4.1.	Instrumen Penelitian.....	27
3.4.2.	Bahan Penelitian.....	27
3.5.	Cara Penelitian.....	28
3.5.1.	Persiapan Penelitian.....	28
3.5.2.	Pelaksanaan Penelitian	28
3.6.	Tempat dan Waktu Penelitian	30
3.6.1.	Tempat Penelitian	30
3.6.2.	Waktu Penelitian	30
3.7.	Alur Penelitian.....	31
3.8.	Analisis Data	32
BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN.....		33
4.1.	Hasil Penelitian.....	33
4.2.	Pembahasan	37
BAB V.....		40
KESIMPULAN.....		40
5.1.	Kesimpulan.....	40

5.2. Saran.....	40
DAFTAR PUSTAKA.....	41
LAMPIRAN.....	44



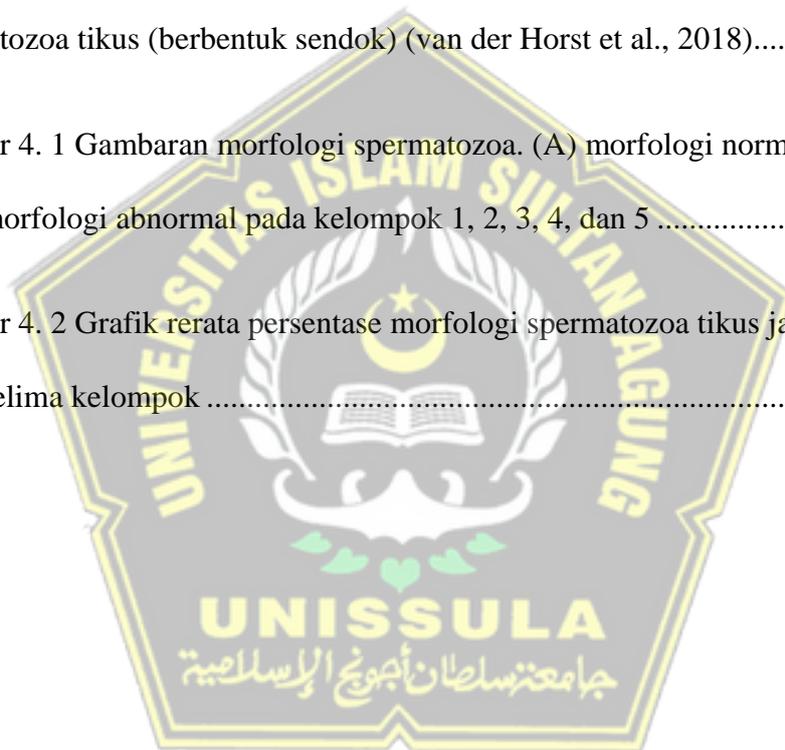
DAFTAR TABEL

Tabel 2. 1 Klasifikasi Morfologi Spermatozoa Manusia (WHO, 2021).....	16
Tabel 2. 2. Efek Paparan Merkuri pada Sistem Tubuh Manusia (Kementerian Kesehatan RI, 2016).....	19



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2. 1 Proses Spermatogenesis (Sherwood, 2019)	10
Gambar 2. 2. Skema bentuk abnormal spermatozoa manusia (WHO, 2021)	15
Gambar 2. 3. A) Morfologi normal spermatozoa tikus. B) Morfologi abnormal spermatozoa tikus (berbentuk sendok) (van der Horst et al., 2018).....	16
Gambar 4. 1 Gambaran morfologi spermatozoa. (A) morfologi normal, (B, C, D, E, F) morfologi abnormal pada kelompok 1, 2, 3, 4, dan 5	34
Gambar 4. 2 Grafik rerata persentase morfologi spermatozoa tikus jantas Wistar pada kelima kelompok	35



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Lampiran Hasil Pengamatan dan Hasil Analisis Statistik Morfologi Spermatozoa tikus jantan Wistar.....	45
Lampiran 2 Ethical Clearance.....	51
Lampiran 3 Surat Izin Penelitian Laboratorium Biologi.....	52
Lampiran 4 Surat Keterangan Selesai Penelitian.....	53
Lampiran 5 Dokumentasi Penelitian.....	54



DAFTAR SINGKATAN DAN ISTILAH

UNEP	: <i>United Nations Environment Programme</i>
PESK	: <i>Pertambangan Emas Skala Kecil</i>
DNA	: <i>Deoxyribo Nucleic Acid</i>
LH	: <i>Luteinizing Hormone</i>
LD50	: <i>Lethal Dose 50% of Responses</i>
FSH	: <i>Follicle-Stimulating Hormone</i>
DM	: <i>Diabetes Mellitus</i>
BBB	: <i>Blood Brain Barrier</i>
WHO	: <i>World Health Organization</i>



INTISARI

Infertilitas menjadi salah satu masalah kesehatan reproduksi, khususnya di Indonesia yang mencapai 12-15% dari 40 juta pasangan usia subur. Pertambangan emas skala kecil (PESK) yang bermunculan di Indonesia menjadi sumber utama pencemaran merkuri di lingkungan dan perairan sekitarnya. Sehingga, air dan sumber makanan yang telah terkontaminasi merkuri berpotensi mengakibatkan infertilitas di daerah sekitarnya. Salah satu indikator infertilitas yang dapat dinilai yaitu rerata morfologi spermatozoa. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh lama paparan merkuri peroral terhadap morfologi spermatozoa tikus jantan Wistar.

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

Rata-rata morfologi spermatozoa pada kelompok 1 ($75,60 \pm 6,88$), kelompok 2 ($69,60 \pm 4,83$), kelompok 3 ($55,20 \pm 9,73$), kelompok 4 ($53,8 \pm 4,44$), dan kelompok 5 ($44,44 \pm 5,55$). Hasil uji *One Way Anova* menunjukkan hasil yang signifikan 0,000 ($p < 0,05$). Uji *Post Hoc Bonferroni* menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok 1 dengan kelompok 3, 4 dan 5 ($p < 0,05$), namun tidak ada perbedaan bermakna antara kelompok 1 dengan kelompok 2 ($p > 0,05$) serta antara kelompok 3 dengan kelompok 4 dan 5.

Berdasarkan hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa lama paparan merkuri peroral menurunkan rerata morfologi spermatozoa tikus jantan Wistar.

Kata kunci : Merkuri peroral, Morfologi Spermatozoa

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Pencemaran lingkungan dari logam berat seperti merkuri menjadi salah satu isu global saat ini. Berdasarkan *United Nations Environment Programme* (UNEP), pertambangan emas skala kecil (PESK) menjadi sumber pencemaran merkuri terbesar kedua di dunia, dan saat ini di Indonesia masih banyak PESK yang bermunculan seperti di daerah Jambi dan Aceh dapat menyebabkan sumber air dan sumber makanan disekitarnya menjadi tercemar merkuri. Pencemaran ini berbahaya karena merkuri merupakan zat yang dapat beredar dalam jangkauan luas, sulit terurai, mampu terbioakumulasi, dan memiliki toksisitas tinggi terhadap sistem organ manusia, seperti sistem reproduksi. Selain itu, air dan sumber makanan yang telah terkontaminasi merkuri berpotensi mengakibatkan infertilitas di daerah sekitarnya.

Infertilitas merupakan ketidakmampuan suatu pasangan untuk hamil bahkan setelah satu tahun hubungan seksual tanpa kontrasepsi (Borghet dan Wyns, 2018). Infertilitas dari seorang laki-laki dapat diukur dengan menilai kualitas spermatozoa, salah satunya yaitu faktor morfologi (Garrido dan Rivera, 2017). Morfologi spermatozoa yang tidak normal (teratospermia), akan memengaruhi pergerakan dan kemampuan sperma untuk membuahi sel telur sehingga meningkatkan risiko infertilitas laki-laki (Kumar dan Singh, 2015). Infertilitas juga merupakan salah satu

masalah kesehatan reproduksi yang berpengaruh pada kepercayaan diri dan citra diri pasangan tersebut. Pada tahun 2021, dari 40 juta pasangan usia subur terdapat 12 hingga 15 persen pasangan yang mengalami infertilitas (Mulyani *et al.*, 2021). Secara global, 25-30% dari infertilitas sebuah pasangan disebabkan oleh faktor laki-laki yang diantaranya karena ada kelainan pada sperma (Panjaitan dan Manurung, 2020). Kelainan pada spermatozoa yang terjadi akibat paparan merkuri dapat berasal dari sumber makanan di lingkungan sekitar PESK. Selain paparan melalui akumulasi merkuri di bahan makanan, paparan merkuri dapat terjadi melalui penggunaannya dari berbagai sumber misalnya pengawet kayu, pewarna tekstil kulit, dan pemisahan emas dari timbal (Kementerian Kesehatan RI, 2016). Penelitian pada tahun 2017 dan 2019 selama 28 hari dan menunjukkan penurunan kualitas spermatozoa. Kemudian, penelitian yang lain menyebutkan efek dari paparan merkuri selama 7 hari sudah berdampak pada hepar tikus. Berdasarkan penelitian tersebut, ditemukan bahwa masih belum ada penelitian terkait pengaruh merkuri terhadap kualitas spermatozoa pada jangka waktu bertingkat.

Penelitian secara *in vitro* pada tahun 2007 telah menunjukkan bahwa merkuri dapat menginduksi pemutusan rantai DNA spermatozoa dan menyebabkan penurunan motilitas, disfungsi, dan viabilitas sperma (Mocevic *et al.*, 2013). Selain itu, toksisitas merkuri terhadap sistem reproduksi telah dijelaskan dalam beberapa penelitian yang telah dilakukan sebelumnya terhadap hewan-hewan, yang menyebutkan bahwa

ada penurunan morfologi sperma normal pada tikus setelah dipaparkan merkuri (Mocevic *et al.*, 2013). Pada tahun 2014 juga telah dilakukan penelitian yang membuktikan adanya korelasi antara patologi sperma dengan peningkatan stres oksidatif di organ reproduksi. Para penulis menyebutkan bahwa paparan injeksi kronis terhadap merkuri dosis rendah dapat merusak kualitas spermatozoa dan memengaruhi fungsi reproduksi pria yang mungkin saja disebabkan karena adanya peningkatan stres oksidatif (Martinez *et al.*, 2014).

Pada penelitian sebelumnya, pengaruh paparan merkuri klorida peroral dengan dosis 0,4 mg/kgBB selama 7 hari terhadap tikus Wistar telah menunjukkan bahwa, paparan merkuri klorida menyebabkan nekrosis hepar dan kekacauan pada struktur lobulus hepar. Selain itu, didapatkan juga perubahan pada ginjal yang ditandai dengan adanya pembengkakan, pucat pada ginjal, dan kongesti (Othman *et al.*, 2014). Pada tahun 2017 juga telah dilakukan penelitian yang serupa selama 14 hari pada dua kelompok perlakuan, yaitu 10 mg/kgBB serta 20 mg/kgBB merkuri klorida peroral pada tikus Wistar dan menemukan bahwa paparan merkuri peroral menyebabkan kerusakan berat pada hepar tikus (Jonathan *et al.*, 2017). Pada tahun 2017 juga telah dilakukan eksperimen paparan merkuri peroral dengan dosis 40 mg/kgBB merkuri klorida peroral selama 28 hari dan ditemukan penurunan kualitas pada parameter spermatozoa (Aderemi *et al.*, 2017). Kemudian di tahun 2019, telah dilakukan eksperimen selama 28 hari tentang efek paparan merkuri klorida peroral dengan dosis 0,4

mg/kgBB pada tikus Wistar dan ditemukan penurunan pada kadar testosteron, LH, dan FSH serta degenerasi testis dan deformasi seluler dari *tubules seminiferous* (Almeer *et al.*, 2019).

Berdasarkan pemaparan di atas, masih diperlukan penelitian lebih lanjut tentang pengaruh lama paparan merkuri peroral dosis 0,4 mg/kgBB dalam waktu bertingkat terhadap morfologi spermatozoa.

1.2. Perumusan Masalah

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

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

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

1.3.2. Tujuan Khusus

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

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

1.3.2.3. Untuk mengetahui perbedaan persentase morfologi spermatozoa tikus Jantan Wistar yang diberi merkuri peroral pada kelompok perlakuan

1.4. Manfaat Penelitian

1.4.1. Manfaat Teoritis

Sebagai landasan penelitian selanjutnya terkait pengaruh lama paparan merkuri peroral terhadap morfologi spermatozoa.

1.4.2. Manfaat Praktis

Untuk memberikan informasi kepada masyarakat luas tentang efek yang ditimbulkan oleh paparan merkuri peroral pada tingkatan waktu berbeda terhadap kualitas spermatozoa.



BAB II **TINJAUAN PUSTAKA**

2.1. Spermatogenesis

2.1.1. Spermatogenesis

Spermatogenesis merupakan sebuah proses rumit sel-sel benih primordial yang tidak berdiferensiasi (spermatogonia dengan 46 kromosom) berkembang dan berproliferasi menjadi spermatozoa motil yang terspesialisasi (sperma dengan 23 kromosom) selama 64 hari (Sherwood, 2019). Spermatogenesis tikus berlangsung selama empat siklus epitel seminiferus, sehingga keseluruhan proses spermatogenesis membutuhkan waktu kurang lebih 35,5 hari yang terbagi atas 8 hari untuk perubahan sel spermatogonia A menjadi spermatosit primer; 12,5 hari untuk perubahan meiosis spermatosit primer dan sekunder; 9,5 hari untuk fase spermatid, dan 5,5 hari untuk fase pematangan (Dillasamola dan Farm, 2021). Spermatogenesis berlangsung di tubulus seminiferus ketika masa seksual aktif sebagai rangsangan dari hormon gonadotropin hipofisis anterior (Hall dan Hall, 2020). Proses ini mulai terjadi ketika masa remaja pada usia rata-rata 13 tahun dan berlanjut sepanjang sisa hidupnya, tetapi akan menurun secara signifikan pada usia tua (Hall dan Hall, 2020).

Pada masa pubertas, spermatogonia akan mulai mengalami pembelahan yang disebut mitosis dan akan terus berproliferasi serta berdiferensiasi melalui tahapan spermatogenesis untuk menjadi sebuah sperma (Hall dan Hall, 2020). Spermatogenesis membutuhkan 64 hari

untuk perkembangan spermatogonium menjadi sperma dewasa melalui tiga tahapan utama: proliferasi mitosis, meiosis, dan *packaging* (Sherwood, 2019). Spermatogenesis dimulai ketika spermatogonia (46 kromosom), sel germinal primitif di sebelah lamina basal tubulus seminiferus, matang menjadi spermatosit primer pada usia remaja. Spermatosit primer selanjutnya akan mengalami pembelahan yang disebut meiosis menjadi spermatosit sekunder dan kemudian menjadi spermatid (23 kromosom), proses inilah yang mengakibatkan jumlah kromosomnya berkurang. Spermatid kemudian matang menjadi spermatozoa (sperma) (Barrett *et al.*, 2019).

Setiap tubulus seminiferus, tempat sel germinal berkembang dibatasi oleh membran basalis yang mempunyai lumen berisi cairan mengandung sel sperma dewasa, yang disebut spermatozoa (Widmaier *et al.*, 2018). Dinding tubulus terdiri atas sel germinal yang sedang berkembang dan sel penyokong disebut dengan sel Sertoli yang memanjang dari membran basalis hingga ke lumen di tengah tubulus membentuk sebuah cincin (Sherwood, 2019). Cincin sel Sertoli ini membentuk suatu dinding yang disebut *Sertoli cell barrier* (*blood-testis barrier*), yang mencegah berbagai bahan kimia mencapai tubulus seminiferus dan menjaga cairan lumen. Susunan sel Sertoli juga memungkinkan berbagai tahapan spermatogenesis untuk terjadi di bagian sel yang berbeda dan, oleh karena itu, di lingkungan yang berbeda pula (Widmaier *et al.*, 2018).

2.1.2. Hormon yang Berperan Dalam Spermatogenesis

Menurut Hall dan Hall (2020), beberapa hormon yang berperan dalam proses spermatogenesis adalah:

1. *Testosterone*, dihasilkan oleh sel Leydig yang terdapat pada interstisial testis, berfungsi untuk pembelahan dan pertumbuhan sel germinal testis, sebagai tahap pertama pembentukan sperma.
2. *Luteinizing hormone* (LH), dihasilkan oleh kelenjar hipofisis anterior, memicu sekresi testosteron oleh sel leydig.
3. *Follicle-stimulating hormone* (FSH), hasil sekresi kelenjar hipofisis anterior, berfungsi merangsang sel Sertoli; tanpa stimulasi ini, perkembangan spermatid menjadi sperma (spermiogenesis) tidak bisa terjadi.
4. *Estrogen*, hormon yang dibentuk dari testosteron oleh sel Sertoli ketika sel tersebut distimulasi oleh *follicle-stimulating hormone*, yang juga penting dalam proses spermiogenesis.
5. *Growth hormone*, diperlukan untuk mengendalikan fungsi metabolisme organ testis. Hormon ini merangsang pembelahan awal spermatogonia; tanpa hormon tersebut, seperti yang terjadi pada *pituitary dwarfs*, spermatogenesis sangat rendah atau sama sekali tidak ada, sehingga mengakibatkan kemandulan.

2.1.3. Proses Spermatogenesis

2.1.3.1. Proliferasi Mitosis

Spermatogonia yang terdapat pada lapisan terluar tubulus terus-menerus melakukan pembelahan secara mitosis, dengan semua sel-sel baru yang akan memiliki 46 kromosom identik dengan sel induk. Setelah spermatogonium membelah secara mitosis, satu dari sel-sel hasil pembelahan menetap sebagai spermatogonium pada bagian luar tubulus, sehingga menjaga garis keturunan sel. Sedangkan, sel-sel yang lain akan bergerak ke lumen dan melalui langkah-langkah yang diperlukan untuk membentuk sperma. Pada manusia, sperma dibentuk oleh sel yang menjalani dua pembelahan mitosis untuk menghasilkan empat spermatisit primer identik. Setelah pembelahan terakhir, spermatisit primer akan menetap untuk persiapan pembelahan meiosis pertama (Sherwood, 2019).

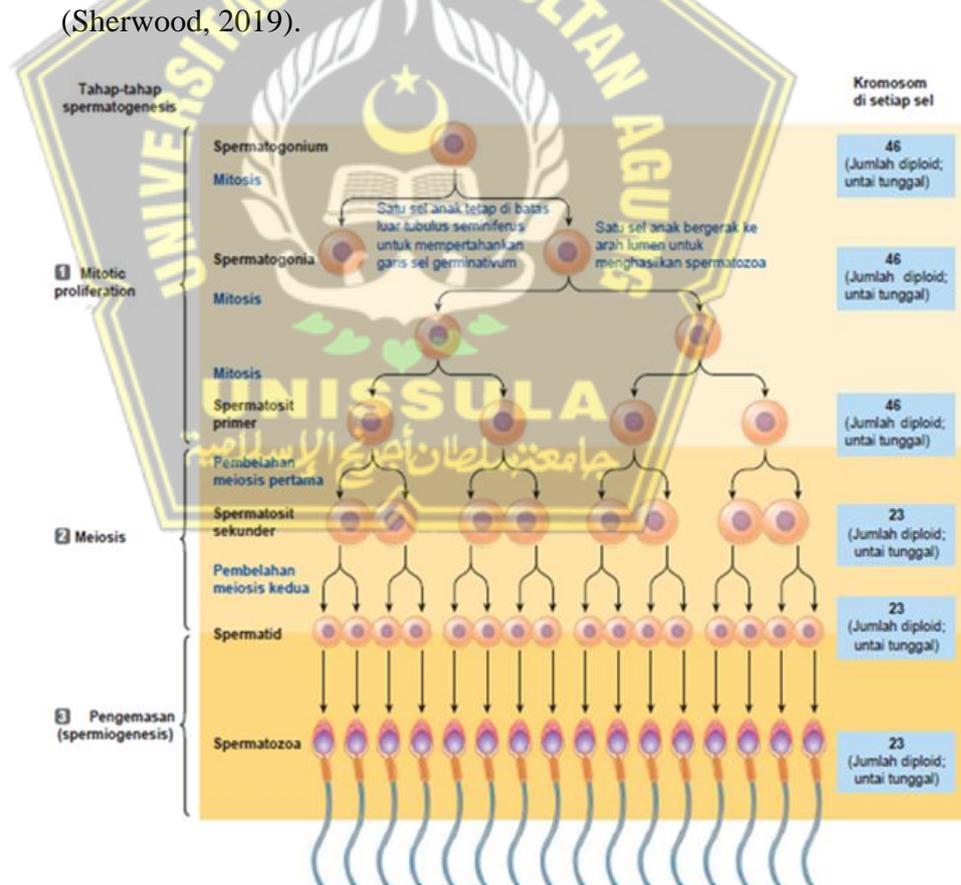
2.1.3.2. Meiosis

Selama meiosis, spermatisit primer (46 kromosom diploid) akan menghasilkan dua spermatisit sekunder dengan 23 kromosom ganda pada pembelahan meiosis pertama. Setelah itu, pada pembelahan meiosis kedua, spermatisit sekunder akan membentuk empat spermatid (masing-masing 23 kromosom tunggal). Tidak ada pembelahan lebih lanjut setelah tahap spermatogenesis ini. Pada akhir pembelahan, setiap sekuens spermatogenic pada manusia bisa menghasilkan 16 spermatozoa. Namun, umumnya, beberapa sel akan

mati pada tahap-tahap sebelumnya, sehingga efisiensi produktivitas jarang setinggi ini (Sherwood, 2019).

2.1.3.3. Packaging

Setelah meiosis, secara struktural spermatid masih menyerupai spermatogonia yang belum berdiferensiasi, kecuali sebagian dari komplemen kromosomnya. Pembentukan spermatozoa dari spermatid memerlukan perombakan ulang yang ekstensif, atau mengemas, elemen sel, sebuah proses yang disebut spermiogenesis hingga memberikan tampilan morfologis normal dan spermatozoa dewasa (Sherwood, 2019).



Gambar 2. 1 Proses Spermatogenesis (Sherwood, 2019)

Proses ini dapat menjadi target faktor toksik eksogen maupun endogen yang bisa mengakibatkan morfologi abnormal pada sperma dan mengganggu kemampuan spermatozoa dalam membuahi sel telur (Garrido dan Rivera, 2017). Sebuah spermatozoa dewasa mempunyai 4 bagian yang terdiri atas kepala, akrosom, *midpiece*, dan ekor. Bagian kepala dari sperma terdiri atas nukleus, yang mengandung informasi genetik. Akrosom merupakan sebuah kantong berisi enzim yang melapisi bagian ujung kepala dari sperma dan berfungsi untuk menembus dinding ovum. Spermatozoa mempunyai ekor panjang menyerupai cambuk yang memberikan mobilitas sperma. Pergerakan ekor sperma mendapatkan energi dari mitokondria yang berkumpul di bagian *midpiece* sperma (Sherwood, 2019).

2.1.4. Faktor yang Memengaruhi Spermatogenesis

2.1.4.1. Obesitas

Beberapa studi penelitian telah memperlihatkan hubungan negatif antara konsentrasi sperma/jumlah total sperma dan peningkatan indeks massa tubuh (IMT). Dampak negatif pada morfologi, motilitas, dan DNA fragmentasi juga telah dilaporkan. Mekanisme yang paling banyak dipelajari peneliti yaitu mekanisme *hyperestrogenism*, yaitu peningkatan level estrogen pada laki-laki dengan obesitas. Kenaikan kadar estrogen ini terjadi akibat enzim aromatase yang banyak ditemukan di jaringan adiposa meningkatkan konversi testosteron menjadi hormon estrogen (Neto *et al.*, 2016).

2.1.4.2. Diabetes

Diabetes merupakan kondisi hiperglikemia yang terjadi karena kegagalan produksi dan aksi insulin. Diabetes mellitus (DM) dapat memicu kerusakan di berbagai macam sistem dan organ termasuk testis. Sebuah studi epidemiologi memperlihatkan bahwa laki-laki yang menderita DM tipe 1 mempunyai keturunan lebih sedikit dibandingkan dengan saudara kandung tanpa DM (Neto *et al.*, 2016).

2.1.4.3. Varikokel

Varikokel merupakan dilatasi abnormal pada vena spermatica internal yang disebabkan oleh katup vena yang tidak kompeten, mengakibatkan darah vena menetap dan terjadi refluks. Varikokel terjadi pada 15% laki-laki dewasa, 35% laki-laki infertil dan 70-80% laki-laki dengan infertil sekunder. Varikokel dianggap penyebab umum infertilitas pada laki-laki, namun, hubungan sebab-akibat antara varikokel dengan infertilitas masih belum ditetapkan. Meskipun penelitian mengkonfirmasi dampak negatif varikokel pada kesuburan, studi pada laki-laki penderita varikokel mengungkapkan hasil yang bertentangan (Neto *et al.*, 2016)

2.1.4.4. Faktor Genetik

Kelainan genetik mencakup 15-30% kasus infertilitas laki-laki dan berpotensi menyebabkan kasus-kasus “idiopatik” yang terjadi (Neto *et al.*, 2016).

2.1.4.5. Suhu

Spermatogenesis membutuhkan suhu lebih rendah dibandingkan bagian tubuh lainnya (normalnya 2°C di bawah suhu dalam tubuh) (Hall dan Hall, 2020). Suhu rendah ini bisa dicapai dengan udara yang mengelilingi skrotum, pleksus pampiriformis yang terdiri dari pembuluh vena yang mempunyai suhu relatif lebih rendah dibandingkan suhu inti tubuh sehingga menurunkan suhu testis pada cuaca panas, serta reflek kremaster yang akan mengerut dan mendekati tubuh agar testis lebih hangat di cuaca dingin (Barrett *et al.*, 2019; Hall dan Hall, 2020). Peningkatan suhu testis bisa mengganggu spermatogenesis dengan menyebabkan degenerasi berbagai sel di dinding tubulus dan bisa menyebabkan penurunan jumlah sperma (Barrett *et al.*, 2019).

2.1.4.6. Bahan Kimia Lingkungan

Paparan zat kimia di lingkungan yang memengaruhi spermatogenesis telah dicurigai sejak zaman dahulu. Menurut Martinez *et al.* (2014), pengaruh dari logam berat seperti merkuri terhadap fungsi normal dari sistem reproduksi pria dapat terjadi melalui beberapa cara:

- a. Secara langsung, pada organ reproduksi, atau
- b. Dengan memengaruhi kejadian *post-testicular* seperti kapasitas, motilitas, dan fungsi sperma

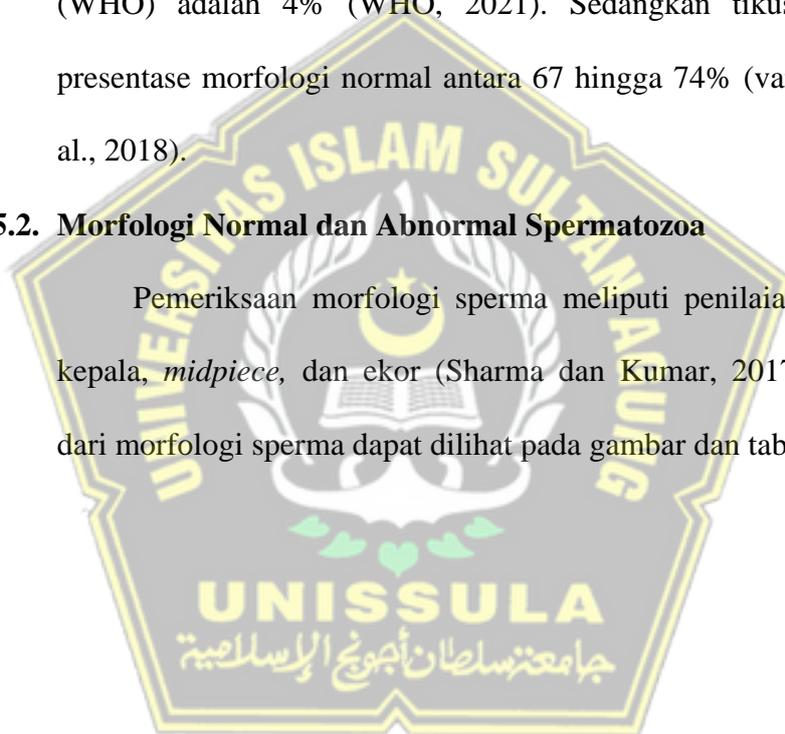
2.1.5. Analisa Morfologi Spermatozoa

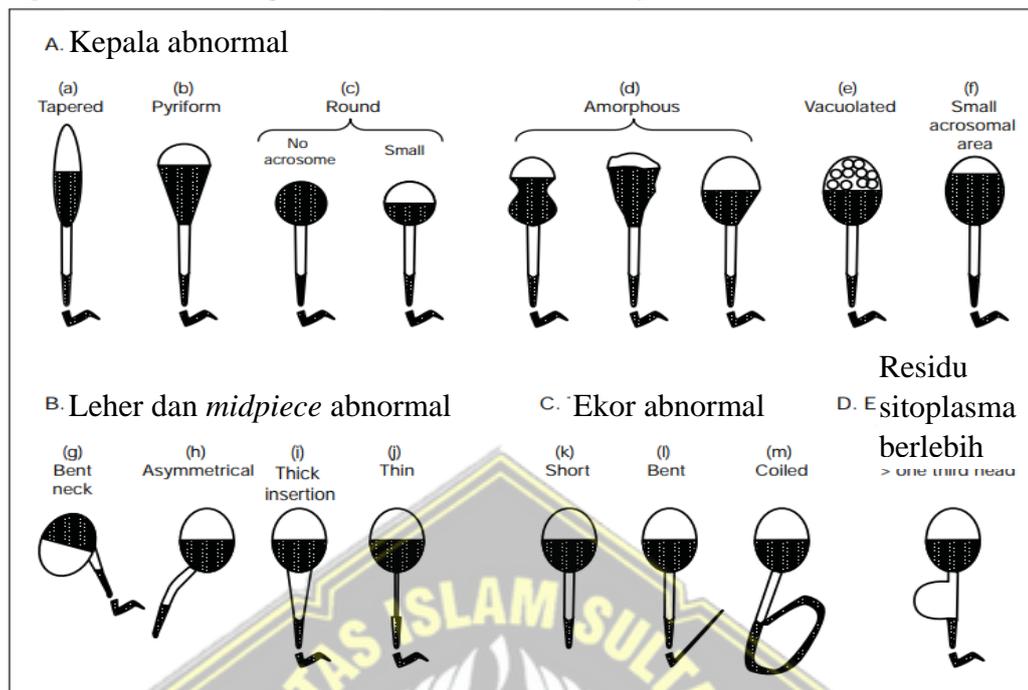
2.1.5.1. Definisi Morfologi Spermatozoa

Morfologi sperma merupakan salah satu parameter yang diperiksa ketika melakukan analisis sperma untuk penilaian infertilitas (Sharma dan Kumar, 2017). Nilai referensi untuk persentase morfologi normal yang diberikan oleh World Health Organization (WHO) adalah 4% (WHO, 2021). Sedangkan tikus mempunyai presentase morfologi normal antara 67 hingga 74% (van der Horst et al., 2018).

2.1.5.2. Morfologi Normal dan Abnormal Spermatozoa

Pemeriksaan morfologi sperma meliputi penilaian dari bentuk kepala, *midpiece*, dan ekor (Sharma dan Kumar, 2017). Klasifikasi dari morfologi sperma dapat dilihat pada gambar dan tabel berikut.





Gambar 2. 2. Skema bentuk abnormal spermatozoa manusia (WHO, 2021)

Pada tikus, bentuk normal dari spermatozoa memiliki kepala yang berbentuk seperti kait dan ekor panjang. Sedangkan untuk bentuk abnormal dari spermatozoa tikus, dapat dilihat dari kepala yang berukuran lebih besar atau lebih kecil, bentuk seperti pisang atau sendok, dan/atau tidak berbentuk. Selain itu, bentuk abnormal spermatozoa juga dapat dilihat dari bentuk ekor yang bengkok atau melingkar (van der Horst *et al.*, 2018).

Tabel 2. 1 Klasifikasi Morfologi Spermatozoa Manusia (WHO, 2021)

Komponen	Normal	Abnormal
Kepala	Berbentuk oval, kontur halus Panjang 3-5 μm ; lebar 2-3 μm	<ul style="list-style-type: none"> • Meruncing, bulat, asimetri atau berbentuk <i>pyriform</i> • Ukuran lebih besar atau lebih kecil
<i>Midpiece</i>	Memiliki panjang yang sama dengan kepala Berbentuk ramping/tipis tanpa pembesaran	<ul style="list-style-type: none"> • Kepala ganda • Bentuk tidak teratur • Asimetri • Tebal atau tipis • Melekuk tajam antara leher dan <i>midpiece</i>
Ekor	Memiliki panjang sepuluh kali dari panjang kepala Bisa melengkung/berkelok tetapi tidak bersudut tajam	<ul style="list-style-type: none"> • Pendek • Jumlahnya banyak • Bentuk melingkar, melekuk tajam • Lebar tidak rata



Gambar 2. 3. A) Morfologi normal spermatozoa tikus. B) Morfologi abnormal spermatozoa tikus (berbentuk sendok) (van der Horst et al., 2018)

2.1.5.3. Pemeriksaan Morfologi Spermatozoa

Cara perhitungan morfologi spermatozoa yaitu dengan membuat preparat sperma yang difiksasi oleh etanol kemudian diberi pewarnaan menggunakan larutan Giemsa lalu dibilas dengan air. Menurut WHO (2021) untuk pemeriksaan morfologi spermatozoa, digunakan metode *smearing*, yaitu dengan menggunakan *object glass* dan mikroskop dengan perbesaran 1000x untuk melihat morfologi spermatozoa.

2.2. Merkuri Klorida

2.2.1. Identifikasi Merkuri Klorida

Nama	: Merkuri Klorida
Simbol	: HgCl ₂ atau Cl ₂ Hg
<i>PubChem CID</i>	: 24085
Berat Atom	: 271.50
Berat Jenis	: 5.4 g / cm ³
Titik Didih (°C)	: 277

(NCBI, 2022)

2.2.2. Deskripsi Merkuri Klorida

Merkuri merupakan satu dari sekian banyak bahan berupa logam berat yang berbahaya dan beracun (Kementerian Kesehatan RI, 2016). Merkuri klorida merupakan salah satu merkuri inorganik yang berbentuk padatan kristal putih tidak berbau dan bersifat toksik jika dihirup, ditelan, atau diserap melalui kulit (NCBI, 2022). Merkuri klorida bersifat mudah

terlarut dalam air dan korosif terhadap jaringan usus, sehingga dapat meningkatkan permeabilitas dan tingkat penyerapan merkuri sebanding dengan lama paparan merkuri. Merkuri klorida yang terabsorpsi akan diekskresikan sebagian besar melalui urin dan feses. Logam berat ini mempunyai LD50 untuk tikus peroral sebanyak 1 mg/kgBB dan mempunyai waktu paruh efektif selama 42 hari (Vaidya dan Mehendale, 2019; Bernhoft, 2012).

2.2.3. Sumber Merkuri Klorida

Manusia dapat menyerap merkuri secara alami melalui konsumsi ikan dan tanaman. Hal ini dikarenakan merkuri yang berasal dari aktivitas hasil sisa dari aktivitas pertambangan emas dapat terdeposit di air atau tanah, sehingga mengakibatkan lingkungan tersebut terkontaminasi oleh merkuri yang kemudian diserap oleh tanaman atau ikan yang berada di dalamnya (Kementerian Kesehatan RI, 2016). Selain itu paparan pekerjaan juga bisa menjadi sumber paparan merkuri kepada manusia. Paparan merkuri ini bisa terjadi melalui kontak kulit, inhalasi, dan/atau konsumsi merkuri. Pekerjaan yang telah banyak dilaporkan adanya paparan merkuri diantaranya yaitu pembuangan limbah, pemrosesan kimia (kosmetik, antiseptik, disinfektan, dan industri farmasi), pemrosesan logam, pekerjaan gigi (amalgam gigi), dan pengecatan rumah (Martinez-Finley dan Aschner, 2014).

2.2.4. Efek Merkuri terhadap Tubuh

Efek merkuri terhadap organ-organ pada tubuh manusia secara akut dan kronik yaitu sebagai berikut:

Tabel 2. 2. Efek Paparan Merkuri pada Sistem Tubuh Manusia (Kementerian Kesehatan RI, 2016)

Sistem	Paparan Akut	Paparan Kronis
Kardiovaskuler	Tekanan darah tinggi, <i>hypovolemic shock</i> , mudah pingsan, jantung berdebar	Hipertensi, takikardi
Respirasi	Nafas cepat dan pendek, radang paru, edema, sakit dada pleuritik, emfisema, batuk	Fibrosis
Gastrointestinal	Mual, muntah, diare, pendarahan	Sembelit, diare
Sistem Saraf Pusat	Tremor, mudah tersinggung, kebingungan, penurunan refleks, konduksi saraf, dan gangguan pendengaran	Tremor, insomnia, hilang ingatan, depresi, anoreksia, sakit kepala, ataksia, disartria, berjalan tidak stabil, gangguan visual dan vasomotor, parestesi
Kulit dan Jaringan Berkeratin	Inflamasi mukosa (stomatitis), kulit iritasi, terbakar dan pendarahan, dermatitis, eritematosa, pruritus, alopesia	Gingivitis, iritasi kulit, munculnya garis biru tipis di gusi, kebotakan
Hepar	Peningkatan serum enzim	Nekrosis hepar
Ginjal	Sering buang air kecil, susah buang air kecil, hematuria, proteinuria hingga gagal ginjal	Polyuria, polydipsia, albuminuria
Sistem Reproduksi	Risiko aborsi spontan	Penurunan volume testis, kualitas sperma menurun, aborsi spontan
Otot dan Rangka	Meningkatkan risiko <i>back pain</i>	Otot melemah, penurunan massa otot, tremor hingga paralisis
Lain-lain	Demam, badan menggigil, lidah terasa seperti logam, pernafasan tidak teratur	Berat badan menurun, keringat berlebihan, ruam di kulit, produksi lendir berlebihan, lebih sensitif terhadap cahaya

2.3. Pengaruh Merkuri terhadap Morfologi Spermatozoa Tikus

Merkuri anorganik seperti merkuri klorida mempunyai bentuk padat berupa garam dan kurang larut dalam lemak, sehingga bila tertelan hanya 7-15% dari total paparan merkuri klorida akan diserap di saluran pencernaan (Kementerian Kesehatan RI, 2016). Selain itu, ada juga merkuri organik seperti *methyl mercury*, yang merupakan sumber utama dari paparan merkuri pada manusia, ditemukan secara alami pada ikan, dan relatif stabil. Mekanisme toksik yang terjadi akibat paparan merkuri digambarkan sebagai mimikri ion, gangguan jalur persinyalan sel, stres oksidatif, menurunkan aktivitas enzim antioksidan, perubahan ekspresi gen, regulasi epigenetik ekspresi gen, apoptosis, gangguan *testis-blood barrier*, peradangan, dan gangguan endokrin (Massányi *et al.*, 2020). Saat masuk ke dalam tubuh, merkuri mempunyai afinitas yang tinggi dengan gugus *sulphydryl* pada eritrosit, *metallothionein*, atau *glutathione* pada plasma darah. Berbeda dengan *metallic mercury* yang dengan mudah melewati *blood brain barrier* (BBB), jenis *mercuric mercury* seperti merkuri klorida kurang efisien dalam melewati BBB, tetapi bisa terakumulasi di plasenta, jaringan janin, dan cairan amnion (Bernhoft, 2012).

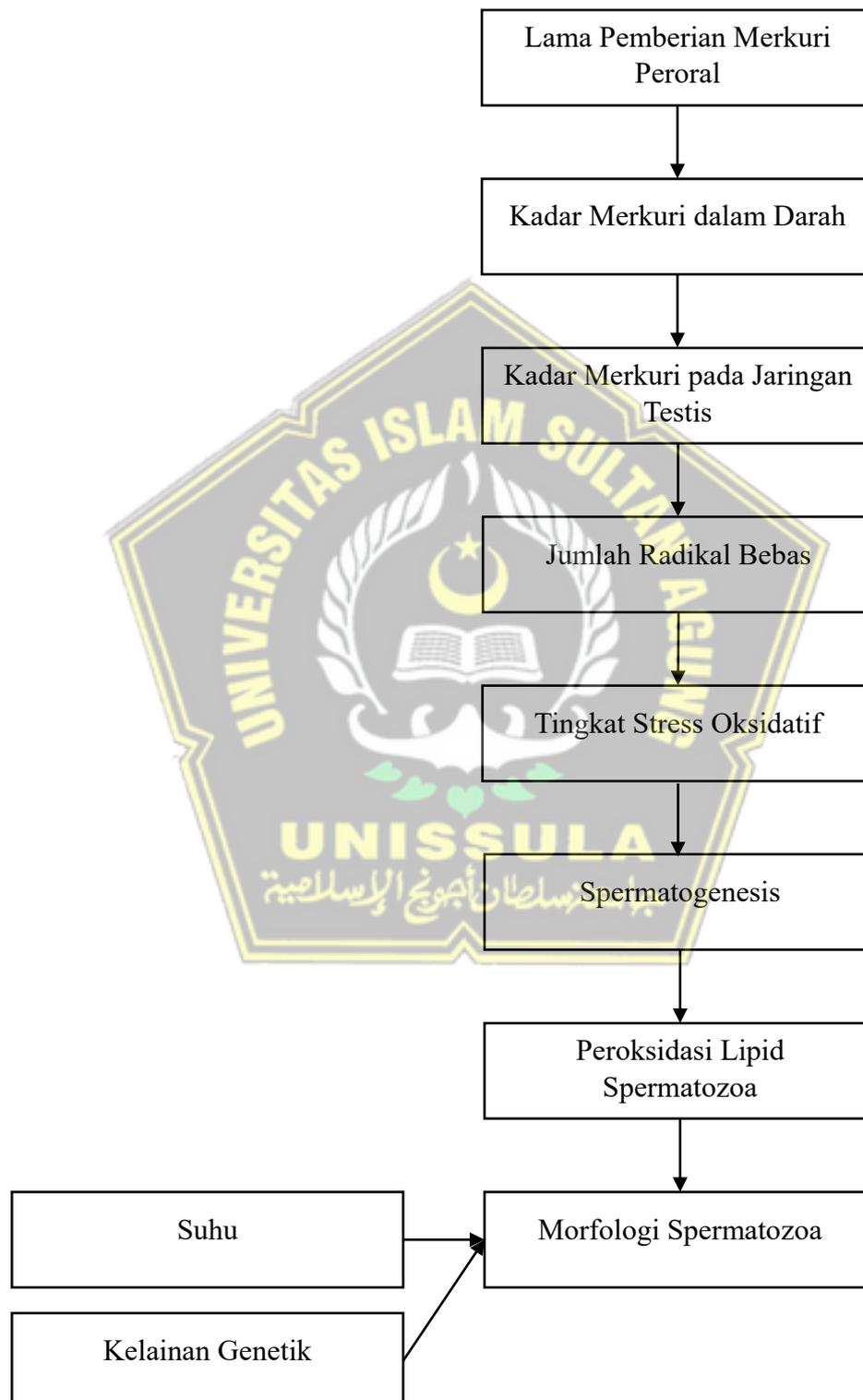
Distribusi merkuri ke jaringan perifer dapat terjadi melalui satu atau lebih pengangkut asam amino, terutama pengangkut sistein yang diduga menyebabkan penumpukan merkuri di jaringan otak. Sebagian besar muatan merkuri dalam tubuh ditemukan di tubulus

proksimal ginjal dan terikat dengan *metallothionein*. Akumulasi merkuri yang signifikan juga ditemukan pada hepar dan dengan jumlah yang lebih rendah di pleksus koroid, jaringan epitel, dan dapat melewati sawar darah testis sehingga dapat terakumulasi pada jaringan testis (Bernhoft, 2012). Merkuri dalam segala bentuknya meracuni fungsi sel dengan mengubah struktur protein tersier dan kuarterner dan dengan mengikat gugus *sulfhydryl* dan *selenohydryl*. Selain itu, merkuri yang bereaksi dengan *sulfhydryl* juga berpotensi mengganggu fungsi struktur seluler dan subseluler. Merkuri diyakini mengganggu transkripsi DNA dan sintesis protein, dengan penghancuran retikulum endoplasma dan hilangnya ribosom. Bukti menunjukkan gangguan pada berbagai elemen subseluler pada organ tubuh dan di mitokondria; efek negatif juga terjadi pada integritas membrane sel, produksi radikal bebas, gangguan *neurotransmitter*, mengganggu DNA *repair*, dan stimulasi eksitasi saraf, yang kemudian menyebabkan kerusakan di berbagai bagian otak dan sistem saraf perifer, termasuk aksis hipotalamus-pituitari-testis yang mengatur spermatogenesis (Bernhoft, 2012).

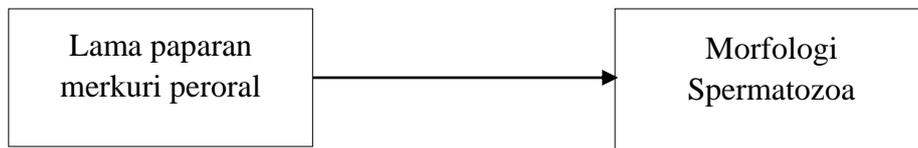
Ion merkuri diketahui meningkatkan kadar intraseluler *reactive oxygen species* (ROS) dan menginduksi stres oksidatif yang mengakibatkan kematian sel hingga akhirnya menyebabkan kerusakan pada jaringan (Bernhoft, 2012). ROS mengganggu integritas DNA dalam inti sperma dengan menginduksi kerusakan untai DNA, *base modifications*, dan *chromatin cross-linking*, ditambah dengan mekanisme

pertahanan spermatozoa yang terbatas terhadap kerusakan DNA yang diinduksi ROS. Ejakulasi manusia mengandung sel sperma dengan berbagai tingkat kematangan, bersama dengan leukosit, sel epitel dan *round cells* dari berbagai tahapan spermatogenesis. Di antara sel-sel ini *peroxidase-positive leukocytes* dan spermatozoa yang belum matang menghasilkan radikal bebas dengan jumlah yang signifikan. Spermatozoa sangat rentan terhadap kerusakan oksidatif karena mempunyai *polyunsaturated fatty acids* dalam membran plasma nya. Asam lemak ini penting karena menyediakan fluiditas membrane, sebuah fitur utama untuk reaksi akrosom dan interaksi sperma-sel telur. Namun, *polyunsaturated fatty acids* ini juga membuat spermatozoa menjadi rentan terhadap serangan radikal bebas dan peroksidasi lipid, yaitu suatu reaksi berantai yang dapat terus menerus menghasilkan radikal bebas. Sehingga, dengan meningkatnya tingkat stress oksidatif dan menurunnya aktivitas enzim antioksidan, maka fluiditas membran akan meningkat, integritas membran akan terganggu, dan menyebabkan sel sperma menjadi *immature* serta morfologi spermatozoa terganggu (Alahmar, 2019).

2.4. Kerangka Teori



2.5. Kerangka Konsep



2.6. Hipotesis

Lama paparan merkuri peroral menurunkan rerata morfologi spermatozoa.



BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan ini adalah penelitian 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 Tergantung

Morfologi 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 pada cairan salin normal (0,9% NaCl). Kemudian didapatkan 0,08 mg/ekor yang larut dalam 0,5 ml larutan NaCl dan diberikan secara oral pada hewan coba kelompok perlakuan melalui sonde selama 7, 14, 21, dan 28 hari.

Skala pengukuran: Ordinal

3.2.2.2. Morfologi Spermatozoa

Pemeriksaan morfologi sperma meliputi penilaian dari bentuk kepala, *midpiece*, dan bentuk dari ekor (Sharma dan Kumar, 2017). Morfologi spermatozoa dihitung dengan cara menghitung jumlah

morfologi normal dari 100 sperma dan dibandingkan dengan sperma abnormal kemudian dikalikan dengan 100% yang dinyatakan dalam persentase.

Skala data: Rasio

3.3. Subjek Uji

3.3.1. Subjek Penelitian

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

3.3.2. 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*

3.3.3. Besar Sampel

Rumus Federer digunakan untuk menghitung jumlah sampel dari setiap kelompok (Federer, 1967). Kelompok perlakuan yang diberi merkuri peroral berjumlah empat (7, 14, 21, dan 28 hari) dengan satu kelompok kontrol (28 hari tanpa paparan merkuri).

Rumus Federer: $(n-1)(t-1) \geq 15$; dengan $t = \text{jumlah kelompok} = 5$

$n = \text{jumlah sampel}$

$$(n-1)(5-1) \geq 15 \rightarrow 4(n-1) \geq 15 \rightarrow n \geq 4,75$$

Berdasarkan perhitungan tersebut, didapatkan total sampel yang diperlukan di masing-masing kelompok adalah minimal lima ekor tikus. Sehingga, jumlah subjek uji yang dibutuhkan adalah 25 ekor tikus.

3.3.4. Teknik Sampling

Teknik sampling penelitian ini menggunakan teknik *random allocation*, yaitu dengan memilih secara acak dari sampel yang didapat kemudian dimasukkan ke dalam kelompok kontrol atau di antara 4 kelompok perlakuan yang ada secara acak.

3.4. Instrumen dan Bahan Penelitian

3.4.1. Instrumen Penelitian

1. Kandang tikus
2. Timbangan
3. Optilab
4. Mikroskop cahaya dan *Object glass*
5. Cawan
6. Gunting kecil
7. Pinset sirugis
8. Pipet
9. Tabung reaksi
10. Tempat larutan giemsa dan etanol
11. Kertas saring

3.4.2. Bahan Penelitian

1. 25 ekor tikus jantan Wistar

2. Merkuri klorida
3. NaCl 0,9%
4. Larutan Giemsa
5. Etanol
6. Aquades
7. 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, serta alat dan bahan untuk menilai morfologi spermatozoa.

3.5.2. Pelaksanaan Penelitian

3.5.2.1. Aklimatisasi

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

3.5.2.2. Pembagian Kelompok

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

1. Kelompok 1 : yaitu kelompok kontrol yang berisikan 5 ekor tikus jantan Wistar dengan diberi pakan dan minum standar tanpa memberikan merkuri klorida peroral.

2. Kelompok 2 : yaitu kelompok perlakuan yang berisikan 5 ekor tikus jantan Wistar yang diberikan pakan dan minum standar dengan diberikan merkuri klorida peroral selama 7 hari.
3. Kelompok 2 : yaitu kelompok perlakuan yang berisikan 5 ekor tikus jantan Wistar yang diberikan pakan dan minum standar dengan diberikan merkuri klorida peroral selama 14 hari.
4. Kelompok 2 : yaitu kelompok perlakuan yang berisikan 5 ekor tikus jantan Wistar yang diberikan pakan dan minum standar dengan diberikan merkuri klorida peroral selama 21 hari.
5. Kelompok 2 : yaitu kelompok perlakuan yang berisikan 5 ekor tikus jantan Wistar yang diberikan pakan dan minum standar dengan diberikan merkuri klorida peroral selama 28 hari.

3.5.2.3. Pengambilan Spermatozoa

Untuk pengambilan sampel spermatozoa di lakukan sesuai dengan lama paparan, yaitu pada hari ke-28 untuk kelompok kontrol dan hari ke-7, 14, 21, dan 28 untuk kelompok perlakuan. Pengambilan sampel dengan mematikan tikus dengan metode *cervical dislocation*. Untuk mengambil spermatozoa dari tikus maka dilakukan pengambilan dari epididimis dan *vas deferens* kemudian diurut menggunakan pinset surgis lalu diletakkan di cawan petri yang sudah diberi larutan NaCl dengan dosis 500 mikroliter menggunakan mikropipet. Lalu dihomogenkan dengan mikropipet dengan berulang

kali menghisap cairannya dan dikeluarkan kembali sampai terlihat homogen.

3.5.2.4. Pemeriksaan Morfologi Spermatozoa

Berdasarkan WHO (2021) penentuan morfologi sperma terdiri dari langkah-langkah berikut:

1. Ambil cairan sperma yang sudah dihomogenkan dengan menggunakan mikropipet.
2. Lalu letakkan 1 tetes cairan tersebut pada ujung *object glass*, kemudian dibuat apusan dengan menggunakan *object glass*.
3. Setelah itu keringkan, lalu alirkan etanol pada *object glass* dan tunggu sampai kering.
4. Setelah kering, alirkan giemsa dan tunggu sampai kering.
5. Setelah itu dibilas dengan air mengalir lalu dikeringkan kembali.
6. Amati menggunakan mikroskop cahaya dengan lensa okuler 10x dan lensa objektif 100x dengan kondensor diturunkan penuh dan diafragma dibuka.

3.6. Tempat dan Waktu Penelitian

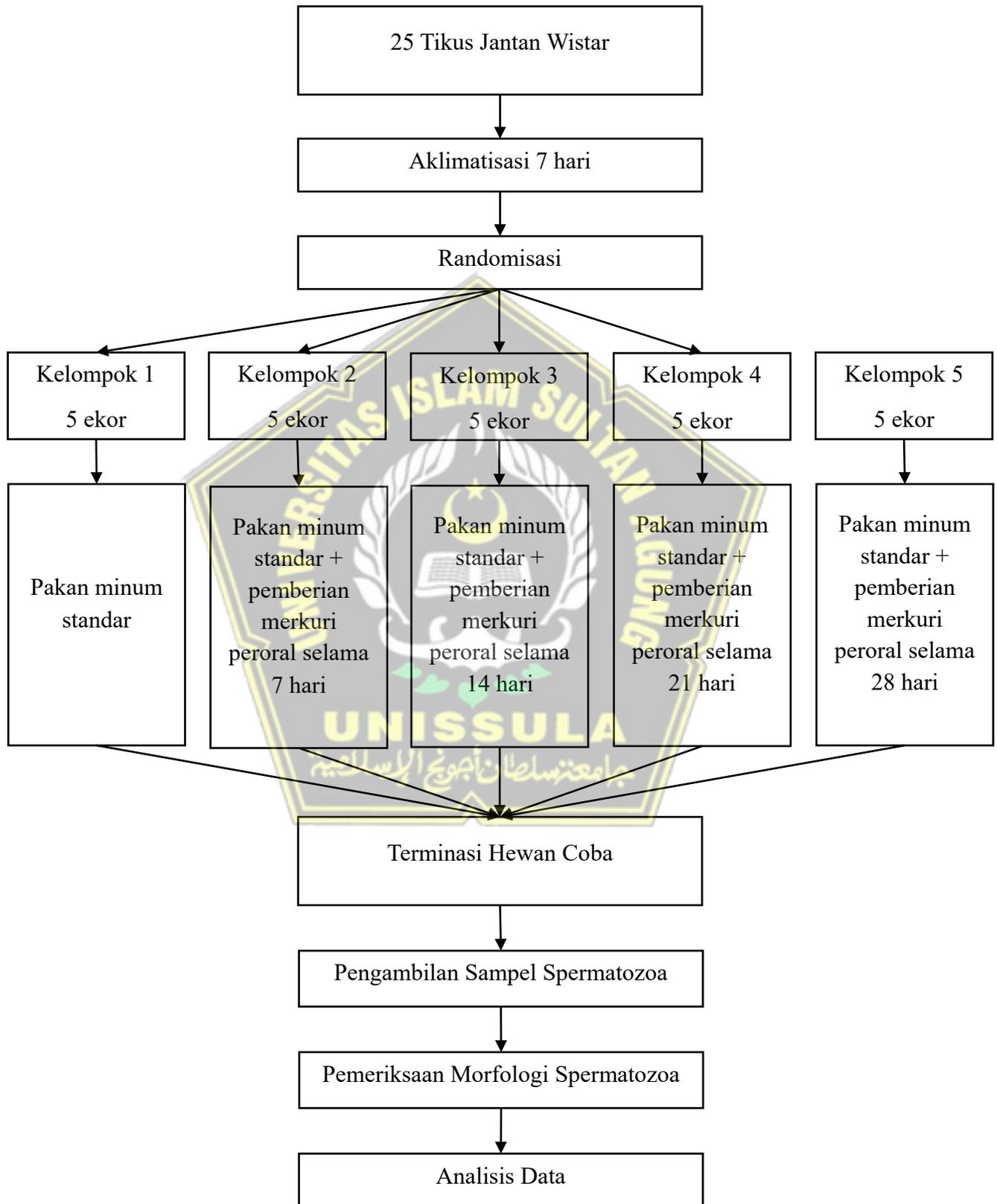
3.6.1. Tempat Penelitian

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

3.6.2. Waktu Penelitian

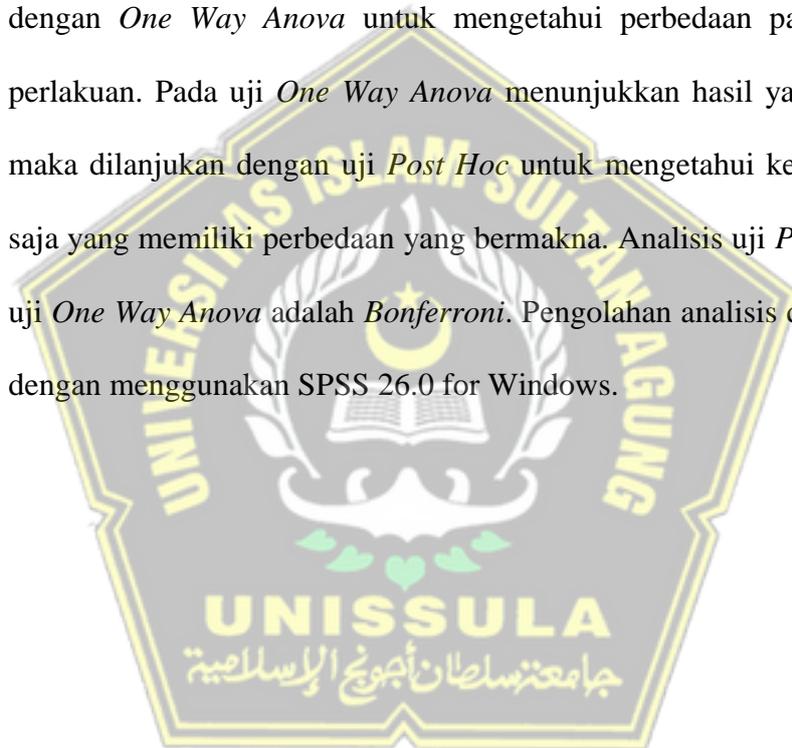
Penelitian dilakukan pada bulan September hingga Oktober 2022.

3.7. Alur Penelitian



3.8. Analisis Data

Analisis hasil dilakukan dengan cara menghitung persentase jumlah normal morfologi spermatozoa pada mencit. Sampel berjumlah kurang dari 50, untuk mengetahui normalitas dilakukan uji *Shapiro-wilk* dan untuk homogenitas variannya dilakukan uji *Levene's test*. Hasil data yang didapatkan adalah normal dan homogen, sehingga dilakukan uji analisis dengan *One Way Anova* untuk mengetahui perbedaan pada kelompok perlakuan. Pada uji *One Way Anova* menunjukkan hasil yang signifikan, maka dilanjutkan dengan uji *Post Hoc* untuk mengetahui kelompok mana saja yang memiliki perbedaan yang bermakna. Analisis uji *Post Hoc* untuk uji *One Way Anova* adalah *Bonferroni*. Pengolahan analisis data dilakukan dengan menggunakan SPSS 26.0 for Windows.



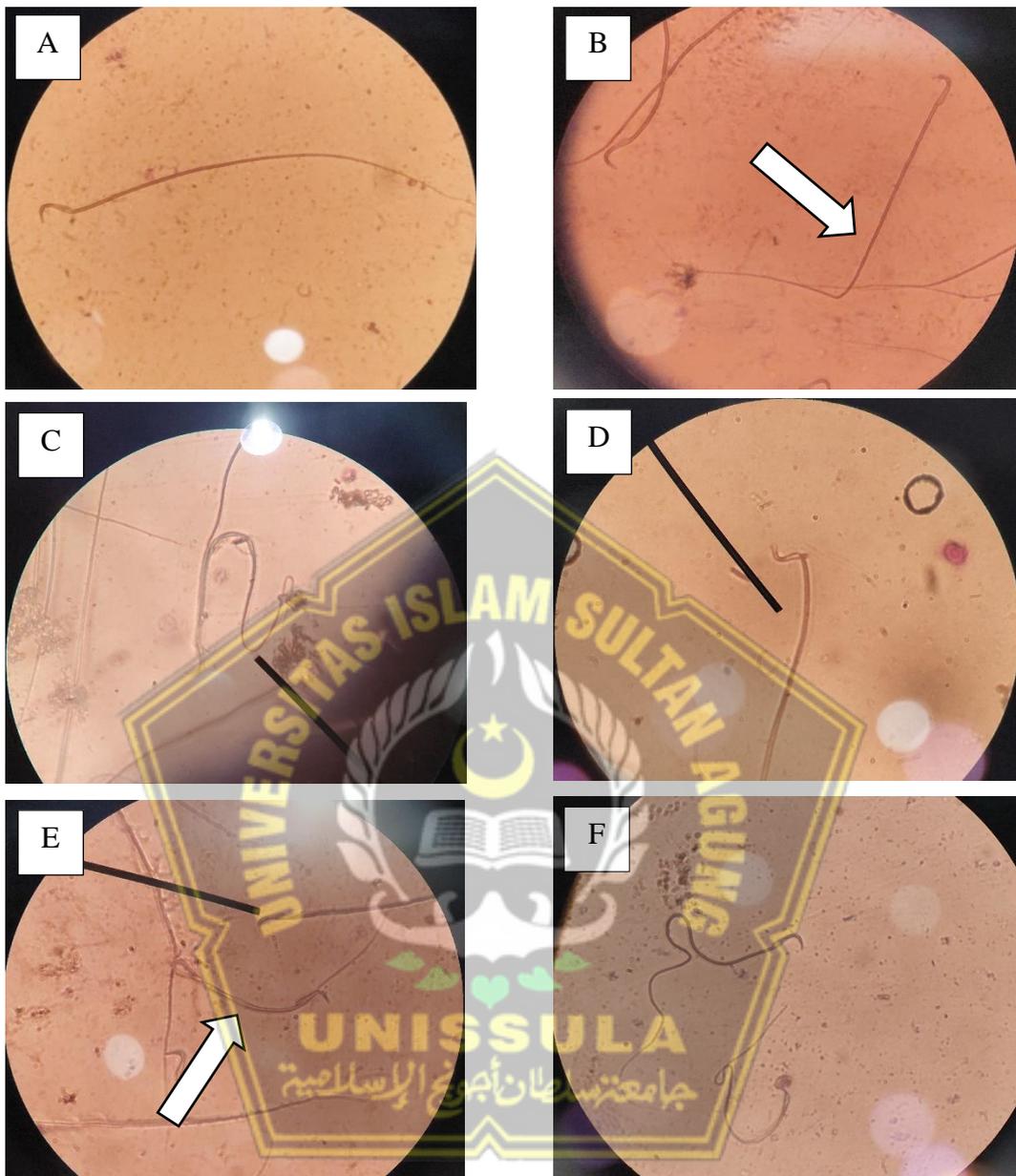
BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

4.1. Hasil Penelitian

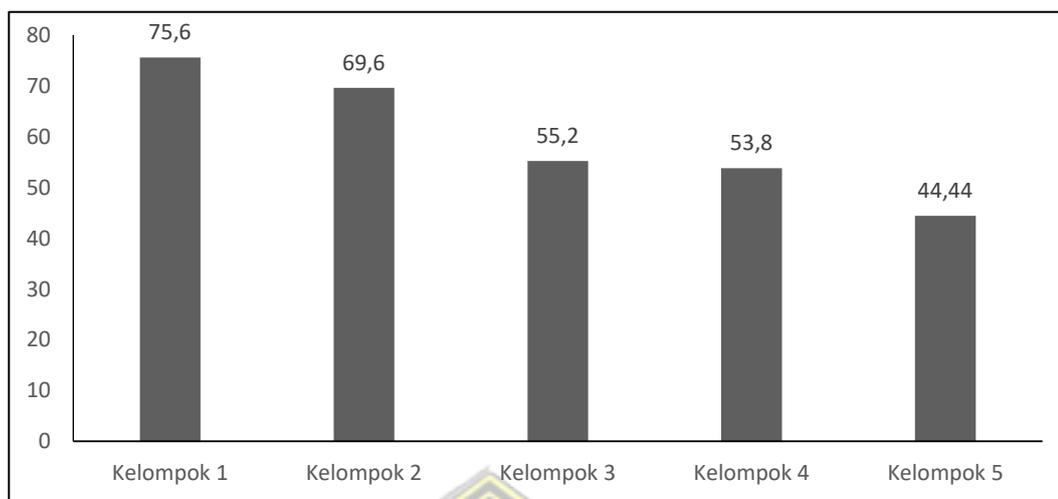
Setelah dilakukan perlakuan selama 7, 14, 21, dan 28 hari, tikus pada setiap kelompok diterminasi serta diambil sampel spermanya satu hari setelah dilakukan perlakuan, sedangkan kelompok kontrol dilakukan pada hari ke-29. Selama penelitian, ke-25 tikus yang berada di laboratorium tidak mengalami suatu penyakit yang mengganggu jalannya penelitian. Data rerata persentase morfologi spermatozoa didapatkan dari hasil pengamatan sampel spermatozoa tikus yang telah diambil. Bentuk morfologi spermatozoa normal memiliki kepala seperti kait dan ekor panjang seperti pada gambar 4.1(A), sedangkan morfologi spermatozoa abnormal memiliki kelainan yang dapat ditemukan pada bentuk kepala, ekor, ataupun leher spermatozoa.

Hasil pengamatan morfologi spermatozoa pada ke-25 tikus menunjukkan, 96% kelainan ditemukan pada bagian ekor spermatozoa dengan 4% lainnya ditemukan pada bagian kepala dan leher/*midpiece*. Hal ini menunjukkan kerusakan pada morfologi spermatozoa terjadi pada proses maturasi di fase *post-testicular*. Bentuk morfologi spermatozoa abnormal yang ditemukan dari setiap kelompok dapat dilihat pada gambar 4.1(B, C, D, E, F).



Gambar 4. 1 Gambaran morfologi spermatozoa. (A) morfologi normal, (B, C, D, E, F) morfologi abnormal pada kelompok 1, 2, 3, 4, dan 5

Pada gambar 4.2 tampak rerata persentase morfologi spermatozoa pada kelompok perlakuan lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol, dengan kelompok kontrol yang mempunyai rerata persentase tertinggi yaitu 75,60 dan kelompok 5 dengan rerata persentase terendah sebanyak 44,44.



Gambar 4. 2 Grafik rerata persentase morfologi spermatozoa tikus jantans Wistar pada kelima kelompok

Hasil analisis uji normalitas distribusi data dengan *Shapiro Wilk* menunjukkan bahwa data morfologi spermatozoa normal kelima kelompok berdistribusi normal dengan $p > 0,05$ di semua kelompok. Setelah itu, dilanjutkan dengan uji homogenitas atau varian data dengan *Levene's test* dan diperoleh nilai $p = 0,160$ ($p > 0,05$), yang menunjukkan bahwa kelima kelompok memiliki varian data yang homogen (Tabel 4.1).

Tabel 4. 1. Normalitas distribusi dan homogenitas varian data persentase

Kelompok	Normalitas	Homogenitas	Anova
Kelompok 1	0,620		
Kelompok 2	0,672		
Kelompok 3	0,822	0,160	0,000
Kelompok 4	0,455		
Kelompok 5	0,656		

morfologi spermatozoa tikus jantan Wistar pada kelima kelompok

Setelah itu dilakukan uji parametrik dengan *one-way anova* untuk mengetahui perbedaan rerata persentase morfologi spermatozoa normal

pada kelima kelompok, dan diperoleh nilai $p = 0,000$ ($p < 0,05$), sehingga H_0 ditolak dan H_1 diterima. Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa terdapat sekurang-kurangnya dua kelompok yang mempunyai rerata persentase morfologi spermatozoa yang berbeda secara signifikan. Kemudian dilakukan uji *post hoc Bonfferoni* untuk mengetahui perbedaan antara satu kelompok dengan kelompok lainnya, dan diperoleh data sebagai berikut:

Tabel 4. 2. Hasil uji post hoc Bonferroni

Kelompok (I)	Kelompok (II)	p	Keterangan
Kelompok 1	Kelompok 2	1,000	tidak bermakna
	Kelompok 3	0,001	bermakna*
	Kelompok 4	0,000	bermakna*
	Kelompok 5	0,000	bermakna*
Kelompok 2	Kelompok 3	0,024	bermakna*
	Kelompok 4	0,011	bermakna*
	Kelompok 5	0,000	bermakna*
Kelompok 3	Kelompok 4	1,000	tidak bermakna
	Kelompok 5	0,172	tidak bermakna
Kelompok 4	Kelompok 5	0,350	tidak bermakna

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

Berdasarkan tabel 4.2, tampak tidak ada perbedaan yang bermakna antara kelompok kontrol dengan kelompok 7 hari. Perbedaan rerata persentase morfologi yang bermakana terlihat pada perbandingan antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan 14, 21, dan 28 hari. Namun, tidak ditemukan perbedaan yang signifikan antara kelompok perlakuan 14, 21, dan 28 hari.

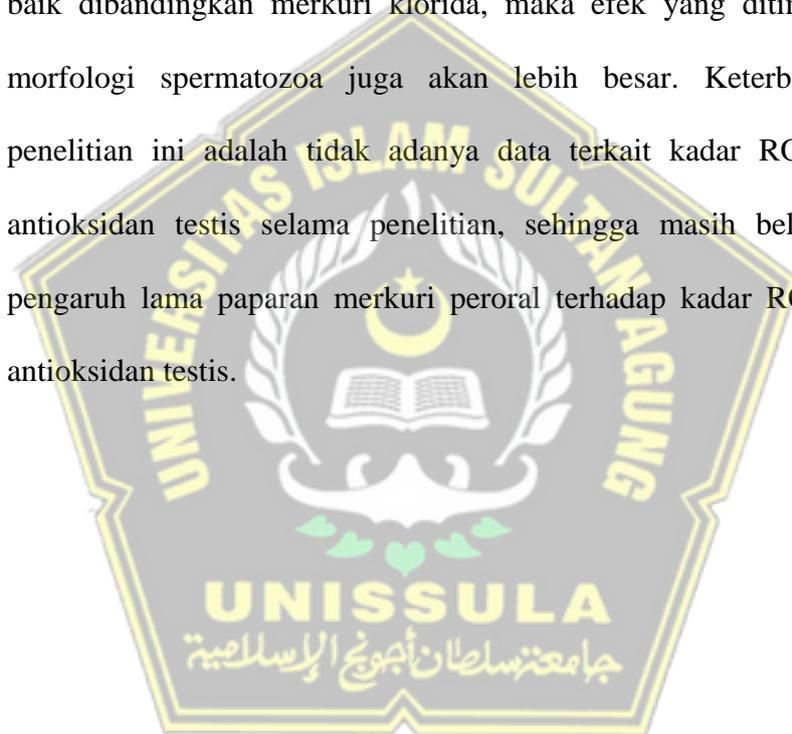
4.2. Pembahasan

Hasil penelitian menunjukkan bahwa lama paparan merkuri peroral memengaruhi morfologi spermatozoa. Hasil ini sesuai dengan penelitian Aderemi *et al.* (2017) yang menyatakan bahwa paparan merkuri peroral terhadap tikus jantan Wistar selama 28 hari telah berpengaruh terhadap morfologi spermatozoa. Pengaruh signifikan paparan merkuri klorida peroral terhadap morfologi spermatozoa mulai tampak pada hari ke-14 perlakuan dengan rerata yang semakin menurun, begitu juga dengan perlakuan hari ke-21 dan ke-28 dengan kecenderungan, semakin lama paparan maka rerata morfologi spermatozoa akan semakin menurun. Hal ini didasari karena merkuri di dalam tubuh meningkatkan kadar intraseluler *reactive oxygen species* (ROS) dan menginduksi stres oksidatif. Sehingga, dengan meningkatnya tingkat stress oksidatif dan menurunnya aktivitas enzim antioksidan, maka membran plasma spermatozoa yang rentan terhadap stres oksidatif akan rusak, fluiditas membran akan meningkat, integritas membran akan terganggu, dan menyebabkan sel sperma menjadi *immature* serta morfologi spermatozoa terganggu (Alahmar, 2019). Oleh karena itu, semakin lama paparan merkuri maka semakin tinggi derajat kerusakan morfologi spermatozoa.

Pada perbandingan rerata antara kelompok kontrol dengan kelompok 7 hari tidak ditemukan perbedaan yang signifikan. Hal ini mungkin terjadi pada paparan 7 hari karena dosis merkuri yang terakumulasi di testis masih belum adekuat sehingga menyebabkan perbedaan rerata yang tidak

signifikan. Ketika terabsorpsi, merkuri anorganik seperti merkuri klorida akan lebih banyak ditemukan di ginjal dibandingkan pada organ lainnya dikarenakan ginjal merupakan organ target dari ion merkuri, sehingga garam merkuri akan diserap dan terakumulasi di tubulus proksimal (Park dan Zheng, 2012). Pada perbandingan antara kelompok 3, 4, dan 5, terdapat kecenderungan penurunan rerata morfologi seiring bertambahnya waktu paparan walaupun tidak ditemukan perbedaan yang signifikan. Hal ini mungkin terjadi akibat akumulasi merkuri klorida di testis selama 21 dan 28 minggu belum adekuat untuk memberikan efek yang berbeda signifikan dibandingkan kelompok 14 hari. Penelitian yang dilakukan oleh Fornazier *et al.* (2018) tentang distribusi merkuri klorida pada tikus jantan wistar yang terpapar merkuri selama 30 hari menyebutkan bahwa pada paparan kronik, merkuri klorida lebih banyak ditemukan di ginjal dan hepar dibandingkan organ lainnya. Pada saat yang sama, paparan merkuri juga memicu ginjal dan hepar untuk menginduksi *stress protein* yang menarik *sulfhydryl reactive metals* seperti merkuri yang masuk ke dalam sel. Sehingga memberikan perlindungan parsial dengan cara menyerap dan mencegah akumulasi merkuri di organ lain seperti testis (Fornazier *et al.*, 2018). Oleh karena itu, efek yang ditimbulkan oleh paparan merkuri pada hari ke-21 dan ke-28 mengalami penurunan. Sehingga dapat disimpulkan bahwa paparan merkuri klorida selama 14, 21, dan 28 hari menimbulkan efek yang sama pada rerata morfologi spermatozoa.

Pada penelitian ini, merkuri yang digunakan adalah merkuri klorida yang memiliki tingkat absorpsi lebih rendah dibandingkan *methyl mercury*. Pada cemaran air dan tanah di lingkungan PESK, jenis merkuri yang banyak ditemukan dan mempunyai risiko yang tinggi untuk dikonsumsi masyarakat sekitar adalah *methyl mercury* yang terkandung dalam ikan. Sehingga, karena absorpsi *methyl mercury* pada saluran pencernaan lebih baik dibandingkan merkuri klorida, maka efek yang ditimbulkan pada morfologi spermatozoa juga akan lebih besar. Keterbatasan dalam penelitian ini adalah tidak adanya data terkait kadar ROS dan kadar antioksidan testis selama penelitian, sehingga masih belum diketahui pengaruh lama paparan merkuri peroral terhadap kadar ROS dan kadar antioksidan testis.



BAB V

KESIMPULAN

5.1. Kesimpulan

- 5.1.1. Lama paparan merkuri peroral berpengaruh terhadap morfologi spermatozoa tikus jantan Wistar
- 5.1.2. Persentase morfologi spermatozoa pada tikus jantan Wistar pada kelompok kontrol adalah 75,60%.
- 5.1.3. Persentase morfologi spermatozoa pada tikus jantan Wistar pada kelompok yang terpapar merkuri peroral selama 7, 14, 21, dan 28 hari yaitu 69,60%, 55,20%, 53,80%, dan 44,44%.
- 5.1.4. Terdapat perbedaan persentase morfologi spermatozoa kelompok paparan merkuri selama 7 hari dengan kelompok paparan merkuri selama 14, 21, dan 28 hari.

5.2. Saran

Perlu dilakukan penelitian mengenai pengaruh lama paparan merkuri kadar ROS dan kadar antioksidan testis pada tikus yang terpapar oleh merkuri klorida.

DAFTAR PUSTAKA

- Aderemi, S., Okoliko, V., Temitope, G., Dare, O., dan Akomaye, J. (2017) '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. doi:10.1016/j.bj.2019.07.004.
- Agarwal, A., Virk, G., Ong, C., dan du Plessis, S. (2014) 'Effect of Oxidative Stress on Male Reproduction', *The World Journal of Men's Health*, 32(1), p. 1. doi:10.5534/wjmh.2014.32.1.1.
- Alahmar, A.T. (2019) 'Role of Oxidative Stress in Male Infertility: An Updated Review', *Journal of Human Reproductive Sciences*, In-press. doi:10.4103/jhrs.jhrs.
- Almeer, R.S., Albasher, G., Kassab, R.B., Ibrahim, S.R., Alotibi, F., Ali, D., Alkahtani, S., dan Moneim, A.E.A. (2019) 'Ziziphus spina-christi leaf extract attenuates mercury chloride-induced testicular dysfunction in rats'.
- Barrett, K.E., Barman, S.M., Brooks, H.L., dan Yuan, J.X.J. (2019) *Ganong's Review of Medical Physiology*. 26th edn. McGraw-Hill Education.
- Bernhoft, R.A. (2012) 'Mercury toxicity and treatment: A review of the literature', *Journal of Environmental and Public Health*, 2012. doi:10.1155/2012/460508.
- Borghat, M. Vander dan Wyns, C. (2018) 'Fertility and infertility: Definition and epidemiology', *Clinical Biochemistry*, 62(February), pp. 2–10. doi:10.1016/j.clinbiochem.2018.03.012.
- Federer, W.T. (1967) *Experimental design theory and application*. Oxford & IBH, Calcutta, 1967.
- Fornazier, M.Z.G., Nascimento, T.B., Marques, V.B., Vassalo, D., dan Carneiro, M.T.W.D. (2018) 'Mercury Biodistribution in Rats after Chronic Exposure to Mercury Chloride', 29(7), pp. 1579–1584.
- Garrido, N. dan Rivera, R. (2017) *Practical Guide to Sperm Analysis: Basic Andrology in Reproductive Medicine*. 1st edn. CRC Press.
- Hall, J.E. dan Hall, M.E. (2020) *Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology E-Book*. 14th edn. Elsevier Health Sciences. Available at: <https://books.google.co.id/books?id=H1rrDwAAQBAJ>.
- van der Horst, G., Skosana, B., Legendre, A., Oyeyipo, P., dan du Plessis, 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), pp. 49–58. doi:10.1080/10520295.2017.1380842.

- Jonathan, J., Johan, J., dan Amarwati, S. (2017) 'Pengaruh Pemberian Merkuri Peroral Terhadap Gambaran Histopatologi Liver Tikus Wistar', 6(2), pp. 673–681.
- Kementerian Kesehatan RI (2016) 'Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 57 Tahun 2016 Tentang Rencana Aksi Nasional Pengendalian Dampak Kesehatan Akibat Paparan Merkuri Tahun 2016-2020', *Kementerian Kesehatan RI*, pp. 1–10.
- Kumar, N. dan Singh, A. (2015) 'Trends of male factor infertility, an important cause of infertility: A review of literature', *Journal of Human Reproductive Sciences*, 8(4), pp. 191–196. doi:10.4103/0974-1208.170370.
- Martinez-Finley, E.J. dan Aschner, M. (2014) 'Recent Advances in Mercury Research', *Current environmental health reports*, 1(2), pp. 163–171. doi:10.1007/s40572-014-0014-z.
- Martinez, C.S., Torres, J.G.D., Peçanha, F.M., Anselmo-Franci, J.A., Vassallo, D.V., Salaices, M., Alonso, M.J., dan Wiggers, G.A. (2014) '60-Day chronic exposure to low concentrations of hgcl2 impairs sperm quality: Hormonal imbalance and oxidative stress as potential routes for reproductive dysfunction in rats', *PLoS ONE*, 9(11), pp. 1–9. doi:10.1371/journal.pone.0111202.
- Massányi, P., Massányi, M., Madeddu, R., Stawarz, R., dan Lukáč, N. (2020) 'Effects of cadmium, lead, and mercury on the structure and function of reproductive organs', *Toxics*, 8(4), pp. 1–31. doi:10.3390/toxics8040094.
- Mocevic, E., Specht, I.O., Marott, J.L., Giwercman, A., Jönsson, B.A.G., Toft, G., Lundh, T., dan Bonde, J.P. (2013) 'Environmental mercury exposure, semen quality and reproductive hormones in Greenlandic Inuit and European men: A cross-sectional study', *Asian Journal of Andrology*, 15(1), pp. 97–104. doi:10.1038/aja.2012.121.
- Mulyani, U., Sukarni, D., dan Sari, E.P. (2021) 'Faktor-Faktor Yang Berhubungan Dengan Infertilitas Primer Pada Pasangan Usia Subur Di Wilayah Kerja Uptd Puskesmas Lembak Kab. Muara Enim Tahun 2021', 8(8), pp. 2698–2710.
- NCBI (2022) *PubChem Compound Summary for CID 24085, Mercuric chloride, National Center for Biotechnology Information*. Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Mercuric-chloride> (Accessed: 28 June 2022).
- Neto, F.T.L., Bach, P.V., Najari, B.B., Li, P.S., dan Goldstein, M. (2016) 'Spermatogenesis in humans and its affecting factors', *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 59, pp. 10–26. doi:10.1016/j.semcdb.2016.04.009.

- Othman, M.S., Safwat, G., Aboulkhair, M., dan Abdel, A.E. (2014) 'The potential effect of berberine in mercury-induced hepatorenal toxicity in albino rats', *FOOD AND CHEMICAL TOXICOLOGY*, 69, pp. 175–181. doi:10.1016/j.fct.2014.04.012.
- Panjaitan, R.F. dan Manurung, E. (2020) 'Analisis Faktor Resiko Kejadian Infertilitas Pada Perawat di RSUD Sembiring', *BEST Journal (Biology Education, Sains and Technology)*, 3(2), pp. 244–250. doi:10.30743/best.v3i2.3333.
- 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. doi:10.3961/jpmph.2012.45.6.344.
- Sharma, M. dan Kumar, A. (2017) *Basics of Human Andrology: A Textbook, Basics of Human Andrology*. Springer. doi:10.1007/978-981-10-3695-8_17.
- Sherwood, L. (2019) *Human Physiology: From Cells to Systems*. 4th edn. Nelson. Available at: <http://books.google.com/books?id=gOmpysGBC90C&pgis=1>.
- Vaidya, V.S. dan Mehendale, H.M. (2019) 'Mercuric chloride', *Encyclopedia of Toxicology*, 77(58), pp. 33–36. doi:10.1016/B0-12-369400-0/00593-7.
- WHO (2021) *World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 6th ed. World Health Organization, Department of Reproductive Health and Research. Geneva, Switzerland, WHO Press.* Available at: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240030787>.
- Widmaier, E., Raff, H., dan Strang, K. (2018) *Vander'S Human Physiology: the Mechanisms of Body Function, Fifteenth Edition*. 15th edn, McGraw-Hill Education. 15th edn. McGraw-Hill Education.