

PENGARUH PEMBERIAN METHOXYCHLOR PADA PERIODE LAKTASI TERHADAP KUALITAS SPERMATOZOA MENCIT (*Mus musculus* L.) STRAIN BALB C

SKRIPSI

Oleh

Hajar Syifa Fiarani NIM 071810401079

JURUSAN BIOLOGI FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM UNIVERSITAS JEMBER 2013



PENGARUH PEMBERIAN METHOXYCHLOR PADA PERIODE LAKTASI TERHADAP KUALITAS SPERMATOZOA MENCIT (*Mus musculus* L.) STRAIN BALB C

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan Program Studi Biologi (S1) dan mencapai gelar Sarjana Sains

Oleh Hajar Syifa Fiarani NIM 071810401079

JURUSAN BIOLOGI FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM UNIVERSITAS JEMBER 2013

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan dengan penuh kasih sayang untuk:

- 1. Ibunda Puji Hastuti tercinta serta keluarga besar M. Yassir, yang telah mendoakan tiada henti dan memberikan kasih sayang, motivasi, nasehat serta pengorbanan baik moril dan materiil;
- 2. Guru-guruku yang telah mendidik dan mengajar sejak sekolah dasar sampai dengan perguruan tinggi, terima kasih yang tak terhingga atas ilmu yang Bapak dan Ibu berikan;
- 3. Almamater Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

MOTO

Gunakanlah kesempatan sebaik-baiknya selama masa sedang menampakkan kepatuhannya kepadamu*)

Ketahuilah bahwa didepanmu terbentang jalan yang amat panjang dan banyak sekali rintangannya. Untuk melintasinya dibutuhkan kepandaian dan kebijakan yang tidak sedikit. Karena itu bawalah bekal secukupnya saja dan jangan memberati dirimu sendiri*

Jadikanlah dirimu neraca adil dalam hubunganmu dengan orang-orang di sekitarmu*)

^{*}Imam Ali R.A. 2003. Mutiara Nahjul Balaghah. Bandung: Penerbit Mizan

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Hajar Syifa Fiarani

NIM : 071810401079

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul: Pengaruh

Pemberian Methoxychlor Pada Periode Laktasi Terhadap Kualitas Spermatozoa

Mencit (Mus musculus L.) Strain Balb C adalah benar-benar hasil karya ilmiah

sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, dan belum pernah

diajukan pada institusi mana pun, serta bukan karya jiplakan. Saya bertanggung

jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus

dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan

paksaan dari pihak mana pun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata

di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 20 Desember 2012

Yang menyatakan

Hajar Syifa Fiarani

NIM 071810401079

iν

SKRIPSI

PENGARUH PEMBERIAN METHOXYCHLOR PADA PERIODE LAKTASI TERHADAP KUALITAS SPERMATOZOA MENCIT (Mus musculus L.) STRAIN BALB C

Oleh

Hajar Syifa Fiarani NIM 071810401079

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Dra. Mahriani, M.Si

Dosen Pembimbing Anggota : Dra. Susantin Fajariyah, M.Si

PENGESAHAN

Skripsi berjudul "Pengaruh Pemberian Methoxychlor Pada Periode Laktasi Terhadap Kualitas Spermatozoa Mencit (*Mus musculus* L.) Strain Balb C" telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal:

tempat : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember

Tim Penguji

Ketua Sekretaris

Dra. Mahriani, M.Si NIP 195703151987022001 Dra. Susantin Fajariyah, M.Si NIP 196411051989022001

Anggota I Anggota II

Dr. Hidayat Teguh W., M.Pd NIP 195805281988021002 Eva Tyas Utami, S.Si, M.Si NIP 197306012000032001

Mengesahkan Dekan,

Prof. Drs. Kusno, DEA., Ph.D NIP 196101081986021001

RINGKASAN

Pengaruh Pemberian Methoxychlor Pada Periode Laktasi Terhadap Kualitas Spermatozoa Mencit (*Mus musculus* L.) Strain Balb C; Hajar Syifa Fiarani, 071810401079; 2012: 37 halaman; Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Methoxychlor (MXC) merupakan insektisida organoklorin pengganti DDT. MXC memiliki aktivitas estrogenik yang dapat mempengaruhi histologi organ reproduksi, mengganggu pematangan spermatozoa dan produksi hormon. Pemberian MXC pada periode laktasi diduga mempengaruhi kualitas spermatozoa mencit dewasa. Pengamatan kualitas spermatozoa antara lain meliputi motilitas dan morfologi spermatozoa yang merupakan indikator penting pada sistem reproduksi pria.

Tujuan penelitian ini untuk mengetahui pengaruh pemberian MXC pada periode laktasi terhadap kualitas spermatozoa mencit (*Mus musculus* L.) strain Balb C. Penelitian dilakukan di laboratorium Zoologi Jurusan Biologi FMIPA Universitas Jember menggunakan rancangan acak lengkap (RAL). Mencit dibagi menjadi 4 kelompok yaitu 1 kelompok kontrol (D0), dan 3 kelompok perlakuan (D1, D2 dan D3). Kelompok kontrol diberi *corn oil*, kelompok perlakuan diberi *corn oil* dengan penambahan MXC. Dosis MXC yang digunakan yaitu 0,14 mg/g bb (D1); 0,28 mg/g bb (D2) dan 0,42 mg/g bb (D3). Masing-masing kelompok terdiri dari 6 ekor mencit betina. Pemberian MXC dilakukan selama 21 hari periode laktasi (PND 1 s/d 21) secara intraperitonial. Pada minggu ke-8 setelah lahir, seluruh anak mencit (F1) berjenis kelamin jantan dari induk yang diberi perlakuan dibedah. Cauda epididimis digunakan untuk pengamatan motilitas dan pengamatan morfologi spermatozoa. Data dianalisis menggunakan Anova satu arah kemudian diuji Duncan dengan derajat kepercayaan 5 %. Untuk melihat hubungan antara motilitas dan morfologi

spermatozoa dilakukan uji korelasi.

Rerata persentase motilitas spermatozoa (D0, D1, D2, D3) secara berturutturut adalah 77,16; 63,08; 55,16; 43,16. Hasil uji Anova taraf signifikansi 5 % untuk rerata persentase spermatozoa motil diperoleh nilai P (0,000) < 0,05. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian MXC berpengaruh nyata terhadap rerata persentase spermatozoa motil. Hasil uji Duncan menunjukkan bahwa peningkatan rerata persentase motilitas spermatozoa pada setiap perlakuan berbeda nyata dengan kontrol. Rerata persentase morfologi spermatozoa abnormal (D0, D1, D2, D3) adalah 15,01; 31,58; 42,7 dan 53,6.. Hasil uji Anova taraf signifikansi 5 % untuk rerata persentase morfologi spermatozoa abnormal diperoleh nilai P (0,000) < 0,05. Hasil tersebut menunjukkan bahwa MXC berpengaruh signifikan terhadap morfologi abnormal spermatozoa. Hasil uji Duncan menunjukkan bahwa persentase morfologi abnormal spermatozoa pada setiap kelompok perlakuan MXC berbeda nyata dengan kontrol. Hasil uji korelasi motilitas dan abnormalitas spermatozoa menunjukkan bahwa terdapat hubungan negatif antara motilitas dan abnormalitas spermatozoa yaitu semakin tinggi nilai persentase spermatozoa abnormal maka semakin rendah nilai persentase motilitasnya.

Berdasarkan hasil penelitian dapat diambil kesimpulan bahwa pemberian MXC pada periode laktasi berpengaruh terhadap kualitas spermatozoa mencit yaitu menurunkan persentase motilitas spermatozoa dan menurunkan persentase spermatozoa normal. Semakin tinggi dosis MXC yang diberikan semakin menurunkan persentase motilitas dan persentase spermatozoa normal pada mencit.

.

PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul "Pengaruh Pemberian Methoxychlor Pada Periode Laktasi Terhadap Kualitas Spermatozoa Mencit (*Mus musculus* L.) Strain Balb C". Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada:

- 1. Dra. Mahriani, M.Si. selaku Dosen Pembimbing Utama dan Dra. Susantin Fajariyah, M.Si. selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah membimbing, mengarahkan, meluangkan waktu, tenaga, dan pikiran sejak awal hingga akhir penelitian, maupun saat penulisan skripsi ini;
- 2. Dr. Hidayat Teguh W., M.Pd., selaku Dosen Penguji I, Eva Tyas Utami,S.Si, M.Si., selaku Dosen Penguji II, atas saran kritik yang sangat membangun dan segala kemudahan yang diberikan;
- 3. Drs. Asmoro Lelono M.Si. sebagai Dosen Pembimbing Akademik yang telah membimbing selama penulis menjadi mahasiswa;
- 4. bapak dan ibu Dosen, serta seluruh staf di lingkungan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember, atas segala keikhlasan hati membantu penulis selama dalam masa perkuliahan;
- 5. kedua orang tua, kakak (almh) Hajar Syifa Ratnasari, pakdhe Wahyu Veteranto, om Arif, om Anwar Aris, om Hadi, tante Yuli, mas Vince Suseno, serta seluruh keluarga tercinta yang selalu memberikan dukungan, perhatian dan kasih sayangnya serta doa yang tiada henti-hentinya;
- 6. seluruh teman-teman angkatan 2007, terima kasih atas dukungan, bantuan, dan kebersamaannya baik dalam suka maupun duka;

- 7. seluruh teman-teman Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember terima kasih atas dukungan dan kebersamaannya;
- 8. semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Penulis berharap semoga karya tulis ini bermanfaat bagi penulis pada khususnya dan bagi semua mahasiswa umumnya.

Jember, Desember 2012

Penulis

DAFTAR ISI

Ha	alaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN	ii
HALAMAN MOTTO	iii
HALAMAN PERNYATAAN	iv
HALAMAN PEMBIMBINGAN	V
HALAMAN PENGESAHAN	vi
RINGKASAN	vii
PRAKATA	ix
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Tujuan Penelitian	2
1.4 Manfaat Penelitian	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Methoxychlor (MXC)	4
2.2 Periode Laktasi	5
2.3 Organ Reproduksi Jantan	6
2.4 Karakteristik Spermatozoa	7
2.5 Kualitas Spermatozoa	8
2.6 Hinotosis	Q

BAB 3. METODE PENELITIAN	10
3.1 Tempat Penelitian dan Waktu	10
3.2 Alat dan Bahan	10
3.3 Rancangan Penelitian	10
3.4 Prosedur Penelitian	11
3.4.1 Aklimatisasi Hewan Uji	11
3.4.2 Pemberian Bahan Uji	11
3.4.3 Pembedahan Hewan Uji	12
3.4.4 Pengamatan Motilitas Spermatozoa	12
3.4.5 Pengamatan Morfologi Spermatozoa	12
3.4.6 Analisis Data	13
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	14
4.1 Hasil Pengamatan	14
4.1.1 Motilitas Spermatozoa	14
4.1.2 Morfologi Spermatozoa	15
4.2 Pembahasan	17
BAB 5. PENUTUP	23
5.1 Kesimpulan	23
5.2 Saran	23
DAFTAR PUSTAKA	24
LAMPIRAN	29

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Sruktur Kimia MXC	4
4.1 Histogram Rerata Persentase Motilitas Spermatozoa Mencit (<i>Mus</i>	
musculus L.) Strain Balb C Setelah Pemberian MXC Pada	
Periode Laktasi	14
4.2 Histogram Rerata Persentase Spermatozoa Abnormal Mencit	
(Mus musculus L.) Strain Balb C Setelah Pemberian MXC	
Pada Periode Laktasi	15
4.3 Histogram Rerata Persentase Spermatozoa Abnormal Primer	
dan Sekunder Mencit (Mus musculus L.) Strain Balb C	
Setelah Pemberian MXC Pada Periode Laktasi	16
4.4 Gambar Abnormalitas Primer dan Sekunder Spermatozoa Mencit	
(Mus musculus L.) Strain Balb C	21

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Perhitungan Dosis Methoxychlor (MXC)	. 29
B. Skema Kerja Penelitian	. 31
C. Perhitungan Persentase Motilitas Spermatozoa	. 32
D. Pengamatan Morfologi Spermatozoa	. 33
E. Hasil Analisis Anova dan Uji Duncan Spermatozoa Motil	. 34
F. Hasil Analisis Anova dan Uji Duncan Spermatozoa Abnormal	. 35
G. Hasil Analisis Anova dan Uji Duncan Spermatozoa Abnormal	
Primer dan Sekunder	36
H. Hasil Uji Korelasi Motilitas dan Abnormalitas Spermatozoa	37

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Pestisida merupakan bahan kimia yang umum digunakan pada pertanian untuk mengendalikan hama/serangga pengganggu tanaman. Salah satu jenis pestisida yang umum digunakan di Indonesia adalah golongan organoklorin (Tarumingkeng, 1992). DDT (*Dichloro Diphenyl Trichloroethane*) merupakan insektisida organoklorin yang saat itu lebih diminati karena harganya yang murah, mudah digunakan, serta efektif membasmi hama. Penggunaan DDT ternyata menimbulkan dampak merugikan karena sifatnya yang larut dalam lemak, dan sukar terurai (bioakumulatif) sehingga membahayakan lingkungan dan manusia. DDT kemudian dilarang digunakan untuk pertanian di seluruh dunia dan sebagai penggantinya adalah methoxychlor karena cepat diekskresi oleh tubuh serta memiliki toksisitas lebih rendah dibandingkan dengan DDT (Akingbemi *et al.*, 2009).

Methoxychlor (MXC) adalah insektisida organoklorin yang telah digunakan di seluruh dunia untuk mencegah kerusakan vegetasi oleh hama serangga (Krawzak *et al.*, 2008). MXC memiliki aktivitas estrogenik dan anti androgen yang dapat mempengaruhi histologi pada organ reproduksi dan kelenjar aksesori, mengganggu pematangan spermatozoa dan produksi hormon (Cupp dan Skinner, 2001). Beberapa penelitian menyebutkan bahwa MXC menimbulkan gangguan reproduksi. Cupp *et al.* (2003) menyatakan bahwa apabila tikus betina dipapar dengan MXC pada umur kebuntingan 7 sampai dengan 15 hari secara intraperitonial dengan dosis 50 dan 150 mg/kg/hari, menyebabkan penurunan jumlah sel-sel spermatogenik per testis pada F1 jantan umur 17 dan 20 serta peningkatan spermatid yang mengalami apoptosis pada hari ke-60 setelah lahir. Menurut Cooke dan Eroschenko (1990), pemberian MXC pada dosis 0,1 mg/hari secara intraperitonial pada mencit jantan umur 1 sampai dengan 9 hari dapat menghambat perkembangan saluran reproduksi dan mengurangi konsentrasi testosteron.

Pestisida yang masuk ke dalam tubuh akan menyebar ke berbagai jaringan. Pada ibu menyusui, pestisida akan masuk ke jaringan kelenjar mamae, yaitu kelenjar yang memproduksi air susu dan keluar bersama ASI pada waktu menyusui (Wilystra, 2007). Kelana dan Diah (2007) menyatakan, beberapa bahan polutan yang masuk ke tubuh ibu hamil dan menyusui akan mempengaruhi perkembangan perilaku pada bayi, gangguan hormonal, dan penyakit kanker. Dikatakan oleh Fielden *et al.* (2002), pemberian Diethylstilbestrol (DES) pada mencit betina hari ke-12 kebuntingan sampai hari ke-20 setelah melahirkan dengan dosis 10 μg DES/kg bb secara *gavage*, menyebabkan penurunan jumlah sel sertoli dan jumlah sel spermatozoa anak (F1) pada hari ke-105 dan hari ke-315 setelah lahir.

Penelitian-penelitian mengenai pengaruh MXC terhadap organ reproduksi tikus jantan dan betina pada masa gestasi maupun neonatal sudah banyak dilakukan, namun penelitian tentang pengaruh MXC yang diberikan pada periode laktasi masih jarang dilaporkan sehingga perlu diteliti pengaruh pemberian MXC pada periode laktasi terhadap kualitas spermatozoa mencit (*Mus musculus*) yang merupakan indikator yang sangat penting pada sistem reproduksi pria.

1.2 Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, maka rumusan masalah penelitian ini adalah bagaimana pengaruh pemberian MXC pada periode laktasi terhadap kualitas spermatozoa mencit (*Mus musculus* L.) strain balb C.

1.3 Tujuan dan Manfaat

1.3.1 Tujuan

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian MXC pada periode laktasi terhadap kualitas spermatozoa mencit (*Mus musculus* L.) strain balb C.

1.3.2 Manfaat

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang paparan pestisida MXC pada periode laktasi terhadap kualitas spermatozoa yang diturunkan dari induk yang terpapar MXC.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Methoxychlor (MXC)

Methoxychlor (MXC) merupakan pestisida organoklorin yang digunakan sebagai pengganti DDT untuk mengendalikan serangga. MXC singkatan dari 2,2-bis (p-methoxyphenyl)-1,1,1-trichloroethane, memiliki aktivitas agonis selektif melalui reseptor estrogen (ER) alfa dan aktivitas antagonis melalui ER beta dan reseptor androgen (Waters *et al.*, 2001). Struktur kimia MXC dapat dilihat pada Gambar 1.

Gambar 1. Sruktur kimia MXC (Kegley et al., 2010)

MXC bersifat sebagai anti androgen (Maness *et al.*, 1998) dan memiliki aktivitas estrogenik (Fan, 1999). MXC dapat menyebabkan perubahan histologi pada organ reproduksi dan kelenjar aksesori, mengganggu pematangan spermatozoa dan produksi hormon. Pada mencit dan tikus jantan yang terpapar pada saat embrio, MXC mengganggu perkembangan morfologi dan pertumbuhan testis (Cupp dan Skinner, 2001). Paparan MXC secara *gavage* pada perinatal dan pubertas dapat mengurangi ukuran testis dan jumlah sel sertoli pada tikus (Johnson *et al.*, 2000).

Cupp *et al.* (2003) menyatakan bahwa apabila tikus betina dipapar dengan MXC pada umur kebuntingan 7 sampai dengan 15 hari secara intraperitonial dengan dosis 50 dan 150 mg/kg/hari, menyebabkan penurunan jumlah sel-sel spermatogenik per testis pada F1 jantan umur 17 dan 20 serta peningkatan spermatid yang mengalami apoptosis pada hari ke-60 setelah lahir.

Menurut Cooke dan Eroschenko (1990), pemberian MXC pada dosis 0,1 mg/hari secara intraperitonial pada anak mencit jantan umur 1 sampai dengan 9 hari

dapat menghambat perkembangan saluran reproduksi dan mengurangi konsentrasi testosteron dalam darah.

2.2 Periode Laktasi

Masa laktasi adalah periode yang terjadi sesaat setelah bayi lahir ketika ASI dibentuk dan dikeluarkan (Fitra, 2010). Machfuddin (2004) menyatakan bahwa air susu ibu (ASI) mengandung sejumlah komponen yang digunakan sebagai sumber nutrisi untuk pertumbuhan neonatus dan perlindungan terhadap infeksi. Proses pembentukan air susu merupakan suatu proses yang kompleks melibatkan hipotalamus, pituitari dan organ payudara, yang sudah dimulai saat kehamilan sampai pada masa pasca persalinan.

Laktasi atau menyusui mempunyai dua mekanisme hormonal yaitu produksi ASI yang dipengaruhi hormon prolaktin dan pengeluaran ASI yang dipengaruhi hormon oksitosin. Sedangkan hormon yang berperan pada maturasi alveoli adalah hormon estrogen dan progesteron. Selama kehamilan, hormon prolaktin dari plasenta meningkat tetapi ASI belum keluar karena pengaruh hormon estrogen yang masih tinggi. Kadar estrogen dan progesteron akan menurun pada saat hari kedua atau ketiga pasca persalinan, sehingga terjadi sekresi ASI (Lusa, 2009).

Kelana dan Diah (2007) menyatakan, beberapa bahan polutan apabila masuk ke tubuh ibu yang mengandung dan menyusui akan mempengaruhi perkembangan perilaku pada bayi, gangguan hormonal, dan penyakit kanker. Hal tersebut dapat terjadi karena zat-zat pestisida apabila diserap tubuh akan masuk ke dalam aliran darah ibu. Bahan kimia dari tubuh ibu akan dimobilisasi dan ditransfer ke payudara saat memproduksi ASI kemudian ditransfer ke bayi saat ASI dihisap oleh bayi.

Lin *et al.* (2009) menyatakan, *diethylhexylphthalate* (DEHP) sebagai *endocrine disruptor* yang diberikan secara *gavage* pada tikus dengan dosis 750 mg/kg bb pada hari ke-12 kebuntingan hingga hari ke-21 setelah melahirkan, dapat mengurangi berat badan anak pada hari ke-2 setelah lahir, menurunkan jarak

anogenital pada hari ke-2 setelah lahir dan menurunkan konsentrasi testosteron hari ke-21 setelah lahir.

Tikus betina bunting yang diberi ethinyl estradiol (EE) dan bisphenol A (BPA) secara *gavage* dari hari kebuntingan ke-7 sampai hari ke-18 setelah melahirkan dengan dosis EE 0,05; 0,5; 1,5; 5; 15; 50 μg/kg/hari dan BPA 2, 20, dan 200 ug/kg/hari, kemudian anak tikus jantan (F1) diamati pada hari ke-150 setelah lahir, terdapat penurunan jumlah spermatozoa pada dosis 50 μg EE/kg/hari sedangkan perlakuan 2, 20, 200 μg BPA/kg/hari atau EE 0,05-1,5 μg/kg/hari tidak mengalami penurunan jumlah spermatozoa (Howdeshell *et al.*, 2008).

2.3 Organ Reproduksi Jantan

Organ reproduksi jantan tersusun atas bagian utama berupa testis yang dilengkapi dengan saluran kelamin antara lain epididimis, vas deferen dan kelenjar asesoris.

2.3.1 Testis

Testis merupakan salah satu organ yang penting dalam reproduksi jantan karena berfungsi memproduksi spermatozoa dan hormon reproduksi, yaitu testosteron (Falk, 2001). Pada testis terdapat tubulus seminiferus yang terdiri dari sel-sel induk spermatozoa atau spermatogonium dan sel sertoli, di antara tubulus seminiferus terdapat sel Leydig. Sel sertoli berfungsi memproduksi cairan sumber makanan spermatozoa sedangkan sel Leydig berfungsi menghasilkan testosteron (Riani, 2009).

Spermatozoa dihasilkan di dalam tubulus seminiferus yang proses pembentukannya dipengaruhi oleh FSH (Follicle Stimulating Hormone), sedangkan testosteron diproduksi oleh sel-sel interstitial dari Leydig yang produksinya dipengaruhi oleh ICSH (Interstitial Cell Stimulating Hormone). FSH merupakan glikoprotein yang salah satu fungsinya adalah bersama-sama dengan androgen berperan dalam proses spermatogenesis, sedangkan ICSH merupakan glikoprotein

yang memiliki fungsi merangsang sel Leydig untuk mensekresi androgen (Setyadi, 2006).

2.3.2 Epididimis

Epididimis merupakan suatu struktur memanjang yang terdapat pada permukaan dorsal testis, dibentuk oleh saluran berliku-liku secara tidak teratur yang disebut duktus epididimis. Epididimis secara makroskopis terdiri atas bagian kepala (*caput*), badan (*corpus*) dan ekor (*cauda*) epididimis. Fungsi utama epididimis adalah untuk pengangkutan, maturasi dan penyimpanan spermatozoa (Agustin, 2012).

Pematangan spermatozoa terjadi di epididimis yang meliputi perubahan morfologis, histokimiawi, fisiologis, biokimia, biofisika dan perubahan metabolik. Di dalam epididimis, disekresi zat yang penting dalam menunjang proses pematangan spermatozoa seperti ion (Ca, Na, K, Cl), substrat (protein, asam sialat, glikogen, asam laktat, fosfolipid) dan enzim (LDH, fosfatase asam dan fosfatase basa) (Rusmiati, 2007).

2.4 Karakteristik Spermatozoa

Semen terdiri atas dua bagian yaitu sel spermatozoa dan cairan plasma seminalis. Spermatozoa adalah sel gamet yang diproduksi di dalam testis melalui proses spermatogenesis (Setyadi, 2006). Cairan plasma seminalis merupakan suatu *buffer* yang berisi makanan untuk spermatozoa dan berfungsi sebagai medium bagi spermatozoa, diproduksi oleh kelenjar-kelenjar tambahan yaitu kelenjar *bulbourethralis* (kelenjar *cowper*), kelenjar prostat dan kelenjar *vesikularis* (Muchtaromah, 2010).

Setyadi (2006) menyatakan bahwa primordial spermatozoa sudah terbentuk sejak embrio berupa sel-sel gonosit yang aktif mengadakan pembelahan yang kemudian akan menjadi spermatogonia pada masa pubertas. Pada masa pubertas, spermatogonia akan berproliferasi dan berdiferensiasi menjadi spermatosit I yang

kemudian memasuki fase miosis, sehingga membentuk spermatid yang mempunyai jumlah kromosom separuh dari jumlah kromosom sel sebelum miosis (haploid). Spermatid kemudian akan mengalami proses spermiogenesis dan pada akhir spermiogenesis ini akan dihasilkan spermatozoa yang mempunyai struktur spesifik yang terdiri atas bagian kepala, leher dan ekor spermatozoa.

2.5 Kualitas Spermatozoa

Pengamatan kualitas spermatozoa antara lain meliputi motilitas dan morfologi spermatozoa. Motilitas adalah perbandingan antara jumlah spermatozoa yang bergerak aktif dengan jumlah total keseluruhan spermatozoa yang terdapat pada hasil pengamatan dalam satuan persen (%). Morfologi spermatozoa ditujukan untuk melihat bentuk-bentuk spermatozoa yang ada dan menentukan persentase bentuk abnormal yang ditemukan. Morfologi spermatozoa dianggap normal jika ditemukan kurang dari 30% bentuk abnormal (Nirmalida, 2012).

Tingkatan pergerakan spermatozoa adalah sebagai berikut:

- 0 = spermatozoa tidak menunjukkan pergerakkan
- 1 = spermatozoa bergerak ke depan dengan lambat
- 2 = spermatozoa bergerak ke depan dengan cepat
- 3 = spermatozoa bergerak ke depan sangat cepat

Spermatozoa disebut mempunyai kualitas bentuk yang cukup baik apabila > 50% spermatozoa mempunyai morfologi normal. Apabila > 50 % spermatozoa mempunyai morfologi abnormal, maka keadaan ini disebut teratozoospermia. Perhitungan persentase daya hidup (viabilitas) dan abnormalitas spermatozoa menggunakan preparat ulas berdasarkan perbedaan afinitas zat warna antara sel-sel sperma yang mati dan hidup. Jumlah sperma yang hidup dihitung secara objektif (Nafa dan Eshre, 2002).

Abnormalitas spermatozoa dibedakan antara bentuk abnormalitas primer dan sekunder. Bentuk abnormalitas primer berasal dari gangguan pada testis dan

abnormalitas sekunder berasal dari gangguan pada epididimis. Abnormalitas spermatozoa primer meliputi kepala kecil, besar, miring, bulat, kepala dua, ekor dua, akrosom salah bentuk, leher besar, sedangkan abnormalitas sekunder meliputi leher patah, leher ekor kusut, ekor patah, ekor bergulung dan kepala terpisah dari leher (Nafa dan Eshre, 2002).

2.6 Hipotesis

- 1. Methoxychlor yang diberikan pada periode laktasi menurunkan kualitas (motilitas dan morfologi) spermatozoa mencit (*Mus musculus* L.) strain balb C.
- 2. Semakin tinggi dosis MXC yang diberikan pada periode laktasi semakin menurunkan persentase spermatozoa motil dan spermatozoa normal pada mencit (*Mus musculus* L.) strain Balb C.

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Zoologi Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember. Penelitian ini dimulai pada bulan Februari 2012 sampai Agustus 2012.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat bedah, cawan petri, *hand counter*, *hemacytometer*, *cover glass*, *obyek glass*, kandang pemeliharaan dari bak plastik dan penutup kawat berukuran 40x30x15 cm, kertas label, kertas tisu, mikroskop, nampan, *syring*, timbangan analitik, toples bius.

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit (*Mus musculus* L.) betina strain Balb C dewasa dengan bobot badan berkisar antara 25-30 gram yang diperoleh dari Fakultas Kedokteran Universitas Jember, pakan mencit pellet CP 511 (PT. Charoen Phokphand), air, *chloroform*, *methoxychlor* dan *corn oil* (MP. Biomeomedicals), *eosin* 1% dalam H₂O, *Phosfat Buffer Saline* (PBS), formalin 2%.

3.3 Rancangan Penelitian

Mencit dibagi menjadi 4 kelompok, pembagian kelompok berdasarkan dosis MXC sebagai berikut:

- kelompok kontrol (D0) = dosis 0 mg/g/bb
- kelompok 1 (D1) = dosis 0,14 mg/g bb
- kelompok 2 (D2) = dosis 0.28 mg/g bb
- kelompok 3 (D3) = dosis 0,42 mg/g bb

Masing-masing kelompok terdiri dari 6 ekor mencit betina. Rancangan penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL).

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Aklimatisasi Hewan Uji

Hewan coba yang digunakan dalam perlakuan adalah mencit betina virgin strain balb C dewasa (umur 2,5-3 bulan) dengan bobot badan berkisar antara 25-30 g sebanyak 24 ekor, yang berasal dari Fakultas Kedokteran Universitas Jember. Keseluruhan hewan coba diaklimatisasi selama kurang lebih tujuh hari untuk beradaptasi dengan lingkungan yang baru. Selama masa aklimatisasi, hewan coba diberi makan dengan pakan standar dan minum *ad libitum*. Sebelum percobaan, mencit betina dikawinkan dengan mencit jantan dengan perbandingan satu jantan untuk tiga betina. Sebagai indikator terjadi kebuntingan ditemukan adanya sumbat vagina setelah 18 jam dikawinkan. Induk bunting dibiarkan sampai melahirkan anak (selama 21 hari).

3.4.2 Pemberian Bahan Uji

Hewan coba dibagi ke dalam empat kelompok, tiap kelompok terdiri dari enam ekor. Perlakuan mulai diberikan pada induk mencit sehari setelah anak lahir selama 3 minggu periode laktasi. Faktor yang digunakan adalah dosis MXC. Kelompok kontrol diberi *corn oil* sebagai kontrol, kelompok 1 diberi MXC dosis 0,14 mg/g bb, kelompok 2 diberi MXC dosis 0,28 mg/g bb, kelompok 3 diberi MXC dosis 0,42 mg/g bb (cara penentuan dosis MXC dapat dilihat pada lampiran A). Volume pemberian sebanyak 0,1 ml. Pemberian bahan uji dilakukan setiap hari secara intraperitonial selama 3 minggu (periode laktasi). Setelah 3 minggu, anaknya (F1) disapih dan dipisah antara jantan dan betina.

3.4.3 Pembedahan Hewan Uji

Pada minggu ke-8 setelah lahir, seluruh anak mencit (F1) berjenis kelamin jantan dari induk yang diberi perlakuan diambil, dianestesi dengan kloroform secara inhalasi kemudian dibedah. Jumlah anak mencit yang diambil dari tiap perlakuan adalah sebagai berikut: kontrol sebanyak 24 ekor, dosis 0,14 sebanyak 12 ekor, dosis 0,28 dan dosis 0,42 masing-masing sebanyak 6 ekor. Cauda epididimis digunakan untuk pengamatan motilitas dan pengamatan morfologi spermatozoa.

3.4.4 Pengamatan Motilitas Spermatozoa

Cauda epididimis hewan uji dipotong dengan gunting kemudian dimasukkan dalam cawan petri berisi 1 ml larutan NaCl 0,9% hangat (suhu 37°C). Cauda epididimis dipotong-potong dengan gunting tajam kemudian diaduk dengan cara pipeting berulang. Selanjutnya satu tetes suspensi diletakkan di atas hemasitometer, kemudian diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 400 kali. Pengamatan dilakukan terhadap 100 spermatozoa dan diulang 3 kali untuk satu hewan uji. Katagori spermatozoa yang diamati adalah sebagai berikut:

- katagori 0 : spermatozoa tidak bergerak sama sekali
- Katagori 1 : spermatozoa bergerak lambat
- Katagori 2 : spermatozoa bergerak ke depan dengan kecepatan sedang atau berputar-putar
- Katagori 3 : spermatozoa bergerak lurus ke depan

Presentase jumlah sperma yang motil ditentukan dengan menjumlahkan katagori 2 dan 3, dibagi 100 kemudian dikalikan 100%. Angka 100 merupakan jumlah katagori 0, 1, 2 dan 3 (Nafa daan Eshre, 2002).

(skema perhitungan motilitas spermatozoa pada lampiran C)

3.4.5 Pengamatan Morfologi Spermatozoa

Suspensi spermatozoa sebanyak 0,5 ml diteteskan pada kaca obyek dan di fiksasi dengan formalin 2% selama 10 menit, kemudian dibiarkan mengering. Setelah

kering diwarnai dengan eosin 1% selama 15 menit, kemudian dibilas dengan aquades. Pengamatan dilakukan di bawah mikroskop dengan perbesaran 400x terhadap 100 spermatozoa, hasilnya dalam persen. Pengamatan dilakukan sebanyak 5 kali.

Parameter yang diamati adalah spermatozoa abnormal. Spermatozoa abnormal meliputi abnormalitas primer dan abnormalitas sekunder. (skema pengamatan morfologi spermatozoa pada lampiran D)

3.5 Analisis Data

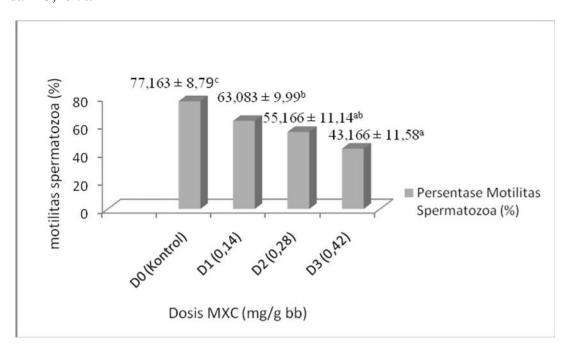
Rancangan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap dengan empat taraf perlakuan dan enam pengulangan. Data yang diperoleh dianalisis menggunakan analisis varian (Anova), jika terdapat perbedaan nyata maka dilanjutkan dengan uji Duncan (Abdulsyahid, 2009) dengan taraf signifikansi 5%. Pengolahan data menggunakan perangkat lunak SPSS 16.0 for Windows.

BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil Pengamatan

4.1.1 Motilitas Spermatozoa

Hasil pengamatan spermatozoa motil mencit (*Mus musculus* L.) strain Balb C setelah pemberian MXC pada periode laktasi dilihat pada Gambar 4.1. Rerata persentase spermatozoa kontrol, MXC dosis 0,14 mg/g bb, MXC dosis 0,28 mg/g bb, dan MXC dosis 0,42 mg/g bb secara berturut-turut adalah 77,16 %; 63,08 %; 55,16 % dan 43,16 %.



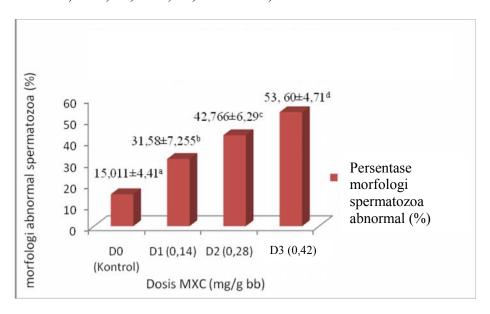
Gambar 4.1 Histogram rerata rersentase motilitas spermatozoa mencit (*Mus musculus* L.) strain balb C setelah pemberian MXC pada periode laktasi

Berdasarkan uji Anova taraf signifikansi 5 % untuk rerata persentase spermatozoa diperoleh nilai P (0,000) < 0,05 (Lampiran E). Hal ini menunjukkan bahwa pemberian MXC berpengaruh nyata terhadap rerata persentase spermatozoa motil. Analisis statistik menggunakan uji Duncan menunjukkan bahwa persentase

motilitas spermatozoa pada kelompok kontrol berbeda nyata dengan perlakuan MXC pada semua dosis. Persentase motilitas spermatozoa MXC dosis 0,14 mg/g bb berbeda nyata dengan kontrol, tidak berbeda nyata dengan dosis 0,28 mg/g bb, dan berbeda nyata dengan dosis 0,42 mg/g bb, persentase motilitas spermatozoa MXC dosis 0,28 mg/g bb berbeda nyata dengan kontrol dan tidak berbeda nyata dengan dosis 0,42 mg/g bb, sedangkan persentase motilitas spermatozoa MXC dosis 0,42 mg/g bb berbeda nyata dengan kontrol dan dosis 0,14 mg/g bb namun tidak berbeda nyata dengan dosis 0,28 mg/g bb (Lampiran E).

4.1.2 Morfologi Spermatozoa

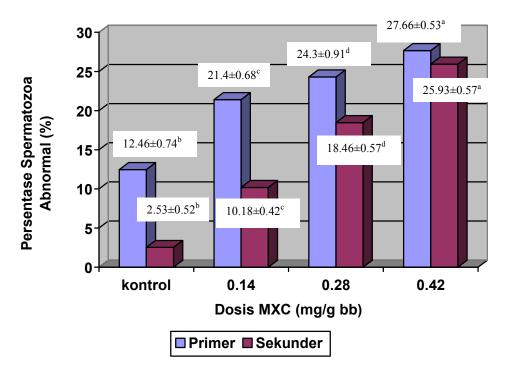
Hasil pengamatan morfologi spermatozoa abnormal mencit (*Mus musculus* L.) strain Balb C setelah pemberian MXC dapat dilihat pada Gambar 4.2 dan Gambar 4.3. Rerata persentase morfologi spermatozoa abnormal pada kontrol, MXC dosis 0,14 mg/g bb, MXC dosis 0,28 mg/g bb, MXC dosis 0,42 mg/g bb secara berturutturut adalah 15,01 %; 31,58 %; 42,7 % dan 53,6 %.



Gambar 4.2 Histogram rerata persentase morfologi spermatozoa abnormal mencit (*Mus musculus* L.) strain balb C setelah pemberian MXC pada periode laktasi

Berdasarkan uji Anova taraf signifikansi 5 % untuk rerata persentase morfologi spermatozoa abnormal diperoleh nilai P (0,000) < 0,05 (Lampiran F). Hasil tersebut menunjukkan bahwa MXC berpengaruh signifikan terhadap morfologi abnormal spermatozoa. Hasil uji Duncan menunjukkan bahwa persentase morfologi abnormal spermatozoa pada setiap kelompok perlakuan MXC berbeda nyata dengan kontrol (Lampiran F).

Hasil pengamatan abnormalitas spermatozoa primer dan sekunder dilihat pada Gambar 4.3. Rerata persentase abnormalitas spermatozoa primer kelompok kontrol, MXC dosis 0,14 mg/g bb; 0,28 mg/g bb, dan 0,42 mg/g bb secara berturut-turut adalah 12,47 %; 21,4 %; 24,3 %; dan 27,66 %, sedangkan rerata persentase abnormalitas spermatozoa sekunder secara berturut-turut adalah 2,53 %; 10,18 %; 18,46 % dan 25,93 %.



Gambar 4.3 Histogram rerata persentase spermatozoa abnormal primer dan sekunder pada mencit (*Mus musculus* L.) strain balb C setelah pemberian MXC pada periode laktasi

Hasil uji korelasi motilitas dan abnormalitas spermatozoa menunjukkan bahwa terdapat hubungan negatif antara motilitas dan abnormalitas spermatozoa yaitu semakin tinggi nilai persentase spermatozoa abnormal maka semakin rendah nilai persentase motilitasnya (lampiran H)

4.2 Pembahasan

Hasil pengamatan kualitas spermatozoa menunjukkan bahwa pemberian MXC pada periode laktasi menurunkan persentase motilitas dan meningkatkan abnormalitas spermatozoa mencit. Penurunan kualitas spermatozoa tersebut diduga karena adanya metabolit MXC yang ditransfer dari induk ke anak mencit melalui ASI. Menurut Schiffer et al. (2007), substansi kimia yang masuk melalui rongga peritonial akan melewati dinding peritonial secara difusi pasif ke pembuluh darah kapiler. Dari kapiler, darah melalui vena portal hepatik menuju hati untuk proses detoksifikasi. Yunita et al. (2007) menyatakan bahwa zat kimia toksik mengalami detoksifikasi di dalam hati yang disebut biotransformasi, yang akan mengubah zat tersebut menjadi produk metabolit. Sebagian metabolit akan diekskresikan dan sebagian lainnya memasuki aliran darah. Metabolit MXC (HPTE) dalam darah melalui vena hepatika ke vena cava inferior (David, 2010) yang kemudian menuju jantung dan diedarkan ke seluruh tubuh termasuk kelenjar mamae. Menurut Sughy (2012), di kelenjar mamae, ASI disalurkan dari alveolus menuju sistem duktus dan selanjutnya mengalir melalui duktus laktiferus masuk ke mulut bayi. ATSDR (2002) menyatakan bahwa metabolit MXC pada hewan dapat ditransfer dari induk menyusui ke anak baru lahir melalui ASI. Methoxychlor terdeteksi pada ASI manusia dan metabolitnya mungkin dapat melewati plasenta.

Penurunan kualitas spermatozoa akibat metabolit MXC dapat terjadi secara langsung maupun tidak langsung. Pengaruh secara langsung dapat terjadi dengan cara metabolit MXC meningkatkan radikal bebas pada testis. Pengaruh tidak langsung dapat terjadi secara hormonal melalui penghambatan fungsi sel Leydig. Menurut

Umami (2009), radikal bebas merupakan suatu senyawa yang mengandung satu atau lebih elektron bebas sehingga bersifat tidak stabil dan reaktif. Radikal bebas yang memiliki kemampuan oksidatif cukup tinggi disebut sebagai *Reactive Oxygen Species* (ROS). Hidrogen peroksida merupakan salah satu senyawa ROS yang berperan dalam proses reproduksi. Apabila produksi ROS melebihi kapasitas antioksidan yang ada, menyebabkan terjadinya stress oksidatif pada sel (Moller, 2000). Latchoumycandane dan Mathur (2002) menyatakan bahwa pemberian MXC pada tikus jantan secara oral dengan dosis 100 mg/kg hari selama 45 hari dapat menginduksi terjadinya stres oksidatif yang disebabkan meningkatnya hidrogen peroksida (H₂O₂) dan lipid peroksidase pada testis.

Lamarande et al. (1997) menyatakan bahwa membran spermatozoa adalah target utama ROS dan lipid merupakan sasaran yang potensial. Lipid membran plasma spermatozoa memiliki fosfolipid dengan kadar yang tinggi sehingga menyebabkan spermatozoa sangat rentan terhadap ROS. Kadar ROS yang tinggi juga dapat mengoksidasi lipid, protein, dan DNA. Oksidasi lipid pada membran spermatozoa menghasilkan senyawa malondialdehyde (MDA), yang bersifat toksik pada sel sehingga menyebabkan kerusakan membran spermatozoa. Menurut Alan (2012),rusaknya membran plasma spermatozoa menyebabkan gangguan metabolisme sel sehingga meningkatkan abnormalitas spermatozoa. Astuti et al. (2009) menambahkan bahwa kerusakan membran spermatozoa dapat menyebabkan penurunan motilitas spermatozoa.

Pada penelitian ini motilitas spermatozoa semakin menurun dengan meningkatnya dosis. Motilitas spermatozoa dikatakan normal apabila persentase spermatozoa motil katagori (2+3) ≥ 50% (Ogli *et al.*, 2009). Rata-rata persentase motilitas spermatozoa kelompok kontrol, MXC dosis 0,14; dan 0,28 termasuk katagori normal karena nilainya diatas 50 %, sedangkan MXC dosis 0,42 mg/g bb memiliki rata-rata persentase sebesar 43,16 %, yang berarti di bawah persentase normal. Penurunan motilitas spermatozoa diduga karena radikal bebas menghambat

proses fosforilasi oksidatif. Stress oksidatif yang diakibatkan oleh peningkatan produksi ROS (*reactive oxigen species*) menyebabkan gangguan pada proses fosforilasi oksidatif pada spermatozoa (Wardani *et al.*, 2012). Fosforilasi oksidatif merupakan proses pembentukan energi yang melibatkan kompleks enzim yang terdapat pada membran bagian dalam mitokondria (Armeinachevana, 2012). Mitokondria spermatozoa terletak pada bagian tengah spermatozoa, sedangkan bagian leher dan ekor berfungsi dalam pergerakan spermatozoa. Setelah disintesa di dalam mitokondria, ATP ditransportasikan ke aksonem pada bagian ekor spermatozoa, selanjutnya dikonversikan oleh dinein pada aksonem yang akan menguraikan ATP menjadi energi untuk pergerakan spermatozoa. Terhambatnya pelepasan ATP ke bagian aksonem mengakibatkan tidak terpenuhinya atau berkurangnya kebutuhan energi untuk menggerakkan ekor, selanjutnya mengakibatkan spermatozoa tidak dapat bergerak cepat atau tidak bergerak sama sekali (Astuti *et al.*, 2009).

Pengaruh pemberian MXC secara tidak langsung terhadap kualitas spermatozoa dapat terjadi secara hormonal melalui penghambatan fungsi sel Leydig. Gore (2002) menyatakan bahwa MXC sebagai *endocrine disruptor* memiliki aktivitas estrogenik sehingga dapat memberikan umpan balik negatif terhadap poros hipotalamus hipofisis. Metabolit MXC akan berikatan dengan reseptor estrogen yang menyebabkan terhambatnya sintesis GnRH. Penurunan Sintesis GnRh menyebabkan penurunan sekresi FSH dan LH (Rochira *et al.*, 2006). Penurunan kadar LH menyebabkan gangguan terhadap sel Leydig untuk memproduksi testosteron.

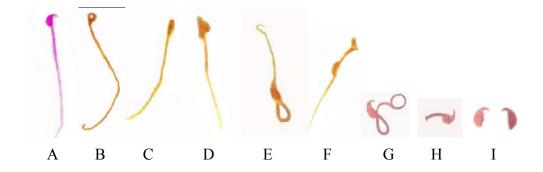
Testosteron dan FSH secara sinergis diperlukan secara normal untuk proses spermatogenesis. Jika sekresi testosteron dan FSH terhambat maka spermatogenesis juga terganggu sehingga terjadi peningkatan abnormalitas primer pada spermatozoa. Terhambatnya sekresi testosteron juga menyebabkan gangguan maturasi spermatozoa di epididimis (Sopia, 2009). Maturasi spermatozoa merupakan salah satu faktor endogen yang mempengaruhi motilitas spermatozoa (Astuti *et al.*, 2009) sehingga

gangguan pada proses tersebut dapat menurunkan motilitas spermatozoa dan meningkatkan abnormalitas sekunder pada spermatozoa.

Kecepatan gerak maju dan motilitas spermatozoa berkaitan erat dengan kondisi morfologi spermatozoa. Apabila morfologi spermatozoa mengalami kelainan (abnormal) maka gerakan spermatozoa menjadi terganggu (Widiyani, 2006). Setyadi (2006) menambahkan bahwa motilitas spermatozoa akan berlangsung dengan baik apabila didukung oleh morfologi spermatozoa itu sendiri.

Nirmalida (2012) menyatakan bahwa spermatozoa dianggap normal jika ditemukan kurang dari 30% bentuk abnormal. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa rata-rata persentase spermatozoa dosis 0,14; 0,28; dan 0,42 termasuk abnormal karena nilainya diatas 30 %. Pemberian MXC berpengaruh nyata terhadap abnormalitas spermatozoa mencit. Persentase abnormalitas spermatozoa meningkat dengan semakin tingginya dosis MXC yang diberikan (Gambar 4.2) dan antar dosis perlakuan MXC menunjukkan perbedaan nyata (Lampiran F).

Morfologi spermatozoa mencit normal adalah kepala berbentuk 'kait' dengan ukuran normal, ekor panjang tidak melingkar ataupun ganda (Setyadi, 2006). Hasil pengamatan morfologi spermatozoa menunjukkan adanya abnormalitas primer pada morfologi spermatozoa mencit seperti kepala bulat, kepala pipih. Abnormalitas sekunder yang ditemukan yaitu kepala pecah, leher menggulung, leher patah, ekor menggulung, ekor patah, kepala tanpa ekor, dan (Gambar 4.4).



Gambar 4.4 Gambar abnormalitas primer (B dan C) dan sekunder (D-I) spermatozoa mencit (Mus musculus L.) strain Balb C setelah pemberian MXC pada periode laktasi. (A) spermatozoa normal; (B) spermatozoa kepala bulat; (C) spermatozoa kepala pipih; (D) spermatozoa kepala pecah, (E) spermatozoa leher menggulung, (F) spermatozoa leher patah, (G) spermatozoa leher dan ekor menggulung (H) spermatozoa ekor patah; (I) spermatozoa kepala tanpa ekor.

Abnormalitas spermatozoa primer terjadi sebagai akibat dari gangguan proses spermatogenesis yang terjadi di dalam tubulus seminiferus testis, meliputi kepala besar, kepala kecil, kepala bulat, kepala pendek, kepala pipih memanjang, kepala rangkap dan ekor ganda. Abnormalitas sekunder merupakan kelainan morfologi spermatozoa yang terjadi selama proses pematangan spermatozoa di dalam epididimis, ditandai dengan ekor putus, kepala pecah, dan kepala tanpa ekor (Toelihere, 1993).

Hasil pengamatan abnormalitas spermatozoa menunjukkan bahwa persentase morfologi abnormal primer lebih tinggi dibandingkan persentase abnormalitas sekunder yang berarti pengaruh MXC terhadap morfologi spermatozoa lebih besar pada saat spermatozoa berada di dalam testis daripada saat berada di dalam epididimis.

Pada masa neonatal, di dalam testis belum terjadi pembentukan spermatozoa, yang ada adalah spermatogonium sebagai bakal spermatozoa, sedangkan spermatogenesis baru dimulai pada saat usia pubertas. Pada penelitian ini, metabolit MXC diduga mempengaruhi sel-sel germinal pada anak mencit jantan yang baru lahir (neonatal) sehingga menimbulkan efek pada kualitas spermatozoa saat pubertas atau

kemungkinan metabolit MXC yang ditransfer dari induk ke anak melalui ASI mengendap dalam tubuh anak dan mempengaruhi kualitas spermatozoa saat dewasa. NPIC (1996) menyatakan bahwa tikus yang diberi MXC dengan dosis 50 mg/kg/hari memiliki kesuburan normal, tetapi keturunannya memiliki fungsi reproduksi abnormal.

BAB. 5 PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian Pengaruh Pemberian Methoxychlor Pada Periode Laktasi Terhadap Kualitas Spermatozoa Mencit (*Mus musculus* L.) Strain Balb C, diambil kesimpulan sebagai berikut:

- 1. Pemberian MXC pada periode laktasi berpengaruh terhadap kualitas spermatozoa mencit yaitu menurunkan persentase spermatozoa motil dan persentase spermatozoa normal.
- 2. Semakin tinggi dosis MXC yang diberikan pada periode laktasi semakin menurunkan persentase spermatozoa motil dan persentase spermatozoa normal pada mencit.

5.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut pengaruh pemberian MXC pada periode laktasi terhadap struktur testis dan epididimis mencit (*Mus musculus* L.) strain balb C.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdulsyahid. 2009. *Uji Duncan's Multiple Range Test (DMRT)*. [serial on line]. http://abdulsyahid-forum.blogspot.com/2009/03/uji-duncan-multiple-range-test-dmrt.html. [24 oktober 2011].
- Agustin, S.N. 2012. *Epididimis dan Duktus (Vas) Deferens*. [serial on line]. http://rashekimfar.blogspot.com/2012/08/23-epididimis-dan-duktus-vas-deferens.html. [5 Oktober 2012].
- Akingbemi, B.T., Ge, Ren-Shan, Klinefelter, G.R., Gunsalus, G.L., dan Hardy, M.P. 2009. A Metabolite of Methoxychlor, 2,2-Bis (p-Hydroxyphenyl)-1,1,1-Trichloroethane, Reduces Testosterone Biosynthesis in Rat Leydig Cells Through Suppression of Steady-State Messenger Ribonucleic Acid Levels of the Cholesterol Side-Chain Cleavage Enzyme. *Biology of Reproduction*, **81**(5).
- Alan, W. 2012. *Pengaruh Alkohol pada Reproduksi Pria*. [Serial On line]. http://ambonhenalima.blogspot.com/2012/08/pengaruh-alkohol-pada reproduksi-pria.html. [3 November 2012].
- Armeinachevana, 2012. *Tugas Fisiologi Mikroba (Rantai Respirasi dan Fosforilasi Oksidatif)*. [serial on line]. http://armeinachevana.wordpress.com/2012/03/30/tugas-fisiologi-mikroba-rantai-respirasi-dan-fosforilasi oksidatif/. [28 November 2012].
- Astuti, S., Muchtadi, D., Astawan, M., Purwantara, B. dan Wresdiyati, T. 2009. Kualitas Spermatozoa Tikus yang diberi Tepung Kedelai Kaya Isoflavon, Seng (Zn) dan Vitamin E. *Media Peternakan*, **32**(1): 12-31.
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). 2002. *Toxicological Profile for Methoxychlor*. [serialonline]. http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp.asp?id=778&tid=151. [16 Juli 2012].
- Cooke, P. dan Eroschenko, V. 1990. Inhibitory Effect of Technical Grade Methoxychlor on Development of Neonatal Male Mouse Reproductive Organs. *Biology of Reproduction*, **42**(3): 585-596.

- Cupp, A.S. dan Skinner, M.K. 2001. Actions of the Endocrine Disruptor Methoxychlor and its Estrogenic Metabolite on In Vitro Embryonic Rat Seminiferous Cord Formation and Perinatal Testis Growth. *Reprod Toxicol*, **15**: 317-326.
- Cupp, A.S., Uzumcu, M., Suzuki, H., Dirks, K., Phillips., dan Skinner, M.K. 2003. Effect of Transient Embryonic In Vivo Exposure to the Endocrine Disruptor Methoxychlor on Embryonic and Postnatal Testis Development. *Journal of Andrology*, **24**(5).
- David, K. 2010. *Introduction to Liver*. [serial on line]. Http://www.siumed.edu/~dking2/erg/liver.htm. [1 november 2012].
- Fan, A.M. 1999. *Public Health Goal for Methoxychlor in Drinking Water*. California: Office of Environmental Health Hazard Assessment California Environmental Protection Agency.
- Falk, H.R. 2001. *Reproduction*. [serial on line] http://www1.br.cc.va.us/murray/Serendipity/Biology/lecture/Human/reproduction.htm. [9 Juni 2011].
- Fielden, M.R., Halgren, R.G., Fong, C.J., Staub, C., Johnson, L., Chou, K., dan Zacharewski, T.R. 2002. Gestational an Lactation Exposur of Male Mice to Diethylstilbestrol Causes Long-Term Effects on the testis, Sperm Fertilizing Ability in Vitro, and Testicular Gene Expression. *Endokrinology*, **143**(8): 3044-3059.
- Fitra, A. 2010. *Laktasi Adalah Penyuplai Gizi Terbaik untuk Bayi*. [serial on line]. http://debuh.com/berita-kesehatan/laktasi-adalah-penyuplai-gizi-terbaik-untuk-bayi/17736/. [11 Juni 2011].
- Gore, A. C. 2002. Organochlorine Pesticides Directly Regulate Gonadotropin-Releasing Hormone Gene Expression and Biosynthesis in the GT1-7 Hypothalamic Cell Line. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **192**: 1-2.
- Howdeshell, K.L., Furr, J., Lambright, C.R., Wilson, V.S., Ryan, B.C., dan Gray, E. 2008. Gestational and Lactational Exposure to Ethinyl Estradiol, but not Bisphenol A, Decreases Androgen-Dependent Reproductive Organ Weights and Epididymal Sperm Abundance in the Male Long Evans Hooded Rat. *Toxicol. Sci*, **102**(2): 371-382.

- Johnson, L., Chapin, R.E., Harris, M.W., Silge, R.L., Guidry, A.C., dan Lee, W.R. 2000. Perinatal/Juvenile Exposure to Methoxychlor Reduces Sertoli Cell Numbers in Adult Rats. *The Toxicologist*, **54**(1): 364.
- Kegley, S.E., Hill, B.R., Orme S., Choi A.H. 2010. *PAN Pesticide Database*, Pesticide Action Network, North America. [Serial On line]. http://www.pesticideinfo.org. [1 November 2012].
- Kelana, A. dan Diah, E. 2007. *Bila ASI Tercemar Pestisida*. [serial on line]. http://arsip.gatra.com/artikel.php?id=110860. [2 Juli 2011].
- Krawzak, R.M., Gupta, R.K., Basavarajappa, M.S., dan Flaws, J.A., 2008. Methoxychlor Alters the Steroidogenesis Pathway in the Mouse Ovary. *Biology of Reproduction*, **78**: 419.
- Lamarande E, Jiang H, Zini A, Kodama H, dan Gagnon C. 1997. Reactive Oxygen Species and Sperm Physiology. *Review of Reproduction*, **2**: 48–54.
- Latchoumycandane, C., dan Mathur, P. P. 2002. Effect of Methoxychlor on the Antioxidant System in Mitochondrial and Microsome-Rich Fractions of Rat Testis. *Toxicolog*, **176** (1-2): 67-75.
- Lin, H., Lian, Q.Q., Xin Hu., Jin, Y., Zhang, Y., Hardy, D.O., Chen, G.R., Qiu Lu, Z., Sottas, C.M., Hardy, M.P., dan Shan Ge, R. 2009. In Utero and Lactational Exposures to Diethylhexyl-Phthalate Affect Two Populations of Leydig Cells in Male Long-Evans Rats. *Biology of Reproduction*, **80**(5): 882-888.
- Lusa. 2009. Fisiologi Laktasi. [serial on line]. http://www.lusa.web.id/fisiologi-laktasi/.[11 Juni 2011].
- Machfuddin. 2004. *Patofisiologi Pembentukan ASI* [serial on line]. http://digilib.unsri.ac.id/download/patofisiologi%20laktasi.pdf. [11 Juni 2011].
- Maness, S., McDonnell, D., dan Gaido, K. 1998. Inhibition of Androgen Receptor Dependent Transcriptional Activity by DDT Isomers and Methoxychlor in HepG2 Human Hepatoma Cells. *Toxicol Appl Pharmacol*, **151**: 135-142.
- Moller, I.M. 2000. Plant Mitochondria and Oxidative Stress: Electron Transport, Nadph Turn Over, and Metabolism of Reactive Oxygen Species. *Plant Biology and Biogeochemistry*, **117**: 221.

- Muchtaromah, B. 2010. *Sel Spermatozoa*. [serial on line]. http://blog.uin-malang.ac.id/bayyinatul/2010/06/28/sel-spermatozoa/. [11 september 2012].
- Nafa and Eshre. 2002. *Manual on Basic Semen Analysis*. [overview on line]. http://www.britishandrology.org.uk/BAS/Policy/NAFA%20ESHRE%20manu al2002.pdf. [10 oktober 2012].
- National Pesticide Information Center NPIC. 1996. *Pesticide Information Profiles: Methoxychlor*. [serial on line]. http://extoxnet.orst.edu/pips/methoxyc.htm. [12 oktober 2012].
- Nirmalida, S. 2012. *Kualitas Spermatozoa*. [serial online]. http://sophianirmalida. blogspot.com/2012/07/normal-0-false-false-false-en-us-x-none.html. [12 Oktober 2012].
- Ogli, O., Enyikwola dan Odeh S. O. 2009. Evaluation of the Efficacy of Separate Oral Supplements Compared with the Combined Oral Supplements of Vitamins C And E On Sperm Motility in Wistar Rats. *Nigerian Journal of physiological sciences*, **24** (2): 129-135.
- Rochira, V., Zirilli, L., Genazzani, A. D., Balestrieri, A., Aranda, C., Fabre, B., Antunez, P., Diazzi, C., Carani, C., dan Maffe, L. 2006. Hypothalamic—Pituitary—Gonadal Axis in Two Men with Aromatase Deficiency: Evidence that Circulating Estrogens are at the Hypothalamic Level for the Integrity of Gonadotropin Negative Feedback. *European Journal of Endocrinology*, **155**: 513–522.
- Riani, I. 2009. *Spermatogenesis*. [serial on line]. http://intanriani.wordpress.com/pembentukan-gamet-jantan-spermatogenesis. [11 oktober 2012].
- Rusmiati. 2007. Pengaruh Ekstrak Kayu Secang (*Caesalpinia sappan* L.) Terhadap Viabilitas Spermatozoa Mencit Jantan (*Mus musculus* L.). *Bioscientiae*, **4**(2): 63-70.
- Schiffer, W., Martine, M., Mirrione dan Stephen L.D. 2007. Optimizing Experimental Protocols for Quantitative Behavioral Imaging with 18F-FDG, *J Nucl Med.* **48**:277-287.
- Schuh, R. A., Kristia'n, T., Gupta, R. K., Flaws, J. A., dan Fiskum, G. 2005. MXC Inhibits Brain Mitochondrial Respiration and Increases Hydrogen Peroxide Production and CREB Phosphorylation. *Toxicological Sciences*, **88**(2): 495-504.

- Setyadi, A. 2006. Organ Reproduksi dan Kualitas Sperma Mencit (*Mus musculus* L.) yang Mendapat Pakan Tambahan Kemangi (*Ocimum basilicum*) Segar. *Skripsi*.
- Sopia, S. 2009. Pengaruh Pemberian Minyak Jinten Hitam (*Nigella sativa*) terhadap Motilitas Spermatozoa Tikus Wistar Hiperlipidemia. *Skripsi*.
- Sughy. 2012. *Anatomi Fisiologi Kelenjar Mammae*. [seial on line]. http://klinik andrologi.blogspot.com/2011/01/motilitas-spermatozoa.html. [2 November 2012].
- Tarumingkeng, R. 1992. *Insektisida: Sifat, Mekanisme Kerja dan Penggunaannya*. Jakarta: Penerbit Ukrida.
- Toelihere, M.R. 1993. Inseminasi Buatan pada Ternak. Bandung: Penerbit Angkasa.
- Umami, H.M. 2009. Pengaruh pemberian minyak jintan hitam (Nigella sativa) terhadap jumlah spermatozoa mencit hiperlipidemia. Laporan Akhir Penelitian Karya Tulis Ilmiah Universitas diponegoro. Semarang.
- Wardani, E.T., Hayati, A., dan Pidada, R. 2012. Pengaruh Ekstrak Jahe (Zingiber officinale Rosc.) Var. Gajah terhadap Jumlah dan Viabilitas Spermatozoa Mencit (Mus musculus L.) yang Terpapar 2-Methoxyethanol. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Waters, K.M., Safe, S., dan Gaido, K.W. 2001. Differential Gene Expression in Response to Methoxychlor and Estradiol Through ERα, ERβ, and AR in Reproductive Tissues in Female Mice. *Toxicol Sci*, **63**: 47-56.
- Widiyani, T. 2006. Efek Antifertilitas Ekstrak Akar Som Jawa (*Talinum paniculatum* Gaertn.) pada Mencit (*Mus musculus* L.) Jantan. *Buletin Penelitian kesehatan*, **34**(3): 119-128.
- Wilystra, 2007. "Berdamai" Dengan Zat Kimia Beracun. [serial on line]. http://wilystra2007.multiply.com/reviews/item/9. [29 Juni 2011].
- Yunita, A., Fatmawati, U. dan Budi, Y.T. 2007. *Absorpsi, Distribusi, Metabolisme dan Ekskresi Toksikan*. Universitas Sebelas Maret. Surakarta.

LAMPIRAN

Lampiran A. Perhitungan Dosis Methoxychlor (MXC)

Dosis 1

Dosis pada tikus

$$100 \text{ mg/kg bb} = \frac{100 \text{ mg}}{1000 \text{ g}} = 0.1 \text{ mg/g}$$

BB tikus rata-rata 200 g, maka:

$$= 0.1 \text{ mg/g bb x } 200 \text{ g}$$

$$= 20 \text{ mg/g bb}$$

Konversi dari tikus ke mencit 20 g adalah 0.14, sehingga:

=
$$0.14 \times 20 \text{ mg/g bb}$$
 = $2.8 \text{ mg/ } 20 \text{ g}$
= 0.14 mg/g bb

Rata-rata berat badan mencit = 25 g

=
$$0.14 \text{ mg/g x } 25 \text{ g} = 3.5 \text{ mg/mencit/} 0.1 \text{ ml}$$

Dosis 2

Dosis pada tikus

$$200 \text{ mg/kg bb} = \frac{200 \text{ mg}}{1000 \text{ g}} = 0.2 \text{ mg/g}$$

BB tikus rata-rata 200 g, maka:

$$= 0.2 \text{ mg/g bb x } 200 \text{ g}$$

$$= 40 \text{ mg/g bb}$$

Konversi dari tikus ke mencit 20 g adalah 0.14, sehingga:

=
$$0.14 \times 40 \text{ mg/g bb}$$
 = $5.6 \text{ mg/ } 20 \text{ g}$
= 0.28 mg/g bb

Rata-rata berat badan mencit = 25 g

=
$$0.28 \text{ mg/g x } 25 \text{ g}$$
 = $7 \text{ mg/mencit/} 0.1 \text{ ml}$

Dosis 3

Dosis pada tikus

$$300 \text{ mg/kg bb} = \frac{300 \text{ mg}}{1000 \text{ g}} = 0.3 \text{ mg/g}$$

BB tikus rata-rata 200 g, maka:

$$= 0.3 \text{ mg/g bb x } 200 \text{ g}$$

$$= 60 \text{ mg/g bb}$$

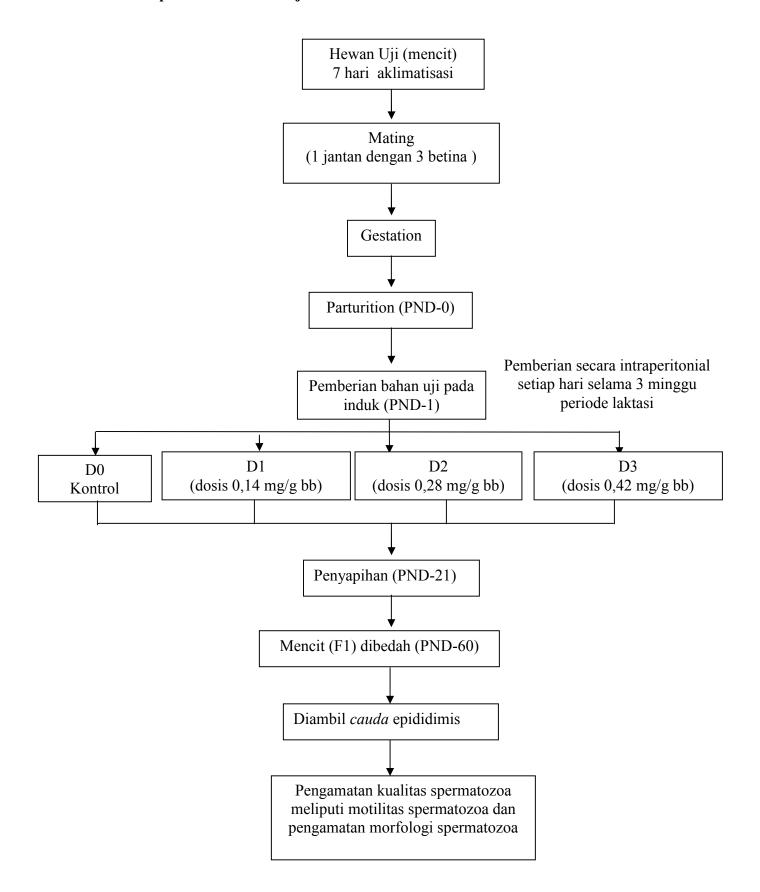
Konversi dari tikus ke mencit 20 g adalah 0.14, sehingga:

=
$$0.14 \times 60 \text{ mg/g bb}$$
 = $8.4 \text{ mg/ } 20 \text{ g}$
= 0.42 mg/g bb

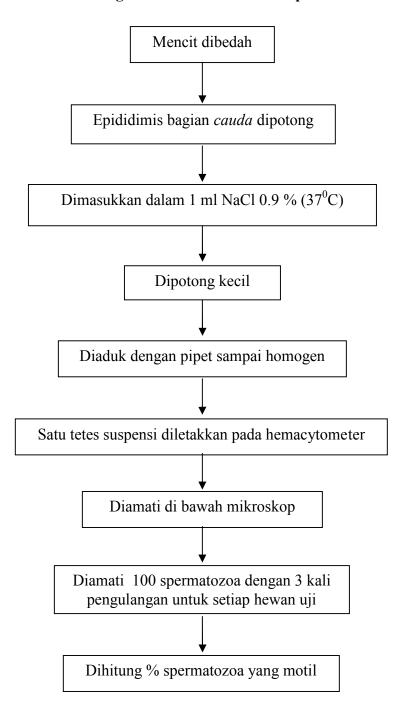
Rata-rata berat badan mencit = 25 g

=
$$0.42$$
 mg/g x 25 g = 10.5 mg/mencit/0.1 ml

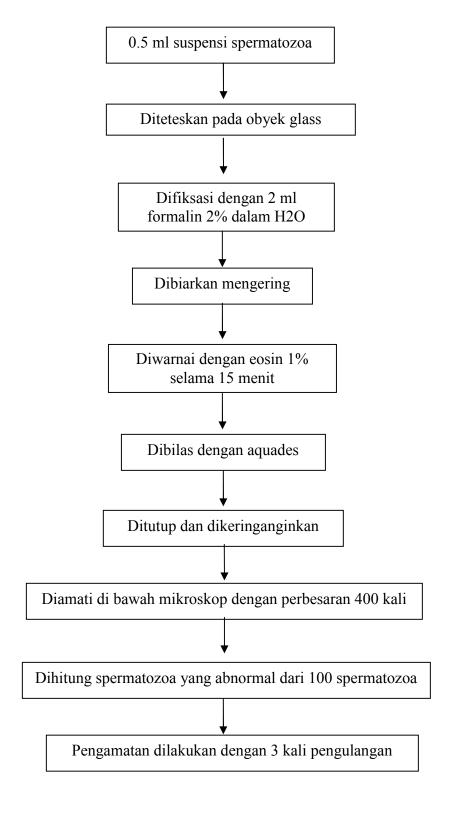
Lampiran B. Skema Kerja Penelitian



Lampiran C. Perhitungan Persentase Motilitas Spermatozoa



Lampiran D. Pengamatan Morfologi Spermatozoa



Lampiran E. Hasil Analisis Anova dan Uji Duncan Spermatozoa Motil

Descriptives

				Descriptiv				
%	·							
					95% Confidence Interval for Mean			
			Std.		Lower	Upper		
	N	Mean	Deviation	Std. Error	Bound	Bound	Minimum	Maximum
Kontrol	6	77.1633	8.79897	3.59216	67.9294	86.3973	64.33	87.66
Kelompok 1	6	63.0833	9.99208	4.07925	52.5973	73.5694	51.00	80.50
Kelompok 2	6	55.1667	11.14550	4.55013	43.4702	66.8632	40.33	69.00
Kelompok 3	6	43.1667	11.58489	4.72951	31.0091	55.3243	30.00	60.33
Total	24	59.6450	15.93507	3.25273	52.9162	66.3738	30.00	87.66

Test of Homogeneity of Variances

%

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.341	3	20	.796

ANOVA

%					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3661.830	3	1220.610	11.206	.000
Within Groups	2178.477	20	108.924		
Total	5840.308	23			

% Duncan

		Subset for alpha = 0.05				
mg/g bb	N	1	2	3		
Kelompok 3	6	43.1667				
Kelompok 2	6	55.1667	55.1667			
Kelompok 1	6		63.0833			
Kontrol	6			77.1633		

Lampiran F. Hasil Analisis Anova dan Uji Duncan Spermatozoa Abnormal

Descriptives

%								
					95% Confidence Interval for Mean			
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	Lower Bound	Upper Bound	Minimum	Maximum
Kontrol	6	15.0112	4.40805	1.79958	10.3852	19.6371	9.60	22.00
Kelompok 1	6	31.5833	7.25546	2.96203	23.9692	39.1975	24.50	44.50
Kelompok 2	6	42.7667	6.29847	2.57134	36.1568	49.3765	36.40	53.20
Kelompok 3	6	53.6000	4.71254	1.92388	48.6545	58.5455	48.00	59.80
Total	24	35.7403	15.55027	3.17419	29.1740	42.3066	9.60	59.80

Test of Homogeneity of Variances

%

70			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.310	3	20	.818

ANOVA

%					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4891.896	3	1630.632	48.693	.000
Within Groups	669.756	20	33.488		
Total	5561.652	23			

% Duncan

70 Buncun								
		Subset for alpha = 0.01						
mg/g bb	N	1	2	3	4			
Kontrol	6	15.0112						
Kelompok 1	6		31.5833					
Kelompok 2	6			42.7667				
Kelompok 3	6				53.6000			
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000			

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Lampiran G. Hasil Analisis Anova dan Uji Duncan Spermatozoa Abnormal Primer dan Sekunder

Abnormalitas Primer

Descriptives

Abprim

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	for N Lower	ence Interval Mean Upper	Minimum	Maximum
		-			Bound	Bound		
kontrol	6	12.4683	.74781	.30529	11.6836	13.2531	11.68	13.48
dosis 1	6	21.4000	.68041	.27778	20.6860	22.1140	20.64	22.57
dosis 2	6	24.3000	.91503	.37356	23.3397	25.2603	22.95	25.14
dosis 3	6	27.6600	.53625	.21892	27.0972	28.2228	26.78	28.45
Total	24	21.4571	5.80439	1.18482	19.0061	23.9081	11.68	28.45

ANOVA

Abprim

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	764.155	3	254.718	474.553	.000
Within Groups	10.735	20	.537		
Total	774.890	23			

abprim

Duncan

	N	Subset for alpha = .01					
group	1	2	3	4	1		
kontrol	6	12.4683					
dosis 1	6		21.4000				
dosis 2	6			24.3000			
dosis 3	6				27.6600		
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000		

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.

Abnormalitas Sekunder

Descriptives

absek

	,	Maan	Std.	Std.		ence Interval ⁄lean	Minimo	Massinasson	
	N	Mean	Deviation	Error	Lower Bound	Upper Bound	Minimum	Maximum	
kontrol	6	2.5300	.51985	.21223	1.9845	3.0755	2.10	3.42	
dosis 1	6	10.1800	.41766	.17051	9.7417	10.6183	9.70	10.64	
dosis 2	6	18.4600	.56907	.23232	17.8628	19.0572	17.88	19.49	
dosis 3	6	25.9300	.57278	.23384	25.3289	26.5311	25.34	26.99	
Total	24	14.2750	8.97796	1.83262	10.4839	18.0661	2.10	26.99	

ANOVA

absek

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1848.404	3	616.135	2247.436	.000
Within Groups	5.483	20	.274		
Total	1853.887	23			

absek

Duncan

Barroarr					
	N	Subset for alpha = .01			
group	1	2	3	4	1
kontrol	6	2.5300			
dosis 1	6		10.1800		
dosis 2	6			18.4600	
dosis 3	6				25.9300
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed. a Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.

H. Hasil Uji Korelasi Motilitas dan Abnormalitas Spermatozoa

Correlations

Control Variables			morf	motil
group	morf	Correlation	1.000	639
		Significance (2-tailed)	-	.001
		df	0	21
	motil	Correlation	639	1.000
		Significance (2-tailed)	.001	
		df	21	0