

## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### A. Gambaran Umum Penelitian

Penelitian dilakukanselama 8 bulan terhadap bayi tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sparague Dawley* jantanberumur 8 hari sejumlah 30 ekor sebagai sampel. Tiga puluh ekor tikus dibagi menjadi tiga kelompok, yaitu kelompok yang dipaparkan dengan pewangi ruangan *gel* (P1), kelompok yang dipaparkan dengan pewangi ruangan *spray* (P2), dan kelompok kontrol (K), masing-masing kelompok terdiri atas 10 ekor tikus.

Kedua puluh sampel dari kelompok P1 dan P2 didedahkan ke dalam pewangi ruangan berbentuk *gel* dan *spray* sesuai kelompoknya. Perlakuan diberikan bertahap diawali 15 menit pada pagi dan sore hari selama minggu pertama. Setiap seminggu dosis pendedahan dinaikkan 15 menit pada pagi dan sore. Dosis bertahap diberikan untuk mencegah kematian tikus, serta 15 menit di pagi dan sore agar mencapai waktu minimal orang di dalam ruangan untuk bekerja, yaitu 30 menit. Pendedahan dilakukan selama 67 hari atau sampai dengan tikus mencapai usia 74 hari, usia tikus tersebut merupakan usia tikus dewasa sehingga tikus sudah dapat menghasilkan sperma. Total waktu pendedahan adalah 4,5 jam. Perlakuan dengan dosis bertahap berdasarkan pertimbangan menyesuaikan usia tikus yang masih bayi untuk mencegah kematian bayi tikus akibat pendedahan terlalu lama.

Setiap hari tikus diberi pakan standar dengan porsi yang sama sebanyak 20gr dan ditingkatkan seiring bertambahnya usia tikus. Minuman yang diberikan berupa air mineral dan penggantian sekam dilakukan secara teratur satu minggu sekali.

Pembedahan dilakukan pada hari ke 68 pendedahan atau pada usia tikus mencapai 75 hari. Pembedahan dilakukan pada hari ke 68 dengan alasan pada usia tersebut tikus telah mencapai usia dewasa dan mampu menghasilkan sperma secara aktif. Pada usia 75 hari tikus-tikus memiliki berat rata-rata 159gr. Sebelum pembedahan tikus dikorbankan dengan menggunakan anastesi kloroform. Pembedahan dilakukan untuk mengambil organ testis guna dibuat preparat histologi. Perubahan yang terjadi pada diameter tubulus seminiferus diamati di bawah mikroskop binokuler dengan perbesaran 4x10 dengan alat bantu optilab. Pengambilan organ juga digunakan untuk membuat larutan campuran spermatozoa yang kemudian dihitung persentase spermatozoa motil di bawah mikroskop binokuler dengan perbesaran 10x10.

## **B. Hasil Penelitian**

### **1. Diameter Tubulus Seminiferus**

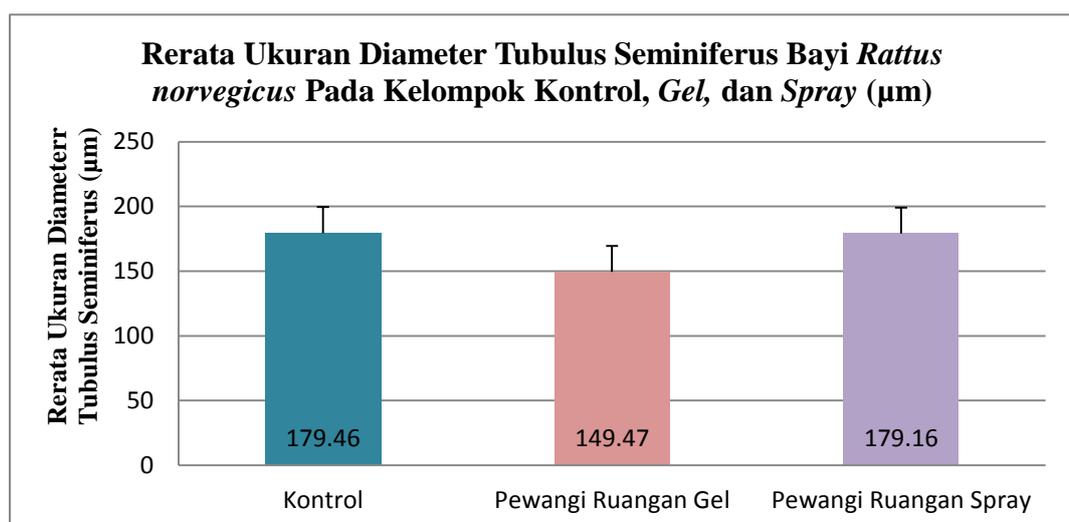
Hasil pengamatan gambaran histologi diameter tubulus seminiferus pada kelompok *gel* (P1), kelompok *spray* (P2), dan kelompok kontrol (K) menunjukkan perbedaan di antara ketiganya. Diameter tubulus seminiferus pada kelompok kontrol menunjukkan ukuran terbesar dibandingkan 2 kelompok yang lain, dengan rerata  $179,46 \pm 8,68 \mu\text{m}$  (Tabel 1 dan Grafik 3).

Tabel 1. Rerata Diameter Tubulus Seminiferus Testis ( $\mu\text{m}$ ) Bayi Rattus norvegicus Pada Kelompok Kontrol, *Gel*, dan *Spray*

No.	Kelompok Perlakuan	Rata-rata $\pm$ SD	P
1.	Kontrol	179,46 $\pm$ 8,68 <sup>a</sup>	0,0001
2.	Pewangi Ruang Gel	149,47 $\pm$ 12,77 <sup>b</sup>	
3.	Pewangi Ruang Spray	179,16 $\pm$ 6,68 <sup>a</sup>	

Keterangan : Angka rata-rata yang diikuti huruf super script berbeda menunjukkan perbedaan yang bermakna dengan uji statistik Kruskal Wallis diikuti uji Mann Whitney pada tingkat kepercayaan 95%

Dari Tabel 1 diperoleh hasil rerata diameter tubulus seminiferus pada kelompok P1 adalah yang terkecil dibanding rerata dua kelompok yang lain. Diameter tubulus seminiferus pada kelompok perlakuan pewangi ruangan *spray* (P2) memiliki diameter yang lebih besar dari pada kelompok pewangi ruangan *gel* (P1) namun lebih kecil dibandingkan kelompok kontrol (K). Distribusi data diameter tubulus seminiferus diperoleh tidak normal ( $p < 0,05$ , uji Saphiro Wilk). Uji statistik Kruskal Wallis menunjukkan perbedaan rerata ketiga kelompok perlakuan berbeda bermakna ( $p = 0,0001$ ) dengan tingkat kepercayaan 95%.

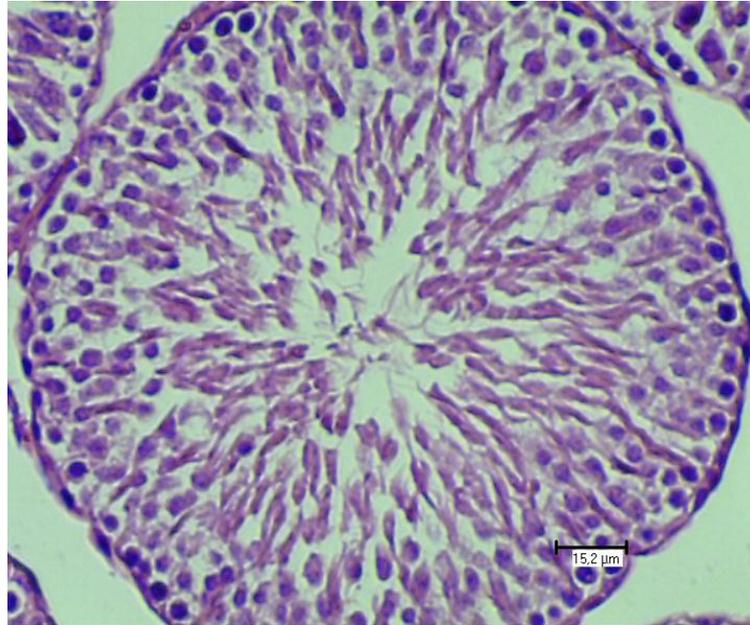


Gambar 5. Perbandingan Ukuran Diameter Tubulus Seminiferus Bayi Rattus norvegicus Pada Kelompok Kontrol, *Gel*, dan *Spray*

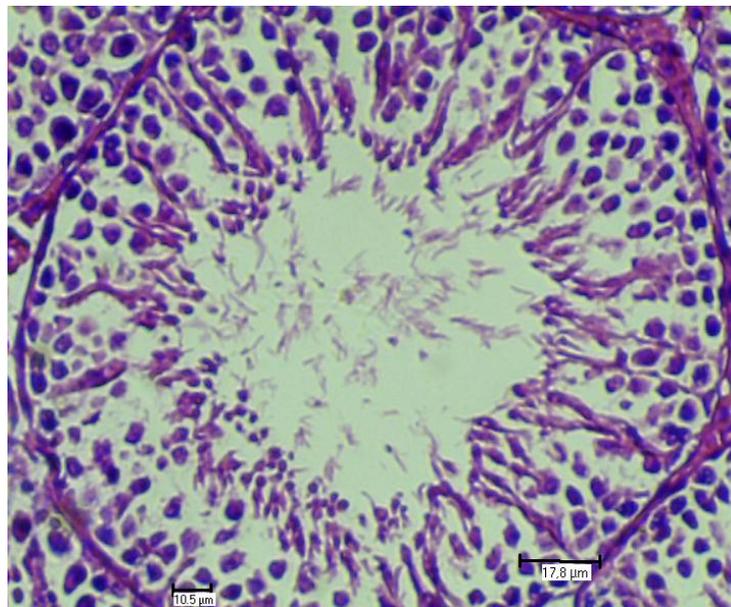
Analisis statistik dilanjutkan menggunakan *Mann-Whitney Test* untuk mengetahui perbandingan antara kelompok perlakuan mana yang memiliki perbedaan bermakna (Tabel 2). Hasil uji *Mann-Whitney Test* menunjukkan terdapat perbedaan rerata diameter tubulus seminiferus yang bermakna antara kelompok yang dipaparkan pewangi ruangan *gel* (P1) dengan kelompok kontrol (K),  $p=0,0001$  pada tingkat kepercayaan 95%. Perbedaan bermakna tersebut dapat diartikan bahwa pewangi ruangan *gel* memiliki pengaruh terhadap terjadinya atrofi diameter tubulus seminiferus. Hal yang berbeda terjadi pada kelompok perlakuan pewangi ruangan *spray* (P2) yang berdasarkan hasil uji *Mann-Whitney Test* tidak menunjukkan perbedaan diameter tubulus seminiferus secara bermakna dengan kelompok kontrol (K),  $p = 0,739$  pada tingkat kepercayaan 95%. Ketidakbermaknaan hasil tersebut dapat diartikan bahwa pendedahan pewangi ruangan *spray* tidak terlalu mempengaruhi ukuran diameter tubulus seminiferus. Perbandingan ukuran diameter antara kelompok P1 dan P2 menunjukkan terdapat perbedaan bermakna,  $p=0,0001$  pada tingkat kepercayaan 95%.

Gambar dan Tabel di atas terlihat bahwa pewangi ruangan *gel* memiliki pengaruh paling buruk. Pengaruh terhadap ukuran diameter tubulus seminiferus antara kelompok *spray* dan kelompok kontrol tidak begitu berbeda. Bila diurutkan dari diameter terbesar (terbaik) ke diameter terkecil (terburuk), maka kelompok kontrol (K) yang terbesar diikuti

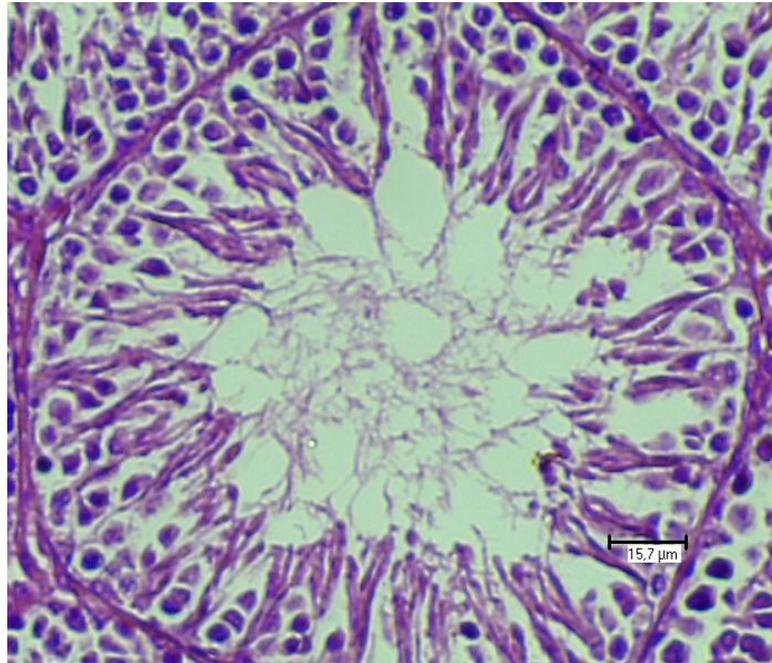
kelompok pewangi ruangan *spray* (P2) dan yang terburuk adalah kelompok pewangi ruangan *gel* (P1).



Gambar 6. Ukuran diameter tubulus seminiferus bayi *Rattus norvegicus* pada kelompok kontrol dengan pewarnaan HE dan perbesaran 10x10



Gambar 7. Ukuran diameter tubulus seminiferus bayi *Rattus norvegicus* pada kelompok *gel* dengan pewarnaan HE dan perbesaran 10x10



Gambar 8. Ukuran diameter tubulus seminiferus bayi *Rattus norvegicus* pada kelompok *spray* dengan pewarnaan HE dan perbesaran 10x10

Gambar 5 menunjukkan ukuran diameter tubulus seminiferus pada kontrol lebih besar dibandingkan kelompok lainnya (Gambar 6 dan Gambar 7) dengan dengan komposisi sel spermatogenik yang jauh lebih padat dibandingkan kelompok P1 dan P2.

## 2. Persentase Spermatozoa Motil

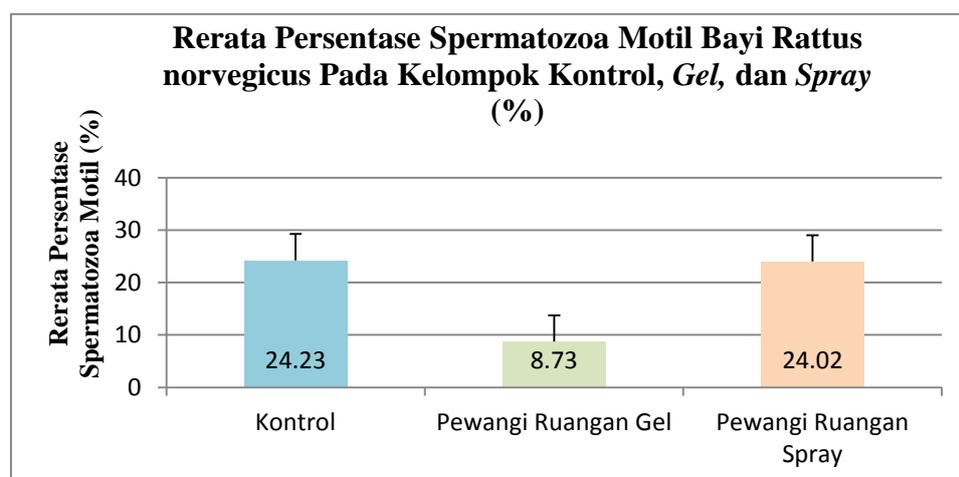
Hasil perhitungan persentase spermatozoa motil menunjukkan perbedaan yang tidak bermakna. Kelompok Kontrol (K) memiliki rerata persentase spermatozoa tertinggi dibandingkan dengan 2 kelompok perlakuan yang lain, yaitu sebesar 24,23% (Tabel 2).

Tabel 2. Rerata Persentase Spermatozoa Motil (%) Bayi *Rattus norvegicus* Pada Kelompok Kontrol, *Gel*, dan *Spray*

No.	Kelompok Perlakuan	Rata-rata $\pm$ SD	P
1.	Kontrol	24,23 $\pm$ 11,88	0,058
2.	Pewangi Ruangan Gel	8,73 $\pm$ 13,97	
3.	Pewangi Ruangan Spray	24,02 $\pm$ 20,744	

Keterangan : Angka rata-rata di antara ke-3 kelompok di atas tidak berbeda secara bermakna dengan uji Kruskal Wallis pada tingkat kepercayaan 95%.

Tabel 2 menunjukkan bahwa P1 memiliki rerata perentase spermatozoa motil terkecil dibanding rerata dua kelompok yang lain. Persentase spermatozoa motil pada kelompok perlakuan pewangi ruangan *spray* (P2) memiliki diameter yang lebih besar dari pada kelompok pewangi ruangan *gel* (P1) namun lebih kecil dibandingkan kelompok kontrol (K). Distribusi data pada persentase spermatozoa motil tidak normal ( $p < 0,05$ , uji Saphiro Wilk). Uji statistik Kruskal Wallis menunjukkan perbedaan rerata ketiga kelompok perlakuan perbedaan yang tidak bermakna ( $p = 0,058$ ) dengan tingkat kepercayaan 95%.



Gambar 9. Perbandingan Rerata Persentase Spermatozoa Motil Bayi *Rattus norvegicus* Pada Kelompok Kontrol, *Gel*, dan *Spray*

Gambar 9 menjelaskan bahwa *gel* memiliki persentase spermatozoa motil terendah (terburuk) dibandingkan *spray* dan kontrol, dan kontrol memiliki persentase motil terbesar (terbaik). Perbedaan ketiga kelompok perlakuan tersebut tidak bermakna (Tabel 2), artinya pendedahan pewangi *gel* dan *spray* kurang memberi pengaruh terhadap turunnya persentase spermatozoa motil pada hewan uji.

### 3. Persentase Jumlah Sel Spermatogenik

Tabel 3. Persentase Jumlah Sel Spermatogenik Bayi *Rattus norvegicus* Pada Kelompok Kontrol, *Gel*, dan *Spray*

Kelompok	Persentase Sel Spermatogenik (%) (Rata-rata ± SD)		
	Spermatogonium	Spermatosit Primer	Spermatid
Kontrol	31,95 ± 3,01 <sup>a</sup>	33,35 ± 6,38	30,83 ± 7,29 <sup>a</sup> <sup>b</sup>
Pewangi ruangan <i>gel</i>	39,44 ± 7,76 <sup>b</sup>	29,95 ± 8,45	24,28 ± 6,75 <sup>a</sup>
Pewangi ruangan <i>spray</i>	30,32 ± 5,25 <sup>a</sup>	29,66 ± 6,25	36,79 ± 5,74 <sup>b</sup>

Keterangan : Angka rata-rata di antara ke-3 kelompok di atas tidak berbeda secara bermakna dengan uji One Way Anova pada tingkat kepercayaan 95%.

Dari tabel 3 dapat dilihat bahwa persentase sel spermatogonium pada *spray* lebih rendah dibandingkan persentase sel spermatogonium pada *gel*. Huruf subscript pada persentase sel spermatogonium menunjukkan perbedaan yang bermakna antara kelompok *gel* dan *spray* dengan tingkat kepercayaan 95%. Artinya adalah pewangi ruangan *spray* memiliki pengaruh lebih buruk pada spermatogonium. Pada persentase spermatosit primer tidak didapati perbedaan bermakna artinya baik *spray* maupun *gel* tidak mempengaruhi spermatosit primer. Pada spermatid didapati hasil

bahwa terdapat perbedaan yang bermakna dengan pewangi ruangan *gel* memiliki dampak lebih buruk dibanding pewangi ruangan *spray* dengan tingkat kepercayaan 95%. Artinya pewangi ruangan *gel* memiliki pengaruh terhadap pembentukan spermatid.

#### 4. Jumlah Sel Leydig

Tabel 4. Rerata Jumlah Sel Leydig Bayi *Rattus norvegicus* Pada Kelompok Kontrol, *Gel*, dan *Spray*

No.	Kelompok Perlakuan	Rata-rata $\pm$ SD
1.	Kontrol	4,12 $\pm$ ,92 <sup>a</sup>
2.	Pewangi Ruangan Gel	5,82 $\pm$ ,94 <sup>b</sup>
3.	Pewangi Ruangan Cair	3,90 $\pm$ 1,16 <sup>a</sup>

Keterangan : Angka rata-rata yang diikuti huruf super script berbeda menunjukkan perbedaan yang bermakna dengan uji statistik Kruskal Wallis diikuti uji Mann Whitney pada tingkat kepercayaan 95%

Pada tabel di atas dapat dilihat bahwa pewangi ruangan *spray* memiliki jumlah sel leydig terburuk. Huruf *subscribed* pada tabel menunjukkan bahwa terdapat perbededaan signifikan antara *spray* dan *gel* dengan tingkat kepercayaan 95%. Perbedaan signifikan tersebut menunjukkan bahwa *spray* memiliki pengaruh terhadap jumlah Sel Leydig.

#### 5. Berat Testis

Tabel 5. Rerata Berat Testis (gr) Bayi *Rattus norvegicus* Pada Kelompok Kontrol, *Gel*, dan *Spray*

No.	Kelompok Perlakuan	Rata-rata $\pm$ SD
1.	Kontrol	1,54 $\pm$ 0,35 <sup>a</sup>
2.	Pewangi Ruangan Gel	1,33 $\pm$ 0,67 <sup>a</sup>
3.	Pewangi Ruangan Spray	2,30 $\pm$ 0,40 <sup>b</sup>

Keterangan : Angka rata-rata yang diikuti huruf super script berbeda menunjukkan perbedaan yang bermakna dengan uji statistik Kruskal Wallis diikuti uji Mann Whitney pada tingkat kepercayaan 95%

Pada tabel di atas dapat dilihat bahwa pewangi ruangan *gel* memiliki berat testis terendah. Huruf *subscribed* pada tabel menunjukkan bahwa terdapat perbedaan signifikan antara *spray* dan *gel* dengan tingkat kepercayaan 95%. Perbedaan signifikan tersebut menunjukkan bahwa *gel* memiliki pengaruh terhadap berat testis.

### C. Pembahasan Penelitian

Pewangi ruangan *gel* pada penelitian ini memiliki pengaruh buruk terhadap ukuran diameter tubulus seminiferus. Pengaruh buruk pewangi ruangan *gel* berupa pengecilan ukuran diameter tubulus seminiferus. Hal tersebut terjadi dikarenakan pewangi ruangan *gel* memiliki konsentrasi formaldehid lebih tinggi dibandingkan *spray*, sedang *spray* mengandung ftalat yang lebih tinggi dibanding *gel* (BEUC, 2005).

Alasan pewangi ruangan *gel* yang mengandung formaldehid berpengaruh terhadap pengecilan ukuran diameter tubulus seminiferus dapat dijelaskan melalui teori bahwa formaldehid dapat memicu terjadinya stres oksidatif pada tubulus seminiferus (Zhou et al., 2006). Teori tersebut bermula dari paparan formaldehid yang dapat membentuk radikal bebas atau *Reactive Oxygen Substances* (ROS) (Mahdi et al., 2008). Peningkatan ROS akan menyebabkan turunnya *super oxyde dismutase* (SOD) yang diikuti dengan adanya stres oksidatif. Hal tersebut akan menyebabkan terjadinya peningkatan apoptosis pada sel germinal yang dapat menyebabkan penurunan diameter tubulus seminiferus serta menghambat aktifitas spermatogenik (Ozen et al., 2005; Kus et al., 2008). Bentuk penghambatan aktifitas spermatogenik berupa ROS yang

terbentuk mudah bereaksi (merusak) di tahap spermatosit dan awal spermatid akibat penurunan kadar SOD (Astuti, et al., 2009). Dampak ROS terhadap terbentuknya spermatid berupa terjadinya gangguan meiosis dan spermiogenesis akibat peningkatan stres oksidatif. Gangguan tersebut selain berimbas kepada penurunan jumlah produksi spermatid juga berimbas kepada penurunan motilitas spermatozoa (Heryani, 2011). Teori bahwa ROS bereaksi pada awal spermatid dapat dibuktikan melalui hasil penelitian ini berupa pewangi ruangan *gel* memiliki persentase jumlah spermatid terkecil.

Pada penelitian kali ini kerusakan hanya terbukti pada tingkat sel spermatogenik. Hasil penelitian tidak membuktikan bahwa pewangi ruangan *gel* mengganggu pembentukan Sel Leydig. Hal tersebut sesuai dengan teori yang disebutkan oleh Astuti et al., 2009 pada paragraf sebelumnya bahwa ROS yang dihasilkan oleh formaldehid hanya bereaksi pada spermatosit dan awal spermatid.

Kecilnya ukuran diameter tubulus seminiferus akan mempengaruhi berat organ testis. Pada penelitian ini dapat dilihat bahwa berat testis terkecil juga dimiliki oleh kelompok P1. Teori yang sudah ada menyebutkan bahwa berat testis berkorelasi positif dengan lingkaran dan diameter tubulus seminiferus yang mendukung spermatogenesis (Ayu, 2014).

Penelitian ini juga didukung oleh penelitian sebelumnya yang pernah dilakukan oleh Zhou dkk (2006) memiliki hasil bahwa pendedahan formaldehid dalam jangka waktu yang cukup lama dapat menyebabkan perubahan histologi, salah satunya adalah atrofi tubulus seminiferus. Hasil

penelitian ini sesuai dengan hasil yang telah dilakukan peneliti sebelumnya, yaitu terdapat pengecilan diameter tubulus seminiferus yang disebabkan oleh adanya atrofi tubulus seminiferus. Pengecilan diameter disebabkan pendedahan pewangi ruangan yang mengandung formalin. Penelitian Zhou dan penelitian ini memiliki kesamaan berupa memberikan paparan formaldehid kepada testis hewan uji.

Hasil penelitian yang lain membuktikan bahwa pewangi ruangan baik gel dan spray tidak berpengaruh pada persentase spermatozoa motil. Hasil penelitian tersebut dapat dijelaskan melalui teori yang menyatakan bahwa spermatozoa terbentuk di dalam testis melalui proses spermatogenesis. Spermatogenesis adalah proses dinamis perkembangan sel-sel spermatogenik dari tahap spermatogonium sampai terbentuk spermatozoa (Untily, et al., 2014). Sel spermatozoa yang dihasilkan oleh testis melalui proses dinamis tersebut ternyata belum cukup siap untuk melakukan fertilisasi. Spermatozoa tersebut membutuhkan kemampuan motil. Kemampuan tersebut didapatkan ketika sperma disimpan di dalam bagian caudal epididimis. Motil sperma menjadi aktif ketika terjadi ejakulasi dan sperma bercampur dengan hasil sekresi dari kelenjar aksesorius (Vicens, 2014).

Penelitian ini bertolak belakang dengan hasil penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Kose, et al (2012). Penelitian Kose menunjukkan bahwa formaldehid dapat menurunkan spermatozoa motil. Pada penelitian tersebut menggunakan formaldehid murni dengan dosis 10ppm/1 jam selama 35 hari, sedang penelitian ini menggunakan formaldehid bahan campuran dengan

dosis sebesar 0,33ppm selama 4,5 jam (67 hari). Kecilnya dosis yang diberikan kepada hewan uji menjadi salah satu penyebab tidak berpengaruhnya pewangi ruangan *gel* terhadap persentase spermatozoa motil.

Pewangi ruangan gel memiliki dampak lebih buruk selain dikarenakan alasan di atas juga disebabkan kandungan pada pewangi ruangan gel yang mendominasi adalah formaldehid. Formaldehid bersifat cepat, walau bisa merusak hormonal namun lebih mudah mempengaruhi langsung ke sel-sel spermatogeniknya melalui mekanisme *ROS-stress oxydative*. Sedangkan pewangi ruangan spray memiliki komposisi terbanyak berupa Ftalat di mana pendedahan ftalat menunjukkan penurunan serum Testosteron serta terjadi penurunan tingkat kepadatan ekor sperma dan keberlangsungan hidup sperma(Nair, et al., 2008).

Dari penjelasan singkat tersebut, maka dapat disimpulkan bahwa ftalat memiliki mekanisme yang lebih rumit dan membutuhkan waktu untuk merubah kondisi yang lebih lama dibandingkan formaldehid, oleh karena itu formaldehid (pewangi ruangan gel) memiliki dampak yang lebih buruk terhadap diameter tubulus seminiferus dibandingkan ftalat (pewangi ruangan spray).