

**PENGARUH BISPHENOL-A (BPA) TERHADAP HISTOLOGI TUBULUS
SEMINIFERUS TIKUS PUTIH (*Ratus novergicus*)
JANTAN GALUR *Sprague dawley***

(Skripsi)

Oleh

ARINA MUTI AMALIAH



**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2019**

**PENGARUH BISPHENOL-A (BPA) TERHADAP HISTOLOGI TUBULUS
SEMINIFERUS TIKUS PUTIH (*Ratus novergicus*)
JANTAN GALUR *Sprague dawley***

Oleh

ARINA MUTI AMALIAH

Skripsi

Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Memperoleh Gelar
SARJANA KEDOKTERAN

Pada

Fakultas Kedokteran Universitas Lampung



**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2019**

ABSTRACT

THE EFFECT OF BISPHENOL-A (BPA) ON HISTOLOGY OF TUBULUS SEMINIFERUS WHITE RAT (*Ratus norvegicus*) *Sprague dawley's* STRAIN

By

ARINA MUTI AMALIAH

Background : Plastic is a material that is often found in everyday life, both for household needs, offices, agriculture / plantations, industry, and so on. One type of plastic commonly used is polycarbonate plastic (polycarbonate / PC). The main ingredient in the manufacture of polycarbonate plastic is 2,2-bis (4-hydroxyphenyl) propan or known as bisphenol A (BPA). BPA can be moved / migrated into food or drinks if the temperature is increased due to increase. When exposed, BPA can cause various health problems, one of which is improving health, such as disruption of spermatogenesis.

Methods : The study design used a randomized controlled method with a post-test control group design pattern. The sample consisted of 24 male rats divided into 4 groups, namely K who were not given bisphenol-a, P1 given bisphenol-a (BPA) dose of 100 mg / KgBB, P2 that was given bisphenol-a (BPA) dose of 200 mg / KgBB and P3 given a bisphenol-a (BPA) dose of 400 mg / KgBB. The treatment was carried out for 21 days.

Results : Analysis using One Way ANOVA showed that there was an effect of giving bisphenol-a to the average number of primary spermatocytes, the average number of spermatids, and the diameter of seminiferous tubules. Giving a dose of 100 mg / kg of bisphenol-a had a significant effect on the decrease in the number of primary spermatocyte cells and the diameter of seminiferous tubules, and a dose of 200 mg / kgbb bisphenol-a had a significant effect on the decrease in spermatid cell count.

Conclusion : Provision of bisphenol-a has been shown to have an effect that can cause a decrease in the number of primary spermatocyte cells, the number of spermatid cells and the seminiferous tubal diameter of male white mice.

Keywords: bisphenol-a, health, spermatogenesis

ABSTRAK

PENGARUH BISPHENOL-A (BPA) TERHADAP HISTOLOGI TUBULUS SEMINIFERUS TIKUS PUTIH (*Ratus norvegicus*) JANTAN GALUR *Sprague dawley*

Oleh

ARINA MUTI AMALIAH

Latar belakang : Plastik merupakan bahan yang banyak dijumpai dalam kehidupan sehari-hari, baik untuk keperluan rumah tangga, perkantoran, pertanian/ perkebunan, perindustrian, dan sebagainya. Salah satu jenis plastik yang umum digunakan adalah plastik polikarbonat (*polycarbonate/PC*). Bahan utama pada pembuatan plastik polikarbonat adalah senyawa 2,2-bis (4-hidroksifenil) propan atau yang dikenal dengan nama *bisphenol A* (BPA). BPA dapat berpindah/bermigrasi ke dalam makanan atau minuman jika suhunya dinaikkan karena pemanasan. Apabila terpapar, BPA dapat menyebabkan berbagai masalah kesehatan, salah satunya kesehatan reproduksi, seperti terganggunya spermatogenesis.

Metode : Desain penelitian dengan menggunakan metode acak terkontrol dengan pola *post-test control group design*. Sampel terdiri dari 24 ekor tikus jantan yang dibagi dalam 4 kelompok, yaitu K yang tidak diberi bisphenol-a, P1 yang diberi bisphenol-a (BPA) dosis 100 mg/KgBB, P2 yang diberi bisphenol-a (BPA) dosis 200 mg/KgBB dan P3 yang diberi bisphenol-a (BPA) dosis 400 mg/KgBB. Perlakuan dilakukan selama 21 hari.

Hasil : Analisis menggunakan *One Way ANOVA* menunjukkan terdapat pengaruh pemberian bisphenol-a terhadap rerata jumlah spermatosit primer, rerata jumlah spermatid, dan diameter tubulus seminiferous. Pemberian dosis 100 mg/kgbb bisphenol-a memberikan pengaruh yang signifikan terhadap penurunan jumlah sel spermatosit primer dan diameter tubulus seminiferous, serta dosis 200 mg/kgbb bisphenol-a memberikan pengaruh yang signifikan terhadap penurunan jumlah sel spermatid.

Kesimpulan : Pemberian bisphenol-a terbukti memiliki efek yang dapat menyebabkan penurunan jumlah sel spermatosit primer, jumlah sel spermatid dan diameter tubulus seminiferous tikus putih jantan.

Kata Kunci: bisphenol-a, kesehatan, spermatogenesis

Judul : **PENGARUH BISPHENOL-A (BPA) TERHADAP HISTOLOGI TUBULUS SEMINIFERUS TIKUS PUTIH (*Ratus novvergicus*) GALUR *Sprague dawley***

Nama Mahasiswa : **Arina Muti Amaliah**

Nomor Pokok Mahasiswa : **1518011043**

Program Studi : **Pendidikan Dokter**

Fakultas : **Kedokteran**



MENYETUJUI
Komisi Pembimbing

Prof. Dr. Sutyarso, M. Biomed
NIP. 195704241987031001

Soraya Rahmanisa, S.Si, M.Sc.
NIP. 1985041220102003

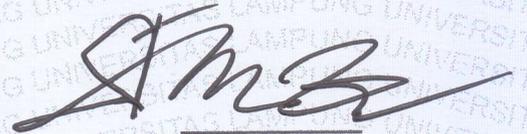
MENGETAHUI
Dekan Fakultas Kedokteran

Dr. dr. Muhartono, S. Ked., M. Kes., Sp. PA
NIP. 19701208 200112 1 00

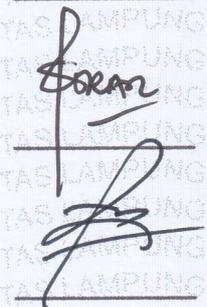
MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

Ketua : Prof. Dr. Sutyarso, M. Biomed



Sekretaris : Soraya Rahmanisa, S.Si, M.Sc



Penguji : dr. Waluyo Rudiyanto, S.Ked, M. Kes

2. Dekan Fakultas Kedokteran



Dr. dr. Muhartono, S.Ked, M.Kes, Sp.PA
NIP. 19701208201121001

Tanggal Lulus Ujian Skripsi: 5 April 2019

LEMBAR PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa:

1. Skripsi dengan judul **“PENGARUH BISPHENOL-A (BPA) TERHADAP HISTOLOGI TUBULUS SEMINIFERUS TIKUS PUTIH (*Rattus novergicus*) JANTAN GALUR *Sprague dawley*”** adalah hasil karya sendiri dan tidak melakukan penjiplakan atau pengutipan atas karya penulis lain dengan cara tidak sesuai tata etika ilmiah yang berlaku dalam masyarakat akademik atau yang disebut plagiarisme.
2. Hak intelektual dan karya ilmiah ini diserahkan sepenuhnya kepada Universitas Lampung

Atas pernyataan ini apabila dikemudian hari ditemukan adanya ketidakbenaran saya bersedia menanggung akibat dan sanksi yang diberikan kepada saya.

Bandar Lampung, April 2019
Pembuat pernyataan,



Arina Muti Amaliah
NPM.1518011043

RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan di Manggopoh, kabupaten Agam, Sumatera Barat, 6 April 1997, sebagai anak pertama dari tiga bersaudara dari Bapak Mustasyar dan Ibu Upriyenti Syam.

Pendidikan Taman Kanak-kanak (TK) diselesaikan pada TK Mandeh Siti Manggopoh pada tahun 2003. Pendidikan Sekolah Dasar (SD) diselesaikan di SD N 09 Balai Satu, Kabupaten Agam pada tahun 2009. Pendidikan dilanjutkan di Sekolah Menengah Pertama (SMP) Negeri 1 Lubuk Basung dan dapat diselesaikan pada tahun 2012. Sekolah Menengah Atas (SMA) diselesaikan di SMA Negeri Agam Cendekia pada tahun 2015. Pada tahun 2015, penulis terdaftar sebagai mahasiswi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung melalui jalur SNMPTN.

“Sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan, maka apabila kamu telah selesai (dari suatu urusan) kerjakanlah dengan sesungguhnya (urusan) yang lain dan hanya kepada Tuhanmulah hendaknya kamu berharap”

(QS Al Insyirah; 6-8)

Sebuah persembahan bagi kedua orang tuaku tercinta♥

SANWACANA

Puji syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT yang telah melimpahkan berkat serta karunianya mencurahkan segala kasih sayangnya dan segala keajaibannya yang masih bisa membawa saya sampai pada titik ini sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini tepat waktu.

Skripsi ini berjudul **“PENGARUH BISPHENOL-A (BPA) TERHADAP HISTOLOGI TUBULUS SEMINIFERUS TIKUS PUTIH (*Rattus novergicus*) JANTAN GALUR *Sprague dawley*”** ini disusun sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana kedokteran di Universitas Lampung.

Selama proses penulisan skripsi ini, penulis mendapatkan banyak sekali bantuan, saran, bimbingan, masukan, serta kritikan dari berbagai pihak. Pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan rasa terima kasih yang mendalam kepada:

1. Allah SWT yang selalu menuntun ke jalan yang mungkin terasa sulit namun memberikan hasil yang teramat indah atas semuanya, terima kasih atas iman yang masih Engkau berikan sehingga saya dapat menyelesaikan skripsi ini.
2. Prof. DR. Ir. Hasriadi Mat Akin, M.P. selaku rektor Universitas Lampung;
3. Dr. dr. Muhartono, M.Kes., Sp.PA selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Lampung;

4. Prof. Dr. Sutyarso, M. Biomed selaku Pembimbing Utama, yang telah meluangkan waktu, memberikan bimbingan, ilmu, nasihat, saran, motivasi hingga kritik yang membangun kami selama penyusunan skripsi ini;
5. Ibu Soraya Rahmanisa, S.Si, M.Sc. selaku Pembimbing Kedua, yang telah meluangkan waktu, memberikan bimbingan, ilmu, nasihat, saran, motivasi serta selalu memberikan catatan penting dalam penulisan skripsi ini sehingga skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik;
6. dr. Waluyo Rudiyanto, S. ked, M. Kes selaku Penguji Utama dan Pembahas dalam skripsi ini. Terima kasih telah meluangkan waktunya, memberikan bimbingan, memberikan ilmu dan arahan pada setiap hal yang belum saya ketahui, terima kasih atas dukungan sehingga saya dapat menjalani skripsi ini dengan lancar;
7. dr. Diana Mayasari, S. ked, M.K.K selaku Pembimbing Akademik selama di FK Unila atas semua bimbingan, saran, kritik, dan nasihatnya selama menempuh pendidikan dokter.
8. Terima kasih kepada Ibu Nuriah dan Mbak Yani, atas seluruh bantuan bimbingan kepada saya selama di Laboratorium Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Universitas Lampung;
9. Terima kasih kepada dr. Rizki Hanriko, S. Ked., Sp. PA dan Mas Bayu atas seluruh bantuan dan bimbingan kepada saya selama di Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung;
10. Seluruh dosen FK Unila yang telah memberikan ilmu pengetahuan, dukungan serta nasihat selama penulis menempuh pendidikan dokter;

11. Seluruh staf TU, administrasi, dan akademik FK Unila yang telah banyak membantu dalam proses penelitian ini;
12. Kepada Ibu, Ayah dan Adik-adik yang selalu memberikan dukungan baik moral maupun materi pada setiap langkah saya, terima kasih Ibu atas doa pada malam hari yang menjadi pelancar segala urusan saya di dunia, terima kasih Ayah yang telah bekerja keras untuk memenuhi segala kebutuhan dalam perkuliahan ini. Terima kasih Adik atas semangat dan motivasi yang diberikan;
13. Kepada Pakde dan Bude di Bandarlampung, terima kasih atas bantuannya dan doanya selama ini;
14. Kepada keluarga besar, terima kasih banyak untuk rasa percaya dan harapan yang begitu tinggi yang kalian letakan pada pundak saya, terima kasih atas segala doa dan dukungannya;
15. Kepada Rizki Novtarina, Nadia Afifah, Meiwa Rizky terima kasih sudah menjadi bagian dari perjalanan ini, terima kasih untuk semangat yang selalu kalian berikan.
16. Kepada teman-teman satu bimbingan Nur Azizah dan Evriana Citra Terima kasih karena sudah sering menunggu kehadiran dokter bersama, saling menyemangati untuk menyelesaikan skripsi kita;
17. Seluruh pengunjung setia *animal house* yang telah berjuang bersama menaklukkan tikus-tikus, berbagi suka dan duka selama penelitian;
18. Seluruh rekan sejawat FK Unila angkatan 2015 yang tidak bisa disebutkan satu persatu, atas semua doa, semangat dan kerja sama nya selama ini.

Akhir kata, Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan, akan tetapi semoga skripsi yang sederhana ini berguna dan bermanfaat bagi setiap orang yang membacanya.

Bandar Lampung, Maret 2019
Penulis,

Arina Muti Amaliah

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR ISI	i
DAFTAR TABEL	iv
DAFTAR GAMBAR	vi
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan penelitian.....	4
1.4 Manfaat penelitian.....	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Tinjauan Pustaka	5
2.1.1 Sistem Reproduksi Jantan.....	5
2.1.1.1 Testis	5
2.1.1.2 Spermatogenesis.....	6
2.1.1.2.1 Siklus Epitel Seminiferus	6
2.1.1.2.2 Spermatogenesis	7
2.1.1.2.3 Spermiogenesis.....	11
2.1.1.3 Pengendalian Spermatogenesis oleh Hormon.....	13
2.1.2 Bisphenol-A.....	16
2.1.2.1 Kimia dan Struktur Bisphenol-A	16
2.1.2.2 Metabolisme Bisphenol-A	17
2.1.2.3 Kegunaan Bisphenol-A	22
2.1.2.4 Dampak Bisphenol-A terhadap Kesehatan	23
2.2 Tikus Putih	29
2.3 Kerangka Teori.....	30
2.4 Kerangka Konsep	30
2.5 Hipotesis.....	32

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Desain Penelitian	33
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian	33
3.3 Populasi dan Sampel Penelitian	34
3.3.1 Populasi	34
3.3.2 Sampel	34
3.4 Kelompok Perlakuan	36
3.5 Kriteria Inklusi dan Eksklusi	36
3.6 Variabel Penelitian	37
3.6.1 Variabel Bebas (<i>Independent Variable</i>)	37
3.6.2 Variabel Terikat (<i>Dependent Variable</i>)	37
3.7 Definisi Operasional	37
3.8 Alat dan Bahan Penelitian	39
3.8.1 Alat	39
3.8.2 Bahan	39
3.9 Prosedur	40
3.9.1 Ethical Clearence	40
3.9.2 Pemeliharaan Hewan Uji	42
3.9.3 Persiapan Hewan Uji	42
3.9.4 Penyediaan bisphenol-A	43
3.9.5 Pemberian perlakuan	45
3.9.6 Proses pembedahan	45
3.9.7 Pengambilan dan penimbangan organ testis hewan uji	46
3.9.8 Pembuatan Preparat Histologi	47
3.9.9 Fiksasi	47
3.9.10 Trimming	47
3.9.11 Dehidrasi	48
3.9.12 Clearing	48
3.9.13 Infiltrasi paraffin	48
3.9.14 Embedding	49
3.9.15 Cutting	49
3.9.16 Inkubasi	50
3.9.17 Staining	50
3.9.18 Pembacaan preparat	50
3.9.19 Pemeriksaan Dan Perhitungan Jaringan Histologi Testis Tikus	51
3.10 <i>Dummy Table</i>	51
3.11 Analisis Data	52

BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

4.1 Data Hasil Penelitian	53
4.1.1 Jumlah Rerata Spermatisit Primer	53
4.1.2 Jumlah Rerata Spermatid.....	57
4.1.3 Jumlah Rerata Diameter tubulus seminiferus.....	61
4.2 Pembahasan	65
4.2.1 Jumlah Rerata Spermatisit Primer	65
4.2.2 Jumlah Rerata Spermatid.....	71
4.2.3 Diameter tubulis seminiferus.....	73
4.3 Keterbatasan Penelitian	81

BAB V KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan.....	82
5.2 Saran.....	82

DAFTAR PUSTAKA**LAMPIRAN**

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Nama dan Komposisi Bisphenol-A.....	17
2. Konsentrasi berbagai produk makanan, serum darah manusia dan darah umbilical.....	22
3. Definisi Operasional.....	37
4. Dummy Table.....	51
5. Rerata Jumlah Spermatisit Primer dan Standar Deviasi Tiap Kelompok Perlakuan.....	54
6. Hasil Uji Normalitas Saphiro Wilk pada jumlah spermatisit primer tiap Kelompok Perlakuan.....	56
7. Hasil Uji Homogenitas Levene	56
8. Hasil Uji <i>One Way Anova</i> Jumlah Rerata Spermatisit Primer.	56
9. Hasil Uji <i>Post Hoc</i> LSD pada Jumlah Rerata Spermatisit Primer.	57
10. Rerata Jumlah Spermatid dan Standar Deviasi Tiap Kelompok Perlakuan.....	58
11. Hasil Uji Normalitas Saphiro Wilk pada jumlah spermatid tiap Kelompok Perlakuan.....	60
12. Hasil Uji Homogenitas Levene	60
13. Hasil Uji <i>One Way Anova</i> Jumlah Rerata Spermatid.....	60
14. Hasil Uji <i>Post Hoc</i> LSD pada Jumlah Rerata Spermatid.....	61
15. Rerata Jumlah Diameter tubulus seminiferus Tiap Kelompok Perlakuan.	62

16. Hasil Uji Normalitas Saphiro Wilk pada Diameter tubulus seminiferus tiap Kelompok Perlakuan	64
17. Hasil Uji Homogenitas Levene Diameter tubulus seminiferus.....	64
18. Hasil Uji <i>One Way Anova</i> Jumlah Diameter tubulus seminiferus	64
19. Hasil Uji <i>Post Hoc</i> LSD pada Diameter tubulus seminiferus	65

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Testis, tubuli seminiferus (potongan transversal)	7
2. Spermatogenesis.....	11
3. Kontrol Hormon Spermatogenesis.....	15
4. Sintesis Testosteron di Sel Leydig	16
5. Struktur Kinia Bisphenol-A (C ₁₅ H ₁₆ O ₂)	17
6. Glucuronidation BPA dalam tubuh manusia.....	18
7. Kerangka Teori Pengaruh Pemberian Bisphenol-A (BPA) terhadap histologi Tubulus Seminiferus	30
8. Kerangka Konsep Pengaruh Pemberian Bisphenol-A (BPA) terhadap histologi Tubulus Seminiferus	31
9. Diagram Batang Rerata Jumlah Spermatisit Primer Tiap Kelompok Perlakuan.....	54
10. Gambaran Tubulus Seminiferus pada Tiap Kelompok Perlakuan dengan Perbesaran 200x dengan pewarnaan Hematoksilin Eosin (HE). Keterangan : menunjukkan sel spermatisit primer.....	55
11. Diagram Batang Rerata Jumlah Spermatisid Tiap Kelompok Perlakuan.....	58
12. Gambaran Tubulus Seminiferus pada Tiap Kelompok Perlakuan dengan Perbesaran 200x dengan pewarnaan HE. Keterangan : menunjukkan sel spermatisid.....	59
13. Diagram Batang Rerata Jumlah diameter tubulus seminiferus Tiap Kelompok Perlakuan.....	62
14. Gambaran Diameter Tubulus Seminiferus pada Tiap Kelompok Perlakuan dengan Perbesaran 200x dengan Pewarnaan HE.	63

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Pada zaman modern saat ini, masyarakat lebih mengutamakan pola hidup yang praktis. Salah satunya dalam hal konsumsi makanan dan minuman. Wadah yang sering digunakan untuk kemasan makanan dan minuman adalah plastik karena lebih fleksibel, kuat, praktis, murah dan ringan (Yuyun, 2011). Selain sebagai kemasan makanan plastik juga digunakan untuk pembuatan botol susu bayi, lensa kaca mata, sikat gigi, perlengkapan rumah tangga, perlengkapan kosmetik dan sebagainya (PPLH, 2007).

Bahan plastik yang dijumpai untuk keperluan sehari-hari tersebut merupakan plastik bikarbonat adalah senyawa 2,2 bis (4-hidroksifenil) propan yang dikenal dengan bisphenol-A (BPA). Hasil pemeriksaan pada lebih dari 90% sampel urin yang diperoleh dari peserta *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES) tahun 2011-2012 di Amerika Serikat memiliki konsentrasi BPA di atas batas normal (Hauser *et al.*, 2017). Penelitian terhadap konsentrasi BPA di negara-negara di Asia bahwa BPA terdeteksi pada 94,3 % sampel yang dianalisis memiliki konsentrasi berkisar antara <0,1 sampai 30,1 ng/mL. Hasil ini menunjukkan keterpaparan manusia secara luas terhadap BPA di negara-negara Asia (Zhang *et al.*, 2011).

Penelitian yang dilakukan di Jepang terhadap peralatan makanan terdapat sepuluh produk komersial mengandung residu BPA di polikarbonat sekitar 5-80 mg/kg, tetapi migrasi hanya terdeteksi pada tiga sampel yaitu di bawah 5µg/kg. Empat sampel dengan tingkat yang sangat tinggi (mangkuk nasi, mug, mangkuk, piring sup) mengandung 370-599 mg/kg residu BPA dalam plastik. Dalam produk-produk ini, migrasi ke dalam simultan makanan yang berbeda bervariasi (Salter, 2000).

Polycarbonate (PC) yang secara luas digunakan dalam bahan kontak makanan seperti botol makanan bayi, peralatan dan wadah makanan, botol air, botol susu dan minuman, menyebabkan paparan BPA juga meningkat. Resin epoksi dari BPA digunakan sebagai lapisan pelindung untuk berbagai makanan dan minuman kaleng, termasuk wadah yang digunakan untuk formula bayi. Sehingga, terjadi paparan BPA ke manusia melalui konsumsi makanan dan minuman tersebut. Pada konsumsi makanan sehari-hari, terdapat BPA berdasarkan konsentrasi yang diukur dalam makanan, diperkirakan di Eropa sekitar 0.2 µg/kgbb pada bayi yang diberi ASI, 2,3µg/kgbb pada bayi yang diberi susu formula dengan menggunakan botol non-PC, 11µg/kgbb pada bayi yang diberi susu formula menggunakan botol PC, dan 1.5µg /kgbb pada orang dewasa (WHO, 2009).

Bisphenol-A (BPA) merupakan salah satu senyawa kimia sintesis yang paling banyak diproduksi saat ini, lebih dari tiga juta ton diproduksi per tahun. Tingginya penggunaan BPA sebagai bahan tambahan karena memiliki sifat keras, bening dan ringan. Namun, dibalik keunggulan penggunaan BPA

sebagai bahan dasar pengemasan terdapat bahaya bagi kesehatan. Penelitian terbaru menunjukkan bahwa kehadiran BPA di lingkungan dan di tubuh manusia telah menyebabkan kekhawatiran lain tentang efek kesehatan yang merugikan. Penelitian pada hewan dan manusia telah memperlihatkan hubungan BPA dengan banyak masalah kesehatan termasuk infertilitas, penambahan berat badan, perubahan perilaku, percepatan masa puber, kanker prostat dan kelenjar susu, efek kardiovaskular, dan diabetes (Birnbaum *et al.*, 2012).

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa paparan BPA bahkan dalam dosis rendah dapat mengganggu fisiologi reproduksi. Penelitian pada tikus dewasa paparan BPA dapat mengurangi jumlah sperma dan mengganggu spermatogenesis. Penelitian lebih lanjut menunjukkan bahwa BPA dapat mengganggu *gonadotropin releasing hormone* (GnRH) di hipotalamus yang menyebabkan penurunan *follicle-stimulating hormone* (FSH) dan testosteron yang dapat mempengaruhi spermatogenesis dan fungsi reproduksi. BPA mengganggu spermatogenesis tidak hanya melalui penurunan hormon reproduksi tetapi juga menginduksi apoptosis sel germinal (Jin *et al.*, 2013). Penelitian lain menunjukkan bahwa paparan BPA pada laki-laki juga terbukti mempengaruhi kesuburan dan berpotensi menimbulkan gangguan dalam sel Sertoli, yang memiliki peran penting dalam spermatogenesis (Liu *et al.*, 2013).

Berdasarkan penelitian sebelumnya, BPA mempengaruhi fungsi reproduksi, salah satunya mengganggu produksi hormon dan spermatogenesis. Untuk itu, peneliti ingin mengetahui apakah pengaruh bisphenol-A terhadap histologi tubulus seminiferus tikus putih (*Ratus norvegicus*) galur *Sprague dawley*.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas didapatkan rumusan masalah yaitu apakah bisphenol-A berpengaruh terhadap histologi tubulus seminiferus tikus putih (*Rattus novergicus*) jantan galur *Sprague dawley*.

1.3 Tujuan penelitian

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh bisphenol-A terhadap histologi tubulus seminiferus tikus putih (*Rattus novergicus*) jantan galur *Sprague dawley*.

1.4 Manfaat penelitian

Adapun manfaat penelitian ini adalah :

1. Bagi Peneliti

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan wawasan dan menambah pengalaman dalam menerapkan ilmu yang sudah didapat.

2. Bagi Masyarakat

Penelitian ini diharapkan dapat menambah wawasan masyarakat mengenai pengaruh dari bisphenol-A yang terkandung dalam kemasan plastik terhadap kesehatan reproduksi.

3. Bagi Peneliti lain

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan gambaran penelitian awal dan selanjutnya supaya mengembangkan penelitian yang lebih mendalam mengenai pengaruh BPA terhadap berbagai organ tubuh.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Pustaka

2.1.1 Sistem Reproduksi Jantan

2.1.1.1 Testis

Testis merupakan organ kelamin jantan yang berfungsi sebagai sintesis hormon androgen dan tempat berlangsungnya spermatogenesis. Kedua fungsi ini terjadi dalam kompartemen struktural dan fungsional yang berbeda di testis (Weinbauer *et al.*, 2010). Proses spermatogenesis berlangsung di tubulus seminiferus dan fungsi sintesis hormon androgen (testosteron) dalam sel leydig di sel interstisium (Sherwood, 2014).

Testis berkembang secara retroperitoneal pada dinding dorsal rongga abdomen embrional. Selama perkembangan fetus testis bergerak sampai akhirnya tertahan di kedua sisi skrotum pada ujung funiculus spermaticus. Karena bermigrasi dari rongga abdomen, setiap testis ini membawa suatu kantong serosa, yaitu tunica vaginalis yang berasal dari peritoneum. Setelah migrasi ke dalam skrotum, saluran tempat turunnya testis (prosesus vaginalis) akan menutup (Mescher, 2015).

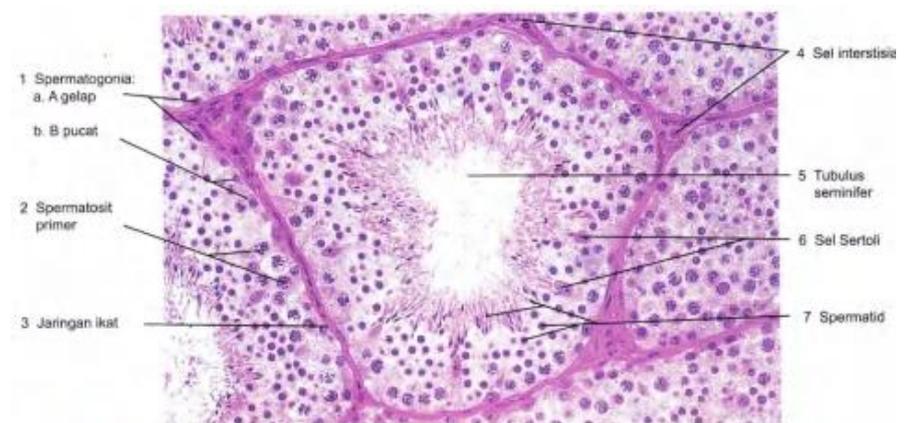
Testis terdiri atas 900 lilitan tubulus seminiferus, yang masing-masing mempunyai panjang rata-rata lebih dari setengah meter dan merupakan tempat pembentukan sperma. Sperma kemudian dialirkan ke dalam epididimis, suatu tubulus lain yang juga berbentuk lilitan dengan panjang sekitar 6 meter. Epididimis mengarah ke dalam vas deferens, yang membesar menjadi ampula vas deferens tepat sebelum vas deferens memasuki korpus kelenjar prostat. Dua vesikula seminalis, masing-masing terletak di sebelah prostat akan mengalir ke dalam ujung ampula prostat, dan isi dari ampula maupun vesikula seminalis masuk ke dalam duktus ejakulatorius terus melalui korpus kelenjar prostat dan masuk ke dalam pars interna. Duktus prostatikus selanjutnya mengalir dari kelenjar prostat ke dalam duktus ejakulatorius. Akhirnya, uretra merupakan rantai penghubung terakhir testis ke dunia luar (Guyton & Hall, 2013).

2.1.1.2 Spermatogenesis

2.1.1.2.1 Siklus Epitel Seminiferus

Sperma dihasilkan dalam tubulus seminiferus dengan laju 2×10^8 per hari pada pria dewasa. Setiap testis memiliki tubulus seminiferus dengan diameter sekitar 150-250 μm dan panjang 30-70 cm. Setiap tubulus seminiferus dilapisi oleh suatu epitel berlapis khusus dan kompleks yang disebut epitel germinal atau epitel seminiferus. Epitel tubulus seminiferus ini terdiri atas dua jenis sel yaitu, sel penyokong (sel sertoli) dan sel-sel proliferasi

dari garis keturunan spermatogenik. Sel-sel turunan spermatogenik membentuk empat sampai delapan lapisan konsentris sel yang fungsinya untuk menghasilkan sperma (Mescher, 2015).



Gambar 1. Testis, tubuli seminiferus (potongan transversal) (Eroschenko, 2008).

Epitel tubulus seminiferus dilapisi oleh epitel germinal atau epitel seminiferus. Membran basal epitel ini dilapisi oleh jaringan ikat fibrosa dengan lapisan terdalam yang mengandung sel-sel mioloid gepeng dan menyerupai otot polos. Epitel tubulus seminiferus terdiri dari dua jenis sel yaitu sel Sertoli dan sel spermatogenik (Mecsher, 2015).

2.1.1.2.2 Spermatogenesis

Di dalam testis terkemas sekitar 250 m (800 kaki) tubulus seminiferus yang berfungsi sebagai penghasil sperma. Tubulus terdiri atas dua jenis sel yaitu, sel germativum yang sebagian besar berada dalam tahap pembentukan sperma dan sel sertoli yang menunjang spermatogenesis (Sherwood, 2014).

Sebagian besar sel epitel seminiferus adalah sel spermatogenik yang menyelesaikan proses pembentukan spermatozoa melalui tiga fase berikut: spermatositogenesis yaitu pembentukan spermatosit, meiosis yaitu pembentukan spermatid haploid dari spermatosit primer diploid dan spermiogenesis yaitu transformasi spermatid menjadi spermatozoa dewasa (sperma) (Gartner, 2007).

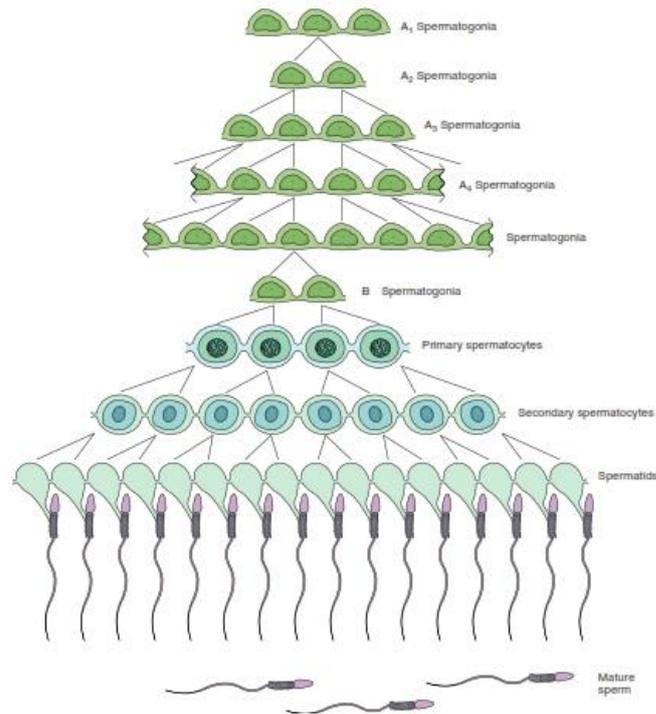
Spermatogenesis terjadi di dalam semua tubulus seminiferus selama masa seksual aktif dari rangsangan hormon gonadotropik hipofisis anterior, dimulai rata-rata pada usia 13 tahun dan berlanjut sepanjang hidup (Guyton & Hall, 2013).

Tahap-tahap spermatogenesis ialah:

- a. Spermatositogenesis merupakan pembentukan spermatosit primer dari spermatogonia yang terjadi di kompartemen basal tubulus seminiferus. Spermatogonia diploid berkumpul di lamina basal, dengan adanya hormon testosteron mendorong mereka untuk memulai aktivitas mitosis mereka. Tiga jenis spermatosit yang berbeda adalah:
 1. Spermatogonia tipe gelap, yang paling tidak matang, adalah sel cadangan yang inti ovalnya kaya akan heterochromatin, sehingga sel menjadi gelap. Sel-sel ini memasuki siklus mitosis untuk membentuk sel tipe A yang lebih gelap

2. Spermatogonia tipe pucat, yang inti ovalnya kaya akan euchromatin, memberi mereka penampilan yang lebih pucat; testosteron mendorong sel-sel ini untuk menjalani pembelahan sel yang cepat membentuk spermatogonia tipe lebih
 3. Spermatogonia tipe B, yang inti bulatnya membedakannya dari prekursornya. Sel-sel ini juga memasuki siklus mitosis untuk membentuk spermatosit primer
 4. Spermatogonia tipe A membelah secara mitosis empat kali untuk membentuk 16 sel berdiferensiasi sebagai spermatogonia tipe B.
- b. Spermatogonia akan bermigrasi ke arah sentral di antara sel-sel Sertoli.
 - c. Dalam waktu 24 hari, setiap spermatogonia yang melewati lapisan pertahanan masuk ke dalam lapisan sel Sertoli, lalu dimodifikasi membentuk suatu spermatosit primer yang besar. Pada akhir hari ke-24, setiap spermatosit terbagi dua menjadi spermatosit sekunder. Pembagian ini disebut pembagian meiosis pertama.
 - d. Pada tahap awal dari pembagian meiosis pertama ini, semua DNA di dalam 46 kromosom bereplikasi. Dalam proses ini, masing-masing 46 kromosom ($44 + XY$) menjadi dua kromatid yang tetap berikatan bersama sentromer, kedua

- kromatid memiliki gen-gen duplikat dari kromosom tersebut. Pada waktu ini, spermatosit pertama terbagi menjadi dua spermatosit sekunder, yang setiap pasang kromosom berpisah sehingga ke-23 kromosom, yang masing-masing memiliki dua kromatid, pergi ke salah satu spermatosit sekunder. Sementara 23 kromosom yang lain pergi ke spermatosit sekunder yang lain.
- e. Dalam 2 sampai 3 hari, pembagian meiosis kedua terjadi dimana kedua kromatid dari setiap 23 kromosom berpisah pada sentromer, membentuk dua pasang 23 kromosom, satu pasang dibawa ke satu spermatid dan satu pasang yang lain dibawa ke spermatid yang kedua. Manfaat dari kedua pembagian meiosis ini adalah bahwa setiap spermatid yang akhirnya dibentuk membawa hanya 23 kromosom, memiliki hanya setengah dari gen-gen spermatogonium yang pertama. Oleh karena itu, spermatozoa yang akhirnya membuahi ovum wanita akan menyediakan setengah dari bahan genetik ke ovum yang dibuahi dan ovum akan menyediakan setengah bagian berikutnya.
- f. Beberapa minggu berikutnya setelah meiosis, setiap spermatid dibentuk kembali secara fisik oleh sel Sertoli, kemudian spermatid diubah secara perlahan-lahan menjadi satu spermatozoa (sebuah sperma) (Gartner, 2007).



Gambar 2. Spermatogenesis
(Gartner, 2007).

2.1.1.2.3 Spermiogenesis

Spermiogenesis adalah suatu proses morfologik kompleks mengubah spermatid bulat menjadi sel sperma yang memanjang. Selama proses spermiogenesis, ukuran dan bentuk spermatid berubah dan kromatin nukleus memadat.

1. Pada fase golgi, terjadi akumulasi granul halus di aparatus golgi spermatid dan akan membentuk granulum acrosomaticum di dalam vesicula acrosomatica yang terbungkus membran.
2. Selama fase akrosomal, vesicula acrosomatica dan granulum acrosomaticum menyebar di inti spermatid yang memadat di ujung anterior spermatid berupa acrosoma. Acrosoma

berfungsi sebagai suatu jenis khusus lisosom dan mengandung beberapa enzim hidrolitik, misalnya hialuronidase dan protease dengan aktivitas mirip-tripsin, yang membantu sperma dalam menembus sel (korona radiata) dan membran (zona pelusida) yang mengelilingi oosit yang berovulasi.

3. Selama fase maturasi (pematangan), membran plasma akan bergeser ke posterior dari nukleus untuk menutupi flagellum (ekor sperma) yang sedang tumbuh. Mitokondria bermigrasi dan membentuk selubung yang rapat di sekitar pars intermedia flagellum.
4. Fase pematangan akhir ditandai oleh terlepasnya kelebihan atau sisa sitoplasma spermatid dan pelepasan sel sperma ke dalam lumen tubulus seminiferus. Sel Sertoli akan memfagositosis sisa sitoplasma tersebut. Sel sperma matang terdiri dari kepala (caput) dan acrosoma yang mengelilingi bagian anterior nukleus, leher (collum), pars intermedia yang ditandai oleh adanya selubung mitokondria padat, dan bagian utama atau pars principalis (Eroschenko, 2008).

Semua tahap perubahan akhir dari spermatosit menjadi sperma terjadi ketika spermatosit dan spermatid terbenam dalam sel-sel Sertoli. Sel-sel Sertoli memelihara dan mengatur proses spermatogenesis, dari sel germinal sampai sperma membutuhkan waktu kira-kira 64 hari.

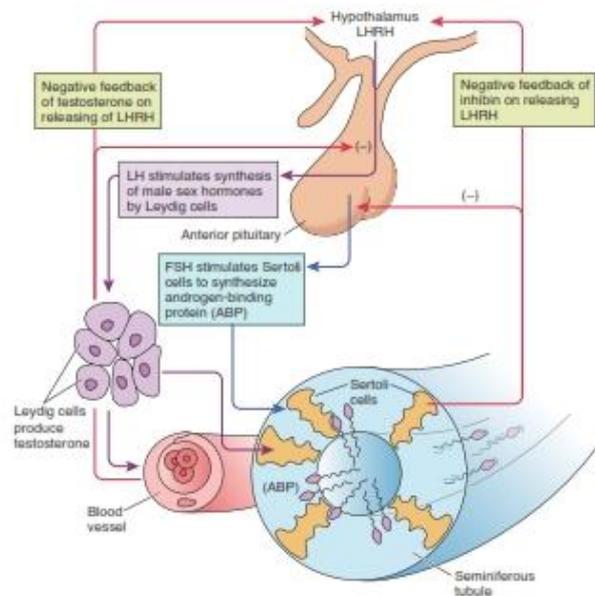
2.1.1.3 Pengendalian Spermatogenesis oleh Hormon

Spermatogenesis pada tikus memerlukan waktu selama 35,5 hari setelah menempuh 4 kali daur epitel seminiferus. Lama satu daur epitel seminiferus pada mencit adalah 207 ± 6 jam. Berlangsungnya spermatogenesis pada tubulus seminiferus melibatkan hipotalamus, hipofisis dan testis. *Gonadotropin releasing hormone* (GnRH) hipotalamus merangsang hipofisis anterior untuk mensekresikan *luteinizing hormone* (LH) dan *follicle-stimulating hormone* (FSH). LH mempengaruhi spermatogenesis melalui testosteron yang dihasilkan oleh sel Leydig. FSH berpengaruh langsung terhadap sel Sertoli dalam tubulus seminiferus. FSH meningkatkan sintesis protein pengikat hormon androgen (ABP). Androgen Binding Protein (ABP) merupakan glikoprotein yang mengikat testosteron. ABP disekresikan ke dalam lumen tubulus seminiferus dan dalam proses ini testosteron yang dihasilkan oleh sel Leydig diangkut dengan konsentrasi yang tinggi ke tubulus seminiferus. Beberapa hormon yang berperan penting dalam spermatogenesis, antara lain:

1. Testosteron merupakan hormon yang disekresikan oleh sel Leydig yang terletak di interstitium testis. Hormon ini berperan bagi pertumbuhan dan pembelahan sel-sel germinal testis yang merupakan tahap pertama pembentukan sperma.

2. Hormon luteinasi (luteinizing hormone), yang disekresikan oleh kelenjar hipofisis anterior. Hormon ini merangsang sel-sel Leydig untuk menyekresikan testosterone.
3. Hormon perangsang-folikel (FSH), yang disekresikan oleh kelenjar hipofisis anterior. Hormon ini merangsang sel-sel Sertoli yang berperan dalam proses perubahan spermatid menjadi sperma (proses spermiogenesis).
4. Estrogen, dibentuk dari testosterone oleh sel-sel Sertoli ketika Sel Sertoli dirangsang oleh hormone perangsang folikel.
5. Growth hormone diperlukan untuk fungsi metabolisme testis. Hormon ini meningkatkan pembelahan awal spermatogonia, bila kekurangan hormone ini dapat menyebabkan infertilitas (Guyton & Hall, 2013).

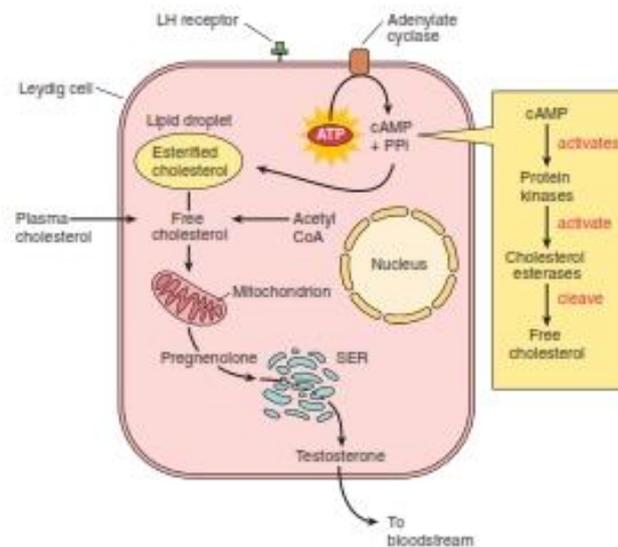
Setiap testis menghasilkan sekitar 100 juta spermatozoa per hari yang diberi makan dan diangkut ke saluran genital. Proses ini membutuhkan peran hormon luteinizing (LH) dan hormon perangsang folikel (FSH). Mekanisme kontrol hormonal spermatogenesis diilustrasikan pada Gambar 3.



Gambar 3. Kontrol Hormon Spermatogenesis (Gartner, 2007).

- a. LH bekerja pada sel Leydig untuk mengatur sekresi testosteron.
- b. FSH bekerja pada sel Sertoli untuk memproduksi dan pelepasan protein pengikat androgen (ABP), yang mengikat testosteron dan mencegahnya meninggalkan tubulus seminiferus. Meningkatnya tingkat testosteron di tempat spermatogenesis merangsang proses produksi spermatozoa.
- c. Hormon testosteron dan inhibin, disekresikan oleh sel Sertoli, merangsang umpan balik mekanisme untuk menghambat produksi LH. Testosteron juga:

Diperlukan untuk berfungsinya vesikula seminalis, kelenjar prostat, dan kelenjar bulbourethral dan bertanggung jawab atas karakteristik seksual pria (Gartner, 2007).



Gambar 4. Sintesis Testosteron di Sel Leydig (Gartner, 2007)

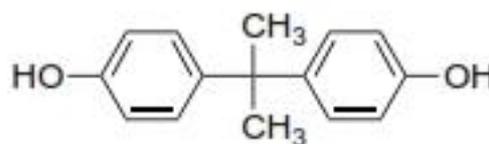
2.1.2 Bisphenol-A

2.1.2.1 Kimia dan Struktur Bisphenol-A

Bisphenol-A (BPA) adalah senyawa organik yang diklasifikasikan ke dalam kelompok fenol. Namanya menurut International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) adalah 4,4'-dihidroksi-2,2-difenilpropan. BPA diproduksi secara sintesis melalui reaksi fenol dengan aseton dengan adanya pertukaran ion yang sangat asam sebagai katalis. BPA sangat larut dalam etanol, asam asetat dan dietil eter, dan kurang larut dalam air. BPA merupakan unsur penting dalam produksi polikarbonat, resin epoksi dan resin polyester (Mikołajewska *et al.*, 2015).

BPA (nomor CAS 80-05-7) adalah senyawa kimia sintetis yang karena strukturnya memiliki banyak kegunaan. Molekul bisphenol-A (4,4'-dihydroxy-2,2-diphenylpropane) (BPA) terdiri dari dua cincin fenol

yang dihubungkan oleh sebuah jembatan metil yang mengandung dua buah gugus fungsional. Umumnya BPA disintesis melalui reaksi kondensasi aseton dan phenol bersama dengan asam hidroklorida sebagai katalis (Carlisle, 2009).



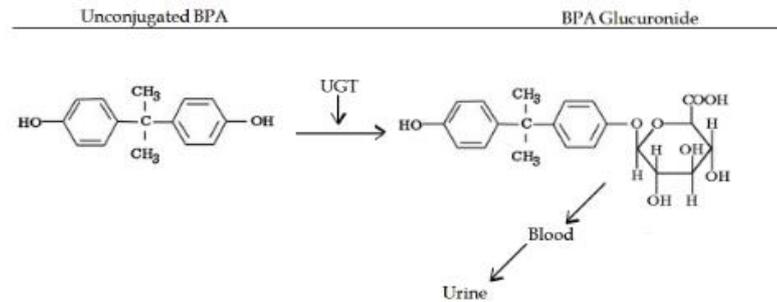
Gambar 5. Struktur Kinia Bisphenol-A (C₁₅H₁₆O₂) (NTP, 2008).

Tabel 1. Nama dan Komposisi Bisphenol-A (Lous, 2013).

EC number	201-245-8
EC name	4,4'-isopropylidenediphenol
CAS number	80-05-7
IUPAC name	2,2-bis(4-hydroxyphenyl)propane
Other names and explanations	Bisphenol A (BPA), 4,4'-(1-methylethylidene)bisphenol 4,4'-Isopropylidenediphenol
Molecular formula	C ₁₅ H ₁₆ O ₂
Molecular weight	228.29
Concentration range (% w/w)	99 – 99.8 (Impurities typically include phenol (<0.06%), ortho and para isomers of bisphenol-A (<0.2%) and water (<0.2%).)
Structure	

2.1.2.2 Metabolisme Bisphenol-A

BPA dimetabolisme di hati oleh uridin 5'-diphospho-glukuronil transferase (UGT), yang mengkatalisis glukuronidasi BPA. BPA juga bisa dimetabolisme menjadi zat lain seperti BPA-sulfat atau bisfenol-3,4- kuinon. Waktu paruh BPA dalam tubuh manusia diperkirakan menjadi 5,4 jam (Koniczna *et al.*, 2015).



Gambar 6. Glucuronidation BPA dalam tubuh manusia (NTP, 2008).

Pada manusia dan primata, BPA yang dikonsumsi secara oral akan diserap dari saluran pencernaan, menjalani metabolisme fase II presistemik substansial dalam usus dan hati, terutama untuk glukuronida konjugat. Konversi ke glukuronida konjugat sangat penting karena tidak seperti aglycone (yaitu bebas atau tidak terkonjugasi) bentuk dari BPA, ini tidak mengikat reseptor estrogen. Di tikus, BPA glukuronida akan terkena ekskresi empedu, resirkulasi enterohepatic dan diekskresikan. BPA terkonjugasi dikeluarkan lewat urin dalam 6 jam (WHO, 2010).

BPA yang masuk ke tubuh melalui makanan atau minuman akan diserap dalam saluran cerna, lalu dimetabolisme di dalam hati membentuk senyawa yang tidak aktif, yaitu konjugat BPA-glucuronic acid yang tidak memiliki aktivitas hormonal dan tidak berbahaya. Senyawa ini bersifat larut dalam air sehingga dapat dikeluarkan dari tubuh melalui urin. Selain itu, dalam jumlah sedikit dihasilkan senyawa lain dalam bentuk inaktif,

yaitu BPA sulfat. Baik BPA-glucuronic acid maupun BPA sulfat, keduanya dapat diukur kadarnya di dalam tubuh, namun hanya BPA bentuk bebas (BPA bentuk aktif) saja yang berpotensi menimbulkan efek merugikan bagi kesehatan (NTP, 2008).

Penelitian lain menunjukkan bahwa terjadi pula peristiwa dekonjugasi BPA yang menyebabkan BPA yang sudah dideaktivasi (BPA yang terglukoronidasi dan tersulfatasi menjadi aktif kembali/reaktivasi oleh enzim β -glukoronidase dan arisulfatase C menjadi BPA bebas. Enzim β -glukoronidase merupakan enzim yang tidak hanya terdapat pada saluran pencernaan usus halus, namun juga terdapat pada seluruh bagian tubuh, termasuk plasenta dan hati fetus. Arisulfatase C berkembang pada masa awal kehidupan dan dapat mendekonstruksi BPA sulfat menjadi bentuk bebasnya (Aschberger., 2010).

Selain melalui rute tertelan, BPA dapat pula masuk ke dalam tubuh melalui kontak kulit, misalnya pada pekerja industri yang terlibat langsung pada pembuatan produk yang mengandung BPA serta pada individu yang menggunakan mesin penghitung uang. BPA juga terkandung dalam kadar rendah di udara dan debu di dalam ruangan, serta pada *dental sealants*, namun tingkat paparannya terhadap manusia relatif lebih kecil daripada paparan melalui pangan (Salter, 2000).

Sumber utama paparan BPA pada manusia diperkirakan terjadi melalui konsumsi. Namun, penyerapan transdermal dan menghirup debu udara yang terkontaminasi adalah kemungkinan rute sekunder. BPA dapat dengan mudah merembes ke sumber makanan melalui lapisan resin epoksi dari barang kaleng dan yang telah di kemas polikarbonat. Sementara tingkat migrasi BPA ke dalam air lebih tinggi pada suhu yang meningkat, migrasi yang signifikan juga dapat terjadi pada kamar. Karena barang kaleng baik murah dan nyaman, penggunaannya sangat umum di negara maju dan sumber signifikan dari BPA yang dicerna (WHO, 2009).

Penelitian Mileva *et al.*, 2014 menjelaskan efek luas dari BPA yang menggambarkan bahwa BPA tak terkonjugasi dapat mempengaruhi jalur transduksi sinyal ganda. Penelitian sebelumnya belum menemukan efek dosis rendah dari paparan BPA mungkin karena sebagian besar difokuskan terutama pada metabolit dinonaktifkan, bisphenol A-glucuronid. Namun, jumlah BPA aktif tak terkonjugasi dalam serum manusia adalah sekitar 4,4µg/L menunjukkan bahwa tidak semua BPA dimetabolisme. BPA dapat diubah melalui oksidasi menjadi berbagai metabolit, banyak yang mungkin memiliki dampak fisiologis yang lebih signifikan daripada senyawa itu sendiri. Misalnya, BPA metabolit bisphenol-A 3,4-quinone dapat membentuk ikatan kovalen dengan dan merusak DNA, yang

pada gilirannya berkontribusi terhadap hepatotoksisitas. Selanjutnya campuran kimia, metabolit, dan senyawa yang dihasilkan ketika BPA dalam air minum dicampur dengan klorin juga telah dipelajari. Pada konsentrasi rendah (10^{-15} – 10^{-7} M), jenis BPA yang terklorinasi atau tersulfonasi ini dapat mempengaruhi afinitas pengikatan ER α pada protein lain. BPS juga bertindak sebagai EDC dan dapat menyebabkan perubahan dalam kematian sel, proliferasi, dan mutagenisitas.

BPA diserap dengan baik oleh rute oral. Karena itu, sifat BPA dapat dengan mudah dilepas dari produk polimer, di mana ia hadir, dan bermigrasi ke lingkungan. Ikatan ester yang menghubungkan molekul BPA dalam polikarbonat atau resin epoksi dihidrolisis selama pemanasan atau dalam medium asam atau basa. Hasil dari, BPA bebas dilepaskan dan bermigrasi ke makanan, minuman dan ke lingkungan. Selain itu, migrasi dapat meningkatkan dengan pencucian berulang dengan deterjen, gosok dan sterilisasi. BPA dapat bermigrasi ke makanan dari kaleng dan dari produk plastik polikarbonat seperti botol bayi, peralatan makan, dan wadah makanan. Penggunaan BPA dalam wadah makanan dan minuman menyumbang mayoritas paparan manusia setiap hari, perkiraan konsumsi manusia dari BPA dari kaleng makanan epoksi saja adalah 6,6 $\mu\text{g/orang-hari}$ (Carlisle, 2009). Batas migrasi yang ditetapkan oleh European Commission adalah 3 mg/kgbb untuk BPA dan 1 mg/kgbb

untuk BADGE dan BFDGE . Tabel 2 daftar konsentrasi BPA terjadi dalam berbagai produk makanan, serum darah manusia, dan darah umbilikal.

Tabel 2. Konsentrasi berbagai produk makanan, serum darah manusia dan darah umbilical (Rykowska & Wasiak, 2006)

Food products	0.07-0.42 ppb
Food products for infants	0.1-13.2 ppb
Powdered milk	~45 ng/g
Water	0.016-0.5 ug/L
Blood serum	0.46-0.56 ppb
Umbilical blood	0.46-0.62 ppb

2.1.2.3 Kegunaan Bisphenol-A

Polikarbonat banyak digunakan di industri antara lain, dalam produk manufaktur yang bersentuhan dengan makanan (botol bekas pakai, termasuk botol bayi, wadah untuk minuman dan makanan) dan mainan untuk bayi dan anak-anak, serta dalam produksi peralatan medis, lensa untuk kaca mata, kemasan media, compact disc dan panel jendela. Selain itu, epoxy resin juga digunakan sebagai pelapis untuk pipa air di rumah dan dalam produksi cat yang menutupi permukaan internal kaleng logam untuk penyimpanan makanan. Aplikasi luas BPA dalam industri plastik menyebabkan peningkatan permintaan untuk zat kimia ini dan akibatnya dapat menimbulkan risiko bagi kesehatan manusia (Mikołajewska *et al.*, 2015).

BPA juga digunakan dalam produksi plastik polivinil klorida dan dalam daur ulang kertas termal. Beberapa polimer yang

digunakan dalam sealant gigi dan pelapis gigi mengandung BPA. Sumber utama paparan BPA bagi kebanyakan orang diasumsikan terjadi melalui diet. Sementara udara, debu, dan air (termasuk kontak kulit selama mandi dan berenang) adalah sumber paparan lain yang mungkin, BPA dalam makanan dan minuman menyumbang mayoritas paparan manusia setiap hari (NTP, 2008).

2.1.2.4 Dampak Bisphenol-A terhadap Kesehatan

Paparan sejumlah besar BPA sangat beracun bagi manusia dan hewan. Bukti adanya kemungkinan efek berbahaya telah terjadi meningkat sekitar 10 tahun. Jelas bahwa BPA mampu mengganggu aksi estrogen, fungsi reproduksi dan perkembangan. Penelitian terbaru efek pada tikus terpapar dosis rendah BPA meliputi perubahan dalam otak dan perilaku, lesi prakanker di prostat dan kelenjar susu dan percepatan pubertas. Studi lain menemukan bahwa kadar BPA urin pada manusia dikaitkan dengan peningkatan prevalensi diabetes dan penyakit kardiovaskular. Sebagai contoh, sebuah studi yang baru-baru ini diterbitkan menemukan bahwa paparan tingkat rendah terhadap BPA menghambat pelepasan adiponektin dari jaringan adipose (lemak) manusia. Adiponektin berfungsi meningkatkan sensitivitas insulin dan membantu mengatur metabolisme glukosa. Para peneliti berhipotesis bahwa paparan BPA lingkungan dapat meningkatkan kerentanan terhadap obesitas dan diabetes (Schierow *et al.*, 2010).

Pengaruh BPA terhadap kesehatan manusia menyebabkan kekhawatiran yang berkembang dan perdebatan di seluruh dunia mengenai kemungkinan yang berhubungan dengan obesitas, diabetes, gangguan neurobehavioral, hipersensitivitas karsinogenik, dan gangguan reproduksi (Liu *et al.*, 2013).

BPA dikaitkan dengan penurunan fungsi reproduksi laki-laki, diabetes, obesitas, penyakit kardiovaskular, disfungsi tiroid, gangguan perkembangan, keguguran, kelainan reproduksi wanita, dan kanker. Sebagian besar penelitian tentang BPA dalam konteks reproduksi melaporkan toksisitas perkembangannya pada spermatozoa melalui kerusakan DNA, metilasi DNA, stres oksidatif, dan peroksidasi lipid, di antara mekanisme lainnya. Sementara beberapa studi *in vivo* telah menunjukkan hubungan antara parameter fungsional BPA dan spermatozoa, BPA telah dikaitkan dengan perubahan motilitas, morfologi, dan kandungan ATP intraselular (Rahman *et al.*, 2015).

Struktur fenolik BPA yang ditunjukkan untuk berinteraksi dengan reseptor estrogen dan bertindak sebagai agonis atau antagonis melalui endocrine receptor (ER) jalur sinyal dependen. Karena itu, BPA telah terbukti berperan dalam patogenesis beberapa kelainan endokrin termasuk infertilitas pada perempuan dan laki-laki, percepatan pubertas, kanker

payudara dan prostat dan beberapa gangguan metabolik termasuk sindrom ovarium polikistik (SOP). Peningkatan konsentrasi BPA pada urin berkorelasi dengan berkurangnya jumlah sperma diejakulasi, serta penurunan motilitas dan viabilitasnya. Mekanisme BPA mengganggu kesuburan pada wanita dan juga pria karena aktivitas estrogeniknya di hipotalamus yang akan mengganggu fungsi GnRH sehingga sekresi FSH dan LH yang memadai terganggu (Konieczna *et al.*, 2015).

Penelitian lain juga menunjukkan bahwa paparan BPA dapat mengganggu hormon reproduksi melalui perubahan pada aksis hipotalamus-pituitari-gonad pada laki-laki (Mileva *et al.*, 2014). Pada tikus jantan proses ini sebagian dimediasi oleh estradiol yang diproduksi secara lokal di otak dari sirkulasi testosteron. Gangguan pada hipotalamus-pituitari-gonad pada tikus betina neonatal dapat merubah waktu pubertas dan kesuburan. Demikian pula, dengan gangguan fungsi hipotalamus-hipofisis tikus laki-laki neonatal dapat mengganggu perkembangan dan fungsi testis dan saluran reproduksi (WHO, 2010).

Penelitian yang dilakukan Nakamura *et al.*, 2010, pada hewan coba tikus membuktikan bahwa BPA dan ekstradiol (E2) memiliki efek buruk pada sistem reproduksi. Kedua bahan kimia tersebut secara signifikan mengurangi bobot organ reproduksi,

kadar testosteron testis dan plasma, dan kadar LH plasma dalam dosis terpisah, serta menyebabkan kelainan morfologi seperti penurunan sel Leydig. Menurunnya berat organ reproduksi dan sel Leydig di testis tikus yang diberi BPA atau E2 mungkin sebagian dihasilkan dari pengurangan testosteron. Dalam penelitian lain, ada laporan asosiasi antara urin atau konsentrasi darah yang lebih tinggi dari BPA dan kadar FSH yang lebih rendah pada pria yang terpajan di tempat kerja (NTP, 2008).

Sejumlah penelitian menunjukkan bahwa paparan tikus dewasa terhadap dosis lingkungan BPA bisa mengurangi jumlah sperma dan efisiensi dari spermatogenesis. Tikus jantan dewasa menunjukkan penurunan jumlah sperma testis yang signifikan, dan juga jumlah sperma epididimis, setelah terpapar 25 ng/kg BPA (Jin *et al.*, 2013).

BPA adalah salah satu bahan kimia yang diidentifikasi sebagai endocrine disruptor potensial berdasarkan sifat estrogeniknya. Studi pada hewan laboratorium menunjukkan bahwa BPA memiliki aktivitas estrogenik, dengan mempertimbangkan berbagai reseptor estrogen (ER) dan molekul pengikat estrogen dan fungsinya dalam proses reproduksi yang berbeda dan tahapan yang berbeda dari siklus kehidupan (Carlisle, 2009).

BPA adalah salah satu bahan kimia yang bertindak sebagai agonis atau antagonis pada reseptor estrogen atau androgen

vertebrata (Flint *et al.*, 2012). Penelitian lain terhadap hewan uji yang diberi paparan BPA menunjukkan bahwa reseptor estrogen (ER) α dan β ditemukan dalam testis. ER- α diekspresikan dalam sel Leydig pada tikus dan mangy. Kehadiran ER- β , pada gilirannya ditemukan dalam sel Sertoli, spermatosit pachytene, dan spermatid bulat dari testis tikus dewasa. ER telah ditunjukkan di jaringan lain pada laki-laki saluran reproduksi (Sakaue *et al.*, 2001).

Penelitian terdahulu yang dilakukan dengan menginduksikan BPA dengan dosis 200 mg/kgbb dapat mengganggu spermatogenesis pada tikus dewasa (Sakaue *et al.*, 2001). Spermatogenesis diatur oleh FSH dan testosteron yang dilepaskan dari sel Leydig sebagai respons terhadap hormon luteinizing (LH). Pada hewan dewasa, androgen bekerja pada sel Sertoli untuk memelihara perkembangan sel germ. FSH merangsang spermatogenesis melalui peningkatan jumlah spermatogonia dan selanjutnya masuknya sel ini ke meiosis. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa penurunan kadar FSH atau testosteron dapat mempengaruhi spermatogenesis dan fungsi reproduksi. BPA dilaporkan dapat menyebabkan efek samping pada organ yang sensitif terhadap estrogen atau androgen dengan mengganggu interaksi hormon reproduksi endogen. Mendiola *et al.*, melaporkan bahwa pada pria subur yang terpapar tingkat rendah BPA menyebabkan penurunan

kadar testosteron yang rendah. Tohei *et al.*, melaporkan bahwa paparan tikus dewasa laki-laki terpapar BPA menyebabkan penurunan konsentrasi hormon testosteron plasma, namun meningkatkan konsentrasi LH. Penelitian lain juga bukti bahwa dosis rendah BPA mengganggu spermatogenesis melalui tidak hanya mengurangi hormon reproduksi tapi juga menginduksi apoptosis sel germ (Jin *et al.*, 2013).

Penelitian lain juga menunjukkan BPA dapat mengganggu fungsi reproduksi dengan menginduksi stres oksidatif di testis dan epididimis, dengan menghambat enzim antioksidan dan merangsang lipid peroksidasi (Pascal *et al.*, 2014).

Dilaporkan juga bahwa BPA dapat menembus penghalang blood-testis dan dapat secara langsung mempengaruhi sel Sertoli dan kemudian mempengaruhi aktivitas dehidrogenase laktat dan dehidrogenase glukosa-6-fosfat, menghasilkan sel-sel spermatogenik yang terlepas dari sel Sertoli dan mempengaruhi perkembangan spermatogenesis (Li *et al.*, 2015) Penelitian lebih lanjut menunjukkan BPA secara konsisten menyebabkan cedera pada testis dan gangguan spermatogenesis, hal ini bukti langsung untuk mendukung toksisitas BPA pada sistem reproduksi laki-laki. Sel-sel Sertoli pada testis melekat erat pada persimpangan dan membentuk Blood Testis Barrier (BTB). Ini persimpangan yang ketat membagi tubulus seminiferus menjadi

dua kompartemen, kompartemen basal dan kompartemen adluminal, yang menghambat jalannya sitotoksik agen ke tubulus seminiferus. Gangguan persimpangan ketat antara sel Sertoli dan sel germinal dianggap berkontribusi terhadap toksisitas reproduksi dari endocrine disruptors (EDs) (Tian *et al.*, 2016).

2.2 Tikus Putih

Tikus adalah binatang yang termasuk ordo *Rodentia*, sub ordo *Myomorpha*, family *Muridae*. Family *Muridae* merupakan family yang dominan dari ordo *Rodentia* karena memiliki daya reproduksi yang tinggi, pemakan segala macam makanan (Omnivorous) dan mudah beradaptasi dengan lingkungan. Tikus putih adalah salah satu hewan uji yang paling banyak digunakan untuk penelitian. Berikut ini klasifikasi taksonomi tikus putih (*Rattus norvegicus L*) yaitu:

Kingdom : Animalia

Filum : Chordata

Subfilum : Vertebrata

Kelas : Mamalia

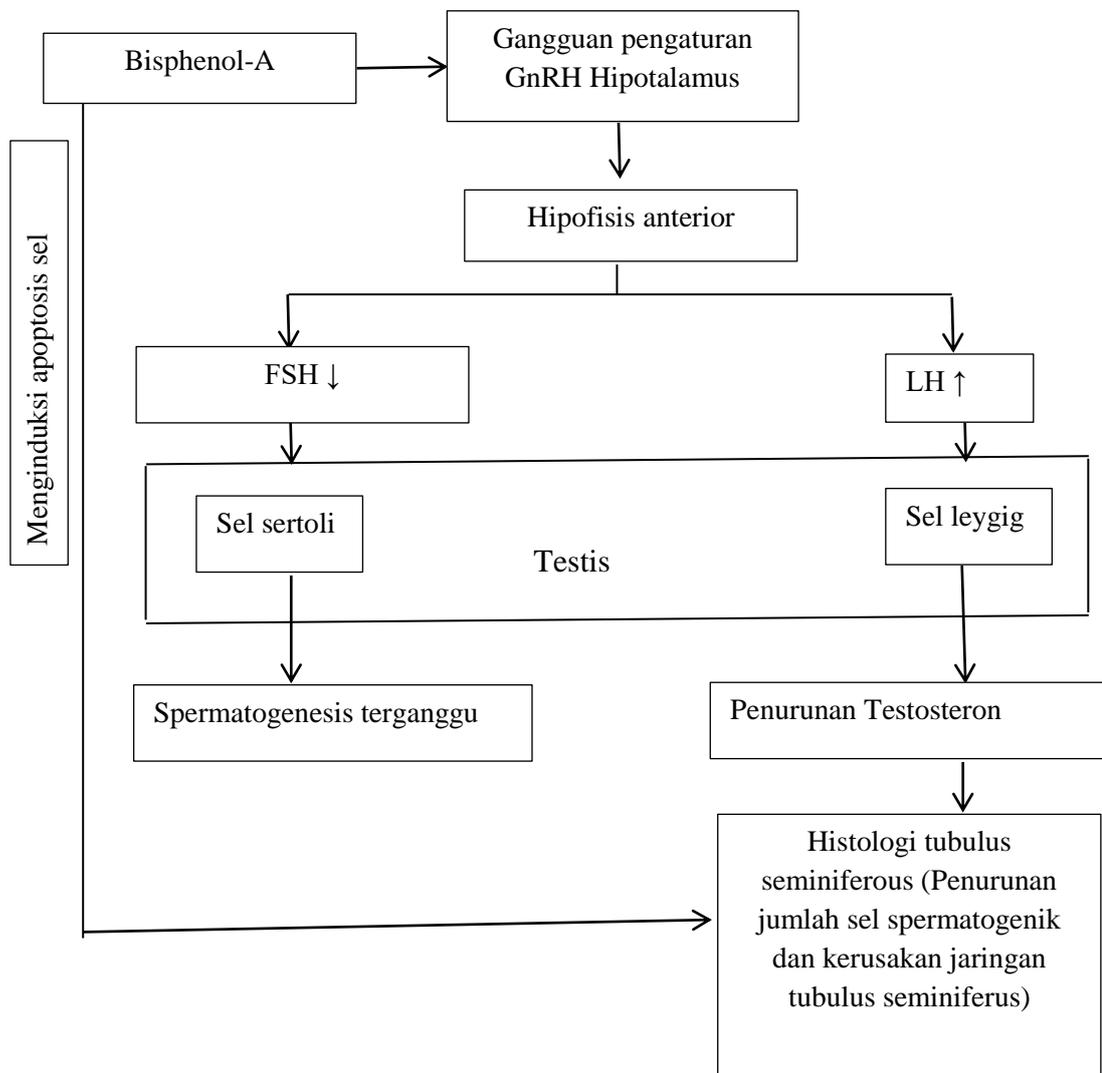
Ordo : Rodentia

Famili : Muridae

Genus : *Rattus*

Spesies : *Rattus norvegicus* (Sadgala, 2010).

2.3 Kerangka Teori



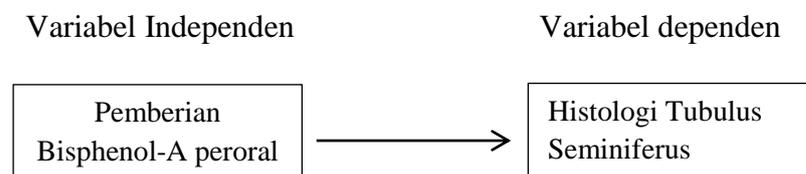
Gambar 7. Kerangka Teori Pengaruh Pemberian Bisphenol-A (BPA) terhadap histologi Tubulus Seminiferus

2.4 Kerangka Konsep

Berdasarkan kerangka teori yang ada, maka diturunkan kerangka konsep pengaruh bisphenol-A terhadap histologi tubulus seminiferus.

Penelitian yang dilakukan dengan menginduksikan BPA secara signifikan menurunkan kadar testosteron dalam plasma. Hal ini menjadi dasar bahwa

rendahnya kadar testosteron plasma akan mengakibatkan gagalnya spermatogenesis dan gangguan pada epitel tubulus seminiferus (Gurmeet *et al.*, 2014). Penelitian lain menunjukkan pemberian yang dilakukan secara subkutan pada tikus jantan dewasa dengan dosis 3 mg BPA/kgbb per hari menyebabkan penurunan testosteron (T) dan peningkatan luteinizing hormone (LH) di kedua serum dan testis (Jahan *et al.*, 2016). Rendahnya testosteron juga bertanggung jawab untuk degenerasi sel berupa proses apoptosis dari sel-sel germinal jantan. Penurunan testosteron ini dapat menyebabkan turunnya nafsu seksual (libido), spermatogenesis, dan diameter tubulus seminiferus. Bila kadar testosteron tinggi atau rendah (di bawah ambang normal) akan berakibat umpan balik negatif ke hipotalamus yang mengakibatkan proses spermatogenesis terganggu (Dikti *et al.*, 2017). Proses spermatogenesis yang terganggu mengakibatkan terjadinya penurunan jumlah sel sperma sehingga tubulus seminiferus mengalami perubahan struktur mikroanatominya seperti penurunan ukuran diameter tubulus seminiferus (Ernawati, 2012). Sebagai ilustrasi kerangka konsep penelitian ini dapat dilihat pada gambar berikut



Gambar 8. Kerangka Konsep Pengaruh Pemberian Bisphenol-A (BPA) terhadap histologi Tubulus Seminiferus

2.5 Hipotesis

Hipotesis penelitian ini adalah

H1: Terdapat pengaruh pemberian bisphenol-A terhadap histologi tubulus seminiferus tikus putih (*Ratus norvegicus*) galur *Sprague dawley*.

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan rancangan *Post Test Only Control Group Design*. Pengambilan data dilakukan hanya pada saat akhir penelitian setelah dilakukannya perlakuan dengan membandingkan hasil pada kelompok yang diberi perlakuan dengan kelompok yang tidak diberi perlakuan (Budiarto, 2004).

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini mencakup pemeliharaan hewan coba yang dilakukan di *Animal House* Fakultas Kedokteran Universitas Lampung dari masa adaptasi, perlakuan, hingga terminasi. Pembedahan untuk pengambilan organ reproduksi tikus jantan yaitu testis dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Pembuatan dan pembacaan preparat dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi dan Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Penelitian ini akan dilakukan kurang lebih selama 21 hari.

3.3 Populasi dan Sampel Penelitian

3.3.1 Populasi

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague dawley* dengan jenis kelamin jantan dewasa dengan usia 11-12 minggu dengan rata-rata berat 200-300 gram. Populasi penelitian ini berasal dari Palembang Tikus Center.

3.3.2 Sampel

Sampel penelitian ini merupakan organ testis tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Sprague dawley* yang telah diberi perlakuan dengan dosis dan dalam kurun waktu tertentu. Besar sampel dapat dihitung dengan metode rancangan acak lengkap (RAL) dapat menggunakan rumus Frederer sebagai berikut:

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

Keterangan:

t= Kelompok perlakuan

n= Jumlah sampel untuk 1 kelompok perlakuan

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

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

$$3(n - 1) \geq 15$$

$$(n - 1) \geq 15:3$$

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

$$n \geq 6$$

Jadi, jumlah sampel yang digunakan pada tiap kelompok adalah 6 ekor tikus putih jantan dewasa serta dikalikan dengan empat perlakuan sehingga jumlah sampel yang diperlukan yaitu 24 ekor tikus.

$$\begin{aligned}\text{Besar sampel (N)} &= txn \\ &= 4 \times 6 \\ &= 24 \text{ ekor tikus}\end{aligned}$$

Untuk menghindari *drop out*, maka setiap kelompok diberi tambahan dengan rumusan sebagai berikut:

$$n' = \frac{n}{1 - f}$$

Keterangan :

n' = Jumlah sampel setelah dikoreksi

n = Jumlah sampel berdasarkan estimasi sebelumnya

f = Prediksi presentase sampel *drop out* (10%)

$$n' = \frac{6}{1 - f}$$

$$n' = \frac{6}{1 - 10\%}$$

$$n' = \frac{6}{0,9}$$

$$n' = 7$$

Jadi di dalam penelitian ini, dibutuhkan 28 tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Sprague dawley* yang dibagi menjadi 4 kelompok masing-masing kelompok terdiri dari 7 ekor tikus.

3.4 Kelompok Perlakuan

Penelitian ini menggunakan 28 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan dibagi random dalam 4 kelompok sampel masing-masing 7 ekor di tiap kelompok dengan nama kontrol, P1, P2, dan P3

1. Kelompok kontrol (K): Kelompok tikus yang tidak diinduksi oleh bisphenol A dan diberi 1 ml minyak jagung
2. Kelompok perlakuan 1 (P1): Kelompok tikus yang diinduksi oleh bisphenol-A sebanyak 100 mg/kgbb per hari
3. Kelompok perlakuan 2 (P2): Kelompok tikus yang diinduksi oleh bisphenol-A sebanyak 200 mg/kgbb per hari
4. Kelompok perlakuan 3 (P3): Kelompok tikus yang diinduksi oleh bisphenol-A sebanyak 400 mg/kgbb per hari

3.5 Kriteria Inklusi dan Eksklusi

Terdapat kriteria inklusi dan eksklusi yang harus dipenuhi dalam pengambilan sampel. Adapun kriteria inklusi sampel yaitu tikus yang akan digunakan pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Tikus sehat
2. Tikus memiliki berat badan 200–300 gram
3. Tikus berjenis kelamin jantan
4. Tikus berusia sekitar 11-12 minggu

Kriteria eksklusi sampel yang akan digunakan pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Tikus mati disela perlakuan (sakit, patah).
2. Terdapat penurunan berat badan lebih dari 10% setelah masa adaptasi di laboratorium.

3.6 Variabel Penelitian

3.6.1 Variabel Bebas (*Independent Variable*)

Pada penelitian ini yang termasuk ke dalam variabel bebas adalah bisphenol-A.

3.6.2 Variabel Terikat (*Dependent Variable*)

Pada penelitian ini yang termasuk ke dalam variable terikat adalah histologi tubulus seminiferus tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague dawley*.

3.7 Definisi Operasional

Tabel 3. Definisi Operasional

No	Variabel	Definisi	Cara Ukur	Skala Ukur	Alat Ukur	Hasil Ukur
1	Bisphenol-A	Bahan kimia peroral yang diberikan pada tikus jantan berat 200 gram dengan dosis 100 mg/kgbb, 200 mg/kgbb, 400 mg/kgbb pada masing-masing kelompok perlakuan	BPA dilarutkan dalam minyak jagung sampai konsentrasi tertinggi dan dijadikan larutan stok, dibuat sekali seminggu, didistribusikan dalam botol, ditutup dengan sumbat gabus, lalu disimpan sampai digunakan. Pada saat pemberian, volume larutan BPA	Numerik	Sputit	Dosis 1=100 mg/kgbb, dosis 2= 200 mg/kgbb, dosis 3= 400 mg/kgbb

No	Variabel	Definisi	Cara Ukur	Skala Ukur	Alat Ukur	Hasil Ukur
			dipenuhi dengan minyak jagung hingga 1 ml per tikus per pemberian. Kelompok kontrol hanya diberi 1 ml minyak jagung.			
2	Histologi Tubulus Seminiferus tikus	Analisis histologi, diameter tubulus seminiferus, jumlah sel-sel spermatogenik (spermatosit primer, spermatid)	Dihitung rata-rata diameter tubulus seminiferus dalam setiap preparat dan dihitung jumlah sel spermatogenik (spermatosit primer dan spermatid) pada 4 lapang pandang dalam setiap preparat. Diameter tubulus seminiferus merupakan panjang ujung membran basal luar sampai ujung membran basal luar. Rata-rata diameter satu tubulus adalah diameter horizontal dan vertikal yang tegak lurus dibagi dua.	Numerik	Mikroskop dan preparat histologi testis tikus (μm)	Didapatkan diameter tubulus seminiferus (μm) dan jumlah sel spermatogenik

3.8 Alat dan Bahan Penelitian

3.8.1 Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain:

1. Kandang tikus yang terdiri dari bak plastik sebanyak 8 kandang
2. Botol yang tutupnya diberi pipa aluminium sebagai tempat minum tikus
3. Neraca ukur
4. Mikroskop
5. Sonde lambung
6. Spuit
7. *Cover glass*
8. *Object glass*
9. *Embedding cassette*
10. Scapel
11. Kapas
12. Seperangkat alat bedah (*dissecting set*)
13. Handschoon dan masker
14. Toples
15. *Rotatory microtom*

3.8.2 Bahan

Bahan atau komponen yang digunakan dalam penelitian ini antara lain:

1. Tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) yang memenuhi kriteria inklusi
2. Bisphenol-A

3. Minyak jagung
4. Pelet ayam
5. Minum tikus
6. Alkohol 70-100%
7. Sekam untuk kandang tikus
8. Hematoksin 10% (H.E)
9. Minyak emersi
10. Formaldehid 10 %
11. Alkohol 70%
12. Alkohol 96%
13. Alkohol absolut
14. Xylol I dan II

3.9 Prosedur

3.9.1 Ethical Clearence

Penelitian ini dimulai dengan mengajukan proposal *ethical clearance* ke Fakultas Kedokteran Universitas Lampung untuk mendapatkan izin etik penelitian menggunakan tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan *Sprague dawley*. Prinsip etika dalam menggunakan hewan coba untuk penelitian harus memenuhi prinsip 3R yaitu *replacement*, *reduction*, *refinement* dan prinsip 5F (*Freedom*).

1. *Replacement*

Keperluan memanfaatkan hewan percobaan telah diperhitungkan secara seksama, baik pengalaman terdahulu maupun literature untuk

menjawab pertanyaan penelitian dan tidak dapat digantikan oleh makhluk hidup lain seperti sel atau biakan jaringan.

2. *Reduction*

Pemanfaatan hewan dalam penelitian sesedikit mungkin, tetapi tetap dapat mendapatkan hasil yang optimal. Dalam penelitian ini sampel dihitung berdasarkan rumus Rancangan Acak Lengkap Frederer yaitu $t(n-1) \geq 15$, dimana t merupakan jumlah kelompok percobaan dan n merupakan jumlah pengulangan atau jumlah sampel tiap kelompok.

3. *Refinement*

Memperlakukan hewan percobaan secara manusiawi dengan prinsip dasar membebaskan hewan percobaan dalam beberapa kondisi, yaitu sebagai berikut.

- a. Bebas dari rasa lapar dan haus, dalam penelitian ini hewan percobaan diberikan pakan dan minum standar secara *ad libitum*.
- b. Bebas dari ketidaknyamanan, dalam penelitian ini hewan coba ditempatkan di *animal house* dengan suhu terjaga 20-25°C, kemudian hewan coba terbagi menjadi 4 ekor tiap kandang. *Animal house* berada jauh dari gangguan bising dan aktivitas manusia serta kandang dijaga kebersihannya, sehingga dapat mengurangi stress pada hewan coba.
- c. Bebas dari nyeri dan penyakit. Dengan menjalankan program kesehatan, pencegahan, dan pemantauan, serta pengobatan terhadap hewan coba jika diperlukan, pada penelitian hewan coba

diberikan perlakuan dilakukan dengan mengurangi rasa nyeri sesedikit mungkin, dosis perlakuan diberikan berdasarkan pengalaman terdahulu maupun literatur yang telah ada (Ridwan, 2013).

3.9.2 Pemeliharaan Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus putih (*Ratus norvegicus*) jantan usia 11-12 minggu dengan berat 200-300 gram dan sehat. Hewan uji diletakkan pada kandang yang terbuat dari wadah plastik dengan ventilasi udara, alasnya dilapisi oleh sekam padi dengan ketebalan 2-3 cm yang diganti setiap hari agar kebersihan kandang terjaga dan hewan uji terhindar dari infeksi akibat perkembangan mikroorganisme yang berasal dari kotoran hewan uji. Dalam satu kelompok terdapat 7 ekor tikus ditempatkan dalam satu kandang. Kondisi kandang berada pada suhu kamar dan kelembaban alamiah dengan cahaya yang dikondisikan dengan 12 jam terang (pukul 06.00-18.00 WIB), dan 12 jam gelap (18.00-06.00 WIB). Hewan uji mendapat nutrisi dari makanan yang berupa pelet ayam. Makanan dan minuman ditempatkan dalam wadah terpisah dan diberikan secukupnya serta diganti setiap hari. Setiap tikus mendapat perlakuan sekali sehari pada waktu pagi hari selama 21 hari.

3.9.3 Persiapan Hewan Uji

Sebelum diberi perlakuan, hewan uji dikenalkan dengan kondisi lingkungan yang baru untuk adaptasi selama satu minggu di tempat

pemeliharaan hewan *Animal House* Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Setiap hewan uji ditimbang berat badannya dan diperhatikan kesehatannya yang terlihat dari warna dan kondisi bulu yang bersih dan tidak rontok, gerak tikus yang aktif, warna telinga, dan ekstremitas yang merah dan tidak pucat, serta tidak ada tanda penurunan berat badan merupakan tanda tikus yang sehat, kecukupan nutrisi berupa makanan dan minuman yang terpenuhi serta kebersihan kandang yang selalu dijaga.

3.9.4 Penyediaan bisphenol-A

Bisphenol-A digunakan dengan dosis 100 mg/kgbb, 200 mg/kgbb, 400 mg/kgbb dari Pusat Penelitian Kimia LIPI di Tangerang Selatan. BPA dilarutkan dalam minyak jagung sampai konsentrasi tertinggi dan dijadikan larutan stok, didistribusikan dalam botol, ditutup dengan sumbat gabus, lalu disimpan sampai digunakan. Pada saat pemberian, volume larutan BPA dipenuhi dengan minyak jagung hingga 1 ml per tikus per pemberian. Kelompok kontrol hanya diberi 1 ml minyak jagung. Dosis BPA yang akan diinduksikan adalah sebanyak untuk 100 mg/kgbb, 200 mg/kgbb, 400 mg/kgbb per masing-masing kelompok perlakuan. Penentuan dosis pada penelitian ini mengacu pada penelitian yang dilakukan Gurmet *et al*, 2014 mengamati efek pemberian oral BPA pada perkembangan organ reproduksi dan kadar hormon seks plasma pada tikus Sprague-Dawley (SD) jantan. Pada penelitian ini diberikan BPA dalam dosis 1, 5, 10 dan 100 mg/kgBB melalui gavage oral untuk jangka waktu 6 minggu. Hasilnya pada tikus yang diberikan

BPA dengan dosis 100 mg/kgBB secara oral selama 42 hari terbukti menurunkan kadar testosteron, peluruhan sel germinal dan mengganggu spermatogenesis (Gurmett., *et al* 2014). Untuk itu, berdasarkan penelitian sebelumnya pada penelitian ini digunakan dosis 100 mg/kgbb, 200 mg/kgbb dan 400 mg/kgbb untuk diinduksikan secara oral pada tikus selama 21 hari untuk melihat pengaruhnya terhadap tubulus seminiferus tikus putih. Selanjutnya penentuan dosis yang digunakan per tikus jika tikus berat badan 200 gram.

Perlakuan 1

$$\begin{aligned} &= \text{dosis} \times \text{berat badan} \\ &= 100 \text{ mg/kgBB} \times 200 \text{ gr} \\ &= 100/1000 \text{ gr} \times 200 \text{ gr} \\ &= 2000 \text{ gr} = 20 \text{ mg} \end{aligned}$$

Perlakuan 2

$$\begin{aligned} &= \text{dosis} \times \text{berat badan} \\ &= 200 \text{ mg/kgBB} \times 200 \text{ gr} \\ &= 200/1000 \text{ gr} \times 200 \text{ gr} \\ &= 4000 \text{ gr} = 40 \text{ mg} \end{aligned}$$

Perlakuan 3

$$\begin{aligned} &= \text{dosis} \times \text{berat badan} \\ &= 400 \text{ mg/kgBB} \times 200 \text{ gr} \\ &= 400/1000 \text{ gr} \times 200 \text{ gr} \\ &= 8000 \text{ gr} = 80 \text{ mg} \end{aligned}$$

3.9.5 Pemberian perlakuan

Dalam 5 kelompok sampel, terdapat 5 ekor hewan uji di tiap kelompok dengan nama kontrol, P1, P2, P3 dan P4 yaitu:

1. Kontrol: tidak diinduksi bisphenol-a dan diberi 1 ml minyak jagung
2. P1 : diinduksi bisphenol A sebanyak 100 mg/kgbb per hari
3. P2 : diinduksi bisphenol A sebanyak 200 mg/kgbb per hari
4. P3 : diinduksi bisphenol A sebanyak 400 mg/kgbb per hari

3.9.6 Proses pembedahan

Setelah hewan uji diberi perlakuan selama 21 hari, masing-masing hewan uji dianestesi. Lalu dilakukan dislokasi servikal. Alat bedah seperti gunting, jarum, pinset, dan bak parafin, pisau bedah dipersiapkan.

Terminasi tikus dilakukan setelah dilakukannya perlakuan terakhir. Tikus diterminasi dengan cara *cervical dislocation*. Cara melakukan *cervical dislocaion* ini terhadap tikus yaitu dengan meletakkan ibu jari dan jari telunjuk di setiap sisi leher pada dasar tengkorak untuk memberi tekanan ke bagian posterior dasar tulang tengkorak dan sumsum tulang belakang, sementara tangan lainnya pada bagian ekor lalu ditarik dengan cepat sehingga terjadi pemisahan vertebra servikal dari tengkorak dan terjadi pemisahan sumsum tulang belakang dari otak. Setelah itu dilakukan pembedahan pada tikus untuk mengambil testisnya. Dilanjutkan dengan memasukan jaringan tersebut ke dalam tabung penyimpanan organ dan di masukkan dalam lemari es dengan

suhu sebesar -4°C selama 1 hari, setelah itu masukan dalam *upright freezer* pada suhu -80°C (Haqiqi, 2015).

Setelah perlakuan pada tiap kelompok selesai, hewan coba dikorbankan dengan dislokasi leher kemudian diambil testis sebelah kanan saja untuk keseragaman dan dimasukkan ke dalam fiksatif (larutan bouin). Kemudian spesimen ini diproses untuk dibuat sediaan histologik dengan metode parafin. Sediaan diwarnai dengan metode pewarnaan hematoxilin eosin.

Tikus dianestesi menggunakan ketamin Ketalar® dosis 10 mg/kg bb, kemudian diukur berat badannya menggunakan timbangan hewan digital Ohaus®). Tikus kemudian dibedah, testis diambil, dibilas dengan larutan garam fisiologis (NaCl 0,9 %). Testis difiksasi dalam larutan Bouin dan diproses untuk pembuatan preparat histologis metode parafin dengan pewarnaan Ehrlich's Hematoxylin & Eosin. Preparat diiris menggunakan *rotary microtome* dengan tebal irisan $4\ \mu\text{m}$ untuk pengamatan spermatogenesis dengan cara mencacah secara manual spermatogonia, spermatosit, dan spermatid pada tubuli seminiferi *stage* VII (Fitria, 2015).

3.9.7 Pengambilan dan penimbangan organ testis hewan uji

Setelah rangkaian proses pembedahan, testis diambil dengan pinset yang telah dipersiapkan. Kemudian organ testis hewan uji ditempatkan pada aluminium foil dan lemak dipisahkan dari organ testis.

3.9.8 Pembuatan Preparat Histologi

Preparat histologi jaringan testis dibuat di Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Proses pembuatan dilakukan dalam beberapa tahapan sesuai buku panduan laboratorium histopatologi UGM oleh Yunadir; 2008 yaitu fiksasi, trimming, dehidrasi, clearing, infiltrasi parafin, embedding, cutting, inkubasi, dan staining.

3.9.9 Fiksasi

Fiksasi bertujuan untuk mempertahankan struktur sel sel sehingga menjadi stabil secara fisik dan kimiawi dan mencegah terjadinya dialysis atau pembengkakan pada ruptur dan kerusakan jaringan, dengan membuat kestabilan dari unsur-unsur yang dimiliki jaringan testis. Fiksasi yang umum dipakai adalah formalin 10%. Jaringan dari testis yang telah dibedah dan difiksasi menggunakan larutan formalin 10% dengan perbandingan volume spesimen dan larutan 1:10 agar hasil optimal. Fiksasi yang sempurna akan mempercepat kerja alkohol dalam dehidrasi. Keuntungan lain dari fiksasi adalah mengurangi resiko terkena infeksi bagi yang mengerjakannya.

3.9.10 Trimming

Organ yang telah difiksasi kemudian dicuci di bawah air mengalir setelah itu dipangkas sedikit ke tengah dengan ketebalan 2-4 mm. Secara histologi, tubulus seminiferus paling banyak dan jelas berada

ditengah testis. Lalu potongan dimasukkan dalam *embedding cassette* dan dicuci kembali dibawah air mengalir.

3.9.11 Dehidrasi

Dehidrasi merupakan serangkaian proses yang dikerjakan berurutan, diawali dengan pemberian alkohol 70% selama 1,5 jam, diikuti alkohol 80%, kemudian diberi alkohol 90% dan 96% masing-masing dalam waktu 1,5 jam. Dehidrasi berfungsi untuk menghilangkan/ menarik kadar air dalam jaringan dengan cara mulai konsentrasi rendah sampai tinggi.

3.9.12 Clearing

Setelah itu dilakukan proses penjernihan atau *clearing* dengan memakai xylol. *Clearing* berfungsi untuk menarik keluar kadar alkohol yang berada dalam jaringan, memberikan warna yang bening pada jaringan dan juga sebagai zat perantara masuknya kedalam paraffin / zat padat.

3.9.13 Infiltrasi paraffin

Paraffin cair suhu 57 – 59°C berfungsi mengisi rongga-rongga atau pori-pori yang ada pada jaringan setelah ditinggalkan oleh cairan sebelumnya (xylol). Sebaiknya pada paraffin cair ini jangan lebih dari 4 jam dan suhu melebihi 60°C karena jaringan menjadi kering dan keras jika dipotong dengan mikrotom akan mendapatkan hasil potongan pecah-pecah atau bergelombang dan saat pengecatan dimungkinkan lepas dari objek glass. Proses ini menggunakan oven

bersuhu 56°C. Selama 60 menit organ testis dimasukkan dalam campuran taluolparafin dengan perbandingan 1:1. Setelah itu bertahap dimasukkan dalam paraffin murni I selama 60 menit dan paraffin murni II selama 60 menit.

3.9.14 Embedding

Embedding atau pengeblokan dilakukan dengan cara jaringan dimasukkan ke dalam cetakan blok yang sebelumnya sudah diisi dengan paraffin cair (paraffin blok) kemudian etiket / nomor registernya ditempelkan dipinggirnya. Kemudian setelah keras + 20 menit, cetakan dilepas dan diganti dengan etiket / nomor yang permanen.

3.9.15 Cutting

Sebelum dipotong dengan mikrotom sebaiknya blok didinginkan dahulu dengan cara diberi batu es atau dimasukkan dalam plastik yang sudah berisi air terus masukkan dalam freezer ±15 menit. Blok dijepitkan pada mikrotom kemudian dipotong dengan pisau mikrotom dengan kemiringan ±30° terhadap blok parafin setebal ±2-5 mikron. Hasil pemotongan yang berupa pita dimasukkan kedalam *waterbath* yang mana sebelumnya sudah diisi dengan air yang dihangatkan + 50°C, kemudian diambil dengan objek glass dan diberi nomor dengan penil kaca sesuai dengan nomor registrasi blok, dibiarkan ±5 menit kemudian diinkubasi.

3.9.16 Inkubasi

Inkubasi ini berfungsi untuk menguapkan kadar air yang terbawa oleh hasil potongan sehingga jaringan menempel kuat pada objek glass. Preparat diinkubasi di atas *hot plate* dengan suhu 50°C selama 15 menit.

3.9.17 Staining

Proses selanjutnya setelah jaringan melekat sempurna yaitu pewarnaan dengan diberikan zat warna Haematoxilin-Eosin dengan beberapa tahapan seperti memasukkan slide ke dalam xylol, alkohol, aquades, haematoxilin, serta eosin.

3.9.18 Pembacaan preparat

Spesimen jaringan testis berupa preparat yang telah ditutup cover glass dilihat menggunakan mikroskop di Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung.

Pemeriksaan histopatologi testis menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 100 kali (10x10) dan 400 kali (10x40). Sediaan histologi testis kemudian difoto dengan kamera mikroskopis digital (Optilab®) dengan *software*

Optilab Viewer (Micronos®). Pengukuran tebal epitel tubulus seminiferus testis dilakukan pada tubulus seminiferus yang utuh dan bundar secara acak dengan *software* Image Raster (Micronos®).

3.11 Analisis Data

Kelompok penelitian terdiri dari 4 kelompok yaitu 3 kelompok perlakuan dan 1 kontrol. Data yang terkumpul pada tiap kelompok dianalisis menggunakan program SPSS Version 22.0.0.0 *for windows 64 bit* serta menggunakan uji Anova untuk menguji perbedaan rerata pada kelompok perlakuan dan kelompok kontrol. Hasil penelitian dianalisis secara statistik dengan uji normalitas (*Shapiro-Wilk*) dan homogenitas (*Levene*). Jika varian data distribusi normal serta homogen, maka dilanjutkan dengan metode *one way Anova*. Hipotesis akan dianggap bermakna bila $p < 0,05$, maka dilanjutkan dengan melakukan analisis *Post Hoc LSD* (Dahlan, 2011).

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan dari penelitian ini adalah :

1. Pemberian bisphenol-A dapat mengganggu proses spermatogenesis .
2. Pemberian bisphenol-A berpengaruh terhadap jumlah rerata spermatosit primer dan diameter tubulus seminiferous pada tikus putih jantan galur Sprague dawley dimulai pada dosis 100 mg/KgBB dan berpengaruh juga terhadap jumlah spermatid yang dimulai dari dosis 200 mg/KgBB.

5.2 Saran

Adapun saran yang dapat disampaikan dari penelitian ini adalah :

1. Penelitian selanjutnya disarankan untuk mencari efek samping jangka panjang dari pemberian bisphenol-A.
2. Penelitian selanjutnya disarankan untuk meneliti pengaruh pemberian bisphenol-A terhadap organ lain.

DAFTAR PUSTAKA

- Aschberger K, Castello P, Hoekstra E, Kaarakitsios S, Munn S, Pakalin S, et al. 2010. Bisphenol A and baby bottles: challenges and perspective. JRC Scientific and Technical Reports EUR 24389 EN. Luxembourg : Publication Office of the European Union.
- Balasubramanian K ES. 2014. Evaluation of antifertility potential of the Aqueous Extract of *Ocimum sanctum* leaves on the testicular histology of *Rattus norvegicus* Asian J Biochem Pharm Res. 4(2):20- 29.
- Birnbaum LS, Bucher JR, Collman GW, Zeldin DC, Johnson AF, Schug TT, et al. 2012. Consortium-based science: The NIEHS's multipronged, collaborative approach to assessing the health effects of Bisphenol A. Environmental Health Perspectives, 120(12), 1640–44. <https://doi.org/10.1289/ehp.12053300>.
- Budiarto E. 2004. Metodologi Penelitian Kedokteran: Sebuah Pengantar. Jakarta: EGC.
- Carlisle J. 2009. Toxicological Profile for Bisphenol-A. Integrated Risk Assessment Branch Office of Environmental Health Hazard Assessment California Environmental Protection Agency.
- Dahlan S. 2011. Statistik untuk kedokteran dan Kesehatan Edisi 5. Jakarta: Salemba Medika.
- Dikti K, No RIS , Ngurah IG, Dewantara A, Jimbaran B. 2017. Histologi Tubulus Seminiferus dan Kadar Testosteron Tikus yang Diberi Pakan Imbuhan Tepung Daun Kaliandra dan Kulit Nanas, 18(36), 369–77. <https://doi.org/10.19087/jveteriner.2017.18.3.369>
- Ernawati, AN. 2012. Efek Antioksidan Ekstrak Etanol Bulbus Bawang Dayak (*Eleutherine Americana* Merr.) Terhadap Struktur Mikroanatomi Tubulus Seminiferus Testis Tikus Yang Dipapar Asap Rokok. [Skripsi]. Program Studi Biologi FMIPA Universitas Lambung Mangkurat. Kalimantan Selatan.
- Eroschenko VP. 2008. Atlas Histologi: Dengan Korelasi Fungsional, Edisi ke-11. Penerjemah: Brahm, UP. Jakarta: EGC.

- Fitria L, Tiraya CUTM, Andreas DAN. 2015. Profil Reproduksi Jantan Tikus (*Rattus norvegicus* Berkenhout , 1769) Galur Wistar Stadia Muda , Pradewasa , dan Dewasa, 29–36.
- Flint S, Markle T, Thompson S, Wallace E. 2012. Bisphenol A exposure, effect, and policy: A wildlife pespective. *J Environ Manage* 104:19-34
- Gartner LP. 2007. *Concise Histology*. Jakarta : Philadelphia.
- Ghazzawy IFE, Meleis AE, Farghaly EF, Solamain A. 2011. Histological study ofthe possible protective effect of pomegranate juice on bisphenol-A induced changes of the caput epididymal epithelium and sperms of adult albino rats. *Alexandria J Med*;47(2):125-37.
- Gurmeet, I Rosnah, MK Normadiyah, Srijit Das AM. 2014. Detrimental effects bisphenol a on development and functions of the male reproductive system in experimental rats. *EXCLI Journal*, 151–60.
- Guyton AC, JE Hall. 2013. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran*. Edisi kedua belas. Jakarta. EGC
- Hauser R, Gaskins AJ, Hospital MG, Medical H. 2017. HHS public access. effects of bisphenol a on male and couple reproductive health: A Review, 106(4), 864–70. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.07.1118>.
- Haqiqi FN. 2015. Pengaruh madu bee pollen terhadap gambaran histopatologi gaster tikus putih jantan galur Sprague dawley yang diinduksi ibuprofen [skripsi]. Lampung: Universitas Lampung. Hlm. 33.
- Helal E, Badawi M, Soliman M, Nadia AK, Hewaida F. 2013. Physiological and Histopathological studies on Bisphenol-A compound as xenoestrogen in male albino rats. *The Egyptian Journal of Hospital Medicine*. 50: 127 – 36.
- Jahan S, Ain QU, Ullah H. 2016. Systems Biology in Reproductive Medicine Therapeutic effects of quercetin against bisphenol A induced testicular damage in male Sprague Dawley rats Therapeutic effects of quercetin against bisphenol A induced testicular damage. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 62(2), 114–24. <https://doi.org/10.3109/19396368.2015.1115139>
- Jin P, Wang X, Chang F, Bai Y, Li Y, Zhou R, et al. 2013. Low dose bisphenol A impairs spermatogenesis by suppressing reproductive hormone production and promoting germ cell apoptosis in adult rats. *Journal of Biomedical Research*, 27(2), 135–44. <https://doi.org/10.7555/JBR.27.20120076>.
- Konieczna A, Rutkowska A, & Rachoń D. 2015. Health Risk of Exposure To Bisphenol a (Bpa). *Department of Clinical and Experimental Endocrinology, Poland*, 66(1), 5–11.
- Li Y, Duan F, Yang F, Zhou X, Pan H, Li Y. 2015. Pubertal exposure to

- bisphenol A affects the reproduction of male mice and sex ratio of offspring. *Journal of Reproduction and Contraception*, 26(1), 14–21. <https://doi.org/10.7669/j.issn.1001-7844.2015.01.0014>.
- Liu C, Duan W, Li R, Xu S, Zhang L, Chen C, et al. 2013. Exposure to bisphenol A disrupts meiotic progression during spermatogenesis in adult rats through estrogen-like activity. *Exposure to bisphenol A disrupts meiotic progression during spermatogenesis in adult rats through estrogen-like activity. Cell Death and Disease*, 4(6). <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.203>.
- Lous. 2013. Survey of Bisphenol A and diglycidylether polymer. Denmark: The Danish Environmental Protection Agency.
- Mescher AL. 2015. Terjemahan Histologi Dasar Junqueira, Teks dan Atlas, Edisi 12. Jakarta: EGC.
- Mikołajewska K, Stragierowicz J, Gromadzińska J. 2015. Bisphenol A – Application, sources of exposure and potential risks in infants, children and pregnant women. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health*, 28(2), 209–41. <https://doi.org/10.13075/ijomeh.1896.00343>.
- Mileva, Guergana LB, Stephanie, Konkle, Anne TM. 2014. Bisphenol-A: Epigenetic reprogramming and effects on reproduction and behavior. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 37-61.
- Munir B, Qadir A, Tahir M. 2017. Negative effects of bisphenol-A on testicular functions in albino rats and their abolitions with Tribulus terrestris L Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. <https://doi.org/10.1590/s2175-97902017000300104>
- Nanjappa MK, Simon L, Akingbemi BT. 2012. The industrial chemical bisphenol-A(BPA) interferes with proliferative activity and development of steroidogenic capacity in rat Leydig cell. *Biomol Reproduction*. 86:135, 1-12.
- Nakamura D, Yanagiba Y, Duan Z, Ito Y, Okamura A, Asaeda N, et al. 2010. Bisphenol A may cause testosterone reduction by adversely affecting both testis and pituitary systems similar to estradiol. *Toxicology Letters*, 194(1–2), 16–25. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2010.02.002>
- National Toxicology Program (NTP). 2008. NTP-CERHR monograph on the potential human reproductive and developmental effects of bisphenol A. *Ntp Cerhr Mon.*, 22(08), 1–321.
- Norazit A, Mohamad J, Razak SA, Abdulla MA, Azmil A. 2012. Effects of soya bean extract bisphenol A and 17 β -estradiol on the testis and circulating

levels of testosterone and estradiol among peripubertal juvenile male sprague-dawley rats. *Sains Malaysiana*. 41(1):63-69.

- Park B, Kwon JE, Cho SM, Kim CW, Koo YT, Lee SH, et al. 2018. Protective effect of *Lespedeza cuneata* ethanol extract on Bisphenol A-induced testicular dysfunction in vivo and in vitro. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 102:76-85.
- Pascal F, Manfo T, Jubendradass R, Nantia EA, Moundipa PF, Mathur PP. 2014. Adverse effects of bisphenol a on male reproductive function. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-01619-1>.
- Peretz J, Gupta RK, Singh J, Hernandez-Ochoa I, Flaws JA. 2011. Bisphenol A impairs follicle growth inhibits steroidogenesis and downregulates rate-limiting enzymes in the estradiol biosynthesis pathway. *Toxicol Sci* ;119(1):209-217.
- PPLH. 2007. Pendidikan Lingkungan Serial Global Warming. Seloliman: Divisi Penerbitan dan Dokumentasi Pusat Pendidikan Latihan Hidup (PPLH).
- Qiu Z, Wang L, Zhou Q. 2013. Effects of bisphenol A on growth, photosynthesis and chlorophyll fluorescence in above-ground organs of soybean seedlings. *Chemosphere* 90: 1274–80.
- Rahman MS, Kwon WS, Lee JS, Yoon S J, Ryu BY, Pang MG. 2015. Bisphenol-affects male fertility via fertility-related proteins in spermatozoa. *Scientific Reports*, 5(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep09169>.
- Ridwan E, 2013. Etika pemanfaatan hewan percobaan dalam penelitian kesehatan. *Journal Indonesian Medical Assosiation*, 63(3): 112–6.
- Rykowska I , Wasiak W. 2006. Properties, threats, and methods of analysis of bisphenol-a and its derivates. *Acta Chromatographica* No. 16(16).
- Sadgala Y. 2010. Merawat Hamster. Jakarta: PT Agromedia Pustaka.
- Sakaue M, Ohsako S, Ishimura R, Kurosawa S, Kurohmaru M, Hayashi Y, et al. 2001. Bisphenol-a affects spermatogenesis in the adult rat even at a low dose. *Journal of Occupational Health*, 43(4), 185–90. <https://doi.org/10.1539/joh.43.185>
- Sakuma S, Nakanishi M, Morinaga K, Fujitake M, Wada S, Fujimoto Y. 2010. A 3,4-quinone induces the conversion of xanthine dehydrogenase into oxidase in vitro. *Food Chem Toxicol*;48:2217-22.
- Salter E. 2000. Bisphenol A. Bisphenol a a known endocrine disruptor, WWF europe. Head of European Toxics Programme, Panda House, Weyside Park.
- Sherwood L. 2014. Fisiologi manusia Dari Sel ke Sistem Edisi 8. Jakarta: EGC.

- Schierow, Linda J, Lister, Sarah A. 2010. Bisphenol-A(BPA) in plastics and possible human health effect. Congressional Research Service.
- Sikka S. 2004. Role of oxidative stress and antioxidant in andrology. *Journal of Andrology*;25 (1) 2699-722.
- Tian J, Ding Y, She R, Ma L, Du F, Xia K, et al. 2016. Histologic study of testis injury after bisphenol a exposure in mice: Direct evidence for impairment of the genital system by endocrine disruptors. *Toxicology and Industrial Health*, 33(1), 36–45. <https://doi.org/10.1177/0748233716658579>.
- Tomáš J, Bistáková J, Greifová H, TE and LN. 2017. Male reproduction: One of the Primary Targets of Bisphenol A. *Bisphenol A Exposure and Health Risks* Young, 27–44. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.68629> 43
- Tremellen K. Oxidatif stress and male infertility-a clinical perspective. *Oxford Journal*; 14(3):243-58
- Ulfa FM, Fika YP, Dewi KS. 2018. Gambaran Histopatologi Testis Kucing Domestik Jantan (*Felis domestica*) Yang Diinduksi Bisphenol-A Peroral. *Jurnal Riset Veteriner Indonesia*, 2(1), 8–18.
- Vendramini, Cerri ES, Miraglia SM. 2010. Aminofostin reduces the seminiferous epithelium damage in Doxorubicin-treated prepubertal rats without improvibg the fertiitiy status. *Reproduction Bio Endocrinol*. 8:3-14.
- Wang C, Zhang J, Li Q, Zhang T, Deng Z, Lian J, et al. 2017. Low concentration of BPA induces mice spermatocytes apoptosis via GPR30. *Oncotarget* 8:49005.
- Weinbauer, G. F., & Luetjens, C. M. 2010. Physiology of testicular function. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-78355-8>.
- WHO, F. and A. O. of the U. N. 2010. Toxicological and health aspects of bisphenol a. World Health Organization, 60.
- World Health Orgazation. 2009. Bisphenol a (BPA) - Current state of knowledge future actions by WHO and FAO. International Food Safety Authorities Network (INFOSAN).
- Yang Y, Lee S, Kim K, Hong Y. 2010. Acute testis toxicity of bisphenol-A diglycidyl ether in Sprague-Dawley Rats. *Journal of Preventive Medicine and Public Health*, 43(2), 131–37. <https://doi.org/10.3961/jpmph.2010.43.2.131>
- Yama OE. 2011. Sperm Qoutient in Sprague Dawley Rats Fed Graded Doses of Seed Extract of *Momordica charantia*. *Middle East Fertility Society Journal* 16: 152-8.

- Yunadir. 2008. Buku Panduan Laboratorium Histopatologi. Yogyakarta: Universitas Gajah Mada.
- Yuyun A, Gunarsa D. 2011. Cerdas Mengemas Produk Makanan dan Minuman. Jakarta: PT Agromedia Pustaka.
- Zang Z, Ji S, Xia T, Huang S. 2016. Effects of bisphenol-A on testosterone Levels and Sexual Behaviors of Male Mice, 41–49. <https://doi.org/10.4236/asm.2016.64006>
- Zhang Z, Alomirah H, Cho HS, Li YF, Liao C, Minh TB, et al. 2011. Urinary bisphenol a concentrations and their implications for human exposure in several Asian countries. *Environmental Science and Technology*, 45(16), 7044–50. <https://doi.org/10.1021/es200976k>.