

NEKROSIS SEL SPERMATOSIT PRIMER DAN ATRESIA FOLIKEL VITELOGENIK PADA *Danio rerio* DEWASA AKIBAT PAPARAN *Kadmium Klorida* (CdCl_2)

Ayu Puspita Muclisin, Ariani Ratri Dewi, Noer Aini*
Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang

ABSTRAK

Pendahuluan: Kadmium merupakan logam kimia yang digunakan secara luas dalam proses industri. Kadmium pada *Danio rerio* menyebabkan degenerasi sel spermatogenik testis dan memicu apoptosis sel granulosa ovarium. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui perbandingan efek paparan subkronis berbagai dosis CdCl_2 terhadap histopatologi nekrosis sel spermatosit primer dan atresia folikel vitelogenik secara kuantitatif pada *Danio rerio*.

Metode: Penelitian ini menggunakan *Danio rerio* jantan dan betina dewasa yang masing-masing terdiri dari 4 kelompok perlakuan yaitu kelompok kontrol serta kelompok dosis CdCl_2 0.5, 1 dan 1.5 ppm. Paparan dilakukan selama 1 bulan. Preparat testis dan ovarium diwarnai dengan *Hematoxylin and Eosin* dan diamati dengan mikroskop binokuler. Analisis data menggunakan *One Way ANOVA* dan dilanjutkan dengan *Post Hoc Test LSD* ($p < 0,05$).

Hasil: Paparan CdCl_2 dengan dosis 0.5, 1 dan 1.5 ppm meningkatkan jumlah nekrosis sel spermatosit primer pada testis *Danio rerio* jantan dewasa sebesar 50%, 68%, dan 79% dibandingkan dengan kelompok kontrol. Pada paparan CdCl_2 dengan dosis 0.5, 1 dan 1.5 ppm juga meningkatkan jumlah atresia folikel vitelogenik pada ovarium *Danio rerio* betina dewasa sebesar 46%, 63%, dan 77% dibandingkan dengan kelompok kontrol.

Kesimpulan: Paparan subkronis CdCl_2 dosis 0.5, 1 dan 1.5 ppm pada *Danio rerio* meningkatkan persentase nekrosis sel spermatosit primer dan atresia folikel vitelogenik.

Kata kunci: CdCl_2 , *Danio rerio*, nekrosis sel spermatosit primer, atresia folikel vitelogenik.

*Korespondensi: Noer Aini, dr, M.Kes., PhD

Jl. MT Haryono 193 Malang, Jawa Timur, Indonesia, 65145

Telepon: +62(341)573920, Alamat Email: noeraini@unisma.ac.id

PRIMARY SPERMATOCYTES CELL NECROSIS AND VITELLOGENIC FOLLICULAR ATRESIA IN ADULT *Danio rerio* DUE TO EXPOSURE TO *Cadmium Chloride* (CdCl_2)

Ayu Puspita Muclisin, Ariani Ratri Dewi, Noer Aini*
Medical Faculty University of Islam Malang

ABSTRACT

Introduction: Cadmium is a chemical metal that is widely used in industrial processes. Cadmium in *Danio rerio* can cause degeneration of spermatogenic cells in the testes and apoptosis of granulosa cells in the ovaries. This study was conducted to compare the effects of subchronic exposure of various doses of CdCl_2 on the histopathology of primary spermatocyte cell necrosis and vitellogenic follicular atresia quantitatively in *Danio rerio*.

Methods: This study used adult male and female *Danio rerio*, each of which consisted of 4 treatment groups: the control group and the 0.5, 1 and 1.5 ppm doses of CdCl_2 exposure groups. The exposure was carried out for a month. The testicular and ovarian sample were stained with Hematoxylin and Eosin, the histology observed with a binocular microscope. The data analysis used *One Way ANOVA* and continued with *LSD Post Hoc Test* ($p < 0.05$).

Results: Exposure to 0.5, 1 and 1.5 ppm of CdCl_2 increased the number of primary spermatocytes cell necrosis in adult male *Danio rerio* testes by 50%, 68%, dan 79% compared to the control group. Exposure to CdCl_2 at doses of 0.5, 1 and 1.5 ppm also increased the number of vitellogenic follicular atresia in adult female *Danio rerio* ovaries by 46%, 63%, dan 77% compared to the control group.

Conclusion: Subchronic exposure of 0.5, 1 and 1.5 ppm of CdCl_2 to *Danio rerio* increased the percentage of primary spermatocytes cell necrosis and vitellogenic follicular atresia.

Keywords: CdCl_2 , *Danio rerio*, primary spermatocytes cell necrosis, vitellogenic follicular atresia.

*Correspondence: Noer Aini, MD, M.Kes., PhD

Jl. MT Haryono 193 Malang, Jawa Timur, Indonesia, 65145

Phone: +62(341)573920, E-mail address: noeraini@unisma.ac.id

PENDAHULUAN

Kadmium (Cd) adalah logam kimia yang di alam pada umumnya berikatan dengan klorida dan membentuk senyawa kadmium klorida (CdCl_2). Kadmium banyak digunakan dalam proses industri, contohnya sebagai *stabilizer* dalam produk PVC dan *neutron absorber* dalam pembuatan baterai nikel kadmium. Polusi kadmium umumnya disebabkan oleh pembuangan dan pembakaran limbah yang tercemar kadmium.¹

Kadmium dalam udara berikatan dengan *particulate matter* yang dapat bercampur dengan air atau tanah dan menyebabkan kontaminasi dalam bentuk nano pada ikan, tumbuhan, dan hewan. Secara umum ada tiga jalur yang memungkinkan masuknya kadmium pada manusia, yaitu melalui ingesti, inhalasi, dan transdermal. Kadmium akan berikatan dengan protein pembawa sehingga membentuk kompleks metal-protein. Bioakumulasi kadmium dalam tubuh manusia dan dalam rantai makanan menyebabkan intoksikasi akut dan kronik karena biomagnifikasi.² Biomagnifikasi merupakan kadar bahan kimia yang cenderung meningkat seiring dengan peningkatan tingkat trofik dalam rantai makanan.³

Paparan kadmium dapat menimbulkan berbagai efek toksik pada tubuh. Akumulasi kadmium pada organ reproduksi *Danio rerio* dapat menyebabkan kerusakan gonad dan gangguan gametogenesis.⁴ Kadmium pada testis dapat menyebabkan degenerasi dan disintegrasi dari sel-sel spermatogenik yang terjadi sebagai akibat oksidasi pada lipid maupun protein penyusun sel.⁵ Kadmium pada ovarium dapat menginduksi stres retikulum endoplasma yang akan memicu apoptosis sel granulosa.⁶

Penelitian efek paparan CdCl_2 terhadap gonad *Danio rerio* pernah dilakukan sebelumnya, yaitu uji toksisitas sub-lethal terhadap *Danio rerio* jantan⁴ dan betina.⁷ Pada kedua penelitian tersebut dilakukan pengukuran *Gonad Somatic Index* (GSI) serta mendeskripsikan perbedaan histologi testis dan ovarium kelompok paparan dibandingkan kontrol. Namun pada kedua penelitian tersebut tidak dilakukan pengamatan histologi secara kuantitatif.^{4,7} Penelitian perbandingan efek paparan berbagai dosis CdCl_2 terhadap histopatologi nekrosis sel spermatosit primer dan atresia folikel vitelogenik secara kuantitatif pada *Danio rerio* belum pernah dilakukan.

Dalam penelitian ini digunakan ikan zebra (*Danio rerio*) sebagai hewan uji coba. *Danio rerio* merupakan model alternatif hewan uji coba yang sangat baik karena ukurannya yang kecil, perkembangan eksternal yang cepat, 70% kesamaan genetik dengan manusia, dan fertilitas yang tinggi. *Danio rerio* dewasa dapat dengan mudah dipelihara di laboratorium dengan ruang yang terbatas dan pengembangbiakannya dapat dilakukan dengan mudah tanpa banyak pengalaman sebelumnya dan biaya yang murah.⁸

METODE PENELITIAN

Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilangsungkan di Laboratorium *Zebra Fish* Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang pada Januari-Mei 2019. Jenis penelitian yang digunakan adalah eksperimental laboratorium *in vivo* dengan metode *control group post test only*. Penelitian ini telah memperoleh persetujuan kelayakan etik dari *Animal Care and Use Committee* Universitas Brawijaya, Malang dengan Nomor:1070-KEP-UBTahun2019.

Penentuan Sampel

Hewan coba yang dipakai dalam penelitian ini adalah *Danio rerio* jantan dan betina dewasa yang masing-masing terdiri dari 4 kelompok perlakuan, yaitu kelompok kontrol serta kelompok dosis CdCl_2 0.5, 1 dan 1.5 ppm. Pengambilan sampel memakai metode *simple random sampling* sehingga kuantitas sampel ditentukan dengan rumus Federer.⁹ Terdapat 6 ekor *Danio rerio* di setiap kelompok. Ikan didapatkan dari Sentra Pembiakan Ikan Zebra Tulung Agung, Jawa Timur dan telah diidentifikasi dan disertifikasi oleh Fakultas Perikanan dan Kelautan Universitas Airlangga, Surabaya dengan Nomor:006/ULMKIL/UAFPK/03/2019.

Penentuan Dosis Paparan

Dosis CdCl_2 yang dipakai dalam penelitian ini adalah 0.5, 1 dan 1.5 ppm serta 0 ppm sebagai kontrol. Dosis paparan tersebut ditentukan setelah dilakukan eksplorasi selama 1 minggu sebelumnya dan didapatkan *Lethal Concentration 50* (LC 50) CdCl_2 pada *Danio rerio* adalah 2.5 ppm. CdCl_2 yang dipakai dalam penelitian ini diperoleh dari *cadmium stock Loba Chemie* dengan kode produk 02147 dan nomor:CAS-35658-65-2. Sebanyak 250 mg CdCl_2 dalam bentuk serbuk ditimbang dengan timbangan *digital* merek *Ohaus Pioneer* PA214210 lalu dilarutkan dalam akuades hingga mencapai 500 mL sehingga diperoleh larutan induk 500 ppm. Larutan induk kemudian diencerkan ke dalam akuarium berisi 50 L air sesuai dosis yang dibutuhkan.¹⁰ Volume larutan induk yang ditambahkan yaitu sebanyak 50 mL untuk akuarium kelompok paparan CdCl_2 0.5 ppm, 100 mL untuk akuarium kelompok paparan CdCl_2 1 ppm dan 150 mL untuk akuarium kelompok paparan CdCl_2 1.5 ppm. Paparan dilakukan selama 1 bulan (subkronis).

Pembedahan Sampel dan Pembuatan Preparat

Danio rerio dibius dengan Tricaine 0.2% sebelum memulai pembedahan dan dieutanasia dengan inkubasi dalam air es selama 15 menit. Ikan dikeringkan dengan kertas tisu. Kemudian difiksasi ke alas bedah dengan jarum pada ekor dan bagian ventral rongga mata. Kulit dan otot dinding tubuh pada bagian perut ikan dipotong sehingga organ dalamnya terlihat. Testis dan ovarium diambil dari *Danio rerio*, kemudian difiksasi menggunakan larutan fiksatif Buffer Neutral Formalin 10% untuk

selanjutnya dilakukan pembuatan preparat histologi dan diwarnai dengan *Hematoxylin and Eosin*.¹¹

Penghitungan Nekrosis Sel Spermatosit Primer *Danio rerio* Jantan Dewasa

Preparat testis diamati menggunakan mikroskop binokuler perbesaran 1000x. Nekrosis sel spermatosit primer bisa diidentifikasi dengan adanya perubahan inti sel yaitu piknosis (inti mengecil dan warna basofil meningkat), karioreksis (inti piknotik mengalami fragmentasi), dan kariolisis (warna basofil/kebiruan dari kromatin memudar). Dilakukan pengamatan histologis nekrosis sel spermatosit primer pada 6 sampel di setiap kelompok perlakuan. Pengamatan pada 5 lapang pandang di setiap sampel. Pengamatan dilakukan oleh 3 orang pengamat. Kemudian dihitung persentase nekrosis sel spermatosit primer dengan rumus:¹²

$$\% \text{Nekrosis} = \frac{\text{Jumlah sel spermatosit primer yang nekrosis}}{\text{Total sel spermatosit primer}} \times 100\%$$

Penghitungan Atresia Folikel Vitelogenik *Danio rerio* Betina Dewasa

Preparat ovarium diamati menggunakan mikroskop binokuler perbesaran 100x. Atresia folikel vitelogenik adalah degenerasi folikel vitelogenik sebelum matang yang ditandai dengan hiperplasia dan hipertrofi pada sel granulosia serta karakteristik struktur lurik melintang dari zona radiata telah menghilang (fase I), zona radiata terputus dan komponen kuning telur (*vitellus*) pecah (fase II), sel teka hipertrofik serta terdapat sel-sel granulosia yang membesar menembus zona radiata dan *vitellus* tampak sebagai massa yang retak (fase III), dan sel granulosia yang membesar menelan semua *vitellus* dan meninggalkan rongga besar yang disebut atrium (fase IV).¹³ Dilakukan pengamatan histologis atresia folikel pada 6 sampel di setiap kelompok perlakuan. Pengamatan pada 5 lapang pandang di setiap sampel. Pengamatan dilakukan oleh 3 orang pengamat. Kemudian dihitung persentase atresia folikel dengan rumus:¹⁴

$$\% \text{Atresia} = \frac{\text{Jumlah folikel vitelogenik yang atresia}}{\text{Total folikel vitelogenik}} \times 100\%$$

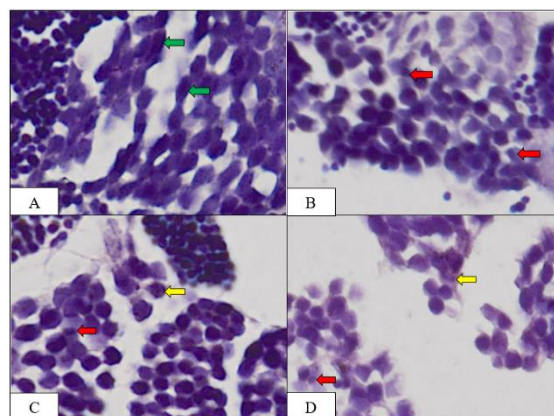
Analisis Data

Hasil penelitian akan ditampilkan dalam bentuk data statistik kemudian dilakukan uji normalitas dan homogenitas menggunakan program *software Statistical Product and Service Solution* (SPSS) versi 23.0. Selanjutnya dilakukan analisis data menggunakan uji *One Way Analysis of Variance* (*One Way ANOVA*). Kemudian diteruskan dengan *Post Hoc Test* yaitu menggunakan uji *Least Significant Difference* (LSD).

HASIL DAN ANALISIS DATA

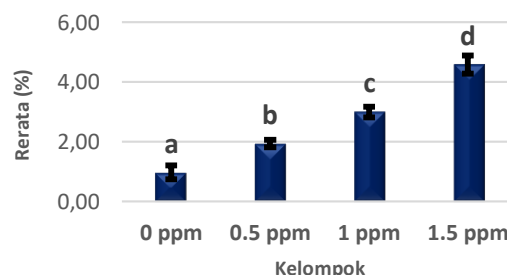
Hasil Paparan Subkronis CdCl_2 Terhadap Nekrosis Sel Spermatosit Primer *Danio rerio* Jantan Dewasa

Efek paparan subkronis CdCl_2 terhadap nekrosis sel spermatosit primer *Danio rerio* jantan dewasa dapat diamati pada Gambar 1 dan 2 berikut ini :



Gambar 1 Hasil Pengamatan Struktur Histologi Spermatosit Primer *Danio rerio* Jantan Dewasa Perbesaran 1000x

Keterangan: (A) Pada kelompok kontrol tanda panah hijau menunjukkan spermatosit primer normal yang ditandai dengan inti sel yang besar (~ 5.5-6.5 μm) dan heterokromatin; (B) Pada kelompok paparan CdCl_2 0.5 ppm tanda panah merah menunjukkan adanya sel yang piknosis ditandai dengan inti sel mengecil dan warna basofil meningkat; Pada kelompok (C) dan (D) yaitu paparan CdCl_2 1 ppm dan 1.5 ppm tanda panah kuning menunjukkan adanya sel yang karioreksis ditandai dengan inti sel mengalami fragmentasi.



Gambar 2 Histogram Rerata Persentase Nekrosis Sel Spermatosit Primer pada *Danio rerio* Jantan Dewasa

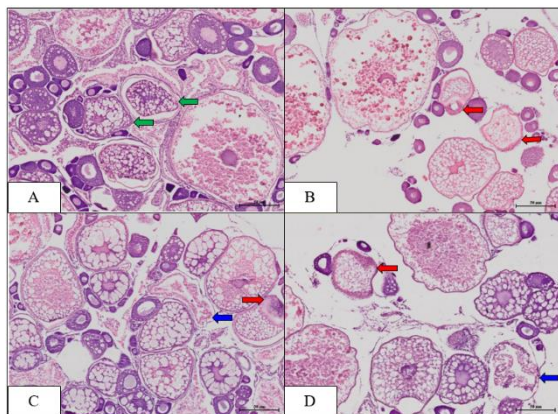
Keterangan: Gambar 2 menyajikan rerata persentase nekrosis sel spermatosit primer *Danio rerio* jantan dewasa yang dipapar CdCl_2 selama 1 bulan. Data dalam mean $\pm$ SD kelompok CdCl_2 0 ppm (0.969 ± 0.232^a), CdCl_2 0.5 ppm (1.931 ± 0.127^b), CdCl_2 1 ppm (2.982 ± 0.186^c), CdCl_2 1.5 ppm (4.577 ± 0.305^d).

Data diatas sudah diuji statistik *One Way ANOVA* dengan nilai $p < 0.05$. Notasi a = CdCl_2 0 ppm berbeda terhadap CdCl_2 0.5, 1 dan 1.5 ppm ($p < 0.05$); b = CdCl_2 0.5 ppm berbeda terhadap CdCl_2 0, 1 dan 1.5 ppm ($p < 0.05$); c = CdCl_2 1 ppm berbeda terhadap CdCl_2 0, 0.5 dan 1.5 ppm ($p < 0.05$); d = CdCl_2 1.5 ppm berbeda terhadap CdCl_2 0 ppm, 0.5 ppm, 1 ppm ($p < 0.05$).

Data hasil penelitian ini didapatkan rerata persentase nekrosis sel spermatosit primer pada *Danio rerio* jantan dewasa kelompok CdCl₂ 0 ppm (0.969 ± 0.232^a), CdCl₂ 0.5 ppm (1.931 ± 0.127^b), CdCl₂ 1 ppm (2.982 ± 0.186^c), dan CdCl₂ 1.5 ppm (4.577 ± 0.305^d). Pada penelitian ini diperoleh hasil yang menunjukkan adanya perbedaan signifikan antara kelompok perlakuan dibandingkan kelompok kontrol. Paparan CdCl₂ dengan dosis 0.5, 1 dan 1.5 ppm secara signifikan meningkatkan jumlah nekrosis sel spermatosit primer pada *Danio rerio* jantan dewasa sebesar 50%, 68%, dan 79% jika dibandingkan kelompok kontrol. Diperoleh pula peningkatan jumlah nekrosis sel spermatosit primer *Danio rerio* jantan dewasa di kelompok CdCl₂ 1.5 ppm sebesar 58% dibandingkan kelompok CdCl₂ 0.5 ppm serta 35% jika dibandingkan kelompok CdCl₂ 1 ppm ($p < 0.05$).

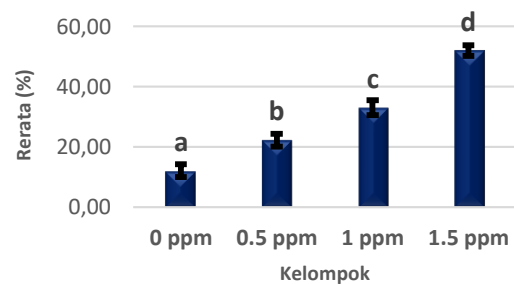
Hasil Paparan Subkronis CdCl₂ Terhadap Atresia Folikel Vitelogenik *Danio rerio* Betina Dewasa

Efek paparan subkronis CdCl₂ terhadap atresia struktur histologi folikel vitelogenik *Danio rerio* betina dewasa dapat dilihat pada Gambar 3 dan 4 berikut ini :



Gambar 3 Hasil Pengamatan Struktur Histologi Folikel Vitelogenik *Danio rerio* Betina Dewasa Perbesaran 100x

Keterangan: (A) Pada kelompok kontrol tanda panah hijau menunjukkan folikel vitelogenik normal yang ditandai dengan mulai terbentuknya kuning telur (*vitellus*) dan bentuk inti sel ireguler; (B) Pada kelompok paparan CdCl₂ 0.5 ppm tanda panah merah menunjukkan atresia folikel vitelogenik fase I yang ditandai dengan adanya hiperplasia dan hipertrofi pada sel granulosa serta hilangnya karakteristik struktur lurik melintang dari zona radiata; Pada kelompok (C) dan (D) yaitu paparan CdCl₂ 1 ppm dan 1.5 ppm tanda panah merah menunjukkan atresia folikel vitelogenik fase I dan tanda panah biru menunjukkan atresia folikel vitelogenik fase IV yang ditandai dengan hilangnya *vitellus* sehingga meninggalkan rongga besar.



Gambar 4 Histogram Rerata Persentase Atresia Folikel Vitelogenik pada *Danio rerio* Betina Dewasa

Keterangan: Gambar 4 menunjukkan rerata persentase atresia folikel vitelogenik *Danio rerio* betina dewasa yang dipapar CdCl₂ selama 1 bulan. Data dalam mean ± SD kelompok CdCl₂ 0 ppm (12.093 ± 2.106^a), CdCl₂ 0.5 ppm (22.311 ± 2.138^b), CdCl₂ 1 ppm (33.006 ± 2.490^c), dan CdCl₂ 1.5 ppm (52.012 ± 1.785^d).

Data diatas sudah diuji statistik One Way ANOVA dengan nilai $p < 0.05$. Notasi a = CdCl₂ 0 ppm berbeda terhadap CdCl₂ 0.5, 1 dan 1.5 ppm ($p < 0.05$); b = CdCl₂ 0.5 ppm berbeda terhadap CdCl₂ 0, 1 dan 1.5 ppm ($p < 0.05$); c = CdCl₂ 1 ppm berbeda terhadap CdCl₂ 0, 0.5 dan 1.5 ppm ($p < 0.05$); d = CdCl₂ 1.5 ppm berbeda terhadap CdCl₂ 0, 0.5 dan 1 ppm ($p < 0.05$).

Data hasil penelitian didapatkan rerata persentase atresia folikel vitelogenik pada *Danio rerio* betina dewasa kelompok CdCl₂ 0 ppm (12.093 ± 2.106^a), CdCl₂ 0.5 ppm (22.311 ± 2.138^b), CdCl₂ 1 ppm (33.006 ± 2.490^c), dan CdCl₂ 1.5 ppm (52.012 ± 1.785^d). Pada penelitian ini diperoleh hasil yang menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antara kelompok perlakuan dibandingkan kelompok kontrol. Paparan CdCl₂ dosis 0.5, 1 dan 1.5 ppm secara signifikan meningkatkan jumlah atresia folikel vitelogenik pada *Danio rerio* betina dewasa yaitu sebesar 46%, 63%, dan 77% jika dibandingkan kelompok kontrol. Terjadi peningkatan jumlah atresia folikel vitelogenik *Danio rerio* betina dewasa di kelompok CdCl₂ 1.5 ppm sejumlah 57% jika dibandingkan dengan kelompok CdCl₂ 0.5 ppm serta sejumlah 37% jika dibandingkan kelompok CdCl₂ 1 ppm ($p < 0.05$).

PEMBAHASAN

Efek Paparan Subkronis CdCl₂ terhadap Jumlah Nekrosis Sel Spermatosit Primer pada *Danio rerio* Jantan Dewasa

Pada penelitian ini didapatkan perbedaan signifikan jumlah nekrosis sel spermatosit primer antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan (CdCl₂ 0.5, 1 dan 1.5 ppm). Diperoleh juga perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan ($p < 0.05$). Hasil penghitungan menunjukkan bahwa perbedaan tersebut dipengaruhi oleh konsentrasi CdCl₂ (*dose-dependent*), semakin tinggi kadar CdCl₂ maka persentase nekrosis sel spermatosit primer juga semakin meningkat.

CdCl₂ dalam air diabsorpsi *Danio rerio* melalui insang, transdermal, dan ingesti. Kadmium yang

telah diabsorpsi akan masuk ke dalam sirkulasi darah lalu berikatan dengan albumin, terakumulasi dalam eritrosit, atau berikatan dengan *metallothionein*. Albumin mendistribusikan kadmium ke seluruh organ tubuh, termasuk testis.¹⁵ Kadmium dapat menggantikan kalsium berikatan dengan *E-cadherin* sel sertoli sehingga menurunkan adhesi antar sel yang akan menurunkan integritas sawar darah-testis sehingga kadmium dapat melewatinya. Kadmium bebas sebagai *thiol-affectionate metal* akan berikatan dengan glutation (GSH). Penurunan GSH sebagai antioksidan menyebabkan peningkatan kadar spesies oksigen reaktif (ROS). Kadmium juga dapat berikatan dengan kompleks III dalam mitokondria dan menghasilkan akumulasi *semi-ubiquinone* tidak stabil, yang kemudian mentransfer sebuah elektron ke molekul oksigen dan membentuk ROS.¹⁶ Interaksi ROS dengan lipid pada membran sel menghasilkan peroksidase yang tidak stabil dan reaktif sehingga menyebabkan kerusakan membran sel. ROS juga akan mengakibatkan reaksi silang pada protein yang dimediasi oleh *sulfhydryl*. Reaksi ROS dengan timin juga akan menyebabkan kerusakan DNA. Semua kerusakan sel akibat ROS tersebut akan menyebabkan terjadinya nekrosis pada sel – sel germinativum, termasuk spermatosit primer, dalam testis *Danio rerio* jantan dewasa.¹⁷

Testis terdiri dari dua bagian yaitu ruang interstisial dan ruang tubular. Pada ruang interstisial terdapat sel Leydig, pembuluh darah, pembuluh limfatik, makrofag, sel mast, sel saraf, serta jaringan ikat.¹⁸ Ruang tubular dibatasi oleh membran basal dan sel myoid peritubular serta berisi epitel germinal. Epitel germinal terdiri dari dua jenis sel, yaitu sel sertoli dan sel germinal yang mengalami spermatogenesis.¹⁹ Spermatosit primer terutama pada fase *pachytene* adalah sel germinal yang paling sering ditemukan sehingga lebih mudah untuk dilakukan pengamatan.²⁰

Pada penelitian sebelumnya tentang pengamatan histologi testis ikan medaka (*Oryzias latipes*) normal yang tidak dipapar zat apapun, didapatkan adanya beberapa spermatogonia dan spermatosit dengan inti sel piknosis. Pada penelitian tersebut dilakukan uji lebih lanjut yaitu *cleaved caspase-3 staining* yang berfungsi sebagai penanda apoptosis. Didapatkan hasil *cleaved caspase-3* positif sehingga disimpulkan bahwa spermatogonia dan spermatosit tersebut mengalami piknosis inti sel karena apoptosis. Apoptosis spermatogonia dan spermatosit merupakan proses degeneratif normal.¹² Pada penelitian ini juga didapatkan adanya piknosis inti sel spermatosit primer pada kelompok kontrol. Pada penelitian ini tidak dilakukan *cleaved caspase-3 staining*, sehingga tidak diketahui penyebab piknosis inti sel spermatosit primer pada kelompok kontrol tersebut adalah nekrosis atau apoptosis. Nekrosis adalah kematian sel tidak terprogram yang merupakan proses patologis. Nekrosis sel spermatosit primer pada kelompok kontrol dapat disebabkan oleh perubahan suhu yang ekstrim, kekurangan oksigen, atau paparan mikroorganisme dari lingkungan sekitarnya.²¹

Pada penelitian ini didapatkan adanya peningkatan jumlah persentase nekrosis sel spermatosit primer *Danio rerio* jantan seiring dengan meningkatnya dosis paparan CdCl₂. Hasil tersebut cocok dengan penelitian terdahulu tentang paparan CdCl₂ pada *knifefish* (*Gymnotus carapo*) secara injeksi *intra-peritoneal* dengan dosis 5, 10, 20, 30 dan 40 µM. Didapatkan bahwa peningkatan konsentrasi kadmium menyebabkan peningkatan nekrosis sel germinal pada testis.²²

Konsentrasi kadmium pada organ akan meningkat sebanding dengan intensitas dan durasi paparan.¹⁵ Hal ini disebabkan karena ciri metabolisme utama kadmium adalah waktu paruh biologis yang sangat lama akan menghasilkan akumulasi kadmium yang hampir *irreversible* dalam tubuh.²³ Hal ini dibuktikan antara lain dalam penelitian tentang paparan CdCl₂ pada ikan medaka (*Oryzias latipes*) dengan dosis 10 ppm selama 24, 48, 72, dan 96 jam yang mendapatkan bahwa jumlah spermatogonia dan spermatosit dengan inti sel yang piknosis lebih banyak pada kelompok paparan 72 dan 96 jam dibandingkan dengan kelompok paparan 24 dan 48 jam.¹² Penelitian ini menggunakan waktu paparan sub kronis selama 1 bulan sehingga konsentrasi kadmium pada jaringan testis dapat diperkirakan cukup tinggi.

Efek Paparan Subkronis CdCl₂ terhadap Jumlah Atresia Folikel Vitelogenik pada *Danio rerio* Betina Dewasa

Pada penelitian ini didapatkan perbedaan signifikan jumlah atresia folikel vitelogenik kelompok kontrol dibandingkan kelompok perlakuan (CdCl₂ 0.5, 1 dan 1.5 ppm). Diperoleh juga perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan. Perbedaan tersebut dipengaruhi oleh konsentrasi CdCl₂ atau *dose-dependent*. Semakin tinggi kadar CdCl₂ maka persentase atresia folikel vitelogenik juga semakin meningkat.

Pada *Danio rerio* betina, kadmium pada ovarium dapat mengaktifkan *immunoglobulin heavy chain-binding protein* (BIP) sehingga terlepas dari pasangan ikatannya yaitu protein kinase *R-like endoplasmic reticulum kinase* (PERK) pada membran retikulum endoplasma sel granulosa folikel di ovarium. PERK kemudian memfosforilasi *α-subunit of eukaryotic initiation factor 2* (eIF2α) yang akan menginduksi translasi *activating transcription factor 4* (ATF4). Hal ini akan meningkatkan *apoptosis-related protein* sehingga terjadi apoptosis sel granulosa dan berakibat atresia folikel.⁶

Peran hormon reproduksi pada atresia folikel tidak sepenuhnya dipahami, dan sebagian besar literatur penelitian tentang efek berbagai jenis stres pada oogenesis.²⁴ Hipotalamus menghasilkan *Gonadotropin Releasing Hormone* (GnRH) yang merangsang hipofisis menghasilkan hormon gonadotropin, yaitu *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) dan *Luteinizing Hormone* (LH).²⁵ FSH merupakan *survival factor* terpenting untuk pertumbuhan folikel pada fase pra-ovulasi, dan

kekurangan FSH dapat menyebabkan atresia folikel melalui apoptosis.²⁶ Pada penelitian terdahulu tentang paparan CdCl₂ pada tikus betina dewasa dengan dosis 0.05 mg/kgBB selama 15 hari, didapatkan adanya penurunan kadar FSH secara signifikan dibandingkan dengan kelompok kontrol.²⁷ Sehingga dapat disimpulkan bahwa paparan CdCl₂ dapat menurunkan kadar FSH sehingga menyebabkan atresia folikel.

Ovarium merupakan organ berpasangan yang terdiri dari folikel, yang berasal dari epitel germinal dan mengandung oogonia yang berkembang menjadi oosit dan akhirnya menjadi sel telur, dan epitel folikel sekitarnya.²⁸ Pada proses perkembangan folikel, tidak semua folikel dapat berkembang dan berovulasi. Sebagian besar folikel akan mengalami atresia yaitu kematian sel yang diprogram oleh folikel melalui apoptosis.²⁹ Pada penelitian terdahulu tentang atresia folikel pada 20 ekor *Danio rerio* betina didapatkan bahwa folikel vitelogenik lebih sering mengalami atresia dibandingkan fase lainnya.¹³

Atresia folikel vitelogenik yang didapatkan pada kelompok kontrol penelitian ini kemungkinan merupakan proses degeneratif dan resorptif normal dalam oogenesis.²⁸ Atresia folikel dapat dipengaruhi oleh perubahan aktivitas gonad akibat musim pemijahan ikan.³⁰ Pada penelitian terdahulu tentang atresia folikel pada *Saurida undosquamis* dan *Liza carinata* yang tidak dipapar zat apapun didapatkan adanya hubungan panjang musim pemijahan ikan dengan jumlah atresia folikel. Pada spesies dengan musim pemijahan pendek seperti *Liza carinata* didapatkan adanya atresia folikel pada 30% sampel yang diambil saat musim pijahnya. Sedangkan pada spesies dengan musim pemijahan yang panjang seperti *Saurida undosquamis* didapatkan atresia folikel pada semua sampel sepanjang tahun. Ikan dengan musim pemijahan yang panjang memiliki siklus pemijahan berulang yaitu ketika ikan melakukan pemijahan maka folikel untuk pemijahan selanjutnya tengah dalam proses pematangan. Produksi yang berlebihan menyebabkan peningkatan folikel yang gagal dipijahkan.³¹ *Danio rerio* di alam bebas memiliki musim pemijahan terbatas yaitu selama musim hujan pada bulan April-Agustus. Namun *Danio rerio* yang dipelihara di laboratorium dapat melakukan pemijahan sepanjang tahun.³² Oleh karena itu atresia folikel dapat ditemukan pada semua sampel kelompok kontrol penelitian ini.

Paparan kontaminan lingkungan juga dapat meningkatkan jumlah atresia folikel.²⁸ Pada penelitian sebelumnya tentang paparan CdCl₂ pada ikan lele (*Heteropneustes fossilis*) betina dengan dosis 6 ppm dan 9 ppm selama 45 hari. Didapatkan adanya peningkatan jumlah atresia folikel pada kelompok dosis 9 ppm dibandingkan dengan kelompok dosis 6 ppm.³³ Pada penelitian lain tentang paparan CdCl₂ pada katak (*Xenopus laevis*) dengan dosis 0.5, 0.75, 1, 3 dan 5 mg/kg secara injeksi pada kantung limfa dorsal selama 21 hari didapatkan adanya peningkatan signifikan jumlah atresia folikel

seiring dengan meningkatnya dosis CdCl₂.³⁴ Pernyataan tersebut juga sesuai dengan hasil penelitian ini yaitu didapatkan adanya peningkatan jumlah persentase atresia folikel vitelogenik *Danio rerio* betina seiring dengan meningkatnya dosis paparan CdCl₂.

Peningkatan atresia folikel vitelogenik *Danio rerio* akan mempengaruhi *Gonad Somatic Index* (GSI) ovarium karena adanya penurunan folikel matang. GSI merupakan indikator status biologis ikan dan digunakan untuk menentukan tahap reproduksi karena pematangan folikel seiring dengan peningkatan berat gonad.³⁵ Pernyataan tersebut cocok dengan penelitian terdahulu tentang paparan kadmium pada ikan lele (*Heteropneustes fossilis*) betina dengan dosis 1.11, 2.21, 4.41, 8.82 dan 17.64 ppm selama 14 dan 28 hari. Didapatkan adanya penurunan GSI ovarium seiring dengan peningkatan dosis CdCl₂ setelah dipapar selama 28 hari. GSI ovarium masing-masing kelompok paparan setelah 28 hari juga dibandingkan dengan data hasil paparan pada hari ke-14. Didapatkan adanya penurunan GSI ovarium seiring dengan peningkatan waktu paparan pada semua kelompok.³⁶ Hasil penelitian tersebut membuktikan adanya peningkatan jumlah kadmium yang terakumulasi pada ovarium seiring dengan meningkatnya durasi paparan. Pada penelitian ini dilakukan paparan CdCl₂ dosis rendah selama 1 bulan sehingga dapat diperkirakan konsentrasi kadmium pada ovarium cukup tinggi.

Pada penelitian ini dilakukan pemberian paparan CdCl₂ secara subkronis, yaitu zat yang diuji diberikan dengan dosis berulang ke hewan coba selama ≤10% seluruh umur hewan.³⁷ *Danio rerio* memiliki harapan hidup 2-5 tahun. Pada penelitian ini dilakukan paparan selama 1 bulan. Dengan asumsi masa hidup paling rendah (2 tahun), didapatkan jangka waktu paparan dalam penelitian ini adalah 4.2% dari seluruh umur hewan coba. Pada tahun 2019, Perserikatan Bangsa-Bangsa (PBB) memperkirakan bahwa rata-rata harapan hidup manusia secara global adalah 72.6 tahun.³⁸ Sehingga apabila lama paparan pada hewan coba dalam penelitian ini dikonversikan ke manusia akan menjadi 36.6 bulan. Dapat diperkirakan bahwa paparan kadmium dosis rendah selama 36.6 bulan pada manusia dapat menyebabkan peningkatan nekrosis sel spermatosit primer dan atresia folikel vitelogenik.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian yang didapatkan, maka dapat disimpulkan bahwa:

1. Paparan subkronis CdCl₂ dosis 0.5, 1 dan 1.5 ppm pada *Danio rerio* jantan dewasa selama 1 bulan meningkatkan persentase nekrosis sel spermatosit primer.
2. Paparan subkronis CdCl₂ dosis 0.5, 1 dan 1.5 ppm pada *Danio rerio* betina dewasa selama 1 bulan meningkatkan persentase atresia folikel vitelogenik.

SARAN

Saran untuk peningkatan dan pengembangan lebih lanjut dari penelitian ini antara lain:

1. Penelitian lebih lanjut terhadap batas dosis yang dapat menyebabkan infertilitas pada *Danio rerio* dewasa.
2. Penelitian lebih lanjut mengenai penyebab piknosis inti sel spermatosit primer pada testis *Danio rerio* dengan *cleaved caspase-3 staining*.

UCAPAN TERIMAKASIH

Terimakasih disampaikan kepada Ikatan Orang Tua Mahasiswa yang telah mendanai penelitian ini, dosen pembimbing, serta staf laboratorium di Fakultas Kedokteran UNISMA.

DAFTAR PUSTAKA

1. Jarup, L. Hazard of Heavy Metal Contamination. 2003. Dalam Godt, J.; Scheidig, F.; Reich, A.; Esche, V.; Siestrup, C.G.; Bradenburg, P.; *et al.* Toxicity and Hazard of Cadmium for Human Health. Jurnal of Occupational Medicine and Toxicology. 2006. 1(22): 1-6.
2. Sharma, H.; Mathew, B.B.; dan Rawal, N. The Characteristics, Effect, and Toxicity of Cadmium. Jurnal Internasional Nanoteknologi dan Nanosains. 2015. 3: 1-9.
3. Puspitasari, R. Laju Polutan dalam Ekosistem Laut. Oseana. 2007. 32(2): 21-28.
4. Hassanzadeh, N.; dan Mortazavi, S. Sublethal Effect of Cadmium Chloride to *Danio rerio* Testis. Journal of Marine Sciences. 2016. 7(23): 51-60.
5. Flora, J.S.; Mittal, A.; dan Mehta. Oxidative Stress Induced by Heavy Metal and It's Reversal with Chelation Therapy. Indian J. Med. Res. 2008. 128(4): 501-523.
6. Liu, J.; Luo, L.F.; Wang, D.L.; Wang, W.X.; Zhu, J.L.; Li, Y.C.; *et al.* Cadmium Induces Ovarian Granulosa Cell Damage by Activating PERK-eIF2 α -ATF4 Through Endoplasmic Reticulum Stress. Oxford University Press. 2018. 100(1): 292-299.
7. Hassanzadeh, N. Effect of Cadmium Chloride on Maturity of Female Zebrafish (*Danio rerio*) Using Vitellogenin Biomarker and Ovary Histopathology. J Aqu Eco. 2017. 7(2): 95-105.
8. Reynolds, M. A Toxicological Study Using Zebrafish (*Danio rerio*) as a Model. The Journal of Toxicological Education. 2013. 1: 10-20.
9. Federer, W. Experimental Design Theory and Application. Oxford and Lbh Publish Hinc. 1963.
10. Jhon; dan Rachmawati. Chemistry 3 A. Erlangga. 2011.
11. Gupta, T.; dan Mullins, M.C. Dissection of Organs from Zebrafish. Journal of Visualized Experiment. 2010. doi: 10.3791/1717.
12. Hirako, A.; Takeoka, Y.; Sugiyama, A.; dan Furukawa, S. Cadmium Exposure Effects on *Oryzias latipes* Testis. Journal of Toxicology. 2017. 30(3): 255-260.
13. Üçüncü, S.İ.; dan Çakıcı, Ö. Atresia and Apoptosis of Preovulatory Follicles in the *Danio rerio* (Zebrafish) Ovary. Turkish Journal of Aquatic Sciences. 2009. 9: 215-221.
14. Wang, W.; Liu, H.L.; Zang, F.F.; Tian, W.; Gong, Y.; Chen, J.W.; *et al.* Morphologic Observation and Classification Criteria for Guinea Pigs Atretic Follicles. Journal of Zhejiang University. 2010. 11(5): 307-314.
15. ATSDR. Toxicology Curriculum - Module One - Lecture Notes. Agency for Toxic Substances & Disease Registry Home. 2012.
16. Nair, A.R.; DeGheselle, O.; Smeets, K.; Kerkhove, E.V.; dan Cuypers, A. The Pathologies Induced by Cadmium. Journal of Molecular Sciences. 2013. 14(3): 6116-6143.
17. Kumar, V.; Abbas, A.; dan Aster, J.C. Buku Ajar Patologi Robbins. Edisi 9. Elsevier Pte Ltd. 2013.
18. Koulisch, S.; Grier, H.J.; dan Kramer, C.R. The Male Gonad's Organization in *Thalassoma bifasciatum*. J. Morphol. 2002. 254: 292-311.
19. Matta, S.L.; Vilela, D.A.; Godinho, H.P.; dan França, L.R. Increased Germ Cell and Sertoli Numbers in the *Oreochromis niloticus* model Caused by The goitrogen 6-n-propyl-2-thiouracil (PTU) Given During Testis Development. Endocrinology. 2002. 143: 970-978.
20. Schulz, R.W.; de Franc a L.R.; Chiarini, G.H.; Lareyre, J.J.; Nobrega, R.H.; LeGac, F.; *et al.* Fish Spermatogenesis. Endocrinol. 2010. 165: 390-411.
21. Kahfi, K.E.; Riau waty, M.; dan Lukistyowati. Efek Pakan Simplisia Kulit *Garcinia Mangostana L.* terhadap Histopatologi Ginjal dan Hepar *Clarias gariepinus*. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Riau. 2016.
22. Vergilio, C.S.; Melo, E.J.T.; Carvalho, C.E.V.; dan Moreira, R.V. Cadmium Effects Evolution in *Gymnotus carapo* Testis and Sperm. Tissue and Cell, Elsevier. 2015.
23. Friberg, L.T.; Elinder, C.G.; Nordberg, G.F.; dan Kjellstrom, T. Cadmium Toxicological and Epidemiological Appraisal. Vol. 1. Exposure, dose and metabolism. Boca Raton, FL, CRC Press. 1986.
24. Corriero, A.; Zupa, R.; Passantino, L.; dan Mylonas, C.C. Fishes Ovarian Follicles Atresia and The Implications and Uses. Journal of Fish Disease. 2021. 44(9): 1271-1291.
25. Yaron, Z.; dan Levavi-Sivan, B. Endocrine regulation in fish reproduction. Encyclopedia of fish physiology. Academic Press, San Diego. 2011. 2: 1500-1508.
26. Hong, I.; Cheung, A.P.; dan Leung, P.C.K. Human Granulosa Cell's Gonadotropin-Releasing Hormones I and II-Induced Apoptosis.

- Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 2008. 93(8): 3179-3185.
27. Pillai, A.; Priya, L.; dan Gupta, S. Cadmium and Lead Effects on the Proestrous Rats Hypothalamic-Pituitary Axis Function. Food Chem Toxicol. 2003. 41(3): 379-384.
 28. Blazer, V.S. Histopathological Assessment of Wild Fishes Gonadal Tissue. Fish Physiology and Biochemistry. 2002. 26: 85-101.
 29. Hannon, P.R.; dan Flaws, J.A. Phthalates Effects on Ovary. Front Endocrinol. 2015. doi: 10.3389/fendo.2015.00008.
 30. Valdebenito, I.; Paiva, L.; dan Berland, M. Teleost Fish Follicle Atresia. Archivos de Medicina Veterinaria. 2011. 43(1):11-25.
 31. Ramadan, A.M.; dan EL-Halfawy, M.M. The Red Sea Fishes Ovary's Common Forms of Atresia in Reproductive Cycle. Journal of Biological Sciences. 2007. 10: 3120-3125.
 32. Spence, R.; Fatema, M.K.; Wahab, M.A.; Huq, K.A.; Reichard, M.; Ahmed, Z.F.; *et al.* Zebrafish Preference of Habitat and Distribution. Journal of Fish Biology. 2006. 69: 1435-1448.
 33. Sharma, S.; Manhor, S.; Kaur, P.; Qureshi, T.A.; dan Dar, B.A. Studies of Air-Breathing Fish (*Heteropneustes fossilis*) Exposed to Cadmium Chloride. Journal of Environmental Sciences. 2011. 2(2): 411-416.
 34. Lienesch, L.A.; Dumont, J.N.; dan Bantle, J.A. The Effects of Cadmium on Oogenesis in *Xenopus laevis*. Chemosphere. 2000. 41(10): 1651-1658.
 35. Marcon, L.; Freitas, V.R.; Bazzoli, N.; Rizzo, E.; dan Benjamin, L.A. Growth Hormone on Ovarian Morphology of Lambaris (*Astyanax bimaculatus*) After Induced Spawning. Ciencia Rural. 2019. 49:8.
 36. Jayakumar, N.; Subburaj, A.; dan Francis, T. Effects of Sub-Lethal Cadmium Toxicity on Gonadosomatic Index of Freshwater Catfish, *Heteropneustes fossilis*. Outreach. 2016. 9: 241-246.
 37. BPOM. Peraturan Kepala Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia nomor 7 tentang Pedoman Uji Toksisitas Non Klinik secara In Vivo. 2014.
 38. Roser, M.; Ortiz-Ospina, E.; dan Ritchie, H. Life Expectancy. Our World in a Data, Inggris. 2019.