

MANFAAT RUMPUT LAUT (*Eucheuma spinosum*) UNTUK MENINGKATKAN KUALITAS SPERMA TIKUS AKIBAT PEMBERIAN TIMAH HITAM

THE USEFUL OF SEAWEED (*Eucheuma spinosum*) TO ACCELERATE THE SPERM QUALITY OF RATS TREATED WITH LEAD

¹Bambang Dwi Haryanto, ¹Woro Danur Wendo, ¹Hendri T. S. Saragih,
¹Arif Suhodo, ¹Yuliati Wahyu S. dan ²Siti Isrina Oktavia Salasia

¹Mahasiswa Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada

²Bagian Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada, Sekip Unit Yogyakarta 55281
Telp./Fax. (0274) 563083

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian rumput laut terhadap kualitas sperma tikus akibat pencemaran timah hitam. Dalam penelitian ini digunakan 12 ekor tikus putih jantan dewasa, dibagi secara acak menjadi 4 kelompok masing-masing 3 ekor. Kelompok I, tikus-tikus hanya diberi akuades secara oral. Kelompok II, III dan IV, semua tikus diberi Pb asetat 0,5 g/kg bb secara oral setiap hari selama 120 hari. Kelompok III dan IV masing-masing disertai dengan pemberian larutan rumput laut dosis 8 g/kg dan 16 g/kg bb secara oral per hari selama 120 hari. Pada akhir penelitian masing-masing tikus dari semua kelompok dikoleksi spermanya untuk dilakukan pemeriksaan terhadap motilitas, viabilitas dan konsentrasi spermanya. Semua tikus percobaan kemudian dietanasi dan dinekropsi, organ testis diambil dan difiksasi dalam 10% formalin untuk preparasi histopatologis. Hasil penelitian memperlihatkan adanya peningkatan motilitas, kemampuan hidup dan konsentrasi spermatozoa secara sangat signifikan ($P < 0,01$) pada tikus yang diberi Pb asetat dan rumput laut dibanding dengan tikus yang hanya diberi perlakuan Pb asetat. Secara mikroskopis, terlihat bahwa rumput laut mampu meningkatkan jumlah spermatozoa dalam tubulus seminiferi tikus yang diberi perlakuan Pb asetat. Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa rumput laut dengan dosis 8 g/kg dan 16 g/kg bb mempunyai potensi untuk menghambat pengaruh timah hitam terhadap proses spermatogenesis tikus percobaan.

Kata kunci: rumput laut (*Eucheuma spinosum*), Pb asetat, spermatozoa

ABSTRACT

The objective of the research was to determine the effects of seaweed (*Eucheuma spinosum*) on the quality of sperm of rats (*Rattus norvegicus*) contaminated by lead. Twelve adult male rats were divided randomly into four groups of 3 each. The group I, the rats were given orally aquadest. All of rats of group II, III, dan IV were treated with by lead acetate 0.5 g/kg body weight daily orally for 120 days. The rats of group III and IV were treated with seaweed 8 g/kg and 16 g/kg body weight daily orally for 120 days of each group respectively. At the end of treatment, the sperm of rats were collected to evaluate their motility, ability and their concentrations. All of rats were then euthanized, the testes were removed and fixed in 10% buffer formaline for histopatologic preparation. The research results showed that the seaweed with dose of 8 g/kg and 16 g/kg body weight have potential substances to protect against the toxic effects of lead to the spermatozoa of rats. The seaweed could raise the motility, ability and concentration of sperm ($P < 0.05$) rats treated with lead acetate. Microscopically, showed that the seaweed could increase the population of spermatozoa in the tubuli seminiferi of rats contaminated by lead acetate.

Key words: seaweed (*Eucheuma spinosum*), lead acetate, spermatozoa

PENDAHULUAN

Timah hitam atau *plumbum* (Pb) telah dikenal sebagai sumber pencemaran lingkungan. Kendaraan bermotor di Indonesia umumnya menggunakan bensin premium yang ditambah timah hitam dalam bentuk timbal tetraetil (TEL) dan timbal tetrametil (TML) dengan tujuan untuk meningkatkan bilangan oktan agar titik bakarnya turun sehingga bensin lebih mudah terbakar. Namun dalam proses pembakarannya, 98% timbal yang terkandung di dalamnya akan dilepas dan menimbulkan pencemaran udara, sehingga pembakaran bensin menjadi sumber terbesar polutan timbal di udara di negara Indonesia (Anonim, 2000a).

Senyawa Pb organik seperti TEL dan TML hampir seluruhnya diabsorpsi karena mudah larut dalam substansi lemak (Bartik, 1981), demikian juga TEL mudah diabsorpsi melalui kulit (Lang dan Kunze, 1948) dan paru-paru (Mortensen, 1942). Dalam tubuh, TEL akan diubah menjadi *triethyl lead* dan diakumulasikan pada jaringan yang kaya lemak seperti hati, ginjal dan otak (Bolanowska *et al.*, 1967).

Penelitian *Clean Air Project* Jakarta memberikan hasil yang cukup mengejutkan yaitu kualitas sperma polisi lalu lintas di jalan raya Jakarta lebih rendah dibandingkan dengan polisi yang bertugas di kantor (Anonim, 2000a). Berdasar hasil penelitian tersebut telah disimpulkan bahwa asap knalpot adalah faktor utama yang menyebabkan menurunnya kualitas sperma polisi lalu lintas, mulai dari jumlah, gerak, sampai kualitas spermanya, semua tercatat lebih rendah dari standar normal.

Polisi lalu lintas yang bertugas di jalan raya 70% mengeluhkan pusing, lelah dan mual, gejala tersebut sama dengan yang dialami polisi yang bertugas di kawasan padat lalu lintas di Yokohama dan Tokyo, Jepang. Dari penelitian juga diketahui bahwa polisi lalu lintas mempunyai jumlah spermatozoa 19,5 juta/ml, lebih rendah dari standar normal 20 juta/ml. Gerakan spermatozoa 44,5 %, lebih rendah dari standar normal 50 %, sedang bentuk spermatozoa yang normal hanya 39,3 %, lebih rendah dari standar normal 50 % (Anonim, 2000a).

Rumput laut atau dikenal dengan *seaweed* atau *seavegetable* mempunyai kandungan yang kaya nutrisi berupa asam amino esensial dan non esensial, vitamin, mineral termasuk β -karoten, vitamin B₁₂ dan vitamin C (Karl, 1998; Soerjodinoto, 1962). Berdasarkan data penelitian, secara kualitas dan kuantitas protein rumput laut mempunyai nilai biologik yang sangat tinggi sehingga dapat digunakan sebagai komponen *biological life-support* (BLS) (Antonyan *et al.*, 1985). Asam amino esensial yang terkandung dalam rumput laut antara lain leusin, arginin, lisin, treonin, valin, isoleusin dan fenilalanin (Karl, 1998). Menurut Werbach (2000), pemberian arginin dengan dosis 4 – 9 g tiap hari pada manusia efektif untuk mengatasi beberapa kasus astenospermia (berkurangnya mobilitas sperma) pada manusia.

Berdasarkan penelitian dari Tim Rumput Laut, BPP Teknologi dan Pusat Pengembangan Teknologi Pangan IPB (Anonim, 1990), diketahui bahwa diantara beberapa rumput laut yang terdapat di perairan Indonesia, jenis *Eucheuma spinosum* yang berasal dari perairan Lombok dan Bali selain mempunyai kandungan nutrisi protein, mineral dan berbagai macam vitamin, juga diketahui mempunyai kandungan Pb yang rendah (0 ppm). Selain itu, rumput laut merupakan jenis makanan yang mengandung serat dalam jumlah yang tinggi. Serat makanan dalam rumput laut mempunyai keistimewaan karena mengandung asam alginat dan karaginan dalam jumlah yang cukup berarti (Anonim, 1997). Kandungan karaginan dalam rumput laut kemungkinan mempunyai peranan dalam spermatogenesis dengan cara menetralkan logam berat.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh timah hitam (Pb) terhadap kualitas sperma tikus putih (*Rattus norvegicus*) dan mengetahui peranan rumput laut (*Eucheuma spinosum*) dalam mengatasi gangguan spermatogenesis akibat pencemaran timah hitam.

MATERI DAN METODE

Digunakan 12 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan, dewasa yang secara klinis sehat (Unit Pengembangan Hewan Percobaan, UGM). Senyawa Pb asetat netral (Merck, Germany). Rumput Laut (*Eucheuma spinosum*) diperoleh dari

Kawasan Pantai Tanjung Luar, Lombok Timur Nusa Tenggara Barat.

Rumput laut direndam dalam akuades selama 12-24 jam dengan tujuan untuk membersihkan rumput laut dari kotoran. Rumput laut ditiriskan, kemudian air rendaman disaring dan digunakan sebagai pengencer pada saat rumput laut diblender dengan perbandingan rumput laut:akuades = 1:1,25 (Salasia *et al.*, 2000).

Tikus percobaan dibagi menjadi 4 kelompok masing-masing terdiri dari 3 ekor. Kelompok I, tikus-tikus hanya diberi akuades secara oral. Kelompok II, III dan IV, semua tikus diberi Pb asetat 0,5g/kg bb (Hariono, 1994) secara oral setiap hari selama 120 hari. Kelompok III dan IV masing-masing disertai dengan pemberian larutan rumput laut dosis 8g/kg dan 16g/kg bb (modifikasi Anonim, 1990; Salasia *et al.*, 2000; Werbach, 2000) secara oral per hari selama 120 hari.

Pada akhir perlakuan semua tikus dibuat pingsan dengan kloroform, kemudian dilakukan pembedahan pada daerah perut bagian bawah untuk mengeluarkan organ reproduksinya. Spenna tikus dikeluarkan dengan cara pengurutan mulai dari epididimis. Sperma masing-masing tikus percobaan kemudian dihisap dengan pipet Thoma sampai angka 0,5 dan ditambahkan dengan NaCl fisiologis sampai dengan angka 101 (pengenceran 1:200). Larutan sperma dicampur sampai homogen, kemudian ditetaskan pada *haemocytometer* (AO, USA), dan jumlah sperma dihitung di bawah mikroskop (modifikasi Benjamin, 1979).

Sperma masing-masing tikus percobaan ditetaskan pada gelas objek, dilarutkan dengan 1 tetes NaCl fisiologis, kemudian diamati gerakannya di bawah mikroskop. Penilaian motilitas sperma ditentukan dengan ketentuan sesuai Bearden dan John (1980). Viabilitas atau daya hidup sperma tikus percobaan diamati setelah dilakukan pewarnaan dengan Eosin-Negrosin. Sperma yang hidup tampak jernih sedangkan sperma yang mati akan menyerap warna biru (Bearden dan John, 1980).

Setelah koleksi sperma, tikus dalam kondisi pingsan dietanasi dengan menambahkan kloroform secara inhalasi, kemudian dilakukan nekropsi, organ testis diambil dan difiksasi dengan formalin 10%. Jaringan testis yang sudah difiksasi selanjutnya dibuat preparat histopatologis dan

diwarnai dengan Hematoksilin-Eosin (Putt, 1977). Preparat histopatologis selanjutnya diamati di bawah mikroskop.

Hasil koleksi spermatozoa dianalisis secara kualitatif meliputi motilitas dan viabilitas sperma dengan cara membandingkan tikus kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol. Hasil perhitungan konsentrasi dan persentase hidup-mati sperma dianalisis secara kuantitatif dengan menggunakan analisis varian melalui uji Tukey-HSD. Hasil preparasi histopatologis jaringan testis diamati secara deskriptif dengan cara membandingkan tikus kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pengamatan motilitas dan penghitungan konsentrasi sperma tikus percobaan dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Motilitas dan rata-rata konsentrasi sperma tikus yang diberi Pb dan rumput laut selama 120 hari

Kelompok	Perlakuan	Motilitas sperma (%)	Rata-rata konsentrasi sperma (10 ⁴ /µl)
I	Kontrol	90	106,7 ± 30,3*
II	Pb (0,5 g/kg bb)	35	51 ± 8,9
III	Pb (0,5 g/kg bb) + rumput laut (8 g/kg bb)	90	120,7 ± 6,5**
IV	Pb (0,5 g/kg bb) + rumput laut (16 g/kg bb)	60	84,7 ± 10,2

*Anova, P < 0,05; ** Anova, P < 0,01

Sperma kelompok tikus yang diberi Pb (0,5g/kg bb) memperlihatkan motilitas sebesar 35% yang tampak kurang progresif karena gerakan dan getaran sperma tampak lemah, serta tidak terlihat adanya gelombang bila dibandingkan dengan kelompok kontrol. Kelompok tikus yang diberi Pb dan rumput laut (8g/kg bb) memperlihatkan motilitas 90%, yaitu sperma bergerak sangat kuat, pemutarannya dan gerakan yang baik dan teratur disebabkan oleh gerakan sperma sangat cepat dan berubah secara beraturan seperti halnya motilitas pada kelompok kontrol. Kelompok tikus yang diberi Pb dan rumput laut (16g/kg bb) memperlihatkan motilitas 60%, yaitu sperma bergerak kuat tetapi

gelombang dan arus bergerak lambat melintasi daerah pandangan.

Hasil penghitungan rata-rata konsentrasi sperma tikus yang diberi Pb (0,5g/kg bb) selama 120 hari tercatat sebanyak $51 \pm 8,9 \times 10^6 / \mu l$, hasil ini berbeda secara signifikan ($P < 0,05$) bila dibandingkan dengan konsentrasi sperma tikus kelompok kontrol ($106,7 \pm 30,3 \times 10^6 / \mu l$). Konsentrasi sperma tikus yang diberi Pb dan rumput laut dengan dosis 8g/kg bb selama 120 hari tercatat sebanyak $120,7 \pm 6,5 \times 10^6 / \mu l$ memiliki perbedaan yang sangat signifikan ($P < 0,01$), bila dibandingkan dengan tikus



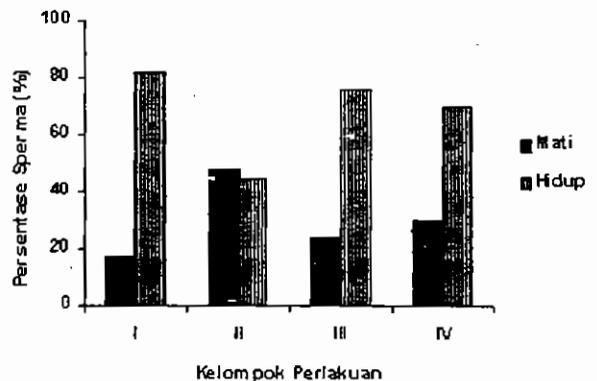
Gambar 1. Fotomikrograf potongan melintang testis tikus kelompok kontrol.
(a) Struktur spermatogenesis normal (Pewarnaan H&E, okuler 10x objektif 10)

yang hanya diberi Pb asetat. Hasil perhitungan konsentrasi sperma tikus yang diberi Pb dan rumput laut dengan dosis 16g/kg bb selama 120 hari adalah $84,7 \pm 10,2 \times 10^6 / \mu l$.

Hasil pengamatan viabilitas tikus percobaan dengan pewarnaan Eosin-Negrosin dapat dilihat pada Grafik 1. Daya hidup (viabilitas) sperma dapat diamati berdasarkan pewarnaan Eosin-Negrosin. Sperma yang hidup tampak jernih sedangkan sperma yang mati akan menyerap warna biru. Dari hasil pewarnaan tersebut diketahui bahwa sperma tikus kelompok kontrol mempunyai kemampuan hidup yang tinggi yaitu $82 \pm 4,6\%$. Sperma tikus yang diberi perlakuan Pb (0,5g/kg bb) selama 120 hari terlihat hanya $45 \pm 16,2\%$ yang hidup. Analisis statistik memperlihatkan adanya perbedaan yang

signifikan ($P < 0,05$) daya hidup (persentase hidup) antara sperma tikus yang diberi Pb asetat saja dan sperma tikus kelompok kontrol. Sperma tikus yang diberi Pb dan rumput laut dosis 8g/kgbb memiliki persentase hidup $76 \pm 14,4\%$ dan sperma tikus yang diberi Pb dan rumput laut dosis 16g/kgbb memiliki persentase hidup $70 \pm 2,8\%$

Secara histopatologik, testis tikus kelompok kontrol terlihat struktur testis tersusun secara lengkap yang menunjukkan terjadinya proses spermatogenesis secara sempurna yang dimulai dari spermatogonia, spermatosit primer, spermatosit



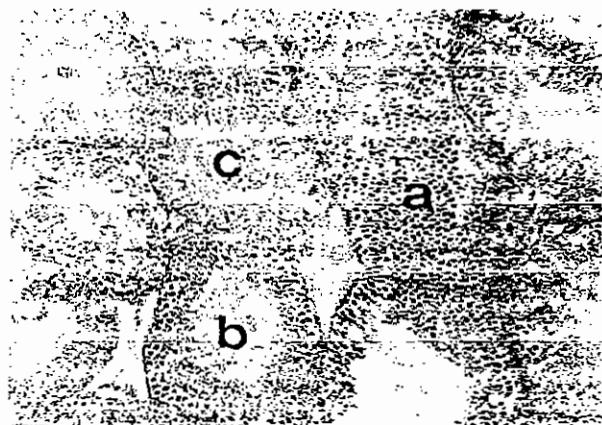
Keterangan: I = kelompok kontrol, II = kelompok Pb, III = kelompok Pb + rumput laut dosis 8g/kg bb dan IV = kelompok Pb + rumput laut dosis 16g/kg bb

Grafik 1. Persentase hidup dan mati sperma tikus percobaan

sekunder, spermatid dan tampak spermatozoa memenuhi lumen tubuli seminiferi testis (Gambar 1). Struktur testis tikus yang diberi Pb (0,5g/kg bb) selama 120 hari tampak mengalami perubahan susunan, proses spermatogenesis yang tidak lengkap dan ditandai dengan tidak terlihatnya spermatozoa pada lumen tubuli seminiferi serta terlihat adanya nekrosis fokal pada tubulus seminiferi testis dan adanya reruntuhan sel-sel yang menyerupai *giant cell structure* di lumen tubuli seminiferi (Gambar 2). Hasil pengamatan histopatologi testis tikus kelompok perlakuan yang diberi Pb dan rumput laut dosis 8g/kg bb dan dosis 16g/kg bb memperlihatkan struktur yang menyerupai kelompok kontrol (Gambar 3). Bahkan populasi spermatozoa tikus yang diberi Pb dan rumput laut dosis 8 g/kg bb

tampak lebih padat bila dibandingkan dengan kelompok kontrol.

Dari hasil pengamatan secara kuantitas maupun kualitas sperma, diketahui bahwa pemberian Pb dengan dosis 0,5 g/kg bb selama 120 hari dapat menurunkan konsentrasi, motilitas maupun viabilitas sperma. Hasil tersebut didukung oleh pemeriksaan histopatologik testis yang memperlihatkan jumlah sperma yang sangat jarang ditemukan pada lumen tubuli seminiferi testis disertai dengan adanya nekrosis fokal maupun reruntuhan menyerupai *giant cell structure*.



Gambar 2. Fotomikrograf potongan melintang testis tikus yang diberi Pb asetat 0,5 g/kg bb. (a) Nekrosis fokal pada tubulus seminiferus (b) struktur spermatogenesis normal (c) reruntuhan sel-sel yang menyerupai *giant cell structure* (Pewarnaan H&E, okuler 10xobjektif 10)

Senyawa Pb merupakan logam berat yang selain berpengaruh pada sistem hemopoetik, sistem urinaria, sistem syaraf, juga bersifat toksik pada sistem reproduksi baik pada hewan dan manusia (Hariono, 1994).

Dalam penelitian ini rumput laut yang diberikan pada tikus percobaan bersamaan dengan pemberian Pb selama 120 hari, terbukti dapat mengurangi terjadinya gangguan proses spermatogenesis akibat Pb. Hal ini terlihat dengan adanya peningkatan motilitas, konsentrasi dan persentase hidup sperma pada kelompok tikus yang diberi Pb bersamaan dengan pemberian rumput laut jika dibandingkan dengan tikus yang diberi Pb tanpa rumput laut. Hasil tersebut diperkuat dengan

pengamatan histopatologi yaitu terlihat populasi spermatozoa yang memenuhi hampir disemua lumen tubulus seminiferus pada kelompok tikus yang diberi Pb bersamaan dengan rumput laut. Bahkan pada tikus yang diberi Pb dan rumput laut dosis 8 g/kg bb tampak populasi spermatozoa lebih padat dan subur dibandingkan dengan kelompok kontrol. Dari hasil pengamatan terlihat bahwa sperma tikus kelompok yang diberi Pb dan rumput laut dosis 8 g/kg bb memiliki kualitas dan kuantitas lebih baik dibandingkan sperma tikus kelompok yang diberi Pb dan rumput laut dosis 16 g/kg bb.



Gambar 3. Fotomikrograf potongan melintang testis tikus yang diberi Pb asetat 0,5 g/kg bb dan rumput laut (*Eucheuma spinosum*) dosis 8 g/kg bb. (a) struktur spermatogenesis normal (Pewarnaan H&E, okuler 10x objektif 10)

Hal ini kemungkinan disebabkan oleh kemampuan lambung tikus untuk menerima bahan makanan per oral maksimal 4 ml/ekor/hari (Smith dan Mangkoewidjojo, 1988), sehingga terjadi penurunan kemampuan absorpsi tikus yang diberi rumput laut dengan dosis 16 g/kg bb.

Rumput laut merupakan jenis tanaman laut yang mempunyai nilai nutrisi sangat tinggi yang dapat digunakan untuk mendukung kesehatan tubuh (Antonyan *et al.*, 1985; Karl, 1998). Nutrisi yang terkandung dalam rumput laut antara lain asam amino esensial seperti leusin, arginin, lisin, treonin, falin, isoleusin dan fenilalanin (Karl, 1998). Selain asam amino, rumput laut juga mengandung berbagai macam vitamin seperti vitamin C, tiamin dan riboflavin serta mineral seng (Anonim, 1971).

Werbach (2000) menguraikan beberapa nutrisi yang mempunyai peranan dalam kesehatan khususnya sistem reproduksi antara lain L-arginin, seng, vitamin B₁₂, vitamin C. L-arginin yang terkandung dalam rumput laut yang digunakan dalam penelitian ini kemungkinan dapat menjaga jumlah maupun motilitas sperma tikus yang terganggu akibat pemberian Pb. Werbach (2000) melaporkan bahwa L-arginin merupakan prekursor testosteron yang dapat mengatasi kasus astenospermia atau berkurangnya motilitas sperma serta dapat menjaga jumlah normal sperma dan motilitas sperma.

Kandungan vitamin C yang cukup tinggi dalam rumput laut yang digunakan dalam penelitian ini mempunyai peranan yang sangat penting dalam mengembalikan fungsi normal spermatozoa. Vitamin C diketahui bermanfaat untuk meningkatkan ketahanan tubuh terhadap radikal bebas, sehingga dapat meningkatkan jumlah sperma dan meningkatkan variasi ukuran sperma sehat (Anonim, 1995; Werbach, 2000).

Vitamin B₁₂ yang terkandung dalam rumput laut yang digunakan dalam penelitian ini ikut berperan dalam proses spermatogenesis. Vitamin B₁₂ dapat digunakan untuk membantu sel dalam penyembuhan dan memelihara fungsi normal tubuh. Pemberian vitamin B₁₂ dapat digunakan untuk meningkatkan produksi sperma (Werbach, 2000).

Mineral yang terkandung dalam rumput laut terutama zinc mempunyai peranan dalam memperbaiki dan meningkatkan fertilitas pejantan. (Anonim, 2000b). Werbach (2000) melaporkan pemberian seng sebanyak 220 mg/hari dapat meningkatkan motilitas dan menjaga bentuk sperma normal serta dapat meningkatkan jumlah sperma karena seng merupakan kofaktor untuk enzim yang berperan dalam proses spermatogenesis. Seng dalam tubuh selain ikut berperan dalam sintesa DNA dan RNA serta pertumbuhan organ reproduksi, juga merupakan substansi yang mampu menurunkan absorpsi Pb dalam tubuh (William dan Caliendo, 1989).

Rumput laut merupakan jenis makanan yang mengandung serat dalam jumlah yang tinggi. Serat makanan dalam rumput laut mempunyai keistimewaan karena mengandung asam alginat dan karaginan dalam jumlah yang cukup berarti (Anonim, 1997). Alginat yang terkandung dalam rumput laut yang di gunakan dalam penelitian ini

mempunyai kemampuan untuk mengikat Pb, sehingga dapat menurunkan absorpsi timah hitam dalam saluran pencernaan. Alginat diketahui mempunyai daya ikat yang tinggi terhadap logam-logam berat dan unsur radioaktif. Alginat sukar untuk dicerna oleh tubuh sehingga dapat membantu membersihkan kontaminan logam berat yang masuk ke dalam tubuh melalui makanan yang terkontaminasi (Anonim, 1997). Kandungan karaginan yang dalam rumput laut kemungkinan juga mempunyai peranan dalam spermatogenesis dengan cara menetralkan logam berat.

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa pemberian Pb dengan dosis 0,5 g/kg bb/hari selama 120 hari dapat menyebabkan penurunan motilitas, viabilitas dan konsentrasi sperma tikus. Rumput laut dengan dosis 8 g/kg bb dan 16 g/kg bb yang diberikan bersamaan dengan Pb (0,5g/kg bb) selama 120 hari, mampu menurunkan pengaruh toksik Pb terhadap proses spermatogenesis, sehingga dapat meningkatkan motilitas, viabilitas dan konsentrasi sperma tikus.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penelitian ini dapat terlaksana berkat bantuan dana dari Lomba Karya Inovatif dan Produktif (LKIP), DIKTI tahun 2000 dan dana bantuan penelitian dari Bidang Lingkungan Hidup, UGM tahun 2000. Ucapan terimakasih disampaikan kepada drh. Bambang Hariono, Ph.D. yang telah membantu dalam diagnosis histopatologik.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim, 1977. Environmental Health Criteria 3: Lead, World Health Organization, Geneva, 19: pp. 91-92.
- Anonim, 1990. Petunjuk Teknis Budidaya Rumput Laut. Badan Penelitian dan Pengembangan Teknologi dan Pusat Pengembangan Teknologi Pangan IPB, Bogor.
- Anonim, 1995. Bila Sperma Suami Tidak Subur dalam Kompas, Juli 1995. Hal. 7.

- Anonim, 1997. Salah Diet Dapat Sebabkan Penyakit Jantung Koroner dalam Kompas, 16 Desember 1997. Hal. 7.
- Anonim, 2000a. Timah Hitam Memang Berbahaya dalam Kompas, 20 Febuari 2000. Hal. 17.
- Anonim, 2000b. Vitamin B₁₂ (cobalamin) In: Healthwell Communication, Penton Media Inc., pp. 1-4.
- Antonyan, A.A., Abakumova, I.A., Meleshko, G.I., and Vlasova, T.F., 1985. Algae, Biological Effects, Diets, Life Support Systems, Proteins. Joint Publications Research Service, Arlington V. A., pp. 1-2.
- Bartik, M., 1981. Veterinary Toxicology. Bartik, M., (ed.), Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam-Oxford, New York.
- Bearden, H.J. and John, W., 1980. Applied Animal Reproduction. Second edition. Fuguay Mississippi State University, Reston Publising Company; Inc.
- Benjamin, M.M., 1979. Outline of Veterinary Clinical Pathology. Third edition, the Iowa State University Press, USA.
- Bolanowska, W., Piotrowski, J., and Garszynski, H., 1967. Triethyl Lead in the Biological Material in Cases of Acute Tetraethyl Lead Poisoning. *Arch. Toxicol.* 22: pp. 278-282.
- Hariono, B., 1994. Review Efek Logam Berat Pb dan Perubahan-perubahan Patologi Klinik dan Histopatologi pada Penderita Intoksikasi Pb. FKH-UGM, Yogyakarta.
- Karl, A., 1998. Essential Amino Acids of Aphanizomenon Flos-Aque (Klamath L Algae). Rossha Enterprises, Inc., pp. 1-2.
- Lang, E.P., and Kunze, F.M., 1948. The Penetration of Lead Through The Skin. *J. Industr. Hyg.* 30: pp. 256-259.
- Mortensen, R.A., 1942. The Absorption of Tetraethyl-Lead with Radioactive Lead As Indicator. *J. Industr. Hyg.* 24: pp. 285-288.
- Putt, F.A., 1972. Manual of Histopathological Staining Methods. John Willey and Sons, Inc., New York.
- Salasia, S.I.O., Maryono, Hilmiati, N., Sulistyawan R., dan Mumpuni, S., 2000. Daya Hipokolesterolemik Karaginan Hasil Ekstrak Rumput Laut (*Eucheuma spinosum*) dalam Seminar Nasional Peranan Ilmu-ilmu Hayati Dalam Peningkatan Produksi dan Penggunaan Agen Hayati yang Ramah Lingkungan di Yogyakarta, 14 Juni 2000. Hal. 27-32.
- Smith, B.J., and Mangkoewidjojo, S., 1988. Pemeliharaan, Pembiakan dan Penggunaan Hewan Percobaan di Daerah Tropis. Edisi pertama. Penerbit Universitas Indonesia, Jakarta.
- Werbach, M.R., M.D., 2000. Eating Right Increase Male Fertility. In: Conception Connection. UCLA State University, pp. 1-7.
- William, E.R. and Caliando, M.A., 1989. Nutrition: Principle, issues and Aplication. Mc Grow-Hill book company, University of Maryland.