

DEPARTEMEN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN
DIREKTORAT JENDERAL PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS AIRLANGGA

PENGARUH LAMA WAKTU PEMBERIAN ESTROGEN
TERHADAP BERAT BADAN DAN SPERMATOGENESIS
TIKUS (*Ratus norvegicus* L.) DEWASA

SELESAI

PAMERAN

Ketua Peneliti :

01 OCT 1997

Dra. Dwi Winarni, M.Si.

Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Dibiayai Oleh : DIP OPF Unair 1996/1997

SK.Rektor Nomor : 6229/J03/PL/1996

Nomor : 72

DEPARTEMEN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN
DIREKTORAT JENDERAL PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS AIRLANGGA

**PENGARUH LAMA WAKTU PEMBERIAN ESTROGEN
TERHADAP BERAT BADAN DAN SPERMATOGENESIS
TIKUS (*Ratus norvegicus* L.) DEWASA**

Ketua Peneliti :

Dra. Dwi Winarni, M.Si.

Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



3000043973141-9



30000439731419

LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

**Dibiayai Oleh : DIP OPF Unair 1996/1997
SK.Rektor Nomor : 6229/J03/PL/1996
Nomor : 72**

SELESAI

**PENGARUH LAMA WAKTU PEMBERIAN ESTROGEN
TERHADAP BERAT BADAN DAN SPERMATOGENESIS
TIKUS (*Rattus norvegicus* L.) DEWASA**

3000043973141

.. **Peneliti :**

**Dwi Winarni
Saikhu Akhmad Husen
Y. Sri Wulan Manuhara
Agus Supriyanto
J. Soemartojo**

Fakultas MIPA - Biologi



**LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
DIP OPF UNIVERSITAS AIRLANGGA
SK REKTOR No. 6229/703/PL/1996
Tanggal 1 Agustus 1996**



DEPARTEMEN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
LEMBAGA PENELITIAN

- | | | |
|------------------------------------|---------------------------------|--|
| 1. Puslit dan Pembangunan Regional | 4. Puslit Lingkungan Hidup | 8. Puslit Kependudukan dan Pembangunan |
| 2. Puslit Obat Tradisional | 5. Puslit dan Pengembangan Gizi | 9. Puslit Bioenergi |
| 3. Puslit Pengembangan Hukum | 6. Puslit/Studi Wanita | 10. Puslit/Studi Kesehatan Reproduksi |
| | 7. Puslit Olahraga | |

Jl. Darmawangsa Dalam No. 2 Telp. (031) 5342322 Fax. (031) 5342322 Surabaya 60286

IDENTITAS DAN PENGESAHAN
LAPORAN AKHIR HASIL PENELITIAN

1. a. Judul Penelitian : Pengaruh Lama Waktu Pemberian Estrogen Terhadap Berat Badan dan Spermatogenesis Tikus (Rattus norvegicus L.) Dewasa
- b. Macam Penelitian : (V) Fundamental, () Terapan, () Pengembangan
2. Kepala Proyek Penelitian
- a. Nama Lengkap Dengan Gelar : Dra. Dwi Winarni, M.Si.
- b. Jenis Kelamin : W a n i t a
- c. Pangkat/Golongan/NIP : Penata Muda Tk.I/IIIb/131 836 619
- d. Jabatan Sekarang : Staf Pengajar
- e. Fakultas/Jurusan/Puslit : FMIPA/Biologi
- f. Univ./Inst./Akademi : Universitas Airlangga
- g. Bidang Ilmu Yang Diteliti : Fisiologi Hewan
3. Jumlah Tim Peneliti : 5 (lima) orang
4. Lokasi Penelitian : FMIPA Unair
5. Kerjasama dengan Instansi Lain
- a. Nama Instansi : -
- b. A l a m a t : -
6. Jangka Waktu Penelitian : 6 (enam) bulan
7. Biaya Yang Diperlukan : Rp 3.000.000,00
8. Hasil Seminar Penelitian
- a. Dilaksanakan Tanggal : 17 Maret 1997
- b. Hasil Penilaian : () Baik Sekali (V) Baik
 () Sedang () Kurang

3000043973141



Surabaya, 17 Maret 1997



Mengetahui/ Mengesahkan :
 a.n. Rektor
 Ketua Lembaga Penelitian,

Prof. Dr. Noor Cholies Zaini f
 NIP. 130 355 372

RINGKASAN PENELITIAN

Judul Penelitian : Pengaruh Lama Waktu Pemberian Estrogen Terhadap Berat Badan dan Spermatogenesis Tikus (*Rattus norvegicus* L.) Dewasa

Ketua Peneliti : Dwi Winarni

Anggota Peneliti : Saikhu Akhmad Husen, Y. Sri Wulan Manuhara, Agus Suprijanto, J. Soemartojo

Fakultas/Puslit : MIPA - Biologi

Sumber Biaya : DIP OPF Universitas Airlangga
SK Rektor Nomor : 6229/703/PL/'96
Tanggal : 1 Agustus 1996

Estrogen adalah senyawa yang terdistribusi luas di alam. Selain dapat ditemukan pada organ-organ tubuh Vertebrata (folikel ovarium, testis dan korteks adrenal), estrogen dapat pula diisolasi dari jaringan berbagai jenis Avertebrata dan berbagai jenis tumbuhan tingkat tinggi maupun tingkat rendah.

Estrogen di dalam sirkulasi mamalia jantan merupakan hasil sintesis korteks adrenal dan testis (Ganong, 1993). Kadar estrogen dalam sirkulasi dapat meningkat karena adanya kontak mamalia jantan dengan sumber-sumber estrogen. Meningkatnya kadar estrogen plasma dapat menyebabkan terjadinya hambatan pada spermatogenesis. Selain itu, dapat pula menurunkan rasio antara lipoprotein plasma VLDL (*very low density lipoprotein*) dan LDL (*low density lipoprotein*) terhadap lipoprotein plasma HDL (*high density lipoprotein*). Terjadinya penurunan rasio antara VLDL dan HDL terhadap HDL plasma disebut-sebut sebagai faktor yang dapat menurunkan resiko terjadinya atherosklerosis - timbulnya timbunan plak yang mengandung lipid di pembuluh darah. Terjadinya penurunan rasio VLDL dan LDL terhadap HDL melibatkan pula peran jaringan lemak. Jaringan lemak menyusun 18% berat tubuh.

Masalah yang diajukan adalah: (1) apakah pemberian estrogen berpengaruh terhadap berat badan tikus jantan dewasa, (2) apakah lama waktu pemberian estrogen berpengaruh terhadap berat badan tikus jantan dewasa, dan (3) bagaimanakah aktivitas spermatogenesis di dalam tubuli seminiferi pada saat estrogen memberikan pengaruh terhadap berat badan.

Penelitian ini bertujuan untuk : (1) mengetahui pengaruh estrogen terhadap tikus jantan dewasa, (2) mengetahui pengaruh lama waktu pemberian estrogen terhadap berat badan tikus jantan dewasa, dan (3) mengetahui aktivitas spermatogenesis di dalam tubuli seminiferi di saat estrogen dapat memberikan pengaruh terhadap berat badan.

Penelitian ini menggunakan 60 ekor tikus putih jantan dewasa umur 9-10 minggu, yang dibagi menjadi 4 (empat) kelompok. Kelompok I diperlakukan dengan pemberian ethyni-

lestradiol (sebagai sumber estrogen) per oral dengan dosis 1 $\mu\text{g}/100$ g BB/hari selama 13 hari, kelompok II selama 25 hari, kelompok III (plasebo I) dan kelompok IV (plasebo II).

Berat badan diukur pada awal dan akhir perlakuan (1 hari setelah perlakuan dihentikan), sedangkan testis kanan diambil untuk dibuat sediaan mikroanatomi setelah pengukuran berat badan akhir.

Data rerata % kenaikan berat badan per hari antar kelompok dianalisis dengan Analisis Varians Searah dilanjutkan dengan LSD pada tingkat kemaknaan 0,05. Mikrofotograf dianalisis secara deskriptif untuk mengetahui aktivitas spermatogenesis dalam tubuli seminiferi masing-masing kelompok perlakuan.

Hasil penelitian ini memberikan kesimpulan : (1) pemberian estrogen berpengaruh terhadap berat badan tikus jantan dewasa yaitu meningkatkan persentase kenaikan berat badan, (2) lama waktu pemberian estrogen tidak berpengaruh terhadap berat badan, dan (3) saat estrogen dapat meningkatkan persentase kenaikan berat badan tikus, terjadi pula hambatan terhadap spermatogenesis. Peningkatan lama waktu perlakuan meningkatkan tingkat hambatan.

Meskipun estrogen dapat memberikan dampak positif menurunkan resiko terjadinya aterosklerosis, tetapi dari hasil penelitian ini disarankan untuk lebih memperhatikan lama waktu kontak dengan estrogen yang cenderung memberikan dampak negatif terutama terhadap spermatogenesis.

KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Tuhan yang Mahakasih atas tersusunnya laporan penelitian dengan judul : **PENGARUH LAMA WAKTU PEMBERIAN ESTROGEN TERHADAP BERAT BADAN DAN SPERMATOGENESIS TIKUS (*Rattus norvegicus* L.) DEWASA.**

Kepada Bapak Rektor dan Ketua Lembaga Penelitian Universitas Airlangga, kami sampaikan terima kasih atas kesempatan yang telah diberikan kepada kami untuk melakukan penelitian ini.

Kami menyadari bahwa penelitian ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu segala kritik dan saran demi penyempurnaannya sangat kami harapkan. Akhirnya kami berharap hasil penelitian ini dapat memberikan manfaat bagi pihak-pihak yang memerlukan.

Surabaya, Januari 1997

Peneliti

DAFTAR ISI

	halaman
RINGKASAN PENELITIAN	ii
KATA PENGANTAR	iv
DAFTAR ISI	v
DAFTAR GAMBAR	vi
DAFTAR LAMPIRAN	vii
BAB I PENDAHULUAN	1
I.1. Latar Belakang Permasalahan	1
I.2. Rumusan Masalah	3
I.3. Tujuan Penelitian	4
I.4. Manfaat Penelitian	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	5
II.1. Estrogen	5
II.2. Lipoprotein Plasma dan Metabolisme Lemak	9
II.3. Lemak dan Berat Badan	13
II.4. Spermatogenesis	13
BAB III METODE PENELITIAN	23
III.1. Bahan Penelitian	23
III.2. Alat Penelitian	24
III.3. Pelaksanaan Penelitian	24
III.4. Analisis Data	30
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	31
IV.1. Berat Badan	31
IV.2. Aktivitas Spermatogenesis dalam Tubuli Seminiferi	33
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	41
V.1. Kesimpulan	41
V.2. Saran	41
DAFTAR PUSTAKA	42
LAMPIRAN	

DAFTAR GAMBAR

Halaman

Gambar 2.1.	Struktur kimia beberapa jenis estrogen steroid dan nonsteroid	6
Gambar 2.2.	Aromatisasi androgen menjadi estrogen oleh enzim aromatase	7
Gambar 2.3.	Nasib lemak diet di dalam tubuh	10
Gambar 2.4.	Diagram jumlah pembelahan yang terjadi dan jenis sel spermatogenik yang terbentuk pada tiap tahap spermatogenesis	14
Gambar 2.5.	Diagram perubahan set kromosom dan DNA selama pembelahan meiosis	15
Gambar 2.6.	Gambar skema bagian tubulus seminiferus yang memperlihatkan hubungan antara sel Sertoli dengan sel spermatogenik dan hubungan antara sel-sel spermatogenik melalui jembatan sitoplasma	17
Gambar 2.7.	Vakuolisasi tubuli seminiferi tikus	19
Gambar 2.8.	Hubungan antara hipotalamus, hipofisis dan testis dalam mempengaruhi spermatogenesis	20
Gambar 3.1.	Tahap-tahap spermatogenesis tikus dengan asosiasi sel tertentu	29
Gambar 4.1.	Histogram rerata persen kenaikan berat badan	31
Gambar 4.2.	Skema pengendalian spermatogenesis melalui jalur hipotalamus-hipofisis-testis ..	35
Gambar 4.3.	Tubuli seminiferi dengan aktivitas spermatogenesis normal	38
Gambar 4.4.	Mikroanatomi testis tikus yang diperlakukan dengan ethynilestradiol 1 µg/100 g BB/hari selama 13 hari	39
Gambar 4.5.	Mikroanatomi testis tikus yang diperlakukan dengan ethynilestradiol 1 µg/100 g BB/hari selama 25 hari	40

DAFTAR LAMPIRAN

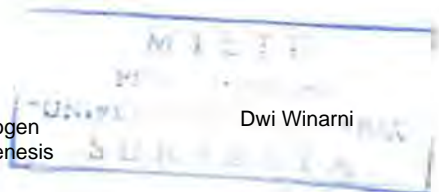
- Lampiran 1. Hasil pengukuran berat badan tikus pada awal perlakuan dan pada akhir perlakuan
- Lampiran 2. Analisis Varians Searah Antar Kelompok Perlakuan

BAB I
PENDAHULUAN

I.1. Latar Belakang Permasalahan

Estrogen adalah senyawa yang terdistribusi luas di alam. Selain dapat ditemukan pada organ-organ tubuh Vertebrata (folikel ovarium, testis dan korteks adrenal), estrogen dapat pula diisolasi dari jaringan berbagai jenis Avertebrata dan berbagai jenis tumbuhan tingkat tinggi maupun tingkat rendah (Gorbman dan Bern, 1974; Fullerton, 1982). Beberapa contoh estrogen tumbuhan yang poten adalah genistein (dari jenis semanggi), coumestrol (dari jenis polong-polongan), dan zearalenon (dari jenis kapang *Fusarium*) (Fullerton, 1982). Aktivitas estrogenik ditemukan pada sejumlah besar bahan kimia, senyawa fenol pada umumnya, teridentifikasi hampir pada semua bentuk kehidupan bahkan pada organisme yang hidup di sedimen laut (Meyers *et al.*, 1979).

Estrogen di dalam sirkulasi mamalia jantan merupakan hasil sintesis korteks adrenal dan testis (Ganong, 1993). Kadar estrogen dalam sirkulasi dapat meningkat karena adanya kontak mamalia jantan dengan sumber-sumber estrogen. Meningkatnya kadar estrogen plasma dapat menyebabkan terjadinya hambatan pada spermatogenesis (Gorbman dan Bern, 1974; Tausk, 1975; Schmidt-Nielsen, 1991). Pemberian estrogen setara dengan ethinylestradiol 1 $\mu\text{g}/100$ g BB/hari pada



tikus selama 13 hari menunjukkan adanya hambatan terhadap spermatogenesis (Winarni, 1996).

Tausk (1975), menyatakan bahwa estrogen pada mamalia jantan selain dapat menghambat spermatogenesis melalui hambatan fungsi gonadotropik hipofisis, dapat pula menurunkan rasio antara lipoprotein plasma VLDL (*very low density lipoprotein*) dan LDL (*low density lipoprotein*) terhadap lipoprotein plasma HDL (*high density lipoprotein*). Jenis lipoprotein plasma tersebut disintesis dan disekresikan oleh hepar dan intestinum (Stryer, 1981). Ketiganya bersama-sama dengan jenis lipoprotein plasma yang lain (kilomikron) berperan dalam transpor berbagai jenis lipid di dalam cairan tubuh (trigliserida, kolesterol dan fosfolipid).

VLDL terutama disintesis oleh hepar, tersusun terutama oleh trigliserida (triasilgliserol), selain kolesterol dan fosfolipid. VLDL berfungsi mengangkut triasilgliserol yang disintesis secara endogen ke jaringan lemak. LDL mengangkut kolesterol ke jaringan perifer dan mengatur sintesis kolesterol di jaringan tersebut. HDL yang disintesis hepar, kaya akan fosfolipid dan kolesterol. HDL mengangkut kolesterol dari jaringan-jaringan perifer untuk dimetabolisme di dalam hepar (Stryer, 1981; Linder, 1992). Terjadinya penurunan rasio antara VLDL dan HDL terhadap HDL plasma disebut-sebut sebagai faktor yang dapat menurunkan resiko terjadinya atherosklerosis yaitu timbulnya timbunan plak yang mengandung lipid di pembuluh darah. Dengan adanya penurunan

tersebut berarti bahwa aktivitas transpor kolesterol dari jaringan-jaringan untuk dimetabolisme di hepar lebih tinggi dari transpor triasilgliserol endogen ke jaringan lemak dan jaringan perifer lain maupun transpor kolesterol ke jaringan perifer (Tausk, 1975; Stryer, 1981)

Jaringan lemak yang merupakan kumpulan sel-sel lemak (adiposit) menyusun 18% berat badan tubuh (dalam hal ini manusia), selain urat daging (41,5%) dan tulang (15,8%). Adiposit ditemukan sebagai jaringan bebas dalam berbagai bagian tubuh (bantalan tulang dan organ vital, di bawah kulit) atau terdispersi dalam urat daging dan jaringan ikat (Linder, 1992).

Berlandaskan terjadinya penurunan rasio VLDL dan LDL terhadap HDL dikarenakan estrogen, yang melibatkan pula peran jaringan lemak, maka pada penelitian ini diamati pengaruhnya terhadap penambahan berat badan, dengan mempertimbangkan pula keadaan spermatogenesis di dalam tubuli seminiferi.

I.2. Rumusan Masalah

Berdasar latar belakang tersebut di atas, dapat dirumuskan masalah sebagai berikut.

- (1) Apakah pemberian estrogen berpengaruh terhadap berat badan tikus jantan dewasa ?
- (2) Apakah lama waktu pemberian estrogen berpengaruh terhadap berat badan tikus jantan dewasa ?

- (3) Bagaimanakah aktivitas spermatogenesis di dalam tubuli seminiferi pada saat estrogen memberikan pengaruh terhadap berat badan?

I.3. Tujuan Penelitian

Tujuan yang ingin dicapai dalam penelitian ini adalah sebagai berikut.

- (1) Mengetahui pengaruh estrogen terhadap berat badan tikus jantan dewasa.
- (2) Mengetahui pengaruh lama waktu pemberian estrogen terhadap berat badan tikus jantan dewasa.
- (3) Mengetahui aktivitas spermatogenesis di dalam tubuli seminiferi di saat estrogen dapat memberikan pengaruh terhadap berat badan.

I.4. Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang pengaruh pemberian estrogen khususnya dan kontak dengan sumber-sumber estrogen di alam pada umumnya terhadap berat badan berkaitan dengan manfaat positifnya dapat mengurangi resiko terjadinya atherosklerosis dan dengan mempertimbangkan dampak negatifnya pada aktivitas spermatogenesis dalam tubuli seminiferi.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

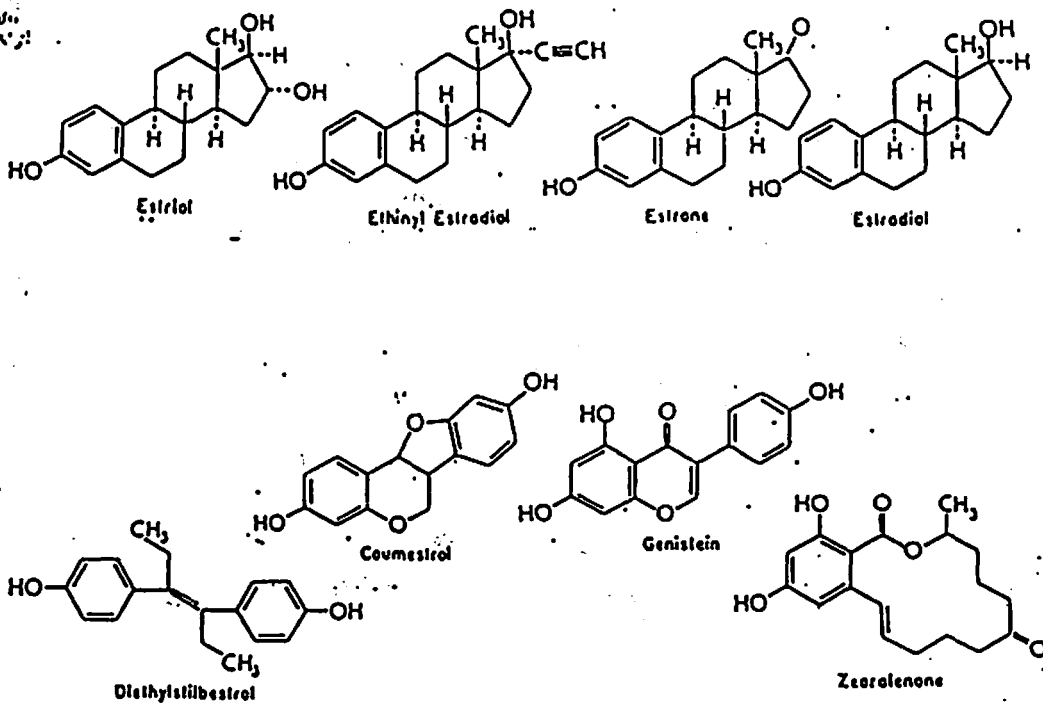
II.1. Estrogen

Estrogen diartikan sebagai hormon yang menimbulkan estrus atau birahi pada hewan betina (Toelihere, 1979), dapat merangsang kornifikasi pada sel-sel epidermal vagina dan proliferasi serta vaskularisasi endometrium tikus betina yang dikastrasi (Norris, 1980).

Berdasar struktur kimianya, estrogen dapat dibedakan atas estrogen steroid dan non steroid. Estrogen dapat dibedakan pula atas estrogen alami (*natural estrogens*) dan estrogen sintetik (Gambar 2.1.) (Gorbman dan Bern, 1974; Tausk, 1975; Toelihere, 1979; Fullerton, 1982).

Estrogen terdistribusi secara luas di alam (Gorbman dan Bern, 1974). Pada mamalia, secara normal estrogen dihasilkan dalam jumlah besar oleh ovarium dan plasenta, dalam jumlah sedikit oleh kelenjar adrenal dan dalam jumlah yang sangat sedikit oleh testis (Fullerton, 1982). Estrogen juga ditemukan pada berbagai jaringan Avertebrata. Sebagai contoh, ovarium bintang laut mengandung estradiol 17 β . Berbagai jenis tumbuhan (seperti *palm kernel* merupakan sumber estron, dan *pussy willow* merupakan sumber estriol)(Gorbman dan Bern, 1974). Beberapa bahan alami yang berasal dari tumbuhan dan merupakan estrogen yang poten adalah genistein (dari jenis semanggi), coumestrol (dari

jenis Leguminosae tertentu) (Toelihere, 1979; Fullerton, 1982) dan zearalenon (dari kapang *Fusarium*) (Fullerton, 1982).

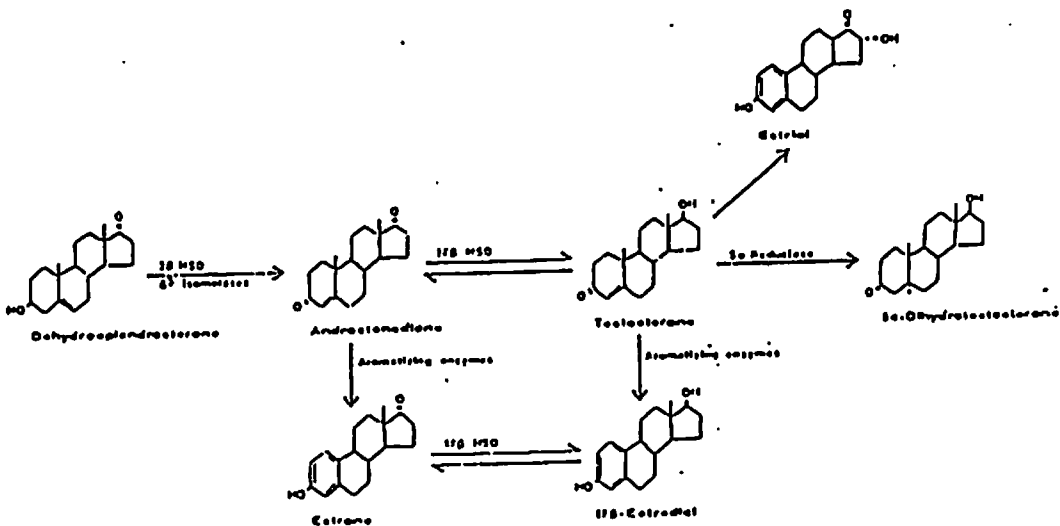


Gambar 2.1. Struktur kimia beberapa jenis estrogen steroid (estradiol 17 β , estriol, etinylestradiol dan estron) dan nonsteroid (diethylstilbestrol/ DES, coumestrol, genistein dan zearalenon). DES dan etinylestradiol merupakan estrogen sintetik (Fullerton, 1982)

Estrogen yang belum diidentifikasi secara lengkap ditemukan pula pada lebih dari 30 famili tumbuhan tinggi (Gorbman dan Bern, 1974). Schmidt-Nielsen (1991) menyebutkan bahwa beberapa jenis tanaman kacang-kacangan yang termakan mamalia perumput, mengandung senyawa aktif yang memberikan pengaruh sama dengan estrogen yang dihasilkan

oleh hewan. Aktivitas estrogenik ditemukan pada sejumlah besar bahan kimia, kebanyakan senyawa fenol dan berbagai bentuk kehidupan sampai pada organisme yang hidup pada sedimen di bawah laut (Meyers et al., 1979).

Estrogen yang berasal dari hewan pada umumnya berupa senyawa steroid sedang yang berasal dari tumbuhan non-steroid (Toelihere, 1979; Fullerton, 1982). Estrogen yang dihasilkan oleh testis sebagian besar dihasilkan oleh sel Leydig dan sisanya oleh sel Sertoli. Estrogen di dalam testis merupakan hasil aromatisasi androgen di dalam sel (Gambar 2.2). Tujuh puluh persen estrogen dalam sirkulasi sebagian besar bukan berasal dari testis (Ganong, 1993).



Gambar 2.2. Aromatisasi androgen menjadi estrogen oleh enzim aromatase (Tienhoven, 1983)

Pemberian estrogen (estradiol benzoat) 1 dan 2,5 µg/hari pada mencit jantan dewasa dapat menekan pengaruh testosteron, dan mencit jantan tersebut akan menunjukkan

perilaku lordosis saat dihadapkan pada pejantan lain yang tidak diberi estrogen (Samama dan Aron, 1991). Pemberian estrogen (estradiol benzoat) pada tikus jantan 10 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ BB/ hari selama 7 hari dapat menekan sekresi hormon-hormon gonadotropin yang dihasilkan oleh hipofisis baik FSH (*Follicle Stimulating Hormone*) maupun LH (*Luteinizing Hormone*) (Wierman et al., 1988). Sekresi LH tikus jantan dewasa juga ditekan karena pemberian estrogen (ethynilestradiol 1 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ BB/hari) selama 13 hari (Winarni, 1996). FSH mempengaruhi spermatogenesis dengan bekerja langsung pada tubuli seminiferi, sedangkan LH bekerja melalui stimulasi sekresi testosteron pada sel Leydig di dalam testis (Hall, 1988).

Kadar estrogen plasma yang relatif tinggi akibat pemberian estrogen mengakibatkan terganggunya fungsi reproduksi melalui mekanisme hambatan terhadap sekresi FSH dan atau LH (Gorbman dan Bern, 1974; Fullerton, 1982; Ross dan Reith, 1985; William-Ashman, 1988; Wierman et al., 1988). Dengan adanya hambatan tersebut, spermatogenesis terhenti dengan segera dan pemberian lebih lanjut dapat menyebabkan terjadinya sterilitas. Atrofi testis bahkan dapat terjadi karena pemakaian estrogen (Tausk, 1975). Konsumsi bahan bersifat estrogenik memberikan pengaruh yang sama dengan estrogen yang dihasilkan hewan (Schmidt-Nielsen, 1990).

Selain menghambat fungsi gonadotropik hipofisis, estrogen dapat menurunkan rasio antara lipoprotein plasma

VLDL dan LDL terhadap lipoprotein plasma HDL (Tausk, 1971). Jenis lipoprotein plasma tersebut berperan dalam transpor berbagai jenis lipid di dalam cairan tubuh (trigliserida, kolesterol dan fosfolipid) (Tausk, 1971; Stryer, 1981; Linder, 1992).

II.2. Lipoprotein Plasma dan Metabolisme Lemak

Lipoprotein plasma yang berperan dalam transpor berbagai jenis lipid di cairan tubuh, disintesis dan disekresikan oleh hepar dan intestinum. Lipoprotein plasma tersebut dibedakan berdasarkan densitasnya menjadi kilomikron, VLDL, (*very low density lipoprotein*), LDL (*low density lipoprotein*), dan HDL (*high density lipoprotein*). Lipoprotein tersebut mengandung inti lipid hidrofobik dan dikelilingi oleh kulit apoprotein. Kompleks tersebut dapat melarutkan lipid hidrofobik, sedangkan komponen proteinnya berperan dalam mengatur keluar-masuknya lipid tertentu pada target spesifik (Stryer, 1981).

Kilomikron mengangkut triasilgliserol, kolesterol dan lipid lain dari intestinum ke jaringan lemak dan hepar. Kilomikron kaya akan triasilgliserol dan mengandung protein paling sedikit dibanding dengan lipoprotein plasma yang lain. VLDL terutama disintesis oleh hepar, tersusun terutama oleh trigliserida (triasilgliserol), selain kolesterol dan fosfolipid. Salah satu fungsi VLDL adalah mengangkut triasilgliserol yang disintesis secara endogen ke jaringan

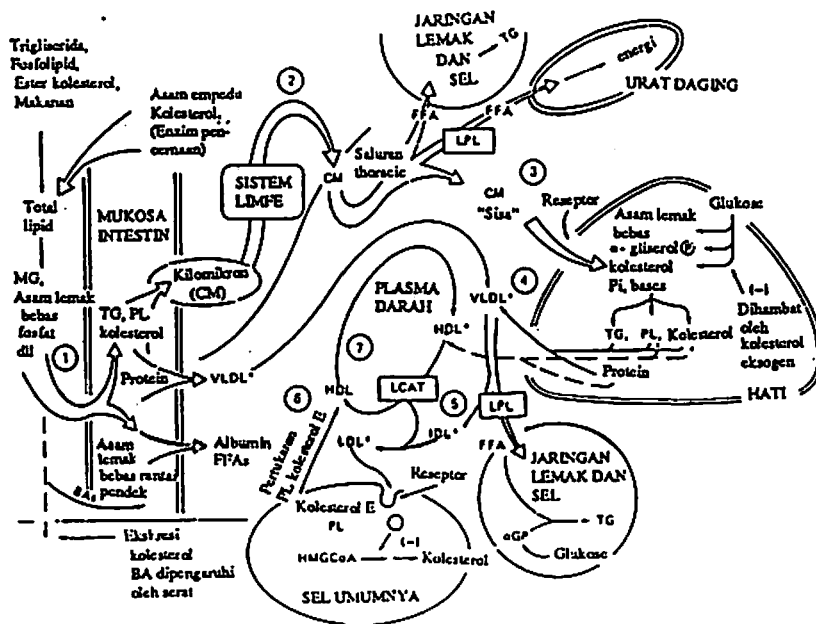
lemak. LDL mengangkut kolesterol ke jaringan perifer dan mengatur sintesis kolesterol di jaringan tersebut. HDL yang disintesis hepar, kaya akan fosfolipid dan kolesterol. HDL mengangkut kolesterol dari jaringan-jaringan perifer untuk dimetabolisme di dalam hepar (Stryer, 1981; Linder, 1992).

Metabolisme lemak terutama melibatkan hepar, darah dan jaringan lemak (jaringan adiposa yang terdiri dari sel-sel adiposit/sel lemak). Hepar dan jaringan lemak merupakan tempat utama metabolisme lemak, sedangkan darah berperan sebagai sistem transpor. Selain itu, terlibat pula otot skeletal (otot rangka/otot lurik) dan otot jantung, yang merupakan pemakai utama produk metabolisme lemak (Conn et al., 1987).

Triasilgliserol yang berasal dari diet, di dalam lumen intestinum akan didegradasi menjadi asam lemak bebas (FFA/*free fatty acid*) dan monoasilgliserol dengan bantuan garam empedu dan lipase pankreas. Garam empedu, asam lemak dan monoasilgliserol bersama-sama membentuk misel yang memudahkan absorpsi ke dalam epitel intestinum. Sedangkan asam lemak bebas rantai pendek dapat langsung masuk ke darah dalam bentuk terikat albumin plasma, dan setelah diubah menjadi asam lemak bebas oleh hepar dapat dimanfaatkan oleh jaringan sebagai sumber energi (Conn et al., 1987).

Di dalam mukosa intestinum, triasilgliserol, fosfolipid dan kolesterol ester disintesis kembali, kemudian

bersama-sama dengan protein disekresikan ke sistem limfe dalam bentuk kilomikron. Kilomikron memasuki aliran darah terutama menuju jaringan lemak (jaringan adiposa) dan jaringan otot, melalui duktus torakikus. VLDL yang juga disintesis oleh mukosa intestinum juga memasuki darah dan kemudian dikonversi menjadi LDL dengan melepaskan kandungan trigliserida dan protein. (Linder, 1992)



Gambar 2.3. Nasib lemak diet di dalam tubuh. TG=triasilgliserol; PL=fosfolipid; Cholest. E.= kolesterol ester; CM=kilomikron; =enzim plasma/kapiler; LPL=lipase lipoprotein; LCAT= transferase acyl lesitin kolesterol; BA=garam empedu. (1) pencernaan lemak diet masuk ke dalam intestinum; (2) distribusi melalui kilomikron; (3) sisa kilomikron masuk ke hepar; (4) sekresi VLDL oleh hepar (dan intestinum); (5) konversi menjadi LDL dan pengambilan kolesterol; (6) fungsi HDL; (7) kembalinya kolesterol ke dalam hati melalui HDL (Linder, 1992)

Kilomikron dan VLDL terutama diproses oleh sel-sel adiposit dan sel otot rangka. Apoprotein di permukaan lipoprotein mengaktifkan lipase lipoprotein (LPL) yang terikat pada kapiler jaringan. Aktivasi ini mengakibatkan pelepasan asam lemak bebas yang akan segera digunakan sebagai sumber energi atau disimpan sebagai cadangan lemak dalam jaringan lemak. (Linder, 1992)

Sisa triasilgliserol dan ester kolesterol dalam kilomikron diambil oleh hepar, sedangkan kelebihan fosfolipid, kolesterol dan protein dipindahkan ke HDL. Di dalam hepar, kolesterol diekskresikan ke empedu atau diesterifikasi dan diinkorporasi ke VLDL untuk diangkut lebih lanjut. Asam-asam lemak yang terbentuk yang tidak dibutuhkan hepar diinkorporasikan kembali ke dalam triasilgliserol bersama-sama fosfolipid kolesterol dalam protein dikemas dalam bentuk VLDL hepar menuju ke jaringan lemak dan jaringan perifer lain.

Hampir semua asam lemak masuk ke jaringan lemak untuk disimpan dalam bentuk triasilgliserol. Lipoprotein sisa diubah menjadi LDL dengan bantuan HDL dan LCAT (Lecithin - Cholesterol Acyl Transferase). LDL diambil oleh semua jaringan perifer. Pengambilan LDL oleh sel tergantung adanya reseptor-reseptor LDL di permukaan sel (Linder, 1992).

Terjadinya penurunan rasio antara VLDL dan HDL terha-



dap HDL plasma disebut-sebut sebagai faktor yang dapat menurunkan resiko terjadinya atherosklerosis yaitu timbulnya timbunan plak yang mengandung lipid di dinding pembuluh darah. (Tausk, 1975; Stryer, 1981).

II.3. Lemak dan Berat Badan

Adiposit (sel-sel lemak) penyusun jaringan lemak didapatkan sebagai jaringan bebas di berbagai bagian tubuh (bantalan tulang dan organ vital, di bawah kulit sebagai insulator) atau terdispersi di antara otot dan jaringan ikat (Linder, 1992). Adiposit yang merupakan cadangan utama lemak adalah jaringan lemak subkutan, otot dan mesenterium. cadangan lemak ini tak statis, melainkan secara sinambung mengalami deposisi dan mobilisasi (Conn et al., 1987).

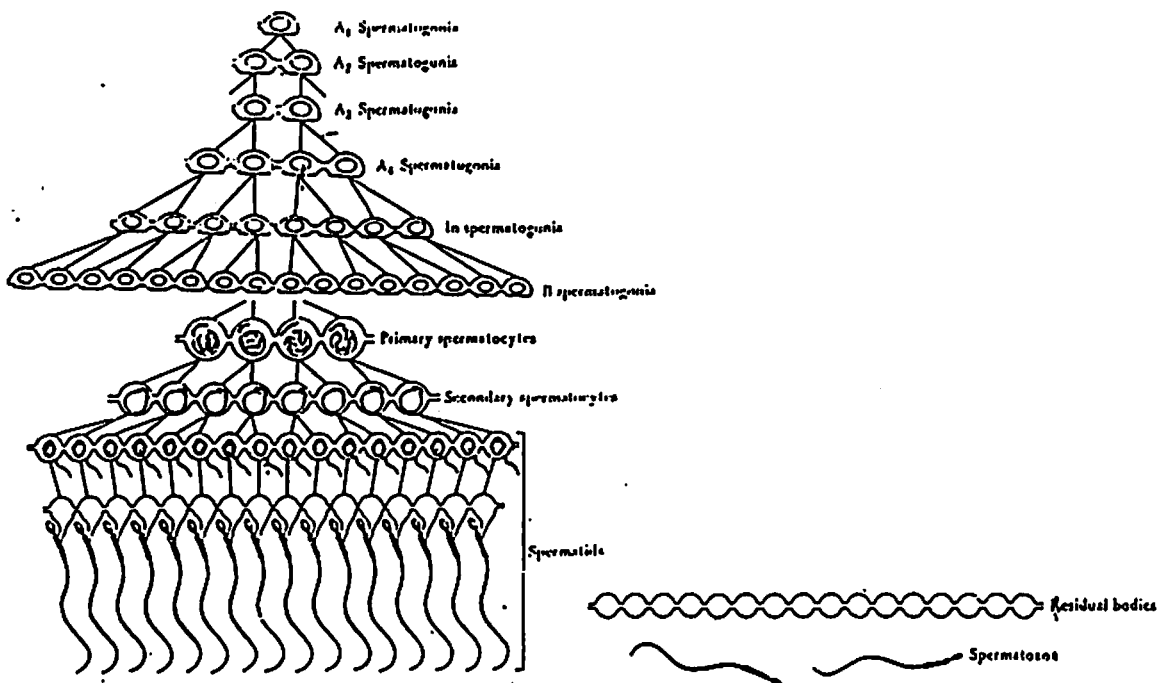
Berat badan mamalia dewasa, dalam hal ini manusia, tersusun terutama oleh berat otot (urat daging) sebesar 41,5% total berat badan, lemak dalam jaringan lemak/adiposa (18%) dan tulang (15,8%). Lemak memegang peran penting dalam penambahan/pengurangan berat badan karena komposisi tubuh tanpa lemak pada individu dewasa relatif konstan (Linder, 1992).

II.4. Spermatogenesis

Spermatogenesis adalah rangkaian peristiwa sitologi yang bertujuan menghasilkan spermatozoa masak dari spermatogonia. Pada mamalia, spermatogenesis berlangsung di dalam

tubuli seminiferi testis dan berlangsung terus secara sinambung sepanjang masa reproduksi (de Kretser dan Kerr, 1988).

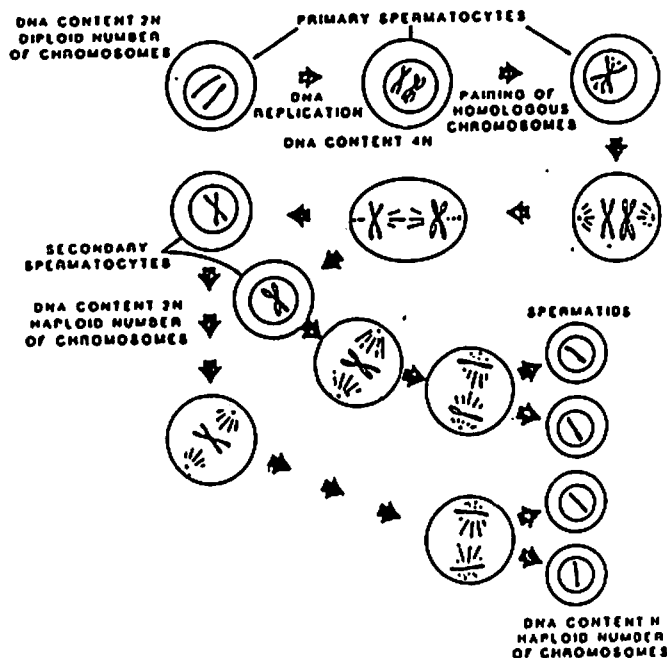
Tiga tahap utama yang terjadi dalam spermatogenesis adalah : 1. perbanyakan spermatogonia melalui mitosis (spermatositogenesis), 2. reduksi jumlah kromosom melalui meiosis dan 3. transformasi sel menjadi spermatozoa yang berstruktur kompleks melalui serangkaian perubahan tanpa disertai pembelahan sel (spermiogenesis) (Gambar 2.4 dan 2.5) (de Kretser dan Kerr, 1988; Junquiera *et al.*, 1992).



Gambar 2.4. Diagram jumlah pembelahan yang terjadi dan jenis sel spermatogenik yang terbentuk pada tiap tahap spermatogenesis (Gilbert, 1991)

Pembelahan sel selalu diakibatkan oleh terjadinya kariokinesis (pembelahan inti) dan sitokinesis (pembelahan

sitoplasma. Sitokinesis pada sel-sel spermatogenik, baik pada pembelahan mitosis maupun meiosis tidak sempurna (Gilbert, 1991). Sel-sel spermatogenik hasil pembelahan spermatogonium masih berhubungan satu sama lain dengan perantaraan jembatan sitoplasma (*cytoplasmic bridges*) (Ross dan Reith, 1985; Gilbert, 1991). Hubungan seperti ini bahkan masih berlangsung sampai tahap spermatid akhir (Ganong, 1993).



Gambar 2.5. Diagram perubahan set kromosom dan DNA selama pembelahan meiosis (de Kretser dan Kerr, 1988)

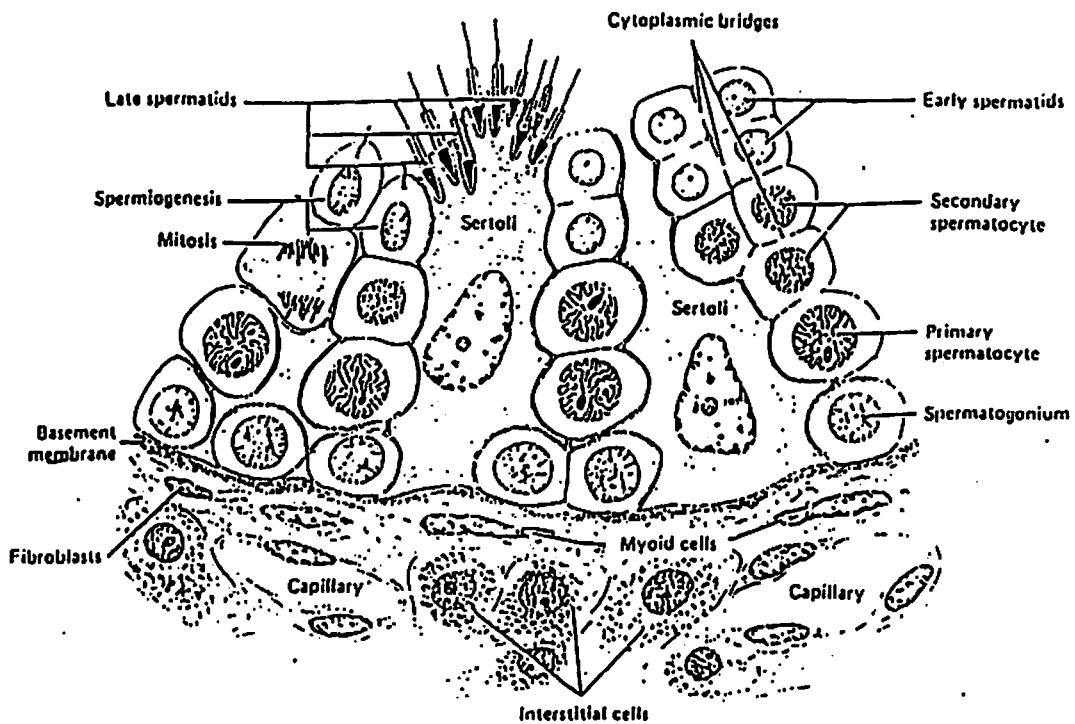
Tubuli seminiferi merupakan saluran-saluran halus panjang berkelok-kelok (Ross dan Reith, 1985), masing-masing dibatasi oleh lamina basalis yang jelas. Sel-sel penyusun

tubulus yang melekat langsung pada lamina basalis adalah spermatogonia A, spermatogonia antara dan sel Sertoli. Selanjutnya ke arah lumen terdapat berurutan sel-sel spermatogenik dalam tahap perkembangan lebih lanjut (spermatozoa berada paling dekat lumen tubulus). Dari lamina basalis ke luar tubulus berturut-turut ditemukan sel-sel myoid/peritubular (yang memiliki ciri otot polos), dan beberapa lapis fibroblas (Junquiera *et al.*, 1992).

Spermatogonium A berinti oval dengan kromatin tersebar halus, spermatogonium antara berinti oval dengan agregasi kromatin dekat dengan membran nukleus, dan spermatogonium B berinti hampir bulat dengan agregasi kromatin dekat membran nukleus (Ross dan Reith, 1985). Spermatisit primer berbentuk sferik dengan nukleus menunjukkan berbagai tahap pembelahan. Spermatisit sekunder berbentuk sferik dengan nukleus sentrik dan mengandung jala-jala kromatin. Ukuran spermatisit sekunder antara ukuran spermatisit primer dan spermatid. Spermatid tahap awal berbentuk sferik dengan inti sferik terletak sentral dan pada perkembangan selanjutnya bentuk dan letak inti berubah, inti terletak eksentrik (de Kretser dan Kerr, 1988).

Sel Sertoli berbentuk dasar kolumnar dengan prosesus apikal dan lateral yang mengisi ruang di antara sel spermatogenik, berinti ovoid atau trianguler (Ross dan Reith, 1985). Sel sertoli yang berdekatan dihubungkan oleh *tight junction* (Ross dan Reith, 1985) dan *gap junction*. Kompleks

junction ini membentuk *blood-testis barrier* (Gambar 2.6) yang melindungi sel spermatogenik yang sedang berkembang terhadap bahan-bahan yang bermolekul besar, dan sebaliknya mencegah masuknya produk aktivitas spermatogenesis ke dalam tubuh yang dapat membangkitkan reaksi imun (Ganong, 1993).



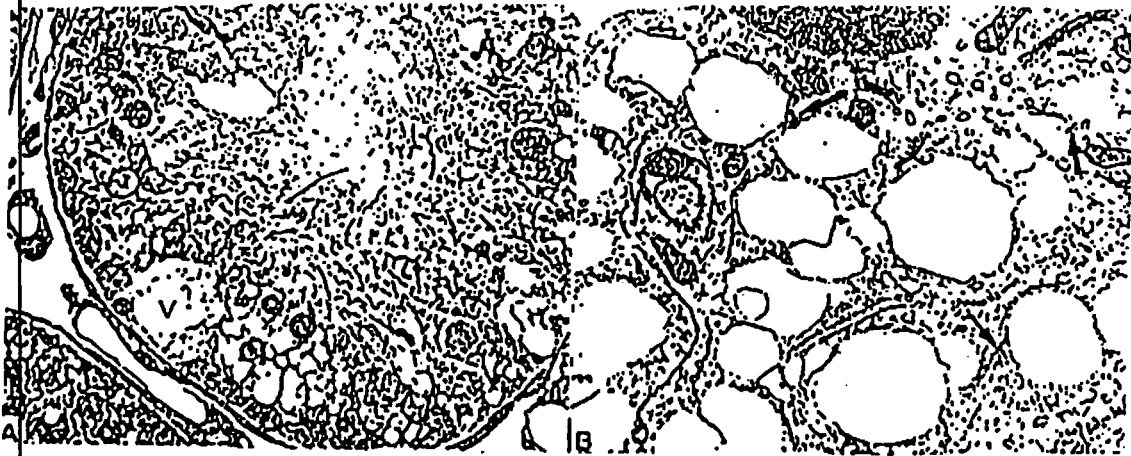
Gambar 2.6. Gambar skema bagian tubulus seminiferus yang memperlihatkan hubungan antara sel Sertoli dengan sel spermatogenik dan hubungan antara sel-sel spermatogenik melalui jembatan sitoplasma (*cytoplasmic bridges*) (Ganong, 1993)

Di dalam "ruang" antara tubuli didapatkan sel interstitialis/ sel Leydig (penghasil androgen), kapiler darah dan pembuluh limfe (de Kretser dan Kerr, 1988; Junquiera et al., 1992; Ganong, 1993).

Di dalam tubulus, sel-sel spermatogenik dengan berbagai tahap perkembangan tidak terdistribusi secara acak tetapi "tertata" dengan pola asosiasi tertentu (Gambar 3.1.). Waktu antara penampakan asosiasi sel tertentu dengan asosiasi sel yang sama berikutnya disebut satu siklus epitelium (Tienhoven, 1983; Ross dan Reith, 1985; de Kretser dan Kerr, 1988). Satu siklus epitelium tikus dapat dibedakan atas 14 jenis asosiasi sel dan memerlukan waktu sekitar 12,3 hari. Pada manusia dikenal adanya 7 tahap yang memerlukan waktu 16 hari (Tienhoven, 1983).

Perubahan jumlah dan jenis anggota sel yang berasosiasi pada tahap tertentu dapat dijadikan indikator adanya gangguan adanya spermatogenesis (Yatim, 1989).

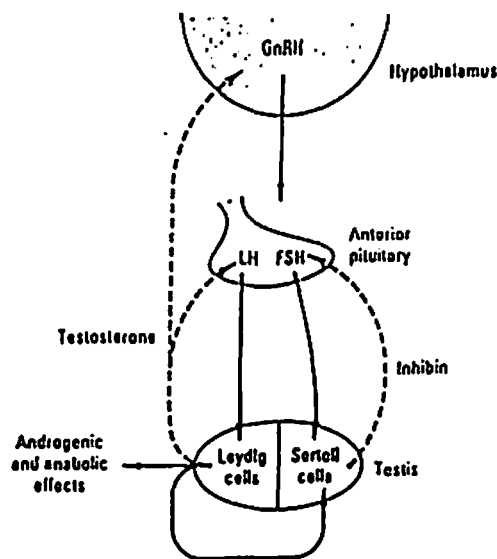
Jika terjadi ketakcukupan stimulasi endokrin, sel akan beradaptasi, menanggapi ketakcukupan tersebut dengan reduksi komponen-komponen selnya oleh adanya peningkatan aktivitas protease proteolitik sebagai mekanisme adaptasi (Robbins et al., 1984). Dalam keadaan demikian, menurut Bardin et al. (1988), sel Sertoli akan mereduksi jumlah mitokondria dan retikulum endoplasma. Kondisi kekurangan yang berkepanjangan akan mengakibatkan ukuran sel terus menyusut mengalami atrofi, sel Sertoli nampak pipih dengan inti pipih (*flattened*) dan banyak ditemukan vakuolisasi di daerah kompleks *junction* antar sel Sertoli (Gambar 2.7), bersamaan dengan terjadinya atrofi tubulus seminiferus (de Kretser dan Kerr, 1988; Thomas, 1981).



Gambar 2.7. Vakuolisasi tubuli seminiferi tikus. Ultrastruktur (B) menunjukkan bahwa vakuolisasi terjadi di daerah kompleks "junction" antar sel Sertoli (de Kretser dan Kerr, 1988)

Pengendalian aktivitas spermatogenesis melibatkan interaksi hormonal antara hipotalamus (sekresi GnRH/*Gonadotropin Releasing Hormone*), hipofisis anterior (sekresi gonadotropin=LH/*Luteinizing Hormone* dan FSH/*Follicle Stimulating Hormone*), dan sel-sel Leydig (sekresi androgen), Sertoli dan spermatogenik (Gambar 2.8) (Ganong, 1993).

GnRH bekerja pada hipofisis anterior, memicu sekresi FSH dan LH. FSH bekerja pada sel Sertoli dan bersama-sama dengan androgen memelihara fungsi gametogenik testis. Inhibin yang dihasilkan sel Sertoli di bawah pengaruh FSH memberikan umpan balik menghambat sekresi FSH. LH bekerja pada sel Leydig, merangsang sekresi testosteron yang akan memberikan umpan balik menghambat sekresi LH (Ganong, 1993).



Gambar 2.8. Hubungan antara hipotalamus, hipofisis anterior dan testis dalam mempengaruhi aktivitas spermatogenesis. Garis-garis kontinyu menunjukkan pengaruh memicu dan garis-garis putus pengaruh menghambat (Ganong, 1993)

Testosteron di dalam tubuli seminiferi disebutkan antara lain diperlukan untuk perkembangan spermatosit primer menjadi spermatid (Norris, 1980), untuk proliferasi dan diferensiasi sel spermatogenik (Ross dan Reith, 1985), pada tahap awal dan akhir spermatogenesis (Hadley, 1992) dan hanya pada tahap spermiogenesis (Ganong, 1993). Pada sel-sel spermatogenik yang tidak mempunyai reseptor untuk androgen, pengaruh testosteron pada spermatogenesis diduga diberikan melalui sel Sertoli (Hadley, 1992).

Sekresi LH ke dalam sirkulasi oleh hipofisis anterior dapat dihambat oleh adanya umpan balik negatif testosteron baik secara langsung pada hipofisis anterior maupun pada sekresi GnRH oleh hipotalamus (Hall, 1988; Ojeda dan Ur-

bansky, 1988; Wierman *et al.*, 1988; Ganong, 1993).

FSH bekerja pada sel Sertoli (Norris, 1980; Tienhoven, 1981; Hall, 1988; Hadley, 1992; Ganong, 1993). Ikatan antara FSH dengan reseptor pada membran sel mengakibatkan peningkatan sintesis cAMP dalam sitoplasma yang kemudian akan mengaktifasi protein kinase. Fosforilasi berbagai jenis protein mengakibatkan aktivasi berbagai fungsi sel Sertoli. Adanya penemuan bahwa FSH dapat merangsang sintesis RNA dan protein memberikan petunjuk bahwa FSH mempengaruhi sejumlah fungsi khusus sel Sertoli melalui mekanisme selain modifikasi aktivitas protein yang sudah ada dalam sel Sertoli (Bardin *et al.*, 1988).

Fungsi-fungsi sel Sertoli yang ada dipengaruhi oleh FSH antara lain adalah sintesis ABP (*Androgen Binding Protein*), sintesis inhibin (Bardin *et al.*, 1988; Ganong, 1993), metabolisme energi sel dan sintesis glikoprotein (Bardin *et al.*, 1988).

FSH merangsang sintesis ABP, yang berfungsi sebagai *carrier* testosteron di dalam sel Sertoli. Di dalam lumen tubuli seminiferi, ABP menjaga konsentrasi testosteron tetap tinggi, yang diperlukan dalam kelangsungan spermatogenesis, dan sebagai pengangkut (*transporter*) testosteron dari testis ke epididimis (Norris, 1980; Tienhoven, 1983; Bardin *et al.*, 1988).

FSH merangsang sintesis inhibin yang merupakan senyawa non steroid yang larut air yang berfungsi memberikan umpan

balik negatif terhadap sekresi FSH (Ying. et al., 1987; Ying, 1988; Ganong, 1993) dan ikut berperan dalam merangsang sintesis testosteron pada sel Leydig (sebaliknya, testosteron menghambat sekresi inhibin yang diinduksi FSH) (Bardin. et al., 1988).

Metabolisme energi dalam sel Sertoli yang meliputi uptake glukosa, produksi laktat, dan aktivasi glikogen fosforilase dirangsang oleh FSH. Fungsi ini penting karena laktat digunakan sebagai sumber energi utama sel-sel spermatogenik. Sel-sel spermatogenik sangat tergantung pada ketersediaan laktat tersebut (Bardin et al., 1988).

FSH juga meningkatkan sintesis glikoprotein permukaan sel (berperan dalam adesi antar sel Sertoli) (Bardin. et al., 1988), meningkatkan jumlah reseptor androgen dalam sel Sertoli (Sanborn et al., 1991), memacu proliferasi sel-sel Sertoli masa pra dan pascanatal (Bardin et al., 1988), memacu proliferasi spermatogonia (Maekawa et al., 1995) dan membantu LH meningkatkan biosintesis androgen dalam sel Leydig (Hadley, 1992).

Dengan demikian, FSH berperan sejak terjadinya proliferasi spermatogonia (Maekawa et al., 1995) hingga terbentuknya spermatis primer (Norris, 1980), dan terhadap perkembangan tahap akhir spermatid menjadi spermatozoa (Ganong, 1993), merupakan pengaruh tak langsung FSH terhadap aktivitas spermatogenesis melalui pengaruhnya pada sel Sertoli.

BAB III

METODE PENELITIAN

III.1. Bahan Penelitian

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini meliputi hewan uji, pakan tikus, sumber estrogen dan bahan-bahan kimia untuk pembuatan sediaan mikroanatomi testis.

Hewan uji yang digunakan adalah tikus putih jantan dewasa dari jenis *Rattus norvegicus* L usia 9-10 minggu sebanyak 60 ekor (penentuan umur dewasa berdasar Kohn dan Barthold (1984)) dengan berat badan berkisar 90 gram sampai dengan 135 gram. Hewan uji tersebut diperoleh dari Unit Pemeliharaan Hewan Percobaan (UPHP) Universitas Gadjah Mada.

Pakan tikus berupa par-G pelet produk P.T. Comfeed Indonesia.

Estrogen yang digunakan adalah Lynoral, produk Organon, Jakarta. Kemasan berupa tablet yang mengandung ethinylestradiol 50 µg/tablet. Ethinylestradiol adalah estrogen steroid sintetik yang 15-20 kali lebih aktif dibanding estradiol jika digunakan per oral (Fullerton, 1982).

Bahan kimia untuk pembuatan sediaan mikroanatomi testis yang meliputi : a. Larutan fiksasi Bouin, dengan komposisi asam pikrat jenuh, formalin dan asam asetat dengan perbandingan volume 15 : 5 : 1 (Drury et al., 1964); b. Bahan-bahan *processing* yang meliputi : formalin

10%, akuades, air, alkohol bertingkat, xylol dan parafin dengan titik leleh 55°C; c. Bahan-bahan untuk pewarnaan : xylol, alkohol bertingkat, pewarna Hematoksilin Harris, akuades, air dan Eosin 1 %.

III.2. Alat Penelitian

Alat-alat penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah 8 buah kandang tikus dengan kapasitas per kandang 7-8 ekor hewan uji; timbangan (dalam gram) dengan kepekaan pengukuran sampai 1 angka di belakang koma untuk mengetahui berat badan hewan uji; *disposable syringe* 1 ml yang ujungnya diberi logam atau kanul untuk memasukkan estrogen ke kerongkongan tikus (per oral); peralatan bedah untuk pengambilan testis; alat-alat yang diperlukan untuk pembuatan sediaan mikroanatomi testis; mikroskop cahaya dan perangkat mikrofotografi.

III.3. Pelaksanaan Penelitian

Penelitian dilaksanakan menurut tahap-tahap berikut.

Tahap persiapan, yang meliputi,

- a. Penyediaan dan aklimasi hewan uji.
- b. Penyiapan larutan estrogen sesuai dengan dosis yang direncanakan untuk perlakuan (1 tablet Lynoral dilarutkan dalam 25 cc air mineral). Dosis yang

digunakan adalah 1 $\mu\text{g}/100$ g berat badan(BB)/ hari (Penentuan dosis berdasar Fullerton (1982), Wierman (1988) serta Samama dan Aaron (1991)). Larutan untuk kelompok plasebo (larutan bahan dasar tablet dalam air mineral) dibuat sesuai dengan larutan estrogen. Dengan demikian volume yang diberikan pada tiap hewan uji sama untuk semua kelompok yaitu 0,5 cc.

Tahap perlakuan.

a. Pengelompokan hewan uji

Hewan uji yang akan diamati berat badannya dikelompokkan menjadi 2 kelompok yaitu:

Kelompok perlakuan, terdiri dari 30 hewan uji yang diberi estrogen 1 $\mu\text{g}/100\text{g}$ BB/hari. Kelompok perlakuan dibedakan menjadi:

Kelompok I : Kelompok yang diberi larutan estrogen selama 13 hari, terdiri atas 15 hewan uji.

Kelompok II : Kelompok yang diberi larutan estrogen selama 25 hari, terdiri atas 15 hewan uji.

Kelompok kontrol (terdiri dari 30 hewan uji) dan dibedakan menjadi:

Kelompok III : Kelompok plasebo I, yaitu kelompok yang diberi larutan bahan dasar tablet, selama 13

hari, terdiri atas 15 hewan uji.

Kelompok IV : Kelompok plasebo II, yaitu kelompok yang diberi larutan bahan dasar tablet, selama 25 hari, terdiri atas 15 hewan uji .

b. Pengukuran berat badan dan pengambilan cuplikan testis

Pengukuran berat badan dilakukan dua kali, pertama pada awal perlakuan dan kedua, 1 hari setelah perlakuan dihentikan.

Cuplikan testis yang akan diproses untuk sediaan mikroanatomi diambil dari testis kanan, 1 hari setelah perlakuan dihentikan (setelah penimbangan kedua).

c. Pembuatan sediaan mikroanatomi

Testis yang telah diangkat, dibersihkan, kemudian difiksasi di dalam larutan fiksatif Bouin. Pembuatan sediaan mikroanatomi dilakukan dengan metode parafin dan pewarnaan Hematoksilin-Eosin dengan urutan cara kerja berikut.

Testis setelah dipotong, difiksasi selama kurang lebih 1-4 jam di dalam larutan Bouin. Kemudian testis diiris menggunakan silet tipis tajam kemudian fiksa-

si dilanjutkan.

Dehidrasi dilakukan dengan jalan mencuci testis yang telah difiksasi dengan alkohol bertingkat berturut-turut 70% (2 jam), 80% (1 jam), 90% (1 jam), 96% (30 menit) dan alkohol absolut (30 menit).

Clearing adalah proses penjernihan sediaan. Untuk keperluan ini potongan testis dapat direndam dalam xylol sampai semalam (*overnight*).

Infiltrasi, proses menyusupkan parafin ke dalam jaringan, dilakukan dengan merendam potongan testis di dalam campuran xylol:parafin berturut-turut dengan perbandingan 3:1, 1:1, 1:3, dan terakhir dalam parafin murni, pada suhu 55° C. Tiap tahap dilakukan selama 1 jam.

Embedding dilakukan dengan jalan menanam potongan testis ke dalam parafin cair dan kemudian membiarkannya membeku membentuk blok yang mudah diiris dengan mikrotom.

Blok parafin yang mengandung potongan testis diiris setebal 4 μ m. Irisan yang bagus kemudian ditempelkan pada gelas obyek yang sudah diolesi perekat Meyer's albumin, ditetesi dengan akuades kemudian diletakkan di atas *hot plate*.

Irisan testis diwarnai dengan Hematoksilin Eosin diperlakukan dengan proses berurut berikut:

1. Deparafinisasi, gelas obyek berisi irisan testis

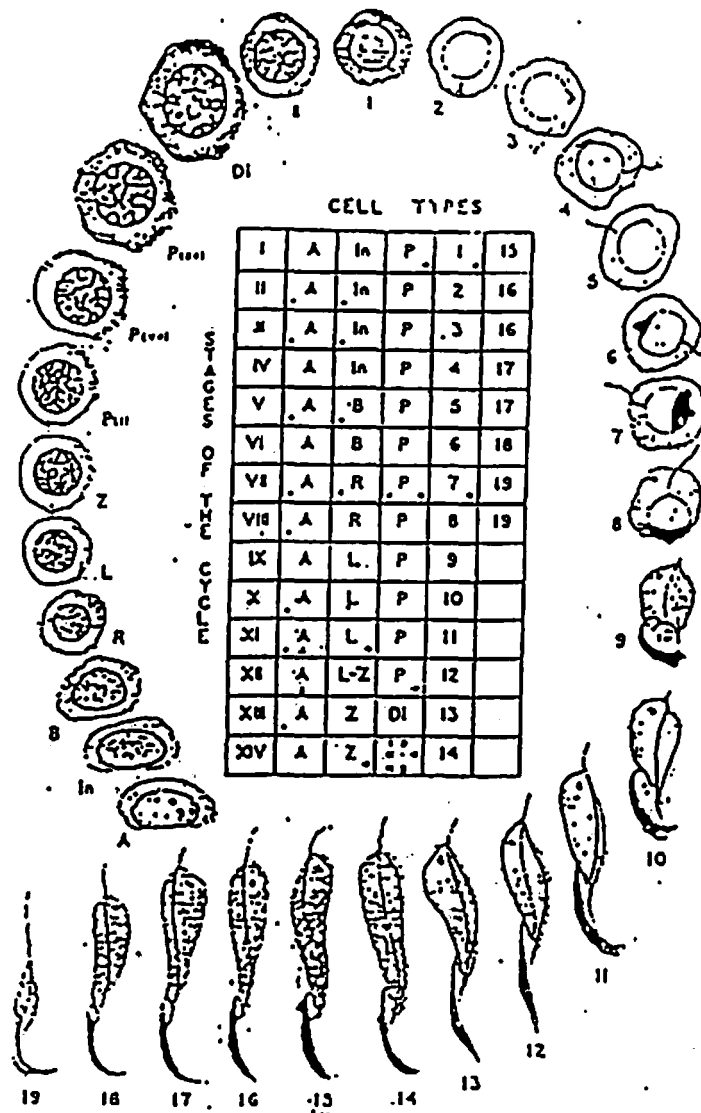
dicelupkan ke dalam xylol dua kali, masing-masing selama 10 menit.

2. Dipindahkan ke dalam alkohol dengan konsentrasi menurun mulai dari alkohol 96%-90%-80%-70%-60%-50%-40%-30% dan yang terakhir air.
3. Dipindahkan ke dalam pewarna Hematoksilin Harris 10 menit. Sisa pewarna dicuci segera dengan air mengalir sekitar 5 menit.
4. Dipindahkan ke dalam pewarna Eosin selama 5 menit.
5. Dipindahkan ke dalam alkohol bertingkat dari konsentrasi 70%-80%-90% dan terakhir 96%.
6. Dipindahkan ke dalam xylol , dua kali, masing-masing 10 menit.
7. Direkat dengan gelas penutup menggunakan perekat Entellan.

Dari tiap 1 testis dibuat 2 irisan sediaan.

d. Pengamatan mikroanatomi dan pembuatan mikrofoto.

Pengamatan mikroanatomi merupakan pengamatan kualitatif terhadap sel-sel spermatogenik pada penampang melintang tubuli seminiferi di bawah mikroskop dengan perbesaran lensa 600 kali . Penentuan jenis sel spermatogenik tikus berdasar Tienhoven (1983) (Gambar 3.1).



Gambar 3.1. Tahap-tahap spermatogenesis tikus dengan asosiasi sel tertentu (baris). A=spermatogonium jenis A; In=spermatogonium jenis antara; B=spermatogonium jenis B; R=spermatosit primer tahap praleptoten; L=spermatosit primer tahap Leptoten; Z=spermatosit primer tahap Zigoten; P=spermatosit primer tahap Pakiten; Di=spermatosit primer tahap Diploten; II=spermatosit sekunder; Angka 1-19 menunjukkan urutan tahap spermiogenesis; Angka romawi menunjukkan tahapan (jenis asosiasi sel) dalam satu siklus epitelium (Tienhoven, 1983)

Pengamatan dilakukan dengan perbesaran obyektif lemah terlebih dahulu untuk mengetahui adanya tubuli seminiferi yang sel-selnya mengalami degenerasi (ditandai dengan adanya diameter lumen yang lebih besar dari tubuli normal dan kadang disertai dengan adanya pengerutan ukuran diameter tubuli/ atrofi), kemudian dilakukan pengamatan pada perbesaran obyektif kuat untuk mengamati struktur tubuli seminiferi.

III.4. Analisis Data

Data yang dikumpulkan meliputi data persentase pertambahan berat badan per hari (rerata persen selisih berat badan setelah perlakuan dengan berat badan awal) dan data mikrofoto gambaran spermatogenesis di dalam tubuli seminiferi.

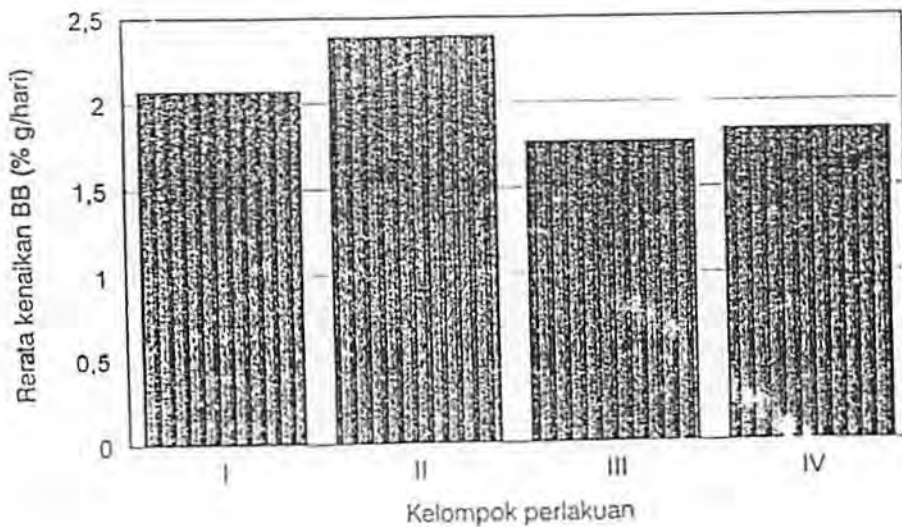
Data persentase pertambahan berat badan per hari dianalisis secara statistik dengan analisis varians satu arah untuk mengetahui perbedaan data tersebut antar kelompok I-III, II-IV dan I-II.

Jika dari hasil analisis varians didapatkan adanya perbedaan bermakna (dengan nilai probabilitas (p) $< 0,05$), untuk mengetahui letak perbedaan (pasangan kelompok yang menunjukkan perbedaan bermakna), uji dilanjutkan dengan LSD (*Least Significance Differences*).

BAB IV
HASIL DAN PEMBAHASAN

V.1. Berat Badan

Data berat badan merupakan data rerata persen selisih hasil pengukuran berat badan akhir dan awal perlakuan, seperti ditunjukkan oleh grafik berikut (gambar 4.1).



Gambar 4.1. Rerata % kenaikan berat badan tikus jantan dewasa yang diperlakukan dengan ethynilestradiol $1 \mu\text{g}/100 \text{ g BB/hari}$ (EE)
 I = EE selama 13 hari II = EE selama 25 hari
 III = plasebo I IV = plasebo II

Dari grafik nampak bahwa rerata % kenaikan berat badan pada kelompok perlakuan (I dan II) lebih besar daripada kelompok kontrol plasebo (III dan IV), meskipun hasil analisis statistik lampiran 2), antara kelompok I dan III (plasebo I), serta I dan II tidak menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna. Tidak adanya perbedaan yang bermakna antara kelompok II dan I menunjukkan bahwa lama waktu perlakuan tidak berpengaruh terhadap % kenaikan berat badan.

Persentase kenaikan berat badan yang ditunjukkan oleh kelompok perlakuan II menunjukkan bahwa terjadi deposisi lipid yang menyebabkan kenaikan berat badan karena pengaruh estrogen. Jika dikaitkan dengan terjadinya penurunan rasio antara LDL dan VLDL terhadap HDL, maka dari hasil penelitian ini cenderung menunjukkan bahwa terjadi peningkatan HDL daripada dugaan terjadinya penurunan LDL dan VLDL. Dengan demikian terjadi peningkatan aktivitas pengambilan kolesterol dari fosfolipid kilomikron setelah dari jaringan perifer oleh HDL untuk dimetabolisme di hepar. Diduga karena adanya peningkatan tersebut, meningkat pula sisa triasilgliseriol dan ester kolesterol yang diambil hepar dari kilomikron sisa.

Asam-asam lemak dibentuk hepar dan tidak diperlukan juga meningkat dan ditranspor ke jaringan lemak dan perifer lain untuk dideposisi. Deposisi ini menyebabkan peningkatan berat badan.

IV.2. Aktivitas Spermatogenesis dalam Tubuli Seminiferi

Gambaran aktivitas spermatogenesis dalam tubuli seminiferi ditunjukkan oleh mikrofoto berturut-berturut gambar 4.3, gambar 4.4, dan gambar 4.5.

Gambaran spermatogenesis normal pada kelompok kontrol plasebo ditunjukkan oleh gambar 4.3. Di dalam tubuli seminiferi terdapat jenis-jenis sel-sel spermatogenik lengkap mulai spermatogonium, spermatosit, spermatid dan spermatozoa. Lumen nampak sempit dipenuhi oleh ekor spermatozoa.

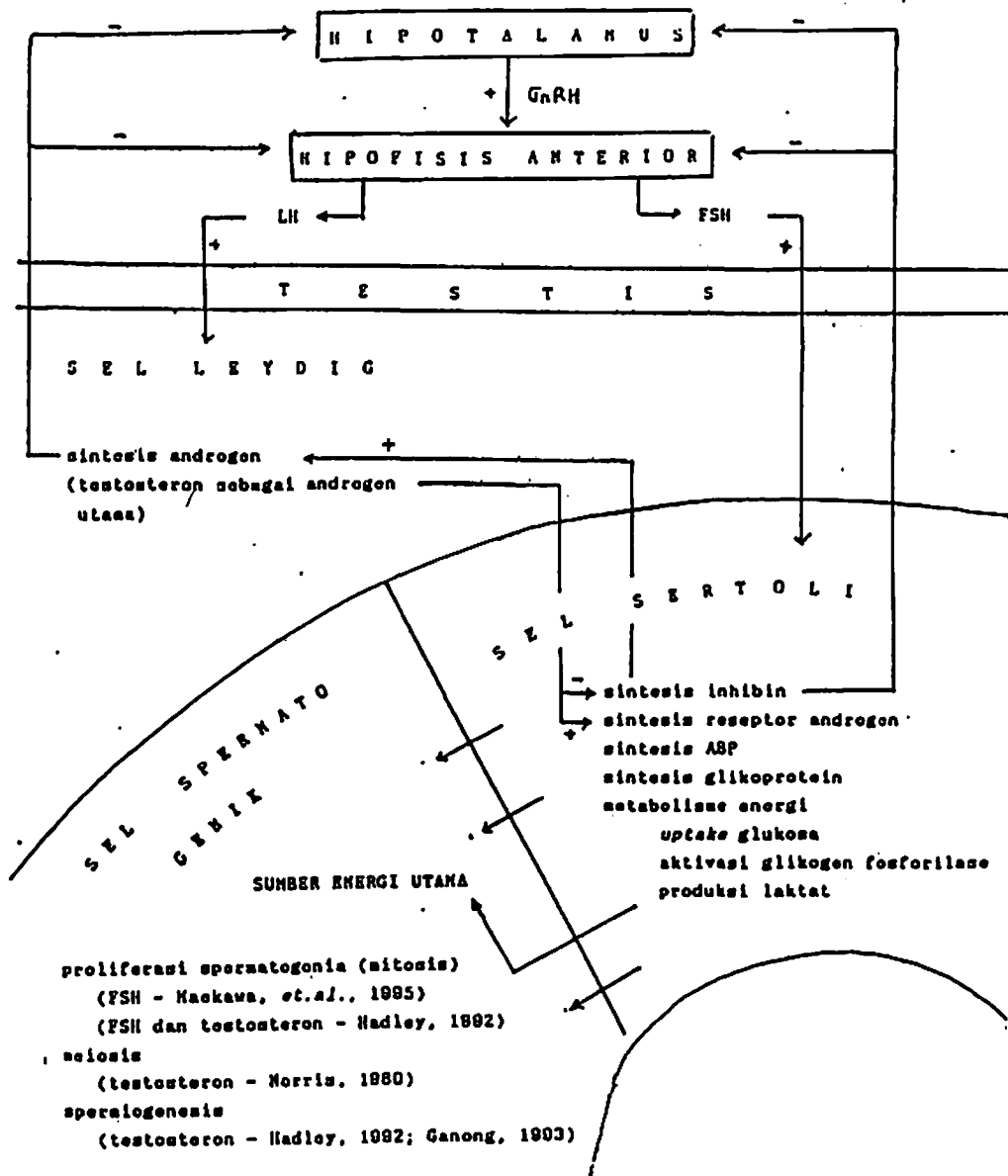
Testis tikus kelompok I (EE 13 hari) (gambar 4.3) menunjukkan adanya sebagian tubuli yang mengalami hambatan spermatogenesis yang ditandai dengan berkurangnya jenis-jenis sel spermatogenik penyusun tubuli. Di dalam tubuli tersebut, hampir semuanya tidak ditemukan adanya spermatozoa, hanya nampak spermatosit dan adanya sel-sel raksasa berinti lebih dari satu yang letaknya lebih ke arah lumen, sehingga diameter lumen nampak lebih besar dari diameter lumen tubuli dengan aktivitas spermatogenesis normal di sekitarnya.

Pada kelompok I ini, saat estrogen memberikan pengaruh terhadap spermatogenesis, pemberian estrogen nampak memberikan pengaruh terhadap persentase kenaikan berat badan, meskipun secara statistik tidak berbeda dengan kelompok kontrol plasebo (kelompok III). Hambatan spermatogenesis ini, berdasarkan Winarni (1996) bersifat reversibel jika pemberian/kontak dengan estrogen dihentikan.

Pada kelompok II, saat pemberian estrogen (EE selama 25 hari) memberikan kenaikan berat badan (dibanding plasebo), ternyata memberikan dampak negatif terhadap spermatogenesis. Hal ini nampak pada mikrofoto (gambar 4.5) yang menunjukkan terjadinya atrofi pada tubuli seminiferi. Tubuli menyusut - berukuran lebih kecil daripada normal - dengan tanpa satupun jenis sel spermatogenik ditemukan di dalam tubuli, hanya sel Sertoli yang masih bertahan.

Pemberian estrogen menurunkan kadar LH serum (Winarni, 1996). Sasaran kerja LH adalah sel Leydig pada testis.

Sel Leydig akan mensekresi testosteron di bawah pengaruh LH. Testosteron yang disekresi, sesampainya di tubuli seminiferi akan memberikan pengaruhnya pada sel Sertoli. Terbentuknya protein baru di bawah pengaruh testosteron menyebabkan terjadinya sejumlah aktivitas biologik dalam sel Sertoli. Testosteron memicu terjadinya spermatogenesis bersama-sama dengan FSH (Hadley, 1992) dan berperan dalam spermatogenesis pada tahap meiosis (Norris, 1980) dan spermiogenesis (Hadley, 1992; Ganong, 1993). Aksi LH dalam biosintesis testosteron dibantu oleh inhibin yang disekresi oleh sel Sertoli di bawah pengaruh FSH (Steinberger dan Wards, 1988).



Gambar 4.2. Skema pengendalian spermatogenesis melalui jalur hipotalamus-hipofisis-testis. Berdasar beberapa sumber. Tanda + menunjukkan pengaruh memacu, tanda - pengaruh menghambat

Sasaran aksi FSH dalam tubuli seminiferi ialah pada sel Sertoli. Fungsi fisiologi sel Sertoli yang dipengaruhi oleh FSH

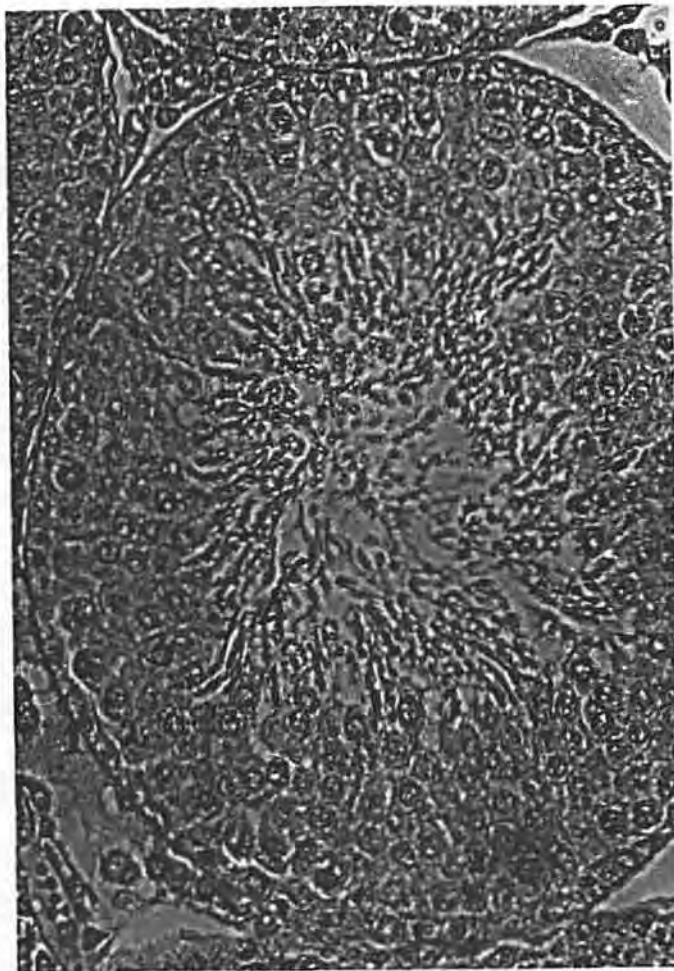
adalah sintesis reseptor androgen (bekerja sama dengan androgen), sintesis ABP, sintesis inhibin, sintesis glikoprotein, dan metabolisme energi dengan salah satu hasilnya berupa laktat yang merupakan sumber energi utama sel-sel spermatogenik. Inhibin dapat memberikan pengaruh umpan balik negatif terhadap sekresi FSH, dan sintesis inhibin dihambat oleh testosteron (Steinberger dan Wards, 1988). FSH, melalui kerjanya pada sel Sertoli, ikut berperan dalam spermatogenesis terutama dalam tahap spermiogenesis (Ganong, 1993).

Penurunan kadar LH serum diikuti dengan penurunan biosintesis testosteron di dalam sel Leydig. Penurunan biosintesis testosteron, secara langsung akan menyebabkan gangguan pada fungsi fisiologi sel Sertoli yang ada di bawah pengaruh testosteron.

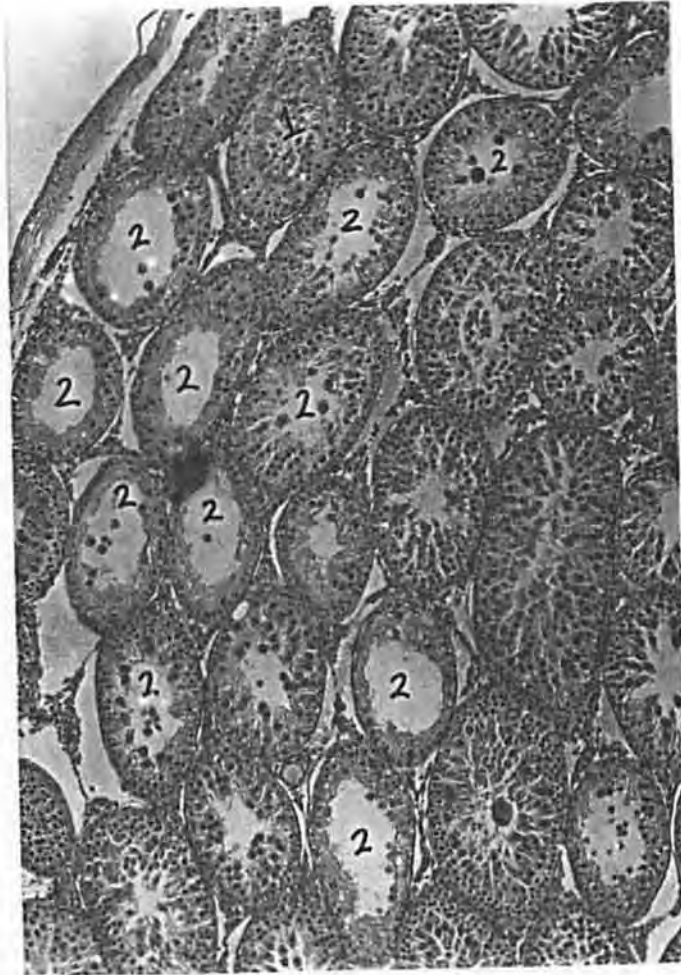
Gangguan sintesis testosteron secara langsung akan mengakibatkan terganggunya sejumlah fungsi sel Sertoli yang merupakan sel pendukung dan pemberi nutrisi sel-sel spermatogenik, akan mengakibatkan terjadinya degenerasi sel-sel spermatogenik di dalam tubuli seminiferi. Sel Sertoli lebih pendek dan mendukung sel-sel spermatogenik dengan jumlah jenis, total dan lapisan sel lebih sedikit. Menghilangnya sel-sel spermatogenik (pada kelompok I - Gambar 4.3) atau semua sel spermatogenik (pada kelompok II - Gambar 4.4), berdasar Robbins, et al. (1984), disebabkan oleh adanya peningkatan konsentrasi protease hidrolitik di dalam sel Sertoli sehingga sel-sel spermatogenik yang mengalami degenerasi karena terganggunya fungsi sel Sertoli akan didegradasi dengan

segera oleh sel Sertoli. Pada tubuli yang mengalami atrofi (Gambar 4.4), sel Sertoli pada pengamatan di bawah perbesaran mikroskop 600 kali nampak lebih pendek, pipih dengan inti memipih, sama sekali tak ada sel spermatogenik yang didukung. Perubahan morfologi sel Sertoli dalam hal ini berupa penyusutan ukuran, menurut Bardin, et al. (1988) disebabkan oleh terjadinya pengurangan jumlah mitokondria dan retikulum endoplasma sebagai respon atas ketakcukupan suplai hormon. Menurut Robbins, et al. (1984) sel-sel Sertoli yang berada di tubuli yang mengalami atrofi mungkin kehilangan fungsi tetapi tidak mati selagi masih cukup nutrisi sekedar untuk tetap bertahan hidup.

Meskipun menurut Winarni (1996) hambatan akan hilang setelah perlakuan dihentikan, tetapi dari hasil penelitian ini tidak jelas apakah setelah perlakuan dihentikan, setelah hambatan terhadap spermatogenesis tidak ada, masih pula kenaikan berat badan dipengaruhi. Terutama tidak dapat dipertimbangkan apakah rasio LDL dan VLDL terhadap HDL tetap menunjukkan penurunan sampai pada waktu tertentu, karena pada penelitian ini tidak dilakukan pengukuran kadar lipoprotein plasma tersebut.



Gambar 4.3. Tubuli seminiferi dengan aktivitas spermatogenesis normal (perbesaran mikroskop 600x). Nampak spermatogonium (1), spermatosit I (2), spermatid (3) dan spermatozoa (4)



Gambar 4.4. Mikroanatomi testis tikus (perbesaran mikroskop 100x) yang diperlakukan dengan ethynilestradiol $1 \mu\text{g}/100 \text{ g BB/hari}$ selama 13 hari. Nampak tubuli seminiferi dengan aktivitas spermatogenesis normal (1) dan tubuli seminiferi yang mengalami hambatan spermatogenesis (2). Nampak pula "giant cell" dengan inti lebih dari satu



Gambar 4.5. Mikroanatomi testis tikus (perbesaran mikroskop 100x) yang diperlakukan dengan ethynilestradiol $1 \mu\text{g}/100 \text{ g BB/hari}$ selama 25 hari. Nampak tubuli yang mengalami atrofi (1) di antara tubuli seminiferi dengan ukuran normal (2)

BAB V
KESIMPULAN DAN SARAN

V.1. Kesimpulan

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan sebagai berikut.

- (1) Pemberian estrogen berpengaruh terhadap berat badan tikus jantan dewasa yaitu meningkatkan persentase kenaikan berat badan
- (2) Lama waktu pemberian estrogen tidak berpengaruh terhadap berat badan
- (3) Saat estrogen dapat meningkatkan persentase kenaikan berat badan tikus, terjadi pula hambatan terhadap spermatogenesis. Peningkatan lama waktu perlakuan meningkatkan tingkat hambatan.

V.2. Saran

Meskipun estrogen dapat memberikan dampak positif menurunkan resiko terjadinya aterosklerosis, tetapi dari hasil penelitian ini disarankan untuk lebih memperhatikan lama waktu kontak dengan estrogen yang cenderung memberikan dampak negatif terutama terhadap spermatogenesis.

DAFTAR PUSTAKA

- Bancroft, John D., and Cook, Harry C. 1984. *Manual of Histological Techniques*. New York: Longman Group Limited.
- Bivin, W.S. and G.D. Smith. 1984. *Techniques of Experimentation in Laboratory Animal Medicine*. (edited by: J.G. Fox, B.J. Cohen and F.M. Loew). Orlando: Academic Press Inc.
- Conn, Eric E, Paul K. Stump, George Bruening, Roy H. Doi. 1987. *Outlines of Biochemistry*. Canada: John Wiley and Sons, Inc.
- De Kretser, D.M., and J.B. Kerr. 1988. *The Cytology of The Testis in The Physiology of Reproduction* (edited by: E. Knobil, J. Neill, L.L. Ewing, and G.S. Greenwald). New York: Raven Press Ltd.
- Drury, R.A.B., E.A. Wallington, and S.R. Cameron. 1964. *Carleton's Histological Technique*. 4th.ed. London: Oxford University.
- Fullerton, D.S. 1992. *Steroids and Therapeutically Related Compounds in Wilson and Gisvold's Textbook of Organic Medicinal and Pharmaceutical Chemistry* (edited by: R.F. Doerge). 8th ed. Philadelphia : J.B. Lippincot Company.
- Ganong, W.F. 1993. *Review of Medical Physiology*. 16th.ed. New Jersey: Prentice Hall Inc.
- Gilbert, S.F. 1991. *Developmental Biology*. 3rd. ed. Massachusetts: Sinaeur Associates, Inc.
- Gorbman, A., and H.A. Bern. 1974. *A Textbook of Comparative Endocrinology*. New Jersey: Prentice Hall Inc.
- Hadley, E.M. 1992. *Endocrinology*. New Delhi: Willey Eastern Private Ltd.
- Hall. P.F. 1988. *Testicular Steroid Synthesis: Organization and Regulation in The Physiology of Reproduction* (edited by: E. Knobil, J. Neill, L.L. Ewing, and G.S. Greenwald). New York: Raven Press Ltd.
- Kohn, D.F., and Barthold, S.W. 1984. *Biology and Disease of Rats in Laboratory Animal Medicine* (edited by: J.G. Fox, B.J. Cohen and F.M. Loew). Orlando: Academic Press Inc.
- Linder, Maria C. 1992. *Steroids and Therapeutically Related Compounds dalam Wilson and Gisvold's Textbook of Organic Medicinal and Pharmaceutical Chemistry* (editor: R.F. Dodge). 8th ed. Philadelphia : J.B. Lippincott Company.

- Maekawa, K., Z.S. Ji, and S.I. Abe. 1995. Proliferation of Newt Spermatogonia by Mammalian FSH via Sertoli Cells In Vivo. *Journ. of Experimental Zoology*. vol 272. no. 5 (Aug. 1. 1995).
- Meyers, F.H., E. Jawetz, and A. Goldfier. 1979. *Review of Medical Pharmacology*. Lange Medical Publications.
- Norris, D.O. 1980. *Vertebrate Endocrinology*. Philadelphia: Lea and Febiger.
- Ross, M.H. and E.J. Reith. 1985. *Histology, A Text and Atlas*. New York: Prentice Hall Inc.
- Robbins, S.L., C. Ramsis, and K. Vinay. 1984. *Pathologic Basis of Disease*. 3 rd. ed. Ontario: W.B. Saunder. Co.
- Samama, B, and C. Aron. 1991. Induction of Progesterin Receptors in The Mediobasal Hypothalamus of Gonadally Intact Male Rats Primed With Estrogen in Relation To Display of Lordosis Behavior. *Journ. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* vol.39. no. 2. p. 215-220.
- Schmidt-Nielsen, K. 1991. *Animal Physiology: Adaptation and Environment*. 4th.ed. New York: Cambridge University Press.
- Steinberger, A and D.N. Ward. 1988. *Inhibin in The Physiology of Reproduction* (edited by : E. Knobil, J. Neill. LL. Ewing and G.S. Greenwald). New York : Raven Press Ltd.
- Stryer, Lubert. 1981. *Biochemistry*. 2nd ed. New York: W.H. Freeman and Co.
- Tausk, M. 1975. *Pharmacology of Hormones*. Stuttgart: Georg Thieme Publisher.
- Tienhoven, A. 1983. *Reproductive Physiology of Vertebrates*. 2nd. ed. Ithaca and London: Cornell University Press.
- Wierman, M.E., S.D. Gharib, J.M. La Rovere, T.M. Badger, and W.W. Chin. 1988. Selective Failure of Androgens To Regulate Follicle Stimulating Hormone Beta Messenger Ribonucleic Acid Levels in The Male Rat. *Mol. Endocrinol.* vol. 2. no. 6. p. 492-498.
- Williams-Ashman, H.G. 1988. Perspectives in Male Reproduction in *The Physiology of Reproduction* (edited by: E. Knobil, J. Neill, L.L. Ewing, and G.S. Greenwald). New York: Raven Press Ltd.

Winarni, Dwi. 1996. Pengaruh Pemberian Estrogen Dengan Lama Waktu Berbeda Terhadap Kadar Luteinizing Hormone Serum dan Spermatogenesis Tikus Putih (Rattus norvegicus L.) Dewasa. Tesis S-2. Program Pascasarjana UGM Yogyakarta. Tidak dipublikasikan.

L A M P I R A N

Lampiran 1

Hasil pengukuran berat badan tikus pada awal perlakuan (1) dan pada akhir perlakuan (2) dalam gram

Ula ngan	Berat badan tikus kelompok							
	I		II		III		IV	
	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)
1	129,0	173,6	106,8	179,4	102,6	124,8	114,4	173,2
2	113,8	127,5	104,1	147,8	107,0	123,4	117,6	169,5
3	122,5	161,9	96,3	147,2	121,0	145,5	122,2	180,2
4	119,0	151,4	101,6	153,9	115,7	139,0	117,9	159,2
5	114,7	150,2	95,4	150,6	104,6	126,7	124,1	166,2
6	112,5	125,9	99,7	167,5	127,1	149,3	120,1	182,1
7	117,7	162,3	107,1	176,4	121,8	140,2	109,3	172,2
8	106,5	132,3	105,7	171,5	117,3	150,1	128,8	174,4
9	112,9	148,7	98,0	154,9	113,6	147,5	105,8	160,2
10	100,8	132,4	103,2	153,5	96,3	132,2	108,2	162,5
11	112,9	148,7	116,5	169,2	121,1	146,4	95,5	146,5
12	108,1	136,2	103,0	157,8	115,6	151,1	110,2	174,6
13	104,3	129,4	93,0	146,6	127,1	150,7	121,4	167,1
14	100,8	132,3	91,1	160,9	102,6	124,8	133,1	198,4
15	92,5	121,2	92,3	142,6	121,8	140,2	132,7	188,5

Lampiran 2. : Analisis Varians Searah Antar Kelompok Perlakuan

----- O N E W A Y -----

Variable PERTBB
By Variable KELOMPOK kelompok perlakuan

Analysis of Variance

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares	F Ratio	F Prob.
Between Groups	3	3,5474	1,1825	5,0268	,0037
Within Groups	56	13,1730	,2352		
Total	59	16,7205			

Group	Count	Mean	Standard Deviation	Standard Error	95 Pct Conf Int for Mean
Grp 1	15	2,0700	,7387	,1907	1,6609 TO 2,4791
Grp 2	15	2,3853	,2865	,0740	2,2267 TO 2,5440
Grp 3	15	1,7633	,4748	,1226	1,5004 TO 2,0263
Grp 4	15	1,8333	,2962	,0765	1,6693 TO 1,9974
Total	60	2,0130	,5324	,0687	1,8755 TO 2,1505

GROUP	MINIMUM	MAXIMUM
Grp 1	,4500	2,9100
Grp 2	2,0500	3,0600
Grp 3	1,1700	2,8700
Grp 4	1,3500	2,2700
TOTAL	,4500	3,0600

Lampiran 2 (lanjutan)

Multiple Range Tests: LSD test with significance level ,05

The difference between two means is significant if
 $MEAN(J)-MEAN(I) \geq ,3430 * RANGE * \sqrt{1/N(I) + 1/N(J)}$
 with the following value(s) for RANGE: 2,83

(*) Indicates significant differences which are shown in the lower triangle

		G G G G
		r r r r
		p p p p
		3 4 1 2
Mean	KELOMPOK	
1,7633	Grp 3	
1,8333	Grp 4	
2,0700	Grp 1	
2,3853	Grp 2	* *

Homogeneous Subsets (highest and lowest means are not significantly different)

Subset 1

Group	Grp 3	Grp 4	Grp 1
Mean	1,7633	1,8333	2,0700

Subset 2

Group	Grp 1	Grp 2
Mean	2,0700	2,3853
