

KE  
KKA  
TFD.22/11  
Ma  
P

TESIS

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK BIJI KEDELAI (*Glycine max*)  
TERHADAP GAMBARAN MIKROSKOPIK TUBULUS SEMINIFERUS  
DAN JUMLAH SEL SPERMATOGENIK MENCIT (*Mus musculus*)**



SITI MAEMONAH



**PROGRAM PASCA SARJANA  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2007**

**TESIS**

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK BIJI KEDELAI (*Glycine max*)  
TERHADAP GAMBARAN MIKROSKOPIK TUBULUS SEMINIFERUS  
DAN JUMLAH SEL SPERMATOGENIK MENCIT (*Mus musculus*)**

**SITI MAEMONAH**

NIM : 090415339M

**PROGRAM PASCA SARJANA  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
S U R A B A Y A  
2 0 0 7**

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK BIJI KEDELAI (*Glycine max*)  
TERHADAP GAMBARAN MIKROSKOPIK TUBULUS SEMINIFERUS  
DAN JUMLAH SEL SPERMATOGENIK MENCIT (*Mus musculus*)**

TESIS

Untuk memperoleh Gelar Magister  
dalam Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar  
pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga

Oleh :

**SITI MAEMONAH**

NIM : 090415339M

**PROGRAM PASCA SARJANA  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
TANGGAL 2 MARET 2007**

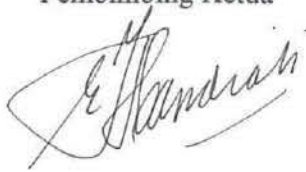
iii

Lembaran Pengesahan

TESIS INI TELAH DISETUJUI  
Pada tanggal 2 Maret 2007

Oleh

Pembimbing Ketua



**Dr Endang Isbandiati, dr, MS, SpFK**  
NIP. 130 531 760

Pembimbing



**Drh Sri Agus Sudjarwo, PhD**  
NIP. 131 406 098

Mengetahui,  
Ketua Program Studi



**Prof Retno Handajani, dr, MS, PhD**  
NIP. 130 541 984

Lampiran Pengesahan

TESIS INI TELAH DISELAMI  
pada tanggal 2 / April 2007

Oleh

Pembimbing Utama

Dr. Bambang Istikomah, dr. MS, SpTK  
NIP. 130 231 780

Pembimbing

Dr. Sri Agus Sudjarmo, PhD  
NIP. 131 409 098

Konstatan

Kelua Program Studi

Prof Retno Handayani, dr. MS, PhD  
NIP. 130 241 984

Telah diuji pada

Tanggal 2 Maret 2007

**PANITIA PENGUJI TESIS**

**Ketua : Dr Paulus Liben, dr, MS**

**Anggota : 1. Dr Endang Isbandiati, dr, MS, SpFK**

**2. Drh Sri Agus Sudjarwo, PhD**

**3. Hamzah, dr, SpFK**

**4. Dr Rina Judiwati, dr, MS**

## UCAPAN TERIMA KASIH

Pertama-tama saya panjatkan puji syukur kehadirat Allah SWT Yang Maha Pengasih lagi Maha Penyayang atas segala rahmat dan karunia-Nya, sehingga tesis ini dapat diselesaikan.

Terima kasih tak terhingga dan penghargaan yang setinggi-tingginya saya ucapkan kepada Dr. Endang Isbandiati, dr., MS, SpFK, sebagai pembimbing ketua yang dengan penuh perhatian telah memberikan dorongan, bimbingan, dan saran sehingga tesis ini dapat terselesaikan.

Terima kasih tak terhingga dan penghargaan yang setinggi-tingginya saya ucapkan kepada Drh. Sri Agus Sudjarwo, PhD, sebagai pembimbing yang dengan penuh perhatian dan kesabaran telah memberikan dorongan bimbingan dan saran.

Dengan selesainya usulan penelitian ini, maka saya ucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

Rektor Universitas Airlangga Prof Dr Fasichul Lisan, Apt. dan mantan rektor Prof Dr Med H Puruhito, dr, SpBTKV atas kesempatan dan fasilitas dalam mengikuti dan menyelesaikan pendidikan Program Magister.

Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga Prof Dr H Muhammad Amin, dr, Sp(K) atas kesempatan yang diberikan menjadi mahasiswa Program Magister pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar Prof Retno Handajani, dr., MS, PhD yang telah membantu dalam kelancaran proses pendidikan sampai terlaksananya seminar usulan penelitian.

Dr Paulus Liben, dr, MS, Hamzah, dr.,SpFK dan Dr Rina Yudiwati, dr, MS yang telah memberikan saran dan masukan dengan tulus serta kesediaannya sebagai penguji.

Direktur Politeknik Kesehatan Surabaya, Moh Muchson, M.Sc.

Ketua Program Studi Keperawatan Soetomo Surabaya, Joko Suwito, SKp, MKes dan mantan Ketua Program Studi Keperawatan Soetomo Surabaya Dwi Adji Norontoko, SKep, Ns atas kesempatan yang diberikan kepada penulis untuk mengikuti pendidikan Program Magister.

Para Dosen Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar minat Farmakologi atas ilmu pengetahuan yang diberikan dan teman Program Pendidikan Magister angkatan 2003, Rima Parwati Sari atas dukungan dan perhatiannya selama pembelajaran di Program Pascasarjana.

Rekan-rekan Dosen Prodi Keperawatan Soetomo Surabaya atas segala dukungannya.

Akhirnya kepada suamiku, Wianda dan ketiga anak-anak kami, Gilang, Ratna, dan Malik atas kesabaran dan dukungannya hingga terselesaikannya program pendidikan ini.

Saya menyadari tesis ini tidak lepas dari kekurangan, oleh karena itu kritik dan saran yang bersifat membangun saya harapkan dari segala pihak. Semoga usulan penelitian ini bisa dilanjutkan untuk dilakukan penelitian. Amin.

Surabaya, Maret 2007

Penulis

## RINGKASAN

**Pengaruh Pemberian Ekstrak Biji Kedelai terhadap Gambaran  
Mikroskopik Tubulus Seminiferus dan Sel Spermatogenik Mencit  
(*Mus musculus*)**

Spermatogenesis adalah proses produksi dan maturasi gamet jantan yang berkembang secara progresif dari daerah basal tubulus seminiferus ke arah lumen. Inisiasi dan pemeliharaan spermatogenesis memerlukan sekresi gonadotropin dari pituitari dan selanjutnya tergantung pada keseimbangan poros *hypothalamo-pituitary-testis*. Komponen utama umpan balik sekresi gonadotropin diperantarai melalui aromatisasi menjadi estrogen.

Fitoestrogen, suatu senyawa yang mempunyai efek estrogenik dimungkinkan dapat memberikan umpan balik negative sekresi gonadotropin yang selanjutnya menurunkan spermatogenesis. Penurunan spermatogenesis dapat diidentifikasi dengan melihat penurunan jumlah sel spermatogenik yang selanjutnya akan mempengaruhi gambaran tubulus seminiferus.

Salah satu sumber fitoestrogen adalah kedelai dan produknya. Penelitian ini bertujuan mengetahui pengaruh pemberian ekstrak kedelai terhadap gambaran tubulus seminiferus dan sel spermatogenik.

Pada penelitian ini menggunakan 50 mencit jantan dewasa (*sexually mature*). Mencit tersebut dibagi menjadi 5 kelompok, masing-masing kelompok terdiri dari 10 ekor. Satu kelompok (kelompok kontrol) diberi larutan CMC Na<sup>+</sup> 0,5% dan 4 kelompok diberikan ekstrak biji kedelai varietas Ijen dengan beberapa dosis, yaitu: 9,1 mg/KgBB/hari, 18 mg/KgBB/hari, 36,4 mg/KgBB/hari, dan 72,8 mg/KgBB/hari. Ekstrak biji kedelai tersebut dilarutkan dalam CMC Na<sup>+</sup> 0,5%. Larutan tersebut diberikan peroral menggunakan sonde selama 35 hari. Setelah selesai perlakuan mencit dibunuh dan testis kiri diambil dan dibuat preparat dengan pewarnaan Hematoxylin Eosin (HE). Selanjutnya preparat diamati dibawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 400 kali untuk menghitung jumlah sel spermatogenik dan pembesaran 100 kali untuk mengukur tebal epitel tubulus seminiferus.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa rerata±simpangan baku pada masing-masing kelompok kontrol dan kelompok perlakuan dengan ekstrak biji kedelai dosis 9,1 mg/KgBB/hari, 18 mg/KgBB/hari, 36,4 mg/KgBB/hari, dan 72,8 mg/KgBB/hari, adalah untuk tebal epitel tubulus seminiferus (49,00±4,29µm, 47,11±4,73µm, 43,63±3,61µm, 41,56±4,59µm, dan 45,74±3,99µm), jumlah spermatogonium (50,89±1,08µm, 48,81±0,08µm, 45,83±1,17µm, 39,37±1,31µm, dan 36,52±0,60µm), jumlah spermatosit primer (48,30±0,63µm, 47,07±0,32µm, 45,03±0,66µm, 37,04±0,59µm, dan 35,74±0,40µm), dan jumlah spermatid (150,81±2,30µm, 150,70±2,06µm, 144,27±3,36µm, 134,59±1,82µm, dan 130,19±3,53µm).

Dari uji normalitas data tebal epitel tubulus seminiferus, jumlah spermatogonium, dan jumlah spermatid didapatkan signifikansi (probabilitas=p) lebih besar dari  $\alpha$  ( $p>0,05$ ), maka dapat disimpulkan bahwa data tersebut



berdistribusi normal, sedang untuk data jumlah spermatis primer didapatkan  $p < 0,05$ , maka dapat disimpulkan bahwa data tersebut tidak berdistribusi normal. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa rerata tebal epitel tubulus seminiferus antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan mengalami penurunan, namun berdasarkan uji Anova dan LSD tebal epitel tubulus seminiferus menurun pada dosis 18,2 mg/KgBB/hari dan 36,4 mg/KgBB/hari. Rerata jumlah spermatogonium antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan mengalami penurunan. Hasil uji Anova didapatkan  $p = 0,000$ , yang berarti terdapat perbedaan yang bermakna diantara kelompok-kelompok tersebut. Dan dari uji LSD menunjukkan bahwa terdapat perbedaan bermakna antara kelompok kontrol dan semua kelompok perlakuan, demikian juga diantara kelompok satu dengan kelompok yang lain. Hasil uji *Kruskal-Wallis* untuk spermatis primer didapatkan hasil  $p = 0,000$ , yang berarti terdapat perbedaan yang bermakna diantara kelompok-kelompok tersebut. Dan dari uji *Mann-Whitney* menunjukkan adanya perbedaan bermakna diantara semua kelompok, baik kelompok kontrol maupun kelompok perlakuan, semakin tinggi dosis semakin sedikit jumlah spermatis primer. Hasil uji Anova untuk spermatid didapatkan  $p = 0,000$ , yang berarti terdapat perbedaan yang bermakna diantara kelompok-kelompok tersebut. Dan dari uji LSD menunjukkan tidak terdapat penurunan jumlah spermatid yang bermakna pada dosis 18,2 mg/KgBB/hari, 36,4 mg/KgBB/hari, dan 72,8 mg/KgBB/hari serta menunjukkan hubungan *dose-response*.

Kesimpulan dari penelitian ini adalah ekstrak biji kedelai dapat menurunkan jumlah sel spermatogenik serta menurunkan tebal epitel.

## SUMMARY

### **Effect of Soybean Extract to Microscopic Shown of Seminiferous Tubules and Numbers of Spermatogenic Cell at Mice (*Mus musculus*)**

Spermatogenesis is a production process and maturation of male gamet. The initiation and maintenance of spermatogenesis require the secretion of gonadotropins from the pituitary and thus is dependent on balance of the hypothalamo-pituitary-testis axis. A major component of the negative feedback action of androgens on gonadotropin secretion is mediated via aromatization to estrogen.

Phytoestrogens is a compound that has estrogenic effect may give negative feedback of gonadotropins secretion and than can decrease spermatogenesis. It can be identified by decrease the numbers of spermatogenic cell and also influenced seminiferous tubules shown.

One of phytoestrogens source is soybean and its product. This research has goal to identify influence of soybean extract to seminiferous tubules microscopic shown and numbers of spermatogenic cell.

This research used 50 adult mice (sexually mature). They were divided into five groups, each group consist of ten mice. One group (control group) was given solution of CMC Na<sup>+</sup> 0,5%, and the others group was given soybean extract varietas Ijen by dosage: 9,1 mg/KgBW/day; 18,2 mg/KgBW/day; 36,4 mg/KgBW/day; and 72,8 mg/KgBW/day. Extract of soybean be soluted by CMC Na<sup>+</sup> 0,5%. Treatment was given by using sonde for 35 day. At the end of treatment, mice were killed, the left testis was fixed in Buffer Formaline and embedding in wax, then stained by the Hematoxylin Eosin (HE) method. After that be observed by microscope 40 x 10 to count the cells of spermatogenic and microscope 10 x 10 to mesure seminiferous tubules diameter and thick of seminiferous epithelium.

Result showed that the average and standart deviation value of the control group and treatment group was given soybean extract varietas Ijen by dosage: 9,1mg/KgBW/day, 18,2mg/KgBW/day, 36,4mg/KgBW/day, and 72,8mg/KgBW/day was seminiferous tubules diameter (197,07±17,04µm, 174,85±20,34µm, 168,87±12,89µm, 174,41±18,35µm, dan 163,85±15,32 µm), thick of seminiferous epithelium (49,00±4,29µm, 47,11±4,73µm, 43,63±3,61µm, 41,56±4,59µm, dan 45,74±3,99µm, numbers of spermatogonia (50,89±1,08, 48,81±0,08, 45,83±1,17, 39,37±1,31, dan 36,52±0,60, numbers of primary spermatocyte (48,30±0,63, 47,07±0,32, 45,03±0,66, 37,04±0,59, dan 35,74±0,40, dan numbers of spermatid (150,81±2,30, 150,70±2,06, 144,27±3,36, 134,59±1,82, dan 130,19±3,53).

From normality test data of seminiferous tubules diameter, thick of seminiferous epithelium, numbers of sprmatogonia and numbers of spermatid were  $p > 0,05$ , so can be concluded that the data has normal distribution, and numbers of primary spermatocyte be founded  $p < 0,05$ , its mean the data is not normal distribution. The result of study showed that average seminiferous tubules diameter among control group and treatment group are decrease and treatment groups are

not the significant difference. The result of Anova test was  $p=0,002$ , that's mean there is a significant difference among those groups. The result of LSD test was a significant difference among control group and all of treatment groups, and among the treatment group in variety dosage were not significant different. The average thick of seminiferous epithelium among control group and treatment group had decrease, but in Anova test and LSD test of seminiferous epithelium thick is decrease at 18,2 and 36,4 mg/KgBW/day dosage. The average of numbers of spermatogonia among control group and treatment groups are decrease. The result of Anova is  $p=0,000$ , its mean there was a significant difference among those groups, and LSD test is significant difference among control group and treatment groups, and also between a group to the other group. The result of Kruskail-Wallis test of primary spermatocytes is  $p=0,000$ , its mean there is a significant difference between those groeps. The result of Mann-Whitney is a significant difference among all of groups, its mean that added of dosage can decrease numbers of primary spermatocyte. The result of Anova test of spermatid is  $p=000$ , it was mean a significant difference among those groups. LSD test shown that no significant difference of spermatid numbers at 9,1 mg/KgBW/day and shown significant difference of spermatid numbers at 18,2, 36,4, and 72,8 mg/KgBW/day and shown the relation of dose-response.

The conclusion of the research was soybean extract can decrease numbers of spermatogenic cell, thick of seminiferous epithelium and seminiferous tubules diameter.

## ABSTRACT

The initiation and maintenance of spermatogenesis require the secretion of gonadotropins from the pituitary and thus is dependent on balance of the hypothalamo-pituitary-testis axis. A major component of the negative feedback action of androgens on gonadotropin secretion is mediated via aromatization to oestrogens.

Phytoestrogens, a compound that has oestrogenic effect can give negative feedback of gonadotropins secretion to decrease of spermatogenesis. Decrease of spermatogenesis can be identified by decrease of numbers of spermatogenic cells that be followed by influenced of seminiferous tubules shown.

One of source of phytoestrogens is soybean and its product. The goal of this research to know the influence given soybean extract to seminiferous tubules microscopic shown and spermatogenic cells.

This research use 50 adult mice (sexually mature). They were divided into five groups, each group consisted of ten mice. One group (control group) was given solution of CMC Na<sup>+</sup> 0,5%, and the others group was given soybean extract varietas Ijen by dosage: 9,1 mg/KgBW/day; 18,2 mg/KgBW/day; 36,4 mg/KgBW/day; and 72,8 mg/KgBW/day. Extract of soybean was soluted by CMC Na<sup>+</sup> 0,5%. Treatment was given by using sonde for 35 day. At the end of treatment, mice were killed, the left testis was fixed in Buffer formaline and embedding in wax, then stained by the Hematoxylin Eosin (HE) method.

The result of this study showed that soybean extract can decrease thick of seminiferous epithelium at dosage 18,2 mg/KgBW/day and 36,4 mg/KgBW/day; soybean extract decrease numbers of spermatogonia and primary spermatocytes at all of dosage and show relationship dose-response; and soybean extract decrease numbers of spermatid and also show relationship dose-response.

The conclusion of the study was that soybean extract can decrease the numbers of spermatogenic cells, and also decrease the thick of seminiferous epithelium.

**Keywords:** soybean extract, spermatogenesis, phytoestrogens, thick of seminiferous epithelium, spermatogonia, primary spermatocytes, spermatid.



## DAFTAR ISI

Halaman

Sampul Depan .....	i
Sampul Dalam .....	ii
Prasyarat Gelar.....	iii
Persetujuan .....	iv
Penetapan Panitia .....	v
Ucapan Terimakasih .....	vi
Ringkasan.....	vii
Summary .....	ix
Abstract.....	xi
DAFTAR ISI .....	xii
DAFTAR TABEL.....	xv
DAFTAR GAMBAR .....	xvi
DAFTAR LAMPIRAN .....	xvii
DAFTAR SINGKATAN.....	xviii
BAB 1 PENDAHULUAN .....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	3
1.3 Tujuan Penelitian .....	3
1.3.1 Tujuan umum .....	3
1.3.2 Tujuan khusus .....	4
1.4 Manfaat Penelitian .....	4
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA .....	5
2.1 Organ Reproduksi Mencit Jantan .....	5
2.1.1 Histologi testis .....	6
2.1.2 Tubulus seminiferus.....	6
2.1.3 Jaringan interstitial .....	9
2.2 Spermatogenesis .....	11
2.3 Pengendalian Aktivitas Spermatogenesis .....	18
2.4 Estrogen .....	22
2.4.1 Reseptor esterogen .....	26
2.4.2 Distribusi ERs dan aromatase pada sistem reproduksi laki-laki .....	26
2.4.3 Peran estrogen pada sistem reproduksi laki-laki .....	30
2.5 Efek Pemberian Estrogen pada Spermatogenesis .....	32
2.5.1 Poros <i>hypothalamo-pituitary-testis</i> .....	32
2.5.2 Sel Leydig.....	33
2.5.3 Sel Sertoli.....	34
2.5.4 Sel Benih.....	36
2.6 Kedelai .....	37
2.6.1 Komposisi kedelai .....	38
2.7 Kedelai sebagai Sumber Fitoestrogen.....	39

2.7.1	Analisis fitoestrogen .....	44
2.7.2	Efek pemrosesan dan pemasakan terhadap kandungan fitoestrogen .....	45
2.7.3	Farmakokinetik fitoestrogen .....	45
2.7.4	Efek fitoestrogen .....	47
2.7.5	Kemungkinan resiko yang dihubungkan dengan fitoestrogen.....	48
<b>BAB 3</b>	<b>KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN .....</b>	<b>51</b>
3.1	Kerangka Konseptual .....	51
3.2	Dasar Teori .....	52
3.3	Hipotesis Penelitian .....	53
<b>BAB 4</b>	<b>METODE PENELITIAN .....</b>	<b>54</b>
4.1	Rancangan Penelitian.....	54
4.2	Unit Eksperimen dan Replikasi.....	55
4.3	Variabel Penelitian.....	56
4.3.1	Klasifikasi Variabel .....	56
4.3.2	Definisi Operasional .....	56
4.4	Bahan Penelitian .....	58
4.5	Instrumen Penelitian.....	59
4.6	Lokasi dan Waktu Penelitian.....	60
4.7	Prosedur Pengumpulan Data.....	61
4.8	Teknik Analisa Data.....	62
4.9	Kerangka Operasional.....	64
<b>BAB 5</b>	<b>HASIL PENELITIAN .....</b>	<b>65</b>
5.1	Data Penelitian .....	65
5.1.1	Pengaruh pemberian ekstrak kedelai terhadap tebal epitel tubulus seminiferus .....	65
5.1.2	Pengaruh pemberian ekstrak kedelai terhadap jumlah spermatogonium ...	65
5.1.3	Pengaruh pemberian ekstrak kedelai terhadap jumlah spermatosit primer.	66
5.1.4	Pengaruh pemberian ekstrak kedelai terhadap jumlah spermatid .....	66
5.2	Analisa dan Hasil Penelitian .....	67
5.2.1	Pengaruh pemberian ekstrak kedelai terhadap tebal epitel tubulus seminiferus .....	67
5.2.2	Pengaruh pemberian ekstrak kedelai terhadap jumlah spermatogonium ...	69
5.2.3	Pengaruh pemberian ekstrak kedelai terhadap jumlah spermatosit primer.	69
5.2.4	Pengaruh pemberian ekstrak kedelai terhadap jumlah spermatid .....	70
<b>BAB 6</b>	<b>PEMBAHASAN .....</b>	<b>73</b>
6.1	Pengaruh pemberian ekstrak kedelai terhadap tebal epitel tubulus seminiferus	74
6.2	Pengaruh pemberian ekstrak kedelai terhadap jumlah spermatogonium.....	76
6.3	Pengaruh pemberian ekstrak kedelai terhadap jumlah spermatosit primer .....	78
6.4	Pengaruh pemberian ekstrak kedelai terhadap jumlah spermatid .....	80

<b>BAB 7 PENUTUP</b> .....	<b>82</b>
<b>7.1 Kesimpulan</b> .....	<b>82</b>
<b>7.2 Saran</b> .....	<b>82</b>
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	<b>83</b>
<b>LAMPIRAN</b> .....	<b>87</b>

## DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1 Ciri-ciri asosiasi sel pada tahapan siklus spermatogenesis mencit (Oakberg, 1956b) .....	18
Tabel 2.2 Aksi estrogen dan hubungan jalur dan mekanisme biomolekuler (Vincenzo et al, 2005).....	25
Tabel 2.3 Distribusi Ers dan Aroataase pada pestis hewan pengerat dewasa (Vincenzo et al, 2005).....	27
Tabel 2.4 Konsumsi rata-rata isoflavon, coumestrol, dan lignan pada beberapa makanan (Hughest et al, 2002) .....	41
Tabel 2.5 Estimasi konsumsi isoflavon pada beberapa negara (Hughest et al, 2002).....	43
Tabel 5.1 Rerata±simpangan baku tebal epitel tubulus seminiferus mencit ( $\mu\text{m}$ ) setelah perlakuan selama 35 hari.....	65
Tabel 5.2 Rerata±simpangan baku jumlah spermatogonium mencit setelah perlakuan selama 35 hari.....	66
Tabel 5.3 Rerata±simpangan baku jumlah spermatosit primer mencit setelah perlakuan selama 35 hari.....	66
Tabel 5.4 Rerata±simpangan baku jumlah spermatid setelah perlakuan selama 35 hari.....	66
Tabel 5.5 Rangkuman Anova tebal epitel tubulus seminiferus mencit ( $\mu\text{m}$ ) setelah perlakuan selama 35 hari.....	68
Tabel 5.6 Rangkuman Anova jumlah spermatogonium mencit setelah perlakuan selama 35 hari.....	69
Tabel 5.7 Rangkuman Uji Kruskal Wallis jumlah spermatosit primer mencit setelah perlakuan selama 35 hari.....	69
Tabel 5.8 Rangkuman Anova jumlah spermatid mencit setelah perlakuan selama 35 hari.....	70



## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Organ reproduksi mencit jantan (Kusumawati D, 2004).....	5
Gambar 2.2 Diagram struktur komponen tubulus seminiferus dan jaringan interstitial (Junquiera, 1998).....	10
Gambar 2.3 Diagram spermatogenesis.....	12
Gambar 2.4 Diagram jumlah pembelahan yang terjadi dan jenis sel spermatogenik yang terbentuk pada tiap tahap spermatogenesis (Gilbert, 1991).....	13
Gambar 2.5 Gambaran skematis spermiogenesis.....	14
Gambar 2.6 Tahap-tahap siklus epitel seminiferus tikus dengan asosiasi sel tertentu (baris) A = spermatogonium jenis A; In = spermatogonium jenis antara; B = spermatogonium jenis B; R = spermatisit primer tahap praleptoten; L = spermatisit primer tahap leptoten; z = spermatisit tahap zigoten; p = spermatisit tahap pakiten; Di = spermatisit tahap diploten; II = spermatisit sekunder; Angka romawi menunjukkan tahap (jenis asosiasi sel) dalam satu siklus epitelium (Tienhoven, 1983).....	17
Gambar 2.7 Peranan testosteron dalam spermatogenesis (Cummings, 2004).....	20
Gambar 2.8 Aksi hormon testis (Sturm N, 2006).....	21
Gambar 2.9 Kontrol gonadotropin oleh steroid kelamin (Vincenzo et al, 2005).....	22
Gambar 2.10 Biosintesis estrogen (Sturm N, 2006).....	23
Gambar 2.11 Perbandingan struktur isoflavon (daidzein, genistein, dan glycitein) dengan 17 $\beta$ -estradiol yang tampak mirip (Setchell & Cassidy, 1999)....	42
Gambar 2.12 Prinsip langkah-langkah ekstraksi dan analisis fitoestrogen (Hughes et al, 2002).....	44
Gambar 5.1 Gambar histologis tubulus seminiferus mencit kelompok kontrol dan kelompok perlakuan dengan pembesaran 100 kali.....	71
Gambar 5.2 Gambar histologis tubulus seminiferus mencit kelompok kontrol dan kelompok perlakuan dengan pembesaran 400 kali.....	72

**DAFTAR LAMPIRAN**

	Halaman
Lampiran 1 Surat keterangan benih penjenis (BS).....	87
Lampiran 2 USDA-Iowa State University Database on the Isoflavon Content of Foods – 1999 .....	88
Lampiran 3 Perhitungan dosis.....	91
Lampiran 4 Berat badan mencit pada awal dan akhir penelitian.....	92
Lampiran 5 Berat badan mencit selama periode penelitian.....	93
Lampiran 6 Dosis pemberian perlakuan selama periode penelitian.....	94
Lampiran 7 Data hasil pengamatan tebal epitel tubulus seminiferus.....	95
Lampiran 8 Data hasil pengamatan jumlah spermatogonium.....	96
Lampiran 9 Data hasil pengamatan jumlah spermatosit primer.....	97
Lampiran 10 Data hasil pengamatan jumlah spermatid.....	98
Lampiran 11 Analisis statistik.....	99

## DAFTAR SINGKATAN

ABP	= <i>Androgen binding protein</i>
AUC	= <i>Area under curve</i>
ArKO	= <i>Aromatase knockout</i>
CNS	= <i>Central nervous system</i>
DES	= <i>diethylstilbestrol</i>
DHT	= <i>dihydrotestosterone</i>
ER	= <i>Estrogen receptor</i>
ERKO	= <i>Estrogen receptor knockout</i>
FasL	= <i>Fas ligand</i>
FSH	= <i>Follicle stimulating hormone</i>
GC-MS	= <i>Gas chromatography – mass spectrometric</i>
GnRH	= <i>Gonadotropin releasing hormone</i>
HPLC	= <i>High performance liquid chromatography</i>
LC-MS	= <i>Liquid chromatography – mass spectrometric</i>
LH	= <i>Luteinizing hormone</i>
PMT	= <i>premenstrual</i>
PND	= <i>Post natal day</i>
ppb	= <i>part per billion</i>
ppm	= <i>part per million</i>
SHBG	= <i>Sex hormone binding globulin</i>

# BAB I

## PENDAHULUAN



### 1.1 Latar Belakang

Spermatogenesis adalah proses produksi dan maturasi gamet jantan yang berkembang secara progresif dari daerah basal tubulus seminiferus ke arah lumen (Wuryantari dan Moeloek; 2000). Spermatogenesis dikontrol oleh hormon gonadotropin yang dihasilkan oleh kelenjar hipofise anterior, yaitu FSH (*Follicle Stimulating Hormone*) yang bekerja pada sel Sertoli untuk merangsang pertumbuhan dan pematangan sel germinal (Guyton dan Hall; 2000) dan LH (*Luteinizing Hormone*) yang merangsang sel Leydig untuk menghasilkan hormon testosteron (Veldhuis; 1991, Guyton dan Hall; 2000).

Secara umum spermatogenesis pada hewan pengerat, manusia, dan primata dapat terganggu oleh bahan kimia yang berhubungan secara langsung dengan testis atau oleh bahan kimia yang mempengaruhi konsentrasi gonadotropin plasma atau hormon seks. Pengaruh pada spermatogenesis dapat dievaluasi dengan mengukur jumlah sperma, motilitas, morfologi, dan kemampuan fertilisasi, serta dengan pemeriksaan histopatologi testis dan epididimis (Working *et al*; 1988 cit. Hughes *et al*; 2002).

Paparan konsentrasi tinggi estrogen dapat menyebabkan perubahan kadar gonadotropin dalam fungsi sistem reproduksi. Keadaan disfungsi seksual dilaporkan pada pria yang terpapar estrogen sintetik di dalam industri farmasi dan paparan diethylstilbestrol dapat menyebabkan kelainan fungsi reproduksi. Ada pula laporan yang menyatakan bahwa estrogen eksogen diduga bertanggung jawab dalam kemunduran bermakna pada mutu semen. Estrogen juga diketahui dapat

menghambat enzim steroidogenesis sel Leydig yang diperlukan untuk biosintesis testosteron (O'Donnell; 2001) dan dapat menyebabkan apoptosis sel benih (Mishra dan Shaha; 2005).

Fitoestrogen adalah senyawa nonsteroid polifenolik tumbuhan yang mempunyai efek sama dengan estrogen tetapi lebih lemah. Fitoestrogen dibagi menjadi tiga subklas, yaitu: isoflavon, coumestan, dan lignan. Isoflavon terdiri dari: genistein, daidzein, formononetin, glycitein, dan biochanin A (Setchell & Cassidy; 1999, Taylor; 2002, Hughes *et al*; 2002). Di antara kelompok ini, isoflavon (genistein dan daidzein) yang paling banyak digunakan dalam bidang nutrisi klinik. Isoflavon ditemukan hampir pada semua makanan yang mengandung protein kedelai (Setchell; 2001).

Konsumsi diet tinggi fitoestrogen dapat menyebabkan gangguan fertilitas dan saluran reproduksi (Mitchell *et al*; 2001). Terdapat bukti kuat bahwa fitoestrogen kedelai seperti genistein dapat menghambat *17 $\beta$ -hydroxysteroid oxidoreductase*, suatu enzim yang diperlukan untuk sintesis testosteron dan perkembangan *CNS-gonadal axis* (Yi MA *et al*; 2002).

Studi yang dilakukan oleh Atanassova *et al* (1999) membuktikan bahwa pemberian genistein (4 mg/kgBB/hari) subkutan pada tikus jantan PND (*Post Natal Day*) 2-18 secara bermakna meningkatkan apoptosis sel benih, memperlambat pembentukan lumen tubulus seminiferus, mengurangi berat testis, FSH plasma dan perbandingan (rasio) volume spermatosit/sel Sertoli pada PND 18. Dari penelitian tersebut dibuktikan tidak terdapat efek terhadap konsentrasi inhibin B dan volume inti sel Sertoli. Pemberian genistein 2,5 mg/kg BB/hari secara subkutan selama 9 hari menurunkan konsentrasi testosteron serum dan testis, serta LH pituitari dan berat prostat (Strauss *et al*, 1998). Penurunan berat

badan dan prostat serta kadar testosteron dan androstenedion plasma jelas pada tikus jantan yang diberi makan makanan berisi kedelai (600 mg isoflavones/kg) pada PND (*Post Natal Day*) 50 untuk 5 minggu dibandingkan dengan binatang yang diberi makan makanan tanpa isoflavon (Weber *et al*; 2001).

Untuk mengetahui lebih lanjut efek fitoestrogen kedelai pada sistem reproduksi jantan perlu dilakukan penelitian mengenai pengaruh pemberian ekstrak biji kedelai terhadap gambaran histologi testis yang meliputi tebal epitel tubulus seminiferus, jumlah spermatogonium, spermatosit primer, dan spermatid. Penelitian eksperimen ini dilakukan dengan model mencit jantan dewasa (*sexual mature*) yang diberi beberapa dosis ekstrak biji kedelai.

## **1.2 Rumusan Masalah**

Berdasarkan latar belakang permasalahan di atas, maka dirumuskan permasalahan sebagai berikut :

1. Apakah pemberian ekstrak biji kedelai menurunkan tebal epitel tubulus seminiferus mencit?
2. Apakah pemberian ekstrak biji kedelai menurunkan jumlah spermatogonium mencit?
3. Apakah pemberian ekstrak biji kedelai menurunkan jumlah spermatosit primer mencit?
4. Apakah pemberian ekstrak biji kedelai dapat menurunkan jumlah spermatid mencit?

## **1.3 Tujuan Penelitian**

### **1.3.1 Tujuan umum**

Untuk membuktikan pengaruh pemberian ekstrak biji kedelai terhadap gambaran mikroskopik tubulus seminiferus dan jumlah sel spermatogenik mencit.

### **1.3.2 Tujuan khusus**

**Mengetahui apakah pemberian ekstrak biji kedelai dapat menurunkan:**

1. **Tebal epitel tubulus seminiferus menciit.**
2. **Jumlah spermatogonium menciit.**
3. **Jumlah spermatisit menciit.**
4. **Jumlah spermatid menciit.**

### **1.4 Manfaat Penelitian**

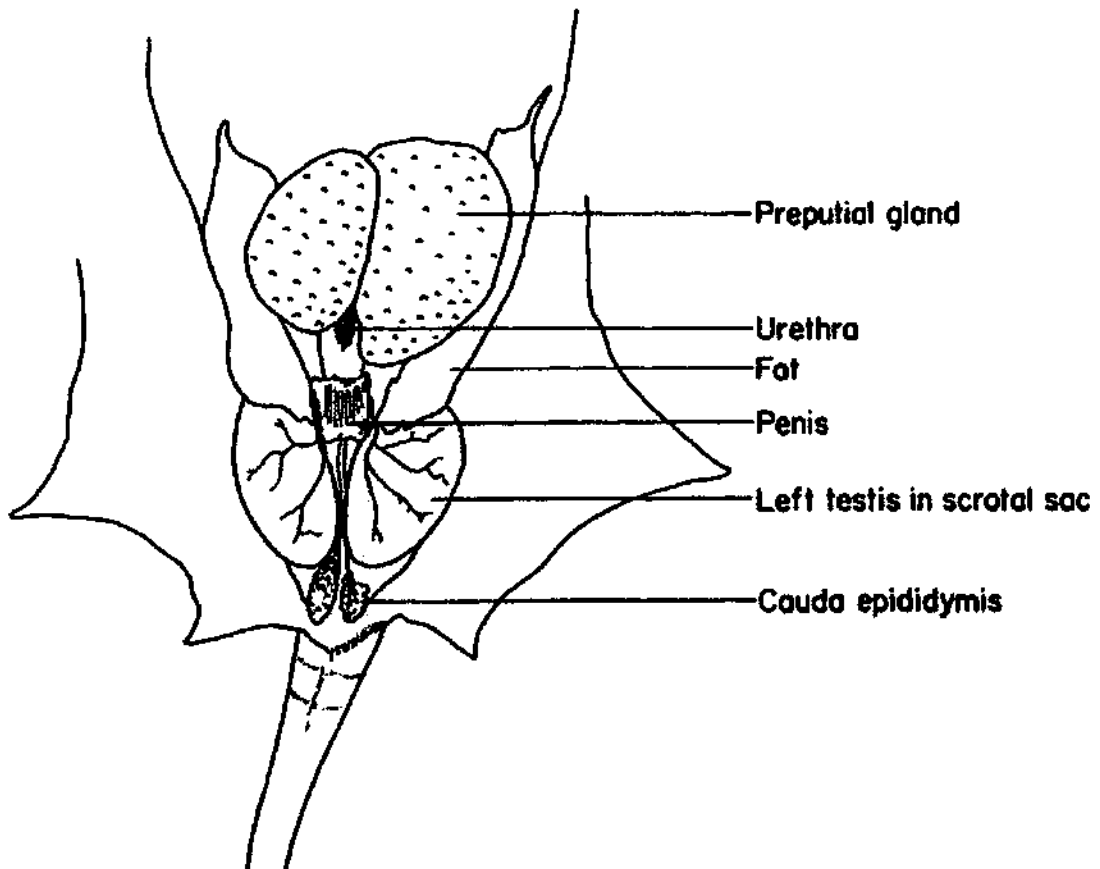
- 1.4.1 **Memberikan informasi kepada masyarakat agar lebih berhati-hati dalam mengkonsumsi kedelai, karena kemungkinan berpengaruh negatif terhadap organ reproduksi laki-laki.**
- 1.4.2 **Bila ekstrak kedelai terbukti menurunkan tebal epitel dan jumlah sel spermatogenik dapat digunakan sebagai masukan untuk penelitian lebih lanjut mengenai alternatif agen antifertilitas.**

## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Organ Reproduksi Mencit Jantan

Organ reproduksi mencit jantan terdiri atas sepasang testis yang terdapat di dalam skrotum. Testis merupakan alat reproduksi utama yang dilengkapi dengan saluran reproduksi: epididymis, ductus deferens, serta kelenjar tambahan yang terdiri dari kelenjar prostat, vesika seminalis, kelenjar bulbouretralis, dan penis di bagian luar (Delmann and Brown, 1992).



Gambar 2.1. Organ reproduksi mencit jantan (Kusumawati D, 2004).



### 2.1.1 Histologi testis

Testis merupakan kelenjar tubuler yang sangat kompleks dan mempunyai fungsi, eksokrin dan endokrin. Fungsi eksokrin yaitu spermatogenesis yang terjadi di tubulus seminiferus, sedangkan fungsi endokrin yaitu proses steroidogenesis yang terjadi pada sel Leydig, memproduksi hormon testosteron dan derivatnya. Berat testis berkorelasi positif dengan berat badan (Thwaits and Hannan, 1989).

Testis dibungkus oleh 3 lapisan yaitu tunika vaginalis, tunika albuginea dan tunika vaskulosa. Tunika vaginalis terdiri dari dua lapisan yaitu lapisan viseral dan parietal (Junqueira *et al*, 1998). Pada tunika albuginea terdapat trabekula-trabekula yang memanjang menuju posterior pada mediastinum sehingga berbentuk septa yang membagi testis menjadi lobulus-lobulus (Lindsay, 1996).

Testis mendapat vaskularisasi dari salah satu cabang arteri testikularis yang memasuki testis dari bagian posterior. Di dalam testis, arteri ini menembus tunika albuginea dan masuk ke tunika vaskulosa. Cabang-cabang arteriol yang lebih kecil mengikuti septula testis masuk ke parenkim dan berakhir sebagai anyaman kapiler (Leeson *et al*, 1989).

Parenkim testis terbagi menjadi lobus-lobus piramidalis yang berisi tubuli seminiferi. Pada potongan melintang tampak banyak bentukan tubulus seminiferus satu dengan yang lain dipisahkan oleh jaringan interstitial. Tubulus seminiferus ini menempati 60-80% dari total volume testis (Leeson *et a.*, 1989; Ismudiono, 1996; Wuryantari dan Moeloek, 2000).

### 2.1.2 Tubulus seminiferus

Dinding tubulus seminiferus terdiri dari 3 komponen, yaitu tunika propria, lamina basalis, dan lapisan epitel. Tunika propria merupakan lapisan paling luar, yang terdiri dari jaringan ikat fibroelastis dan sel fibroelastis yang pipih (Junqueira *et a.*,

1992). Pada rodent, lapisan ini terdiri dari selapis sel polygonal yang disebut sel myoid. Sel ini mempunyai sifat otot polos dan dapat berkontraksi untuk mengeluarkan sperma dari tubulus seminiferus. Pada primata, tunika propria terdiri dari beberapa lapisan fibroblast (Junquiera *et al*, 1992; Bloom dan Fawcett, 1994).

Lapisan epitel terdiri dari 2 jenis sel, yaitu sel spermatogenik dan sel penyokong/sel sertoli (Junquiera *et al*, 1992; Bloom dan Fawcett, 1994).

### 1. Sel Spermatogenik

Menurut Copenhaver *et.al.*, 1978; Leeson *et al*, (1989); Junquiera *et al*, (1992); Bloom dan Fawcett, (1994) sel spermatogenik yang terdapat di dalam tubulus seminiferus adalah sebagai berikut :

#### a. Spermatogonia

Spermatogonia merupakan satu-satunya sel gamet yang ada sampai masa pubertas. Sel ini terletak di dasar epitel tubulus seminiferus dan terdapat dua jenis spermatogonia, yaitu : 1) Spermatogonia tipe A, dengan inti sel lonjong berwarna pucat; 2) Spermatogonia tipe B, mempunyai inti bulat yang mengandung massa kromatin padat.

#### b. Spermatisit primer

Sel ini merupakan sel gamet terbesar di dalam tubulus seminiferus. Ketika dibentuk pertama kali, sel-sel ini terletak di bagian basal tubulus. Pada diferensiasi sel, maka *tight junction* menghilang sehingga memungkinkan perpindahan spermatisit dari bagian basal ke ruang luminal. Sel berbentuk bulat atau bulat telur dan inti sel biasanya berada dalam salah satu tingkat kariokinesis, terlihat besar dan jelas pada tengah sel.

c. Spermatisit sekunder

Volume spermatisit sekunder kira-kira separuh spermatisit primer dan terletak lebih ke arah lumen. Sel ini jarang terlihat pada potongan melintang tubulus seminiferus, karena umur sel pendek dan cepat membelah menjadi spermatid.

d. Spermatid

Spermatid terletak dekat lumen, mempunyai sebuah inti bulat yang terletak di tengah sel. Segera setelah spermatid terbentuk langsung menempel pada permukaan sel sertoli.

e. Spermatozoa

Spermatozoa merupakan hasil dari transformasi spermatid melalui proses spermiogenesis terletak di dalam lumen tubulus seminiferus yang terdiri dari kepala, bagian tengah dan bagian ekor.

2. Sel sertoli

Sel sertoli merupakan sel kolumnar panjang, bagian dasarnya terletak di atas lamina basalis tubulus seminiferus. Bentuk sel Sertoli tidak teratur, memiliki cekungan sebagai tempat perlekatan untuk sel spermatogenik. Ujung atas sel Sertoli ditempati oleh spermatozoa (Leeson *et al*, 1989; Junquiera *et al*, 1992; Bloom dan Fawcett, 1994). Sel Sertoli pada manusia mampu memelihara  $\pm 4$  spermatid, sedangkan pada tikus  $\pm 10$  spermatid (Wuryantari dan Moeloek, 2000).

Sel Sertoli terletak di antara sel spermatogenik dan menempati kurang lebih 35-40% volume epitel (Wuryantari dan Moeloek, 2000). Sitoplasma sel Sertoli tidak tampak pada mikroskop cahaya, hanya inti yang tampak berbentuk polygonal (Junquiera *et al*, 1992; Bloom dan Fawcett, 1994).

Pemeriksaan mikroskop elektron tampak bahwa sel Sertoli mengandung banyak retikulum endoplasmik halus, sedikit retikulum endoplasmik kasar, aparatus golgi yang berkembang biak, dan banyak mitokondria dan lisosom. Inti yang memanjang sering berbentuk segitiga, mempunyai banyak lipatan dan sedikit kromatin. Anak inti berkembang biak dengan nukleolema oval sentral diapit oleh 2 massa kromatin basofil (Junquiera *et al*, 1992; Bloom dan Fawcett, 1994).

Menurut Junquiera *et al*, (1992); Neischlag dan Behre, (1997); Seeley *et al*, (1998); Wuryantari dan Moelock, (2000), sel Sertoli berfungsi sebagai berikut :

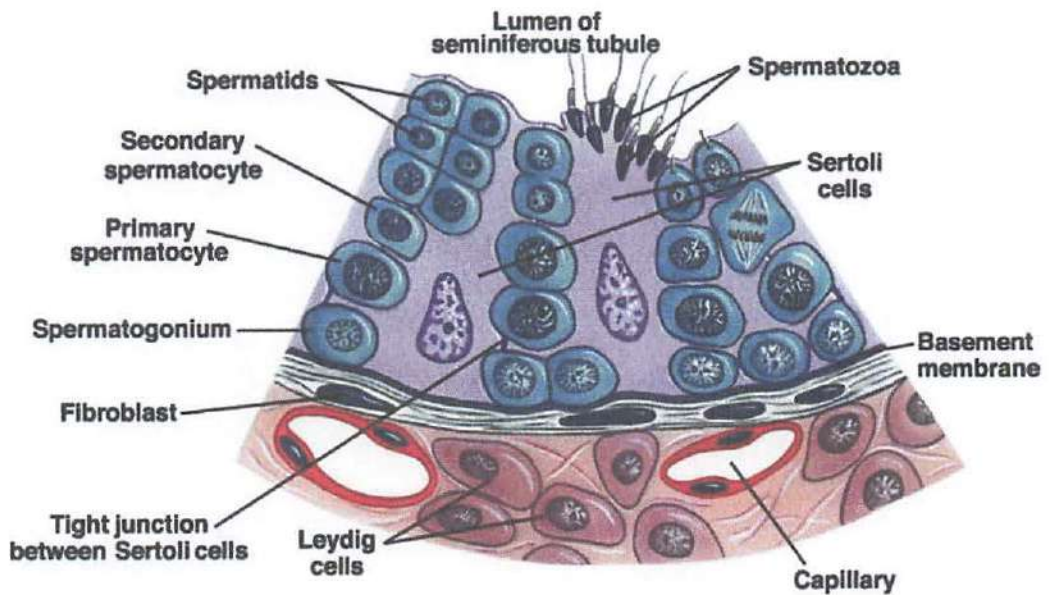
- a. Sebagai penyokong dan penunjang lapisan epitel. Cabang-cabang sel Sertoli menyokong jembatan sitoplasma penghubung sel-sel spermatogenik.
- b. Sebagai fagosom, badan-badan residu akan difagositosis dan direabsorpsi oleh lisosom sel Sertoli.
- c. Mengkoordinasikan proses spermatogenesis melalui produksi dan sekresi protein, sitokinin, faktor pertumbuhan, steroid, prostaglandin, dan lain-lain.
- d. Menjaga lumen tubulus dengan menghasilkan cairan tubulus yang mengandung ion sodium.
- e. Menentukan berat testis dan produksi sperma.
- f. Sebagai salah satu komponen sawar darah testis (*blood testis barrier*).
- g. Mensintesis dan mensekresi *androgen binding protein* (ABP), inhibin, dan plasminogen yang merupakan substansi proteolitik yang berperan dalam pengeluaran sperma ke dalam lumen tubulus seminiferus.

### 2.1.3 Jaringan interstitial

Jaringan interstitial merupakan jaringan yang terdapat di antara tubulus seminiferus, terdiri dari jaringan ikat, saraf, darah, dan pembuluh limfe. Jaringan ini

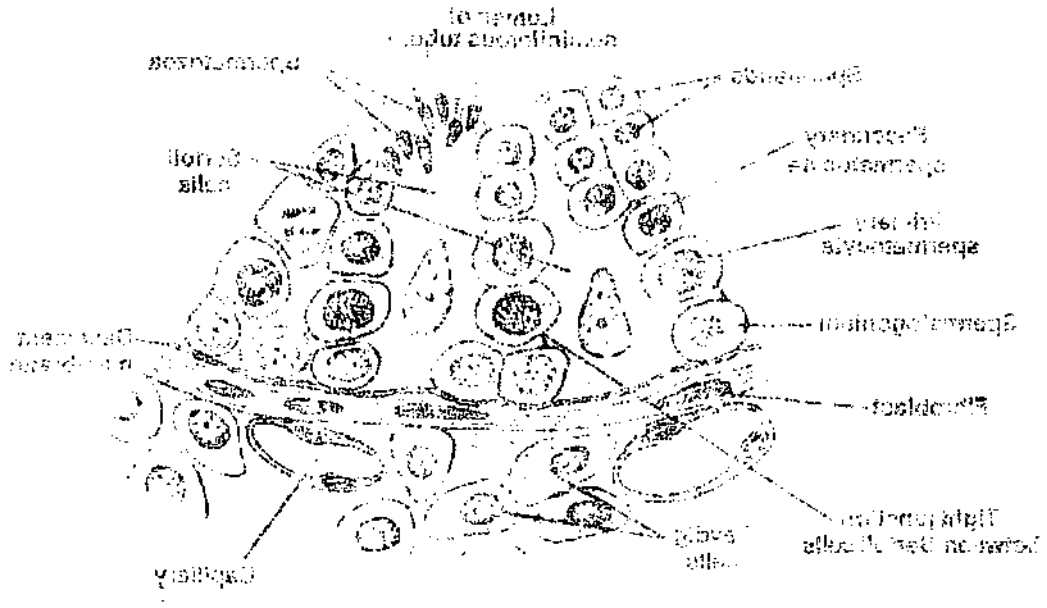
menempati 12-15% total volume testis (Wuryantari dan Moeloek, 2000). Jaringan ikat terdiri dari berbagai jenis sel seperti sel fibroblast, sel mesenkim, makrofag, limfosit, dan sel Leydig. Sel Leydig menempati 10-12% jaringan interstitial (Junquiera *et al*, 1992; Bloom dan Fawcett, 1994).

Di dalam jaringan interstitial, sel Leydig tersusun dalam kelompok atau berbentuk tali, dan menempati sudut antara tubuli seminiferi. Sel ini berbentuk bulat atau polygonal, inti di tengah, sitoplasma eosinofil dengan butir-butir lemak sehingga dengan pewarnaan Hematoksin-Eosin tampak pucat (Leeson *et al*, 1989; Junquiera *et al*, 1992; Bloom dan Fawcett, 1994).



Gambar 2.2 Diagram struktur komponen tubulus seminiferus dan jaringan interstitial (Junquiera *et al*, 1998).

...  
 ...  
 ...  
 ...  
 ...  
 ...  
 ...  
 ...  
 ...  
 ...  
 ...  
 ...  
 ...



Gambar 1.1. Struktur anatomi batang tumbuhan dikotil. (Sumber: Pratiwi, 2017)

## 2.2 Spermatogenesis

Spermatogenesis adalah proses produksi dan maturasi gamet jantan yang berkembang secara progresif dari daerah basal tubulus seminiferus ke arah lumen. Proses ini dimulai dengan pembagian sel muda (*stem cell*) dan diakhiri dengan pembentukan spermatozoon (Bloom dan Fawcett, 1994; Wuryantari dan Moeloek, 2000).

Spermatogenesis terdiri dari 2 proses, yaitu spermatositogenesis dan spermiogenesis. Spermatositogenesis merupakan proliferasi sel spermatogonium hingga terbentuk spermatid, sedangkan spermiogenesis merupakan transformasi spermatid menjadi spermatozoon (Ismudiono, 1996).

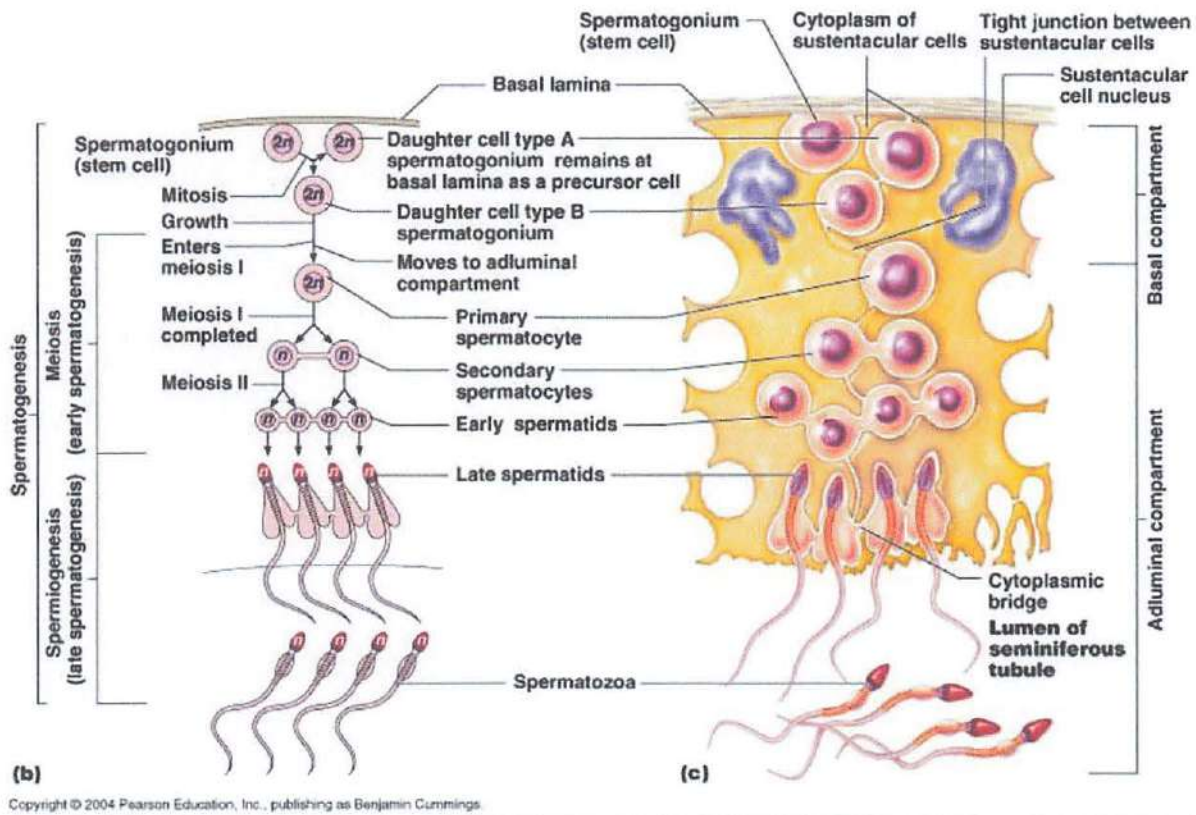
Pendapat lain mengatakan bahwa spermatogenesis dibagi menjadi 3 tahap utama, yaitu:

1. Proliferasi mitotik dan diferensiasi sel gamet diploid atau spermatogonia menjadi spermatosit
2. Pembelahan meiotik spermatosit menjadi spermatid yang bersifat haploid
3. Transformasi sel gamet haploid menjadi spermatozoon (Junquiera *et al*,1992; Bloom dan Fawcett, 1994; Wuryantari dan Moeloek, 2000).

Spermatogenesis dimulai dengan pembelahan dan diferensiasi spermatogonium  $A_{dark}$  menjadi sepasang spermatogonium  $A_{dark}$  yang baru. Salah satu spermatogonium  $A_{dark}$  membelah dan berdiferensiasi menjadi sepasang spermatogonium  $A_{pale}$ , kemudian spermatogonium  $A_{pale}$  membelah dan berdiferensiasi menjadi sepasang spermatogonium B. Spermatogonium B aktif bermitosis membentuk spermatosit primer. Dengan demikian, jumlah kromosom sampai spermatosit primer adalah diploid. Spermatosit primer mengalami meiosis I menjadi spermatosit sekunder, kemudian pada meiosis II, spermatosit sekunder dibagi menjadi

spermatid. Spermatid selanjutnya mengalami spermiogenesis menjadi spermatozoon (Junquiera *et al*, 1992; Bloom dan Fawcett, 1994; Guyton dan Hall, 2000).

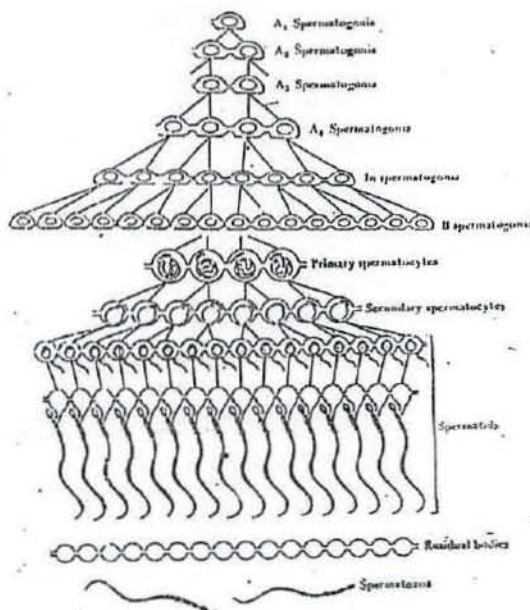
Pada tahap awal pembagian meiosis I, semua DNA di dalam 46 kromosom bereplikasi, kemudian masing-masing 46 kromosom menjadi dua kromatid yang tetap berikatan bersama pada sentromer. Pada waktu ini, spermatosit primer terbagi menjadi dua spermatosit sekunder, setiap pasang kromosom berpisah, sehingga masing-masing 23 kromosom (dengan dua kromatid) menuju ke satu spermatosit sekunder. Pada meiosis II, kedua kromatid dari setiap 23 kromosom berpisah pada sentromer sehingga terbentuk dua pasang 23 kromosom, satu pasang dibawa kesatu spermatid dan satu pasang yang lain dibawa ke spermatid kedua (Guyton dan Hall, 2000; Seeley *et al*, 1998).



Gambar 2.3 Diagram spermatogenesis (Cummings, 2004).

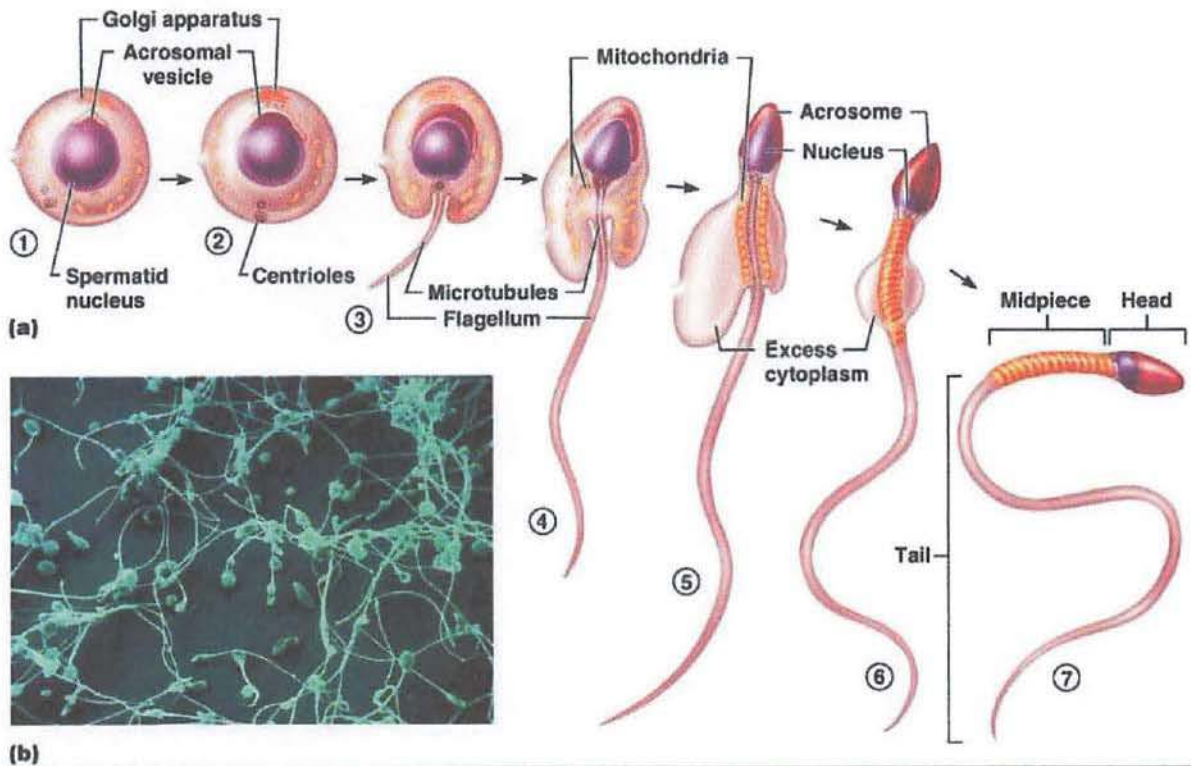


Spermatogenesis pada mencit adalah sebagai berikut: spermatogonium A membelah secara mitosis menjadi spermatogonium  $A_1$  dan spermatogonia  $A_0$ . Selanjutnya spermatogonia intermedia yang selanjutnya membelah menjadi spermatogonium B. Spermatogonium  $A_1$  masuk dalam siklus spermatogenesis dan mengalami pembelahan menjadi spermatogonia intermedia. Spermatogonia intermedia membelah menjadi spermatogonia B. Dalam proses selanjutnya spermatogonia B membelah menjadi spermatosit primer. Spermatosit primer yang terbentuk selanjutnya mengalami pembelahan meiosis menjadi spermatid. Pembelahan meiosis pertama diawali dengan stadium praleptoten, stadium zygoten, stadium pachiten, dan stadium diploten. Pada pembelahan meiosis yang pertama menghasilkan sel yang disebut spermatosit sekunder, kemudian memasuki pembelahan meiosis kedua menghasilkan spermatid yang haploid (Oakberg, 1956a; Oakberg, 1956b; Gilbert, 1991).



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

Spermiogenesis dibagi menjadi 4 fase, yaitu *golgi* ditandai dengan adanya gelembung akromosom dan kraniokaudal yang simetris. Pada fase *cap*, spermatid memanjang dan kromosom tampak lebih berkembang menutup setengah bagian cranial sampai dua pertiga spermatid. Fase *akrosom*, nucleus sel lebih terkondensasi dan sel lebih memanjang. *Maturasi* spermatid ditandai dengan estrusi sisa sitoplasma yang disebut sebagai *residual body*. *Residual body* selanjutnya difagositosis oleh sel sertoli. Setelah melalui keempat fase tersebut, spermatozoon matang siap ditransportasikan ke lumen tubulus sebagai suatu spermiasi (Guyton dan Hall, 2000).



Gambar 2.5 Gambaran skematis spermiogenesis (Junqueira *et al*, 1998).

Lama siklus spermatogenesis dapat diukur mulai dari perubahan spermatogonium sampai menjadi spermatozoon yang matang (Wuryantari dan Moeloek, 2000). Lama siklus spermatogenesis pada tiap spesies berbeda, pada tikus

selama 51 – 53 hari (Clermont, 1972), pada mencit 34,5 hari (Whitting dan Wood, 1983), dan pada manusia selama 64 hari (Wuryantari dan Moelock, 2000).

Jumlah tahapan dalam proses spermatogenesis berbeda pada tiap spesies, pada tikus meliputi 14 tahapan (Parvinen, 1982), pada kera dan mencit 12 tahapan (Clermont, 1972), dan pada manusia 6 tahapan (Wuryantari dan Moelock, 2000). Penentuan jumlah tahapan siklus spermatogenesis pada mencit didasarkan pada siklus spermatid (spermiogenesis) (Clermont, 1972).

Di dalam tubulus, sel germinal (sel spermatogenik) dengan berbagai tahap perkembangan tidak terdistribusi secara acak tetapi “tertata” dengan pola asosiasi tertentu. Waktu antara penampakan asosiasi sel tertentu dengan asosiasi sel yang sama berikutnya disebut satu siklus epitelium. Satu siklus epitelium tikus dapat dibedakan atas 14 jenis asosiasi sel. Proses spermiogenesis pada mencit ada 19 langkah (tahap). Perubahan jumlah sel yang berasosiasi pada tahap tertentu dapat dijadikan indikator adanya gangguan spermatogenesis (Tienhoven, 1983).

Tahap-tahap siklus epitel seminiferus tikus ada 14 yang penulisannya dengan angka Romawi (I s.d. XIV). Pada tahap (stage) I, kepala spermatozoa yang belum matang biasanya jauh dari membrana basalis dan sitoplasmanya mirip bentukan globular di dalam lumen. Pada stage II – IV, kepala spermatozoa sudah berkelompok sehingga disebut *bundles* yang bisa penetrasi cukup dalam pada lapisan epitel. Pada stage VI *bundles* tersebut mulai bergeser ke arah lumen, sehingga pada stage VII dan terutama pada stage VIII, kepala spermatozoa yang belum matang tersebut sudah melingkupi sekitar lumen dengan ekor yang membentuk pusaran di tengah lumen. Pada stage IX, spermatozoa telah meninggalkan lumen, dan lapisan terdalam adalah spermatid muda yang mana topinya (*head cap*) telah terorientasi pada membrana basalis dan sitoplasmanya terakumulasi pada sisi sebelah lumen. Selama stage X–

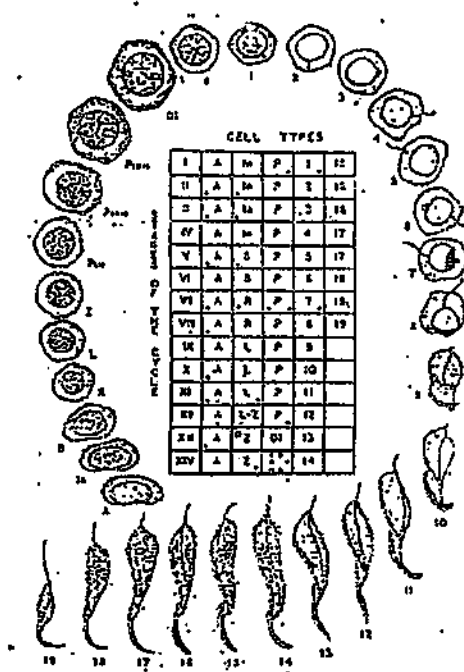
XIII, spermatid panjang dan bentukan globular sitoplasmanya dapat dilihat di dalam lumen. Pada stage XIV tampak sedikit disorganisasi dari seluruh epitel sehubungan dengan pembelahan spermatosit primer dan spermatosit sekunder. Di sini akan dibicarakan agak mendalam tentang stage VII karena stage ini digunakan sebagai pembandingan antara hewan kontrol dan perlakuan, serta stage sebelumnya (VI) dan stage sesudahnya (VIII).

Stage VI, diawali dengan telah tumbuhnya topi spermatid, dari pandangan samping tampak seperti sebuah topi kecil pada permukaan luar suatu kutub inti. Jumlah sel Sertoli tipe perpendikuler meningkat tetapi lebih sedikit dibanding tipe paralel. Spermatogonia A dan cukup banyak tipe B terletak sepanjang membrana basalis. Selama stage ini berlangsung pembelahan mitosis spermatogonia B membentuk spermatosit muda yang khas adalah pada stadia pakiten. Spermatid muda dan spermatozoa yang belum matang tahap 18 tampak berada pada stage VI. Spermatozoa muda ini cenderung melepaskan diri dari elemen sel Sertoli dan dijumpai pada level yang berbeda-beda, umumnya berada pada pertengahan antara lumen dan membrana basalis.

Stage VII, diawali dengan tercapainya ukuran maksimal dari topi spermatid. Spermatogonia A jarang ditemukan, sedangkan tipe B telah membelah diri membentuk generasi baru spermatosit. Spermatosit muda ini disebut *resting* spermatosit, terdapat sepanjang membrana basalis dengan inti mengandung pengelompokan kromatin yang gambarannya mirip dengan spermatogonia tipe B, hanya ukurannya lebih kecil. Spermatosit yang lebih tua terdapat dalam stadia pakiten. Lebih ke arah tengah didapatkan spermatid muda dan spermatozoa muda telah meninggalkan *bundlenya*. Spermatozoa muda tersusun sepanjang tepi lumen

tubulus tetapi tidak selalu teratur. Ekornya mengambang dan membentuk gambaran pusaran pada daerah lumen.

Stage VIII, diawali dengan pengaturan letak sistem akrosom spermatid muda yang semuanya mengarah ke membrana basalis. Pada stage ini tipe sel Sertoli jenis perpendikuler mencapai puncaknya. Spermatogonia tipe A sudah jarang tampak dan terdapat berselang seling dengan spermatisit muda. Pada saat itu spermatisit muda meleburkan kromatinnya yang klemat menjadi butiran halus. Lebih dekat ke arah lumen didapatkan suatu lapisan spermatisit pakiten diikuti oleh spermatid dan akhirnya spermatozoa muda (tahap 19) (Leblond and Clermont, 1952).



Gambar 2.6 Tahap-tahap siklus epitel seminiferus tikus dengan asosiasi sel tertentu (baris).

A=spermatogonium jenis A; In=spermatogonium jenis antara; B=spermatogonium jenis B; R=spermatisit primer tahap praleptoten; L=spermatisit primer tahap leptoten; z=spermatisit tahap zigoten; p=spermatisit tahap pakiten; Di=spermatisit tahap diploten; II=spermatisit sekunder; Angka romawi menunjukkan tahap (jenis asosiasi sel) dalam satu siklus epitelium (Tienhoven, 1983).

Asosiasi sel pada tahapan spermatogenesis mencit dapat dilihat pada table 2.1.

Tabel 2.1. Ciri-ciri asosiasi sel pada tahapan siklus spermatogenesis mencit (Oakberg, 1956b).

Stage		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
Spermatogonia	Type A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
	Intermediate		In	In	In								
	Type B				B	B	B						
Spermatocytes I	First layer						R	R	R	L	L	Z	Z
	Second layer	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	Dip	Dia
Spermatocytes II													S
Spermatids	First layer	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Second layer	13	14	14	15	15	15	16	16				

Keterangan:

A= Spermatogonia tipe A  
 In= Spermatogonia tipe intermediet  
 B= Spermatogonia tipe B  
 M-I= Pembelahan meiotik pertama  
 S= Spermatisit sekunder  
 M-II= Pembelahan meiotik kedua

R= Resting  
 L= Leptotene  
 Z= Zygoten  
 P= Pachytene  
 Dip= Diploten  
 Dia= Diakinesis

} Spermatisit primer

### 2.3 Pengendalian Aktivitas Spermatogenesis

Pengendalian aktivitas spermatogenesis melibatkan interaksi hormonal antara hipotalamus (sekresi *gonadotropin releasing hormone*/GnRH), hipofisis anterior (sekresi gonadotropin: luteinizing hormon/LH dan follicle stimulating hormone/ FSH) dan sel-sel Leydig (sekresi androgen), Sertoli dan spermatogenik.

GnRH bekerja pada hipofisis anterior, memicu sekresi FSH dan LH. FSH bekerja pada sel Sertoli dan bersama-sama dengan androgen memelihara fungsi gametogenik testis. FSH merangsang sintesis inhibin yang berfungsi memberikan umpan balik negatif terhadap sekresi FSH dan ikut berperan dalam merangsang sintesis testoteron pada sel Leydig (Ganong, 1993; Lullmann et al, 2000; Neal,2006). FSH juga meningkatkan sintesis glikoprotein permukaan sel (berperan dalam adesi antar sel Sertoli, meningkatkan jumlah reseptor androgen dalam sel Sertoli, memacu

proliferasi sel-sel Sertoli pada masa pra dan paskanatal, memacu proliferasi spermatogonia dan membantu LH dalam meningkatkan biosintesis androgen dalam sel Leydig (Hadley, 1992). Dengan demikian, FSH berperan sejak terjadinya proliferasi spermatogonia hingga terbentuknya spermatosit primer (Maekawa *et al.*, 1995) dan terhadap perkembangan tahap akhir spermatid menjadi spermatozoa (Ganong, 1993). LH bekerja pada sel Leydig, merangsang sekresi testosteron dan memberikan umpan balik menghambat sekresi LH (Ganong, 1993; Neal, 2006).

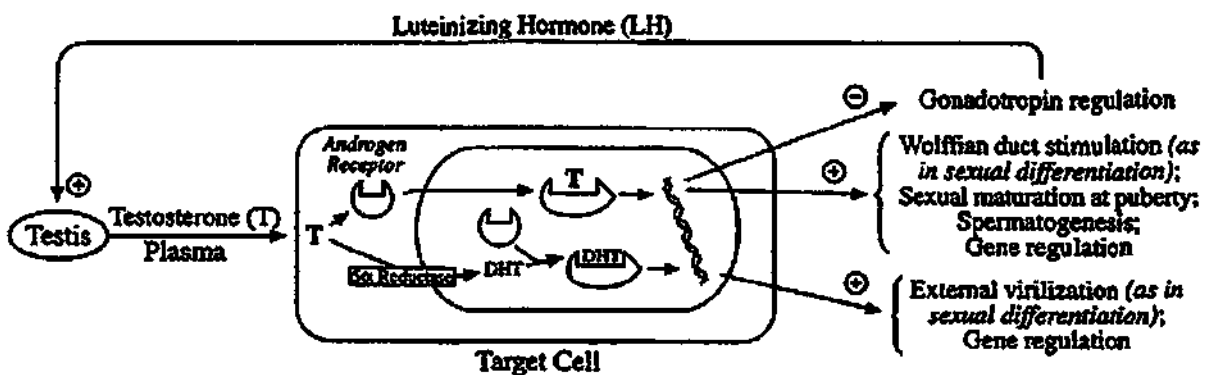
Menurut Frandson (1992) testis melakukan 2 fungsi yang saling mendukung yakni produksi spermatozoa dan sekresi hormon steroid. Hormon steroid yang diproduksi oleh testis adalah androgen. Sebagian besar androgen ini berbentuk testosteron. Menurut Nalbandov (1990) terdapat korelasi positif antara berat testis dengan produksi testosteron. Selain testis androgen juga diproduksi oleh korteks adrenal dan ovarium. Seluruh hormon tersebut baik yang berasal dari testis, ovarium maupun dari korteks adrenal ternyata diproduksi melalui jalur yang sama. Androgen mempengaruhi epitel germinal tubuli testis sehingga mempengaruhi proses spermatogenesis. Sel Sertoli menghasilkan protein pengikat androgen (ABP) atas rangsangan FSH. ABP memiliki afinitas tinggi terhadap testosteron dan dehidrotestosteron, berfungsi mengangkut androgen tersebut serta menahannya dalam tubulus seminiferus testis. Di dalam tubulus seminiferus, ABP menjaga konsentrasi testosteron tetap tinggi yang diperlukan dalam kelangsungan spermatogenesis dan sebagai pengangkut (transporter) testosteron dari testis ke epididimis (Tienhoven, 1983).

Testosteron disekresi ke dalam kapiler darah atau limfe atau masuk ke tubulus seminiferus melalui sel-sel peritubuler. Testosteron masuk ke sel Sertoli kemungkinan dengan transpor aktif atau difusi bersyarat (*facilitated diffusion*) (Hadley, 1992). Di

di nukleus. Testosteron bebas masuk ke dalam nukleus dan berikatan dengan reseptor. Testosteron berikatan dengan reseptor menyebabkan aktivasi kompleks reseptor-testosteron yang kemudian mampu mengikat diri pada *acceptorsites* pada DNA. Ikatan kompleks teraktivasi dengan DNA menyebabkan terjadinya rangsangan, yang kemudian membentuk protein baru. Protein baru yang terbentuk di bawah pengaruh testosteron menyebabkan terjadinya sejumlah aktivitas biologik (Ganong,1993).

Jika kadar testosteron dalam sirkulasi cukup tinggi dapat memberikan umpan balik negatif terhadap sekresi LH baik secara langsung pada hipofisis anterior maupun pada sekresi GnRH hipotalamus dan terhadap sekresi FSH (Ganong, 1993). Di dalam tubulus seminiferus, testosteron diperlukan untuk perkembangan spermatosit primer menjadi spermatid (Norris, 1980), untuk proliferasi dan diferensiasi sel spermatogenik (Rose and Reith, 1985) pada tahap awal dan akhir spermatogenesis (Hadley, 1992) dan pada tahap spermiogenesis (Ganong, 1993).

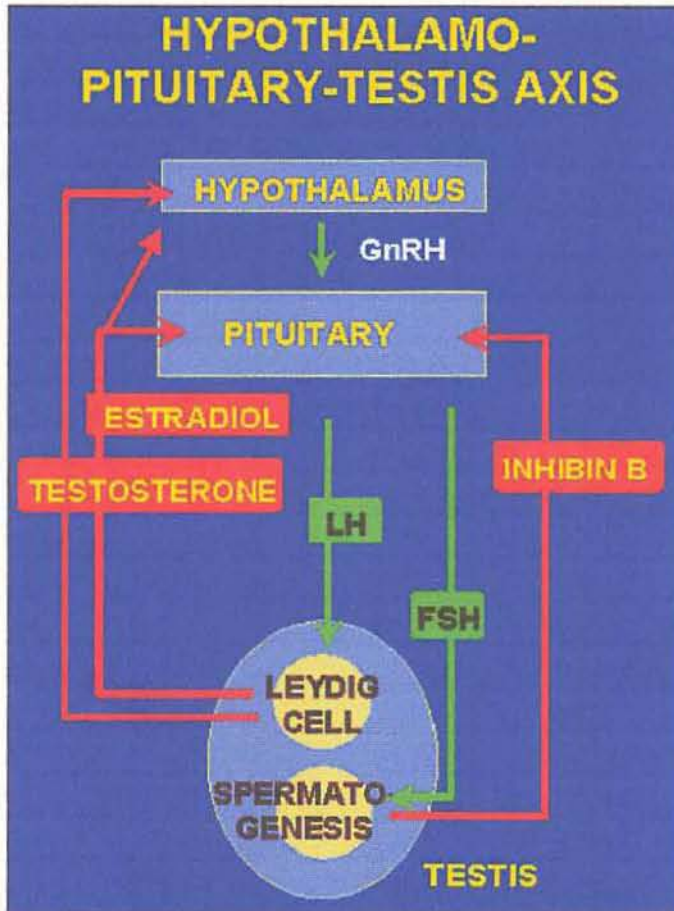
Testosteron dapat dikonversi menjadi dihidrotestosteron (DHT) oleh 5 $\alpha$ -reduktase pada sel sasaran tertentu (misalnya epididimis, vesikula seminalis, prostat dan kelenjar keringat manusia) sebelum berikatan dengan reseptor androgen. Ikatan DHT-reseptor lebih stabil dibanding dengan reseptor-androgen (Ganong, 1993).



Gambar 2.8 Aksi hormon testis (Sturm N, 2006)



Selain testosteron dan inhibin yang melakukan kendali dalam umpan balik gonadotropin pada pria, beberapa androgen perlu untuk dikonversi menjadi estrogen dalam mempertahankan mekanisme umpan balik gonadotropin; testosteron saja mempunyai peran yang lebih kecil (Vincenzo *et al*, 2005).



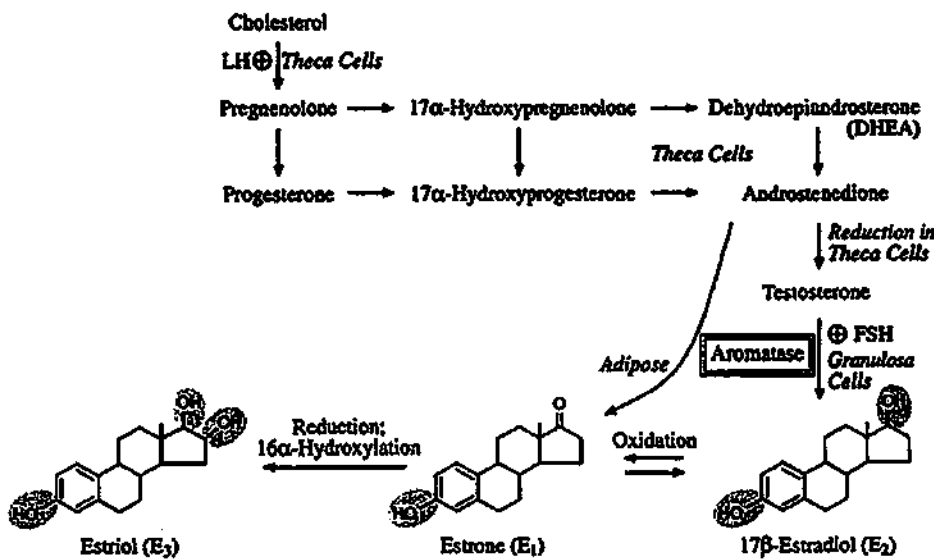
Gambar 2.9 Kontrol gonadotropin oleh steroid kelamin (Vincenzo *et al*, 2005).

## 2.4 Estrogen

Estrogen adalah steroid  $C_{18}$ . Seperti steroid yang lain, estrogen memiliki inti siklopentanoperhidrofenantren. Estrogen endokrin adalah  $17\beta$ -estradiol (estradiol), estron, dan estriol. Potensi estrogenik dari  $17\beta$ -estradiol adalah 12 kali lebih besar dari estron dan 80 kali lebih besar dari pada estriol. Oleh karena itu,  $17\beta$ -estradiol dianggap sebagai estrogen utama (Guyton & Hall, 2000).

Pada wanita, estrogen disintesis di dalam indung telur sebagai respons atas hormon pituitari. Pada wanita dewasa dengan siklus normal, folikel ovarium mengeluarkan 70 sampai 500 ug estradiol per hari, tergantung pada tahap siklus haid. Saat kehamilan, estrogen dalam jumlah yang sangat besar juga disekresi oleh plasenta. Estrogen juga diproduksi di dalam korteks adrenal dan di dalam testis, yaitu dalam sel Leydig dan epithelium seminiferus.

Asetat dan kolesterol merupakan prekursor untuk sintesis estrogen (Turner & Bagnara, 1988). Aromatisasi C19 androgen, testosteron dan androstenedion, membentuk estradiol dan estrone, berturut-turut, adalah kunci pada langkah-langkah biosintesis estrogen di bawah kendali enzim aromatase (gambar 2.9). Enzim aromatase adalah suatu enzim P450 mono-oxygenase yang kompleks terdapat pada retikulum endoplasmik beraksi melalui tiga reaksi hidroksilasi yang berurutan, efek akhir adalah aromatisasi suatu cincin androgen. P450 aromatase adalah produk dari gen CYP19, terdiri dari sedikitnya 16 ekson dan terletak pada kromosom 15 pada manusia.



Gambar 2.10 Biosintesis estrogen (Sturm N, 2006)

Estradiol dapat dikonversi menjadi estrone dan sebaliknya, dan keduanya dapat dikonversi menjadi estriol di dalam hati, metabolit utama melalui air kencing (Guyton & Hall, 2000).

Kira-kira 50 persen estrogen darah dikonjugasi dengan glukoronida dan sulfat di dalam hati dan merupakan senyawa yang diekskresi melalui urin. Estrogen mengalami sirkulasi enterohepatik (Turner & Bagnara, 1988).

Estrogen beredar di dalam tubuh berikatan secara reversibel sebagian besar dengan globulin pengikat hormon seks (SHBG), suatu  $\beta$ -globulin, dan dalam jumlah yang lebih kecil berikatan dengan albumin; dan hanya estrogen yang tidak berikatan yang dapat masuk sel jaringan target dan mempengaruhi aktivitas biologi. Ini adalah suatu poin penting, sebab ini berarti bahwa semua perubahan dalam konsentrasi SHBG dapat mengubah metabolisme estrogen dengan mempengaruhi perubahan dalam ketersediaan estrogen kepada sel target (Guyton & Hall, 2000).

Estrogen, seperti semua hormon steroid, mempunyai suatu cakupan luas aksi dan mempengaruhi hampir semua sistem di dalam tubuh. Estrogen beraksi dengan berikatan dengan afinitas tinggi dengan reseptor estrogen inti spesifik (ERs) di dalam sel target. Sekali terikat oleh estrogen, reseptor mengaktifkan transkripsi target gen yang responsif terhadap estrogen. Karena reseptor estrogen (ER) mempunyai suatu kemampuan unik untuk berikatan dengan berbagai senyawa dengan variasi struktur yang berbeda, banyak toksin lingkungan dan senyawa tumbuhan dapat berikatan dengan ER dengan afinitas yang bermacam-macam dan mengatur aktivitas estrogen.

Estrogen beraksi mengatur ekspresi gen tertentu di dalam sel yang bekerja sebagai sasaran. Estrogen merangsang sintesis mRNA, protein dan DNA. Ada kemungkinan bahwa estradiol memasuki sel dan berikatan dengan protein reseptor di luar inti kemudian kompleks estrogen-reseptor berpindah tempat ke inti. Pada proses

translokasi ini, reseptor mengalami transformasi atau aktivasi sehingga mempunyai kemampuan berikatan dengan inti dan kromatin dan merangsang sintesis RNA. Kemungkinan efek kompleks estradiol-reseptor terhadap transkripsi gen meliputi pengaruhnya pada pengikatan polimerase RNA ke DNA dan kromatin, inisiasi transkripsi dan sintesis RNA, serta pengaruhnya pada pertumbuhan dan distribusi ukuran rantai-rantai RNA (Turner & Bagnara, 1988).

Walaupun jelas bahwa estrogen mengatur transkripsi melalui suatu interaksi inti setelah berikatan dengan reseptornya, suatu tindakan non-genomic estrogen telah membuktikan suatu mekanisme molekuler berbeda meliputi beberapa aksi estrogen. Pada studi *in vitro* menunjukkan suatu waktu laten sangat pendek antara pemberian estrogen dan penampilan efek biologi. Tindakan ini kemungkinan diperantarai reseptor sel permukaan (*cell-surface*), yang tidak mungkin terjadi melalui suatu mekanisme transkripsi. Jenis aksi estrogen yang berbeda diringkas di dalam Tabel 2.2.

Tabel 2.2 Aksi estrogen dan hubungan jalur dan mekanisme biomolekuler (Vincenzo *et al*, 2005).

Table 1. Estrogen actions and related biomolecular pathways and mechanisms.				
Estrogen Actions	Receptors	Mechanism	Final effect	Features
Genomic (nuclear actions)	ER $\alpha$	Transcriptional: nuclear interaction with estrogen-responsive elements	Modulation of estrogen target gene expression.	Slow effects (minutes or hours)
	ER $\beta$	Transcriptional: nuclear interaction with estrogen-responsive elements	Modulation of estrogen target gene expression.	Slow effects (minutes or hours)
Non Genomic (cell membranes actions)	Estrogen receptors on cells membrane	Cells membrane changes	Changes in ionic transport through cell surface.	Rapid effects (seconds)

### 2.4.1 Reseptor estrogen

Dua bentuk reseptor estrogen,  $\alpha$  dan  $\beta$ , telah dikenali berbeda di dalam distribusi pada jaringan, afinitas ikatan, dan fungsi biologi. Reseptor estrogen  $\alpha$  (ER  $\alpha$ ) banyak terdapat pada uterus, testis, epididimis, hipofisis, dan adrenal, sedang reseptor estrogen  $\beta$  (ER  $\beta$ ) banyak terdapat pada ovarium, prostat, paru, kandung kemih, otak, dan tulang. Oleh karena itu, sel target berbeda dapat merespons dengan cara yang berbeda terhadap stimulus estrogenik yang sama tergantung pada perbandingan ekspresi dua subtype reseptor di dalam sel tersebut. Gen manusia yang menyandi ER  $\alpha$  terletak pada lengan panjang kromosom 6, sedang gen yang menyandi untuk ER  $\beta$  terletak pada band/pita q22-24 kromosom 14. Dua protein ER ( $\alpha$  dan  $\beta$ ) mempunyai suatu tingkat kesamaan yang tinggi di tingkat asam amino.

### 2.4.2 Distribusi ERs dan aromatase pada sistem reproduksi laki-laki

ERs dan enzim aromatase diekspresikan di dalam saluran reproduksi laki-laki dan hewan jantan, menunjukkan bahwa biosintesis estrogen terjadi di dalam saluran reproduksi laki-laki dan bahwa keduanya tempat memproduksi dan sirkulasi estrogen dapat saling berinteraksi dengan ERs di dalam suatu bentuk intrakrin/parakrin dan/atau endokrin. Suatu konsep kunci aksi estrogen di dalam saluran reproduksi laki-laki didukung oleh fakta bahwa struktur reproduksi laki-laki dapat memproduksi dan berespons dengan estrogen.

#### 1. ERs dan aromatase pada testis hewan pengerat jantan dewasa

ER $\alpha$  diekspresikan di dalam sel Leydig tikus dan mencit dewasa, tetapi tidak di dalam sel Sertoli. Ekspresi ER $\alpha$  di dalam sel benih (*germ cell*) hewan pengerat dewasa telah ditetapkan dengan kehadirannya di dalam spermatosit pachytene dan spermatid bulat (*round spermatid*); sekalipun pada penelitian yang lain membuktikan bahwa ER $\alpha$  tidak ada di dalam sel benih. ER $\alpha$  banyak terdapat

dalam duktus proksimal sistem reproduksi (rete testis, duktus eferen, epididimis proksimal) dan ekspresinya semakin berkurang ke arah distal (korpus dan kauda epididimis, vas deferens). Tingkat ekspresi ER $\alpha$  tertinggi terlihat pada duktus eferen tikus. Konsentrasi ER $\alpha$  pada saluran reproduksi jantan dibanding dengan ER $\beta$ , paling tinggi dalam saluran distal (Tabel 2.3).

Tabel 2.3 Distribusi ERs dan Aromatase pada testis binatang pengerat dewasa (Vincenzo *et al*, 2005).

<b>Table 4. ERs and Aromatase distribution in the adult rodent testis.</b>			
	<b>ER<math>\alpha</math></b>	<b>ER<math>\beta</math></b>	<b>Aromatase</b>
<b>Leydig cells</b>	+/-	+/-	+++
<b>Sertoli cells</b>	-	+	+
<b>Germ cells</b>	+/-	++	++++
Spermatogonia	-	+	+ (?)
Pachytene Spermatocytes	-/+	+	+
Round Spermatids	-/+	+	++
Spermatozoa	+ (?)	+ (?)	+
<b>efferent ductules</b>	++++	+	- (?)

ER $\beta$  diekspresikan dalam sel Leydig, sel Sertoli dan sel benih pada hewan pengerat dewasa dan telah pula dideteksi pada sel benih primata. Sel benih berisi ER $\beta$  dan aromatase. Tampaknya regulasi multiplikasi gonocyte di bawah pengaruh faktor pertumbuhan dan estradiol, dapat terjadi melalui keterlibatan ER $\beta$ .

Pada umur dewasa, sel Leydig hewan pengerat menunjukkan aktivitas aromatase lebih tinggi dibandingkan dengan pada semua umur yang lain, demikian juga dengan sel Sertoli. Aromatase juga diekspresikan pada tingkat tinggi dalam sel benih pada semua langkah maturasi, dan ekspresinya nampak meningkat ketika sel benih menjadi spermatid matur. mRNA dan aktivitas aromatase ditemukan di dalam sel benih pada tahap spermatosit pachytene pada tikus dan mencit, dan selama maturasi yang berikutnya ke dalam spermatid bulat. Aromatase tampak

terdapat pada tingkat yang lebih tinggi pada spermatid matur tikus dibanding di dalam sel benih yang lebih awal. Ekspresi mRNA dan aktivitas enzim aromatase lebih tinggi di dalam sel benih dibandingkan dengan sel Leydig, membuktikan bahwa sel benih dapat sebagai sumber estrogen yang utama pada hewan pengerat dewasa.

Ketika perkembangan sudah sempurna, spermatid dibebaskan dari epitelium, aromatase yang tersisa di dalam residu tubuh difagosit oleh sel Sertoli. Beberapa aktivitas aromatase tinggal di dalam droplet sitoplasma yang melekat pada flagela, menunjukkan bahwa spermatozoa matang dapat mensintesis estrogen sendiri. Kemampuan untuk mensintesis estrogen berangsur-angsur berkurang ketika droplet pelan-pelan bergerak ke bagian akhir ekor selama transit epididimal sampai akhirnya hilang. Demonstrasi aromatase di dalam sperma penting dalam menyatakan bahwa sperma sendiri bisa mengendalikan tingkat estrogen yang ada di dalam cairan luminal, yang secara langsung mengatur fungsi reabsorpsi cairan dari duktus eferen.

## 2. Distribusi ERs dan aromatase pada sistem reproduksi laki-laki

Kedua ERs telah ditemukan di dalam testis dan saluran reproduksi manusia. Pada janin laki-laki ekspresi ER $\beta$  lebih tinggi dibanding ER $\alpha$ , yang selanjutnya menjadi tidak ada atau diekspresikan pada tingkat sangat rendah. Pada janin manusia imunoreaktivitas ER $\beta$  telah ditunjukkan di dalam epitel seminiferus (sel Sertoli dan beberapa sel benih) dan di dalam epididimis, menunjukkan suatu peran ER $\beta$  dalam perkembangan prenatal dan fungsi struktur reproduksi laki-laki.

ER $\beta$  telah dideteksi pada hewan pengerat seperti halnya di dalam sel benih primata. Pada pria dewasa ER $\alpha$  hanya diekspresikan di dalam sel Leydig, sedang ER $\beta$  telah didokumentasikan pada sel Leydig dan Sertoli dan di duktus eferen.

Kehadiran ERs di dalam epididimis manusia masih diperdebatkan, walaupun ER $\alpha$  telah dideteksi terdapat pada inti sel epitelial kaput epididimis. ER $\alpha$  dan  $\beta$  telah dideteksi dalam spermatisit pakiten manusia dan spermatid bulat dengan hibridisasi di tempat asal. Studi ini dibantah oleh studi yang menunjukkan ekspresi yang kuat ER $\beta$  di dalam testis manusia tetapi kurang ditemukan bukti ER $\alpha$  dengan menggunakan imunohistokimia dan RT PCR, menyimpulkan bahwa ER $\beta$  menjadi mediator utama aksi estrogen pada testis manusia. Studi lain mendemonstrasikan perbedaan ekspresi dari jenis ER $\beta$ 1 dan ER $\beta$ 2 di dalam testis manusia. ER $\beta$ 2, paling tinggi di dalam spermatogonia dan sel Sertoli pada pria dewasa, dapat beraksi sebagai suatu inhibitor negatif yang dominan dari aksi estrogen; namun jenis ER $\beta$ 1 paling tinggi dalam spermatisit pachytene dan spermatid bulat, serta sensitif terhadap estrogen, tetapi lebih sedikit pada sel benih dewasa.

Luconi *et al* menyatakan bahwa membran sperma berisi suatu reseptor estrogen terikat protein yang mampu mengikat hormon steroid yang dapat beraksi melalui suatu jalur "*calcium-calmodulin dependent*" dan menghasilkan efek non-genomic cepat.

Ekspresi aromatase dalam testis manusia terdapat pada sel somatik dan sel benih. Aromatase juga diekspresikan dalam sel Leydig dan Sertoli manusia. Diketahui kemudian, aromatase tidak hanya terdapat dalam sel benih imatur (belum matang), tetapi terdapat pula pada spermatozoa yang telah matang. Berlawanan dengan hewan pengerat, ekspresi aromatase di dalam gamet manusia tidaklah hilang selama perjalanan melalui saluran genital. Dibuktikan aromatase P450 dalam ejakulat spermatozoa manusia didapatkan pada tiga tingkatan fungsional berbeda: ekspresi mRNA, protein dan aktivitas. Lebih lanjut ejakulat spermatozoa manusia secara kontinyu menunjukkan adanya aromatase P450 dan



berisi aromatase aktif, selanjutnya sperma dinyatakan sebagai suatu lokasi potensial biosintesis estrogen. Bukti ini mendukung konsep bahwa spermatozoa manusia harus dipertimbangkan sebagai suatu unit endokrin yang bergerak (*mobile*) karena bisa mensintesis dan berespons terhadap estrogen. Keberadaan secara fungsional aromatase dalam spermatozoa manusia memfasilitasi konversi androgen menjadi estrogen sepanjang saluran reproduksi, suatu peristiwa yang secara konstan menyediakan estrogen bebas di dalam cairan semen yang dapat beraksi pada sel-sel saluran reproduksi. Estrogen berperan sebagai faktor survival selama perjalanan sperma di dalam saluran semen.

#### 2.4.3 Peran estrogen pada sistem reproduksi laki-laki

##### 1. Peran estrogen pada reproduksi hewan jantan

Pada hewan, peran fisiologi estrogen dalam fungsi testikular dibuktikan dengan mencit ER $\alpha$  knockout ( $\alpha$ ERKO). Mencit  $\alpha$ ERKO jantan dewasa adalah infertil. Pada pemeriksaan histologi testis didapatkan suatu atropik dan degenerasi epitel seminiferus, bersama-sama dengan dilatasi tubulus dan suatu dilatasi rete testis. Gangguan spermatogenesis bersifat progresif. Pada pemeriksaan histologi testis normal pada umur sepuluh hari tetapi mulai terjadi degenerasi pada umur 20-30 hari. Pada sekitar 40-60 hari tubulus mengalami dilatasi dengan suatu peningkatan nyata pada volume testis, sedang epitel seminiferus menjadi atropik. Kegagalan absorpsi cairan tubuh dalam derajat berat pada duktus eferen dibuktikan menjadi penyebab infertilitas pada mencit  $\alpha$ ERKO jantan, dan defek ini secara parsial serupa dengan pemberian suatu anti-estrogen pada mencit tipe liar. Di dalam saluran genital jantan konsentrasi paling tinggi ER $\alpha$  terdapat dalam duktus eferen. Reabsorpsi cairan yang tergantung pada estrogen (*estrogen-dependent*) di lokasi tersebut diduga diakibatkan oleh interaksi estrogen dengan

ER $\alpha$  yang mengatur ekspresi *Na(+)/H(+)* exchanger-3 (NHE3). Gangguan ER $\alpha$  atau penggunaan antiestrogen mengakibatkan penurunan ekspresi NHE3 mRNA; juga terjadi penurunan aquaporin I, suatu protein yang terlibat dalam reabsorpsi air. Tidak ada reabsorpsi cairan dalam duktus eferen mencit  $\alpha$ ERKO jantan dan konsekuensi dilatasi duktus ini menginduksi suatu pembengkakan (*swelling*) progresif retroaktif tubulus seminiferus. Kerusakan tubulus seminiferus diakibatkan oleh peningkatan tekanan cairan dan kerusakan spermatogenesis semakin parah dengan atrofi testis terjadi pada umur 150 hari. Profil hormon reproduksi pada mencit  $\alpha$ ERKO jantan abnormal, yaitu: serum LH meningkat secara nyata dengan suatu akibat peningkatan serum testosteron dan hiperplasia sel Leydig, tetapi FSH dalam batas normal. Penelitian lebih lanjut pada perkembangan duktus eferen pada mencit  $\alpha$ ERKO jantan membuktikan bahwa tanpa ER $\alpha$  kongenital menyebabkan kelainan perkembangan jaringan ini.

Berbeda dengan mencit  $\alpha$ ERKO, mencit ArKO jantan pada awalnya subur (fertil), tetapi kesuburan menurun dengan peningkatan umur, dan sebaliknya mencit BERKO secara penuh subur dan organ reproduksi normal pada umur dewasa.

Pada penelitian sel benih manusia yang diberi estrogen *in vitro* terbukti bahwa estradiol dapat bertindak sebagai suatu faktor survival untuk spermatid bulat dan bahwa ketiadaan estradiol dapat menyebabkan apoptosis dengan suatu kegagalan diferensiasi spermatid panjang. Mencit dengan defisiensi ER $\alpha$  dan  $\beta$  (mencit  $\alpha\beta$ ERKO) menunjukkan suatu fenotipe yang sangat dekat dengan mencit  $\alpha$ ERKO, yaitu tidak subur (infertil) dan terdapat dilatasi tubulus seminiferus.

Studi di atas mendukung konsep bahwa suatu ER $\alpha$  fungsional, tetapi bukan ER $\beta$ , diperlukan untuk perkembangan dan pemeliharaan kesuburan normal pada mencit jantan.

## 2. Peran estrogen pada reproduksi pria

ERs yang berlimpah-limpah dalam duktus eferen manusia dan aktivitas aromatase pada sperma manusia, membuktikan keterlibatan estrogen pada fungsi reproduksi pria. Pada manusia dengan defisiensi estrogen kongenital terjadi kelemahan spermatogenesis, menimbulkan dugaan hubungan antara defisiensi estrogen kongenital dan infertilitas.

Pemberian penghambat aromatase pada pria infertil mengakibatkan suatu peningkatan angka fertilitas. Penelitian lain menyimpulkan bahwa paparan estrogen lingkungan berlebihan dapat menyebabkan kelemahan fertilitas (Vincenzo *et al*, 2005).

### 2.5 Efek Pemberian Estrogen pada Spermatogenesis

Secara umum spermatogenesis serupa pada hewan pengerat, manusia, dan primata dan dapat terganggu oleh bahan kimia yang berhubungan secara langsung dengan testis atau oleh bahan kimia yang mempengaruhi konsentrasi gonadotropin plasma atau hormon seks. Pengaruh pada spermatogenesis dapat dievaluasi dengan mengukur jumlah sperma, motilitas, morfologi, dan kemampuan fertilisasi, serta dengan pemeriksaan histopatologi testis dan epididimis (Working *et al*, 1988 cit Hughes *et al*, 2002).

#### 2.5.1 Poros *hypothalamo-pituitary-testis*

Inisiasi dan pemeliharaan spermatogenesis memerlukan sekresi gonadotropin dari pituitari dan selanjutnya tergantung pada keseimbangan poros *hypoyhalamo-pituitary-testis*. Efek umpan balik negatif testosteron pada hipotalamus dan pituitari

untuk meregulasi sekresi gonadotropin telah diketahui dengan baik. Pada manusia, umpan balik negatif testosteron pada poros *hypothalamo-pituitary* untuk menghambat sekresi LH dan FSH menjadi dasar untuk pendekatan kontrasepsi pria. Sekarang menjadi jelas bahwa komponen utama umpan balik negatif aksi androgen pada sekresi gonadotropin diperantarai melalui aromatisasi menjadi estrogen (Vincenzo *et al*, 2005).

Tikus dewasa yang diberi estradiol dosis tinggi untuk 10 hari terjadi penurunan konsentrasi FSH dan LH dalam sirkulasi secara bermakna, sehingga memicu penurunan kadar testosteron serum dan testis (O'Donnell *et al*, 2001).

Pada mencit *transgenic overexpressing enzim aromatase (AROM+)* menunjukkan peningkatan konsentrasi serum estradiol yang sangat tinggi dengan penurunan konsentrasi testosteron. Pengamatan atas banyak degenerasi sel benih dan tidak adanya spermatid dalam tubulus seminiferus mencit AROM+ menyatakan bahwa perkembangan sel benih telah berhenti ditahap spermatosit pachytene dalam testis kriptorkid. Yang menarik, "*spermatogenic arrest*" terjadi pada suatu langkah ketika P450arom secara khas diekspresikan. *Spermatogenic arrest* terjadi pada mencit AROM+ disebabkan oleh aksi supresi FSH. Penurunan kadar FSH serum pada AROM+ jantan adalah bukti lebih lanjut menyangkut penghambatan aksi estrogen pada sekresi FSH pada jantan. Tidak ada perbedaan penting dalam konsentrasi LH pada mencit AROM+ dan jenis liar (Vincenzo *et al*, 2005).

### 2.5.2 Sel Leydig

Estrogen dinyatakan menghambat perkembangan, pertumbuhan dan fungsi sel Leydig yang menyebabkan supresi produksi androgen (Vincenzo *et al*, 2005). Paparan estrogen pada neonatal saat sel Leydig sedang berkembang menghasilkan penurunan permanen kadar testosteron serum tikus dewasa, tanpa penurunan LH, membuktikan

bahwa paparan estrogen yang tidak sesuai selama perkembangan sel Leydig dapat menyebabkan perubahan permanen fungsi sel Leydig.

Estrogen terbukti menghambat enzim steroidogenik sel Leydig yang diperlukan untuk biosintesis testosteron. Estrogen telah dibuktikan menghambat aktivitas P450 *17 $\beta$ -hydroxylase/C<sub>17,20</sub> lyase* pada testis neonatal dan postpubertal. Diethylstilbestrol (DES) dapat menurunkan produksi testosteron pada tikus dewasa tanpa perubahan pada LH. Estrogen dan xenoestrogen juga telah terbukti menghambat produksi androgen oleh jaringan testis amfibi katak Atlantik, dan efek ini nampak dominan melalui mekanisme nongenomik. Pada manusia, estrogen dapat langsung menghambat steroidogenesis testikular, dan sedikit-tidaknya bagian dari aksi ini diduga disebabkan perubahan reseptor LH sel Leydig (O'Donnell *et al*, 2001).

### 2.5.3 Sel Sertoli

Sel Sertoli menghasilkan sejumlah estrogen selama periode pembelahan, sehingga disimpulkan bahwa estrogen terlibat dalam proses ini. Aktivitas aromatase paling tinggi di dalam sel Sertoli dari tikus putih prepubertal. ERs terdapat di dalam sel Sertoli selama perkembangan terutama bentuk  $\beta$ .

Teori yang dikemukakan oleh Sharpe *et al.*, Dorrington dan Khan, dan yang lain menyimpulkan bahwa estrogen mempunyai suatu efek stimulasi pada pembelahan sel Sertoli namun suatu efek negatif pada diferensiasi dan perkembangan (proliferasi) sel Sertoli didukung oleh berbagai pengamatan: 1) produksi estrogen tinggi pada proliferasi sel Sertoli namun menurun pada sel Sertoli dengan lebih banyak diferensiasi morfologi; 2) pada akhir periode proliferasi sel Sertoli, aktivitas aromatase yang diinduksi FSH mulai merosot, sebagian dalam kaitan dengan suatu penurunan kemampuan reaksi sel Sertoli pada FSH; 3) seiring dengan penurunan produksi estrogen dan aktivitas mitotik sel Sertoli, TGF $\beta$ , yang mana dapat

merangsang mitosis sel Sertoli sebagai respons atas estrogen, juga merosot; 4) hormon tiroid, yang mana menstimulasi diferensiasi sel Sertoli, menurunkan aktivitas aromatase pada sel Sertoli prepubertal; 5) kapasitas sel Leydig untuk memproduksi testosteron meningkat dari sekitar hari 14 postpartum, dan androgen menghambat aktivitas aromatase sel Sertoli secara langsung atau melalui efek yang diperantarai androgen pada sel peritubular, menyimpulkan bahwa androgen dari maturasi sel Leydig dapat mengambil bagian dalam *down-regulation* aromatase selama pergantian dari pembelahan ke diferensiasi sel Sertoli; 6) berbagai faktor pertumbuhan yang diproduksi sel Sertoli dapat mengontrol produksi estrogen sel Sertoli dan kemampuan reaksi terhadap FSH dan oleh karena itu terlibat dalam penghentian aromatase selama periode antara pembelahan dan diferensiasi sel Sertoli. Penghilangan estrogen atau faktor yang menginduksi estrogen diperlukan untuk kelangsungan hidup dan diferensiasi sel granulosa, dan hilangnya estrogen mengakibatkan sel Sertoli bisa berdiferensiasi, diduga dari sel granulosa.

Estrogen diduga juga terlibat dalam periode postproliferasi maturasi sel Sertoli. Walaupun studi efek langsung pemberian estrogen eksogen pada sel Sertoli dikacaukan oleh gangguan sirkulasi hormon, beberapa studi telah membuktikan suatu aktivitas estrogen yang khusus pada perkembangan sel Sertoli. Sharpe dan kawan-kawan membandingkan efek antara paparan DES dan antagonis GnRH pada neonatal, yaitu selama hari 2–12 kehidupan tikus. Studi ini membuktikan bahwa di samping DES dan antagonis GnRH dapat menurunkan kadar FSH dan jumlah sel Sertoli, DES menyebabkan suatu penundaan maturitas sel Sertoli, dibuktikan oleh imunolokalisasi protein sel Sertoli, serta cacat permanen pada spermatogenesis dan histologi testis pada umur dewasa. Dari penelitian tersebut dapat disimpulkan estrogen eksogen mempunyai suatu peran menghambat maturasi sel Sertoli.

Proliferasi yang normal, diferensiasi, dan maturasi fungsional sel Sertoli penting dalam spermatogenesis dan potensi fertilitas pada umur dewasa. Studi pemberian estrogen membuktikan bahwa proliferasi dan fungsi sel Sertoli dapat dipengaruhi oleh estrogen eksogen dan substansi seperti estrogen mengakibatkan cacad permanen fungsi reproduksi pada umur dewasa (O'Donnell *et al*, 2001).

#### 2.5.4 Sel benih

Paparan estrogen pada neonatal dapat menyebabkan cacad permanen pada perkembangan sel benih pada tikus dewasa, diduga berkaitan dengan cacad permanen dalam fungsi sel Sertoli lebih besar dibanding efek pada sel benih sendiri (O'Donnell *et al*, 2001).

Efek estrogen yang merugikan pada fungsi testis merupakan suatu konsep dasar untuk menguji kemungkinan hubungan antara paparan estrogen dan kematian sel spermatogenik. Dengan menggunakan suatu model *in vitro*, dapat memberikan pemahaman tentang peristiwa apoptosis yang diinduksi estrogen dalam sel spermatogenik. Kejadian awal dihubungkan dengan paparan estrogen menyebabkan *up-regulation* FasL (*Fas ligand*) dan peningkatan generasi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, *superoxide*, dan *nitric okside*. Kemampuan antibodi anti FasL untuk mencegah beberapa perubahan biokimia dan kematian sel yang diinduksi oleh substansi 17 $\beta$ -estradiol melibatkan jalur reseptor kematian sel. Bukti untuk amplifikasi sinyal yang menginduksi kematian melalui mitokondria diperoleh dari observasi hiperpolarisasi mitokondrial sementara setelah paparan estradiol menghasilkan pelepasan sitokrom c. Suatu kombinasi dari *nitric okside* dan *superoxide* tetapi bukan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> adalah bertanggung jawab untuk hiperpolarisasi mitokondrial. Walaupun penambahan *nitric okside* terjadi melalui suatu peningkatan ekspresi yang dapat diinduksi *nitric okside synthase*, *up-regulation superoxide* adalah suatu hasil metabolisme estradiol. Dapat disimpulkan

bahwa dosis rendah estrogen dapat berpotensi menyebabkan kelainan fungsi seluler spermatogenik parah mendorong ke arah kerusakan fertilitas tanpa pengaruh dari poros *hypothalamo-hypophyseal* (Mishra and Shaha, 2005).

Studi yang dilakukan oleh Nair dan Shaha (2003) dengan model tikus jantan yang diinduksi DES menunjukkan suatu peningkatan ekspresi Fas-FasL pada sel spermatogenik. Peningkatan ini terbatas pada populasi spermatid, hal ini dihubungkan dengan peningkatan apoptosis pada sel haploid. Penambahan testosteron dapat mencegah up-regulation Fas-FasL dan apoptosis sel-sel spermatogenik. Peningkatan ekspresi Fas-FasL pada sel spermatogenik diikuti oleh caspase-8 bentuk aktif yang selanjutnya diikuti perpindahan Bax ke mitokondria dan menyebabkan pelepasan sitokrom c yang diikuti penurunan potensial mitokondria.

## 2.6 Kedelai

Menurut para ahli botani, kedelai adalah tanaman berasal dari Manchuria dan sebagian dari Cina, dan terdapat beberapa jenis kedelai liar yang tergolong dalam spesies *Glycine ussuriensis*. Tanaman ini menyebar ke daerah tropik dan subtropik serta dilakukan pemuliaan sehingga dihasilkan berbagai jenis kedelai unggul yang dibudidayakan (Koswara, 1992).

Kedelai yang dikenal sekarang termasuk dalam famili *Leguminosae*, subfamily *Papilionidae*, genus *Glycine* dan spesies *max*, sehingga nama latinnya dikenal sebagai *Glycine max*. Dilihat dari segi pangan dan gizi, kedelai merupakan sumber protein paling murah, mudah dan banyak ditemukan di Indonesia. Daerah pertumbuhannya tidak lebih dari 500 meter di atas permukaan laut dengan iklim panas dan curah hujan rata-rata 200 mm/bl. Umur tanaman kedelai berbeda tergantung varietasnya, tetapi umumnya berkisar antara 75 sampai 105 hari (Thomas, 1992).



Di antara jenis kacang-kacangan, kedelai merupakan sumber protein yang paling baik. Kedelai juga dapat digunakan sebagai sumber lemak, vitamin, mineral dan serat (Koswara, 1992).

### 2.6.1 Komposisi kedelai

Komposisi kedelai menurut Koswara (1992) adalah sebagai berikut:

#### 1. Protein

Kedelai mengandung protein rata-rata 35% bahkan dalam varietas unggul kandungan proteinnya dapat mencapai 40 – 44%. Protein kedelai sebagian besar (85 – 95%) terdiri dari globulin. Dibandingkan dengan kacang-kacangan yang lain, susunan asam amino pada kedelai lebih lengkap dan seimbang.

#### 2. Lemak

Kedelai mengandung sekitar 18 – 20% lemak dan 85% dari jumlah tersebut terdiri dari asam lemak tak jenuh yang bebas kolesterol. Di dalam lemak kedelai terkandung beberapa fosfolipida yang penting yaitu lesitin, sepalin, dan lipositol.

#### 3. Karbohidrat

Kedelai mengandung karbohidrat sekitar 35%, hanya 12 – 14%nya saja yang dapat digunakan tubuh secara biologis. Karbohidrat pada kedelai terdiri atas golongan oligosakarida dan polisakarida. Golongan oligosakarida terdiri dari sukrosa, stakiosa, dan raffinosa yang larut dalam air; sedangkan golongan polisakarida terdiri dari arabinogalaktan dan bahan-bahan selulosa yang tidak larut dalam air dan alkohol.

#### 4. Vitamin dan mineral

Secara umum kedelai merupakan sumber vitamin B, yaitu vitamin B1, B2, niasin, piridoksin dan golongan vitamin B lain. Vitamin lain yang terkandung dalam jumlah cukup banyak adalah vitamin E dan K; sedangkan vitamin A dan D

terkandung dalam jumlah yang sangat sedikit. Dalam kedelai muda terdapat vitamin C dengan kadar yang sangat rendah. Kedelai banyak mengandung kalsium dan fosfor, sedangkan zat besi terdapat dalam jumlah relatif sedikit. Mineral lain terdapat dalam jumlah yang sangat sedikit yaitu boron, magnesium, berilium dan seng.

## 5. Serat kedelai

Kulit kedelai mengandung 87% serat makanan (*dietary fiber*), 40 – 53% selulosa kasar, 14 – 33% hemiselulosa kasar dan 1 – 3% serat kasar. Serat makanan adalah bagian sel nabati yang tidak dapat dicerna oleh enzim pencernaan pada manusia sehingga tidak dapat diserap oleh usus. Serat makanan ini dapat dikelompokkan menjadi 2 golongan, yaitu polisakarida pembentuk dinding sel seperti selulosa dan polisakarida bukan pembentuk dinding sel yaitu lignin, pectin dan gum.

## 2.7 Kedelai sebagai Sumber Fitoestrogen

Estrogen nonsteroidal tumbuhan (fitoestrogen) pertama dikenali pada awal 1930an, dengan penemuan bahwa kacang kedelai, pohon willow, biji, dan buah delima mengandung senyawa dengan struktur mirip estrogen. Fitoestrogen terdapat pada tingkat 50-300 miligram per 100 gram kacang kedelai, dan dalam tingkat yang lebih rendah pada produk kedelai seperti miso, susu kedelai, dan tofu. Ada 3 kelompok fitoestrogen, yaitu isoflavon, lignan, dan coumestan.

Isoflavon mempunyai fungsi biologi dalam jangkauan luas pada tumbuhan. Dua fungsi yang dikenali adalah: (a) sebagai fito-alexin atau stressor bahan-kimia yang dikeluarkan oleh tumbuhan sebagai jawaban atau respons atas serangan benalu seperti serangga, jamur, virus, dan paparan aktivitas agen parasit ini, dan (b) bahan-

kimia yang mendorong kolonisasi bakteri *nitrogen-fixing* dalam akar jenis kacang polong.

Isoflavon terdistribusi secara luas pada tumbuhan dan terdapat lebih dari 700 isoflavon yang berbeda. Namun isoflavon yang memiliki aktivitas estrogenik merupakan suatu bagian sub-grup dan terbatas hampir eksklusif pada famili *Leguminosae*. Kelompok *oestrogenic isoflavones* adalah daidzein, formononetin, genistein, glycitein dan biochanin A. Bahan makanan seperti soya, kacang panjang/buncis, tanaman kacang-kacangan lentil dan kacang tanah mempunyai kadar total *oestrogenic isoflavones* 40 - 300 mg tiap 100 g berat kering.

Lignan merupakan unsur dinding sel tanaman dan terdistribusi secara luas pada tumbuhan. Lebih dari seratus lignan diuraikan dan dilaporkan terdapat pada bahan makanan seperti gandum, buah-buahan dan sayur-mayur. Oilseeds seperti rami (biji rami) diketahui mempunyai kadar paling tinggi yaitu 20-60 mg/100 g berat kering, sedang gandum dan jenis kacang polong mempunyai kadar yang lebih rendah yaitu 0.3-0.6 mg/100 g, dan sayur-mayur kadarnya lebih rendah lagi yaitu 0.1-0.2 mg/100 g.

Coumestan terdapat pada semanggi merah (*red clover*), biji bunga matahari dan kecambah (Taylor, 2002).

Konsentrasi rata-rata isoflavon, coumestrol dan lignan pada beberapa makanan tercantum pada tabel 2.4.

Tabel 2.4. Konsentrasi rata-rata isoflavon, coumestrol dan lignan pada beberapa makanan (Hughes *et al*, 2002).

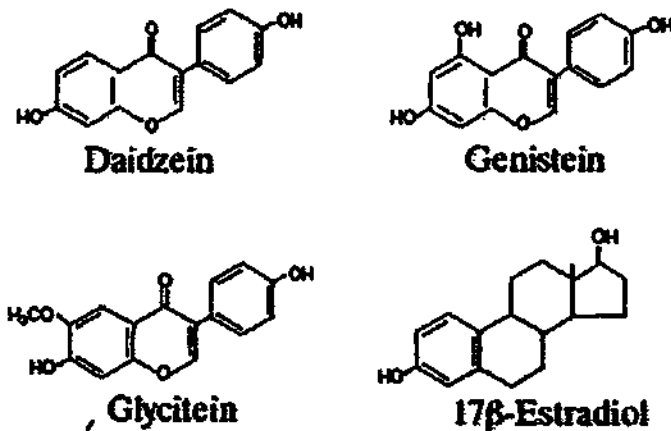
Makanan	Isoflavon (mg/100g)	Coumestrol (mg/100g)	Lignan (mg/100g)
Kacang	0-1,5	0-3,6	0,05-0,18
Kecambah, alfalfa		4,7	
Roti, coklat	0-0,02		
Bir (minuman yang mengandung alkohol)	0,002-0,005		
Kopi	0,05		0,5
Telur	0,03		
Buah segar dan sayuran	0,1		0,1
Es krim	0,09		
Legumes	0-0,54		
Linseeds (flaxseed)			60-370
Miso	43-60		
Jamur	0,02		
Biji-bijian: bunga matahari, alfalfa, clover	0,01-0,6		
Keju kedelai	6-31		
Susu kedelai	5-10		
Protein kedelai konsentrat/isolat	12-102		
Saos kedelai	0,1-1,6		0,03
Tepung kedelai	131-198		0,13
Kacang kedelai	14-153	0,05	0,01-0,27
Teh: hitam, hijau	0,04-0,05		2,04
Tempe	29-53		
Tofu	13,5-67		

Di antara kelompok fitoestrogen, isoflavon (genistein, daidzein) adalah yang paling diminati dalam bidang nutrisi klinik. Minat terhadap senyawa ini besar karena mempunyai aksi estrogenik dan inhibitori yang mempunyai kapasitas moderat sebagai anti-oxidan. Hal ini dapat mendukung suatu kemungkinan peran isoflavon dalam pengobatan atau pencegahan penyakit neoplastik.

Aktivitas estrogenik diperoleh dari kapasitas mereka untuk berinteraksi dengan reseptor  $17\beta$ -estradiol. Namun aktivitas estrogeniknya sangat sedikit

dibandingkan dengan estrogen manusia (aktivitas estrogeniknya 1/500 - 1/1000 dari aktivitas oestradiol).

Isoflavon memiliki struktur kimia (gambar 2.11) dan mempunyai fungsi mirip estrogen mamalia. Cincin fenol merupakan unsur struktur kunci dari senyawa isoflavon yang berikatan dengan reseptor estrogen. Ikatan fitoestrogen tampak lebih tinggi pada reseptor B (ER  $\beta$ ) daripada reseptor estrogen  $\alpha$  (ER  $\alpha$ ) (Setchell & Cassidy, 1999).



Gambar 2.11 Perbandingan struktur isoflavon (daidzein, genistein, dan glycitein) dengan 17 $\beta$ -estradiol yang tampak mirip (Setchell & Cassidy, 1999).

Studi tentang efek biologi pada hewan berkenaan dengan konsumsi fitoestrogen dihubungkan dengan strukturnya yang berhubungan dekat dengan estrogen alami yang menyebabkan fitoestrogen mempunyai efek seperti oestrogen endogen. Efek biologi yang dikenal dari fitoestrogen dapat diringkas sebagai berikut: In vitro: (a) berikatan dengan reseptor estrogen pada jaringan manusia, (b) bersaing dengan estrogen untuk reseptor estrogen, tetapi hanya dengan lemah merangsang reseptor tersebut, (c) merangsang produksi *sex hormone-binding globulin* (SHBG) sel

manusia; *in vivo*: (d) estrogenik lemah pada binatang, (e) menghambat secara kompetitif respons jaringan terhadap estrogen.

Rata-rata konsumsi fitoestrogen pada beberapa negara dapat dilihat pada tabel 2.5.

Tabel 2.5. Estimasi konsumsi isoflavon pada beberapa negara (Hughes *et al*, 2002).

Negara	Rata-rata konsumsi isoflavon (mg/hari)
Inggris	0,6
Amerika Serikat	1,2
Australia	17
New Zealand	0,8
Korea	14,88
China	25,4
Singapura	61,4
Jepang	46,5 (Arai <i>et al</i> , 2000) 150-200 (Cassidy <i>et al</i> , 1994)

Fitoestrogen dapat bersifat agonis atau antagonis terhadap estradiol. Studi membuktikan bahwa 60 g soya protein yang mengandung 45 mg isoflavon, bertindak sebagai estrogen dibanding sebagai antiestrogen. Pada studi jangka panjang, ditemukan up-regulation dari suatu gen yang sensitif terhadap estrogen dengan tidak diikuti oleh tanda yang lain dari estrogenitas fungsional seperti proliferasi sel.

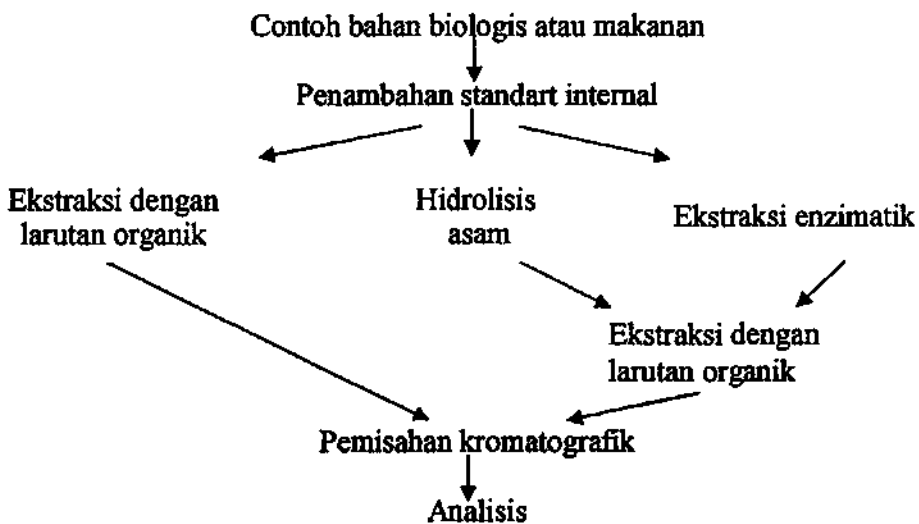
Fitoestrogen diketahui dapat memberikan bermacam efek, meliputi: (i) penurunan tingkat berbagai lipoprotein darah mencakup LDL dan VLDL, serta kolesterol yang mendorong ke arah penurunan risiko perkembangan aterosklerosis; (ii) penurunan risiko perkembangan kanker prostat; (iii) penurunan risiko perkembangan kanker payudara; (iv) penurunan risiko perkembangan kanker kandung; (v) penurunan risiko perkembangan kanker usus besar; (vi) penurunan risiko perkembangan sindroma pre-menstrual, yang meliputi tegangan pre-menstrual (PMT); (vii) penurunan risiko perkembangan gejala: vagina kering, *flushing* perifer,

depresi, yang biasanya dihubungkan dengan wanita menopause; dan untuk pengobatan penyakit payudara kistik pada wanita.

Pada penelitian yang dilakukan Supriyanto (2004) dengan model tikus putih jantan hiperkolesterolemia yang diberi ekstrak kedelai 2,60/200 gram BB/hari selama 6 minggu didapatkan penurunan kolesterol LDL dan kolesterol total.

### 2.7.1 Analisis fitoestrogen

Fitoestrogen umumnya terdapat dalam konsentrasi ppb (*part per billion*) sampai dengan ppm (*part per million*) dari tumbuhan. Untuk mengetahui konsentrasi fitoestrogen pada tumbuhan atau makanan diperlukan tindakan isolasi atau ekstraksi dan dilanjutkan dengan analisis menggunakan teknik kromatografi. Prinsip langkah-langkah ekstraksi dan analisis fitoestrogen terlihat pada gambar 2.12.



Gambar 2.12 Prinsip langkah-langkah di dalam ekstraksi dan analisis fitoestrogen

Metode analisis yang sering digunakan untuk mengukur fitoestrogen adalah:

1. *High performance liquid chromatography* dengan deteksi ultraviolet (HPLC-UV)
2. *Gas chromatography* dengan deteksi *mass spectrometric* (GC-MS)

### 3. *Liquid chromatography* dengan deteksi *mass spectrometric* (LC-MS)

Metode analisis yang digunakan tergantung pada tipe bahan dan senyawa yang dianalisis (Hughes *et al*, 2002).

#### 2.7.2 Efek pemrosesan dan pemasakan terhadap kandungan fitoestrogen

Secara umum pemrosesan kedelai menjadi produk makanan menurunkan konsentrasi fitoestrogen (Coward *et al*, 1993, 1998; Wang & Murphy, 1994b cit Hughes *et al*, 2002). Contohnya, fermentasi kedelai menjadi produk seperti tempe dan miso menurunkan isoflavon sekitar 2-3 dibandingkan dengan kedelai yang tidak difermentasi.

#### 2.7.3 Farmakokinetik fitoestrogen

##### 1. Absorpsi

Isoflavon berada dalam makanan terutama sebagai glucosides, tetapi diabsorpsi dalam bentuk *aglucones* (hasil hidrolisis dari *glucosides*). *Aglucones* lebih mudah diabsorpsi karena lebih hidrofobik dan lebih rendah berat molekulnya dibanding *glucosides*. Absorpsi *aglucones* terutama terjadi di dalam usus halus dan usus besar.

Hasil penelitian Kenneth *et al* (2001) membuktikan bahwa wanita premenopause yang diberi 50 mg daidzein dosis tunggal peroral terjadi peningkatan konsentrasi isoflavon plasma setelah 2 jam dengan rerata waktu untuk mencapai konsentrasi maksimal ( $t_{max}$ )  $6,6 \pm 1,36$  jam. Pada waktu tersebut rerata konsentrasi maksimum daidzein dalam plasma ( $C_{max}$ ) adalah  $194 \pm 30,6$  ng/mL ( $0,76 \pm 0,12$   $\mu\text{mol/L}$ ); sedang dengan pemberian 50 mg genistein dosis tunggal peroral menunjukkan profil plasma yang sama. Rerata  $t_{max}$  adalah  $9,33 \pm 1,33$  jam, dengan rerata  $C_{max}$  untuk genistein adalah  $341 \pm 74$  ng/mL ( $1,26 \pm 0,27$   $\mu\text{mol/L}$ ).



Waktu paruh eliminasi untuk daidzein adalah  $9,34 \pm 1,3$  jam, sedang untuk genistein  $6,78 \pm 0,84$  jam. Daerah di bawah kurva (*area under curve* =AUC) untuk daidzein adalah  $2,94 \pm 0,22$   $\mu\text{g}/(\text{mL}\cdot\text{h})$ , sedang AUC untuk genistein adalah  $4,54 \pm 1,41$   $\mu\text{g}/(\text{mL}\cdot\text{h})$ . Rerata klirens plasma untuk daidzein adalah  $17,5 \pm 1,4$  L/h, sedang rerata klirens plasma untuk genistein adalah  $18,3 \pm 5,7$  L/h. Volume distribusi terhadap fraksi bioavailabilitas ( $V_d/F$ ) untuk daidzein besar, yaitu  $236,4 \pm 35,9$  L, sedang  $V_d/F$  untuk genistein adalah  $161,1 \pm 44,1$  L.

## 2. Metabolisme

Metabolisme isoflavon dan lignan diperantarai oleh enzim-enzim jaringan dan mikroflora usus terutama pada saat absorpsi dan selama sirkulasi enterohepatik. Segera setelah diabsorpsi, isoflavon dan lignan direkonjugasi dengan *glucuronic acid*, dan sebagian kecil dengan sulfat membentuk *sulfolglucuronides*. Konjugasi terjadi di hati dengan enzim UDP-glucuronosyl transferase atau sulfotransferase hati, atau di epitel usus halus yang juga memiliki aktivitas glucuronosyl transferase dan sulfotransferase. Dengan demikian, isoflavon dan lignan terdapat dalam sirkulasi terutama dalam bentuk konjugasi. Hidrolisis asam dari glucosides dapat terjadi di dalam lambung (Kelly *et al*, 1993 cit Hughest *et al*, 2002). Penelitian Day *et al* (1998) membuktikan bahwa hati dan *enterocyte* usus halus manusia berisi enzim  $\beta$ -glucosidase yang efektif menghidrolisis glucosides flavon dan isoflavon (Hughest *et al*, 2002).  $\beta$ -glucosidase bekerjasama dengan mikroflora usus (seperti *Lactobacilli*, *Bifidobacteria*, dan *Bacteriodes*) dalam hidrolisis glucosides (Xu *et al*, 1995; Barnes *et al*, 1996 cit Hughest *et al*, 2002). Glucosides isoflavon dapat dikonversi menjadi aglucones oleh enzim di air ludah (Allred *et al*, 2001 cit Hughest *et al*, 2002).

Pada manusia, isoflavon dimetabolisme lebih lanjut menjadi *equol*, *p-ethylphenol*, dan *O-demethylangolensin (O-DMA)*. Tingkat metabolisme ini merupakan variabel yang individual dan dipengaruhi oleh komponen lain pada diet. Lingkungan tinggi karbohidrat, yang menyebabkan peningkatan fermentasi intestinal, mengakibatkan lebih banyak biotransformasi (Hughes *et al*, 2002).

Dari hasil penelitian Kenneth *et al* (2001) terhadap wanita premenopause yang diberi 50 mg daidzein dosis tunggal peroral terbukti bahwa daidzein bersirkulasi di dalam plasma terutama dalam bentuk terkonjugasi, demikian juga dengan perlakuan dengan genistein.

### 3. Ekskresi

Urin dan empedu merupakan jalur utama ekskresi fitoestrogen. Konjugat yang diekskresikan ke dalam empedu dapat mengalami dekonjugasi oleh bakteri usus dan mengalami sirkulasi enterohepatik. Sirkulasi enterohepatik dapat memperlama paparan terhadap senyawa tersebut.

#### 2.7.4 Efek fitoestrogen

##### 1. Efek fitoestrogen pada bioavailabilitas estrogen

Di dalam sirkulasi estradiol berikatan terutama dengan glikoprotein, yaitu *sex hormone binding globulin (SHGB)* pada manusia dan  *$\alpha$ -fetoprotein (AFT)* pada tikus dan mencit (Baker *et al*, 1998 cit Hughes *et al*, 2002). Pada wanita, sekitar 37% estradiol dalam sirkulasi berikatan dengan SHGB dan 61% berikatan dengan albumin serum, hanya estradiol yang bebas yang dapat berinteraksi dengan sel dan selanjutnya memberikan efek biologis. Sebagian besar testosteron (97%) di dalam plasma berikatan dengan protein, 40%nya berikatan dengan SHGB. Fitoestrogen dapat mempengaruhi konsentrasi hormon sex yang aktif dengan: a) Berikatan dengan SHGB untuk menghambat ikatan estrogen dan atau

androgen sehingga meningkatkan konsentrasi hormon tersebut dalam plasma (suatu efek estrogenik atau androgenik), b) Menstimulasi sintesis SHGB sehingga menurunkan konsentrasi hormon bebas (efek anti-estrogenik).

## 2. Efek fitoestrogen pada biosintesis dan metabolisme estrogen

Fitoestrogen mempengaruhi konsentrasi steroid dengan menghambat enzim *17 $\beta$ -hydroxysteroid oxidoreductase* (17 $\beta$ -HSOR) I dan II, suatu enzim kunci dalam biosintesis dan metabolisme estrogen. Enzim tipe I mengubah estron menjadi estradiol, dan tipe II memperantarai reaksi sebaliknya. Hambatan pada 17 $\beta$ -HSOR I dapat menyebabkan penurunan konsentrasi estradiol dan peningkatan konsentrasi estron (suatu efek antiestrogenik); sedang hambatan pada 17 $\beta$ -HSOR II meningkatkan konsentrasi estradiol dan menurunkan konsentrasi estron (suatu efek estrogenik). Dengan demikian fitoestrogen mempengaruhi keseimbangan konsentrasi estron dan estradiol. Perubahan keseimbangan tersebut tergantung pada struktur fitoestrogen.

## 3. Efek fitoestrogen pada proliferasi sel

Fitoestrogen dapat meningkatkan dan menghambat proliferasi sel tergantung estrogen. Efek tersebut tergantung pada dosis; fitoestrogen meningkatkan proliferasi pada konsentrasi 0,1-10  $\mu$ M dan menghambat proliferasi pada konsentrasi >10  $\mu$ M (Hughes *et al*, 2002).

### 2.7.5 Kemungkinan risiko yang dihubungkan dengan fitoestrogen

Pada tahun 1996 telah ditinjau toksisitas fitoestrogen; menyimpulkan bahwa fitoestrogen dapat menyebabkan efek yang kurang baik pada binatang dan merekomendasi riset untuk menentukan kemungkinan risiko pada bayi yang mengkonsumsi susu kedelai.

Toksisitas estrogen dihubungkan dengan paparan pada tumbuhan; fitoestrogen diketahui mempengaruhi infertilitas dan toksisitas perkembangan pada binatang tertentu, dan coumesterol telah dibuktikan menghambat fertilitas.

Fitoestrogen mempunyai potensi hormonal penting *in vitro*. Pada tikus jantan neonatal yang dipapar dengan genistein, sekresi LH dan konsentrasi testosteron plasma menurun pada umur dewasa, dan paparan genistein pada mencit dewasa menyebabkan penurunan konsentrasi testosteron serum dan testis demikian juga dengan LH pituitari dan berat prostat (Mitchell *et al*, 2001) . Penurunan berat badan dan prostat serta kadar testosteron dan androstenedion plasma jelas pada tikus jantan yang diberi makan makanan berisi kedelai (600 mg isoflavon/kg) pada PND (*Post Natal Day*) 50 untuk 5 minggu dibandingkan dengan binatang yang diberi makan makanan tanpa isoflavon (Weber *et al*, 2001 cit Hughest *et al*, 2002). Ada juga bukti bahwa isoflavon kedelai genistein dan daidzein adalah genotoksik pada sperma manusia. Nagata dan rekan telah melaporkan suatu asosiasi terbalik antara konsumsi produk kedelai dan konsentrasi hormon serum pada pria Jepang. Penelitian telah mendemonstrasikan bahwa senyawa kimia dapat mempunyai sejumlah efek pada kesehatan laki-laki meliputi penurunan berat kelenjar prostat, kadar testosteron lebih rendah, dan menyebabkan nekrosis dan kematian sel-sel testis yang nyata.

Studi yang dilakukan oleh Atanassova *et al* (1999) membuktikan bahwa pemberian genistein 4 mg/kgBB/hari subkutan pada tikus jantan pada antara PND (*Post Natal Day*) 2-18 secara nyata meningkatkan apoptosis sel benih, memperlambat pembentukan lumen tubulus seminiferus dan mengurangi berat testis, FSH plasma dan perbandingan (rasio) volume spermatosit/sel Sertoli pada PND 18, tidak ada efek pada konsentrasi inhibin B dan volume inti sel Sertoli yang diamati. Penurunan berat badan dan prostat serta kadar testosteron dan androstenedion plasma jelas pada tikus

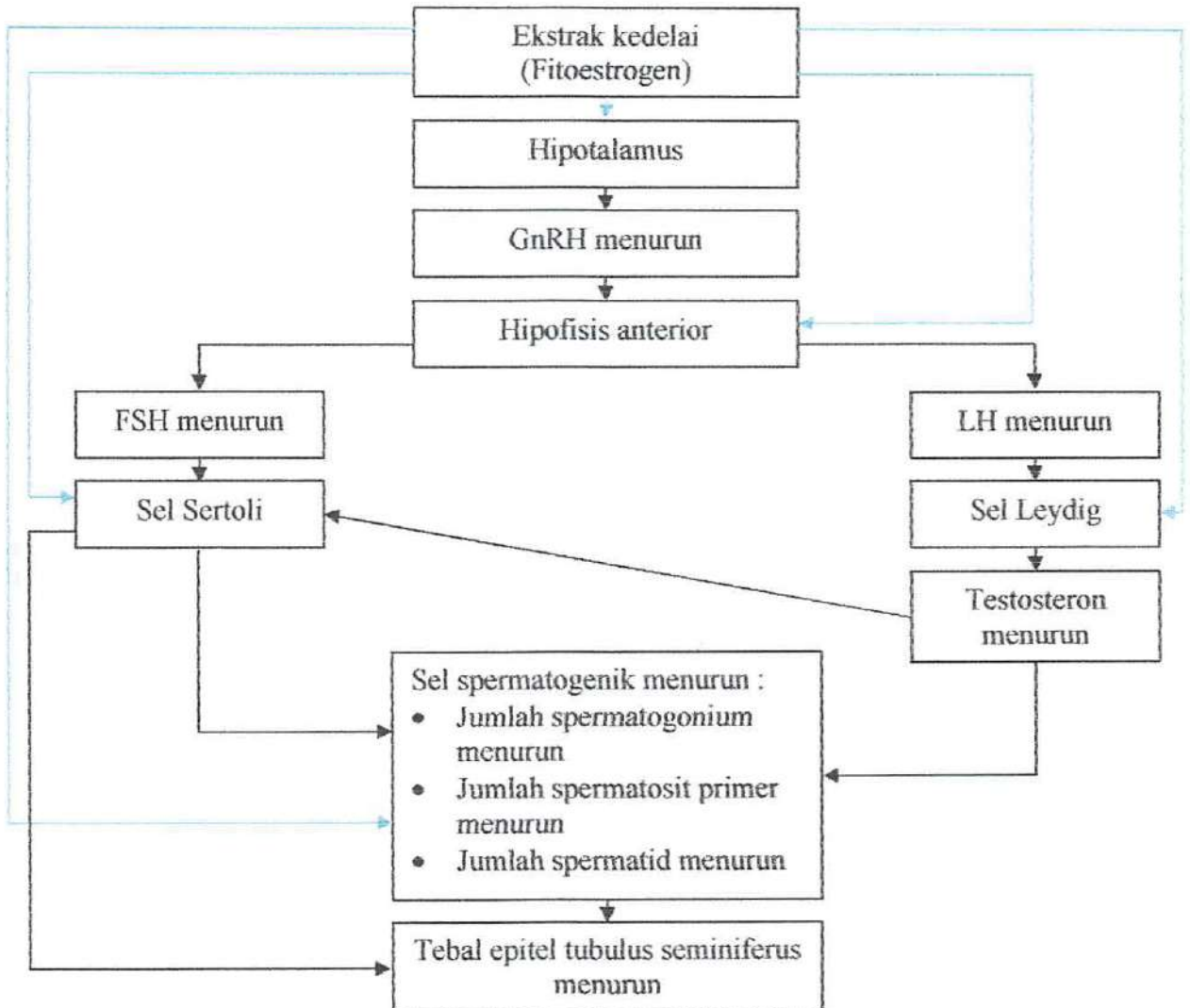
jantan yang diberi makan makanan berisi kedelai (600 mg isoflavones/kg) pada PND (*Post Natal Day*) 50 untuk 5 minggu dibandingkan dengan binatang yang diberi makan makanan tanpa isoflavon (Weber *et al*, 2001).

Studi yang dilakukan Strauss *et al* (1998) membuktikan bahwa pemberian genistein 2,5 mg/kg BB/hari secara subkutan selama 9 hari menurunkan konsentrasi testosteron, LH serum dan berat prostat.

### BAB 3

## KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

### 3.1 Kerangka Konseptual



Keterangan :

→ : merangsang

→ : menghambat

### 3.2 Dasar Teori

Inisiasi dan pemeliharaan spermatogenesis memerlukan sekresi gonadotropin dari pituitary dan selanjutnya tergantung pada keseimbangan poros *hypophalamo-pituitary-testis*. Komponen utama umpan balik negatif aksi androgen pada sekresi gonadotropin diperantarai aromatisasi menjadi estrogen, sehingga dengan peningkatan kadar estrogen serum menurunkan konsentrasi FSH dan LH dalam sirkulasi, sehingga mendorong penurunan kadar testosteron serum dan testis yang selanjutnya menurunkan spermatogenesis (O'Donnell et al, 2001).

Estrogen menghambat perkembangan, pertumbuhan dan fungsi sel Leydig yang menyebabkan supresi produksi androgen. Estrogen juga menghambat aktivitas P450 17 $\beta$ -hydroxylase/C<sub>17,20</sub> lyase pada testis neonatal dan pospubertal, yaitu suatu enzim steroidogenik sel Leydig yang diperlukan untuk biosintesis testosteron sehingga menurunkan spermatogenesis (O'Donnell et al, 2001).

Peningkatan estrogen serum dapat menurunkan jumlah sel Sertoli, juga menyebabkan penundaan maturitas sel Sertoli, serta cacat permanen pada spermatogenesis dan histologi testis. Sharpe et al., Dorrington dan Khan, dan yang lain menyimpulkan bahwa estrogen mempunyai suatu efek negatif pada diferensiasi dan perkembangan sel Sertoli (O'Donnell et al, 2001).

Estrogen menginduksi apoptosis sel spermatogenik melalui jalur mitokondrial. Estrogen menyebabkan up-regulation FasL dan peningkatan generasi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, superoxide, dan oksida nitric. Bukti untuk amplifikasi dari sinyal yang menginduksi kematian melalui mitochondria diperoleh dari observasi hiperpolarisasi mitokondrial sementara setelah ekspose estradiol menghasilkan

pelepasan sitokrom c. Kombinasi dari nitric okside dan superoxide bertanggung jawab untuk hiperpolarisasi mitochondrial (Mishra D.P. dan Shaha C, 2005).

Ekstrak biji kedelai sebagai sumber fitoestrogen mempunyai efek estrogenik yang dapat memberikan umpan balik negatif pada sekresi gonadotropin sehingga menurunkan hormon LH dan FSH yang selanjutnya dapat menghambat perkembangan, pertumbuhan dan fungsi sel Leydig sehingga menyebabkan supresi produksi androgen, menurunkan jumlah sel Sertoli dan menyebabkan penundaan maturitas sel Sertoli sehingga dapat menurunkan spermatogenesis, serta dapat menginduksi apoptosis sel spermatogenik.

Penurunan spermatogenesis dapat dilihat melalui jumlah spermatogonium, spermatosit primer, dan spermatid. Penurunan jumlah sel-sel spermatogenik tersebut dapat menurunkan tebal epitel tubulus seminiferus.

### **3.3 Hipotesis Penelitian**

Rumusan hipotesis penelitian adalah sebagai berikut :

1. Pemberian ekstrak biji kedelai menurunkan tebal epitel tubulus seminiferus mencit.
2. Pemberian ekstrak biji kedelai menurunkan jumlah spermatogonium mencit.
3. Pemberian ekstrak biji kedelai menurunkan jumlah spermatosit primer mencit.
4. Pemberian ekstrak biji kedelai menurunkan jumlah spermatid mencit.



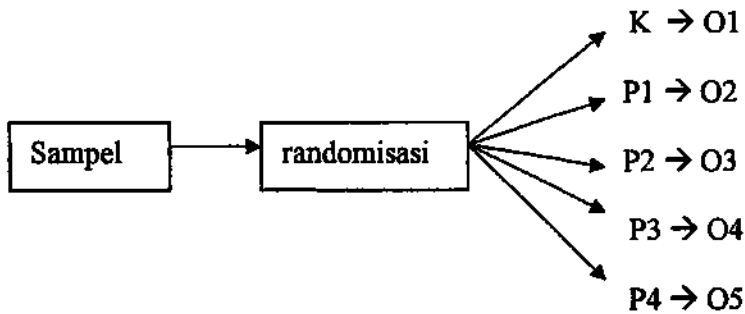
## BAB 4

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental karena unit eksperimen (selain unit kontrol) mendapatkan perlakuan yaitu pemberian ekstrak biji kedelai.

Rancangan yang digunakan adalah *Posttest Only Control Group Design* (Zainuddin; 1998), yaitu subyek penelitian dibagi dalam 5 (lima) kelompok secara random, satu kelompok sebagai kontrol dan kelompok sisanya diberikan ekstrak biji kedelai dengan berbagai konsentrasi. Pengukuran variabel dilakukan pada akhir penelitian. Skema rancangan penelitian yang dipakai:



Keterangan:

K = kelompok kontrol

Diberikan CMC Na<sup>+</sup> 0,5%

P1 = kelompok perlakuan I

Diberikan ekstrak biji kedelai varietas Ijen dosis 9,1 mg/ Kg BB/hari

P2 = kelompok perlakuan II

Diberikan ekstrak biji kedelai varietas Ijen dosis 18,2mg/Kg BB/hari

P3 = kelompok perlakuan III

Diberikan ekstrak biji kedelai varietas Ijen dosis 36,4mg/Kg BB/hari

P4 = kelompok perlakuan IV

Diberikan ekstrak biji kedelai varietas Ijen dosis 72,8mg/Kg BB/hari

Penelitian dilakukan selama 1 siklus spermatogenesis (35 hari).

#### 4.2 Unit Eksperimen dan Replikasi

Unit eksperimen adalah mencit (*Mus musculus*) jantan, umur 7-8 minggu (*sexually mature*), berat sekitar 21-33 gram. Banyak replikasi minimal untuk pengujian hipotesis penelitian ditentukan berdasarkan rumus (Hanafiah; 2003):

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

$$(5-1)(r-1) \geq 15$$

$$r \geq 4,75 \rightarrow \text{dibulatkan menjadi } 5$$

t = banyak kelompok perlakuan

r = jumlah replikasi

Jadi jumlah replikasi minimal perkelompok adalah 5.

Kemungkinan unit eksperimen hilang ( $f$ )  $\pm$  50%, sehingga besar replikasi dikalikan  $1/(1-f)$  (Higgins dan Klimbaum, 1985):

$$1/(1-f) \times 5 = 10$$

Jadi jumlah replikasi 10 ekor perkelompok perlakuan.

### 4.3 Variabel Penelitian

#### 4.3.1 Klasifikasi Variabel

1. Variabel bebas : pemberian biji ekstrak kedelai
2. Variabel tergantung:
  - (1) Tebal epitel tubulus seminiferus
  - (2) Jumlah spermatogonium
  - (3) Jumlah spermatosit primer
  - (4) Jumlah spermatid
3. Variabel kendali
  - (1) Umur mencit
  - (2) Jenis kelamin mencit
  - (3) Berat badan mencit
  - (4) Makanan dan minuman mencit
  - (5) Perawatan dan sanitasi kandang
  - (6) Waktu perlakuan
  - (7) Jaringan testis yang dijadikan bahan penelitian

#### 4.3.2 Definisi Operasional

Variabel-variabel yang digunakan pada penelitian ini dapat didefinisikan sebagai berikut:

1. Ekstrak biji kedelai adalah ekstrak yang dibuat dari biji kedelai (*Glycine max*) varietas Ijen dengan cara ekstraksi maserasi menggunakan pelarut alkohol 96% dengan dosis: 9,1mg/ Kg BB/hari, 18,2mg/Kg BB/hari, 36,4mg/Kg BB/hari, dan 72,8mg/Kg BB/hari.

2. Tebal epitel tubulus seminiferus adalah tebal epitel tubulus seminiferus dari testis kiri yang diukur dengan cara mengukur jarak antara membran basalis sampai ke permukaan lumen tubulus seminiferus menggunakan mikroskop dengan okuler yang mempunyai skala mikrometer dengan pembesaran 100 kali.
3. Jumlah spermatogonium adalah jumlah spermatogonium pada tubulus seminiferus testis kiri stage VII di bawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 400 kali.
4. Jumlah spermatisit primer adalah jumlah spermatisit primer pada tubulus seminiferus testis kiri stage VII di bawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 400 kali.
5. Jumlah spermatid adalah jumlah spermatid pada tubulus seminiferus testis kiri stage VII di bawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 400 kali.
6. Umur mencit adalah umur 7 – 8 minggu (*sexually mature*) yang dihitung mulai hari dilahirkan.
7. Jenis kelamin mencit adalah jantan dengan pengamatan langsung pada mencit.
8. Berat badan mencit adalah berat badan mencit 21 – 33 gram yang diukur menggunakan timbangan dalam satuan gram.
9. Makanan dan minuman mencit adalah makanan, yaitu Pellet CP 511 dan minuman, yaitu aqua yang diberikan pada mencit setiap hari.
10. Perawatan dan sanitasi kandang adalah pembersihan kandang yang dilakukan setiap hari, penggantian sekam dua hari sekali, dan pengaturan suhu, ventilasi, dan kelembaban ruangan.

11. Waktu perlakuan adalah waktu memberikan perlakuan pada hewan coba, yaitu pada jam 08.00 – 09.00 WIB tiap hari selama 35 hari.
12. Jaringan testis yang dijadikan penelitian adalah testis kiri.

#### 4.4 Bahan Penelitian

1. Biji kedelai (*Glycine max*) varietas Ijen kering diekstraksi dengan Ekstraksi Maserasi menggunakan pelarut alkohol 96%: biji kedelai digiling hingga lembut kemudian direndam dengan pelarut alkohol 96% selama 24 jam dan disaring, diulangi sampai 7 kali hingga diperoleh ekstrak biji kedelai encer. Ekstrak biji kedelai encer tersebut dipekatkan dengan alat *Rotary Evaporator* melalui penurunan tekanan pada suhu 40 – 45°C sehingga diperoleh ekstrak biji kedelai (List; 1989 *cit.* Sari; 2001). Pembuatan ekstrak biji kedelai dikerjakan di Laboratorium Farmasi Fakultas Farmasi Unair Surabaya. Bahan biji kedelai didapatkan dari Balai Penelitian Kacang-kacangan dan Umbi-umbian (Balitkabi) Malang, diharapkan biji kedelai tersebut satu varietas yang tidak tercampur dengan varietas lain.
2. Pellet CP 511 dan aqua, serta sekam untuk alas tidur.
3. Ether untuk pembiusan.
4. NaCl fisiologis untuk mencuci testis.
5. Testis kiri mencit.
6. Bahan untuk pembuatan preparat histologis metode paraffin:
  - a. Larutan Buffer formaline untuk fiksasi yang dibuat dari:

Phosphat buffer saline (PBS)	900 cc
Formaldehid 37%	100 cc
  - b. Alkohol 70%, 80%, 90%, 95% dan absolut untuk dehidrasi

- c. Larutan xylol untuk *clearing*
  - d. Parafin cair untuk blok jaringan
  - e. Albumin Meyer yang dibuat dari putih telur dan gliserin 1:1 (Gridley; 1960, Suntoro; 1983)
  - f. Entelan untuk *mounting*
  - g. Kertas tissue
  - h. Kertas label
7. Bahan untuk pewarnaan Hematoxylin-Eosin (Suntoro, 1983):
- a. Larutan xylol
  - b. Larutan alkohol 96%, 89%, 70%, 50%, 30% dan absolute
  - c. Aquadest
  - d. Larutan Hamatoxylin
  - e. Air ledeng
  - f. Larutan Eosin 0,5%
  - g. Canada balsam

#### **4.5 Instrumen Penelitian**

Alat yang digunakan pada penelitian ini dapat dikelompokkan menjadi:

1. Alat untuk pemeliharaan dan perlakuan hewan coba:
  - a. Kandang plastik polypropilen ukuran 20 cm x 15 cm x 15 cm yang ditutup dengan kawat kassa dengan ukuran lubang 6 mm
  - b. Botol minum
  - c. Tempat makan dari aluminium
  - d. Sekam
  - e. Spuit 1 cc yang ujungnya dimodifikasi

2. Alat untuk pembiusan dan pengambilan jaringan testis:
  - a. Toples kecil dan penutupnya dari kaca untuk pembiusan
  - b. Alat fiksasi dan diseksi hewan coba
  - c. Instrumen bedah minor
  - d. Pot kecil dengan tutup plastik untuk fiksasi jaringan
  - e. Kertas label
3. Alat untuk pembuatan preparat histologis metode parafin dengan pewarnaannya:
  - a. Mikrotom putar
  - b. Pot kecil untuk dehidrasi, clearing, dan infiltrasi
  - c. Blok dari timah berbentuk L untuk embedding
  - d. Lampu spiritus
  - e. Water bath
  - f. Pinset
  - g. Gelas obyek dan penutupnya
  - h. Staining jar
  - i. Kran air
4. Alat pengambilan data:
  - a. Mikroskop cahaya binokuler merk Canon Alphaphot Ys yang dilengkapi dengan okuler mikrometer dan kamera
  - b. Counter

#### **4.6 Lokasi dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilakukan di 3 tempat, yaitu Laboratorium Fitokimia Fakultas Farmasi Unair untuk pembuatan ekstrak biji kedelai, Laboratorium Biokimia

Fakultas Kedokteran Unair untuk pemeliharaan dan perlakuan hewan coba serta pengambilan jaringan, dan Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Unair. Waktu penelitian direncanakan pada bulan Oktober sampai dengan Desember 2006.

#### 4.7 Prosedur dan Pengumpulan Data

##### 1. Aklimatisasi

Aklimatisasi hewan coba selama 1 minggu dalam kondisi laboratorium di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Unair. Jika terdapat mencit yang sakit dikeluarkan dari penelitian.

##### 2. Perlakuan hewan coba

Sampel penelitian dibagi secara acak menjadi 5 kelompok, yaitu:

K : Kelompok kontrol yang diberi larutan CMC Na<sup>+</sup> 0,5%

P1 : Kelompok perlakuan yang diberi ekstrak biji kedelai varietas Ijen 9,1mg/Kg BB/hari dalam larutan CMC Na<sup>+</sup> 0,5%

P2 : Kelompok perlakuan yang diberi ekstrak biji kedelai varietas Ijen 18,2mg/Kg BB/hari dalam larutan CMC Na<sup>+</sup> 0,5%

P3 : Kelompok perlakuan yang diberi ekstrak biji kedelai varietas Ijen 36,4mg/Kg BB/hari dalam larutan CMC Na<sup>+</sup> 0,5%

P4 : Kelompok perlakuan yang diberi ekstrak biji kedelai varietas Ijen 72,8mg/Kg BB/hari dalam larutan CMC Na<sup>+</sup> 0,5%

Masing-masing kelompok terdiri dari 10 ekor mencit jantan berumur 7–8 minggu dengan berat badan antara 20–30 gram.

Ekstrak biji kedelai dan larutan CMC Na<sup>+</sup> 0,5% (plasebo) diberikan peroral dengan menggunakan sonde yang dibuat dari spuit dengan ujung



jarum dimodifikasi agar tidak tajam. Ujung jarum diharapkan masuk sampai lambung mencit. Perlakuan diberikan satu kali sehari pada jam 08.00 -- 09.00 selama 35 hari.

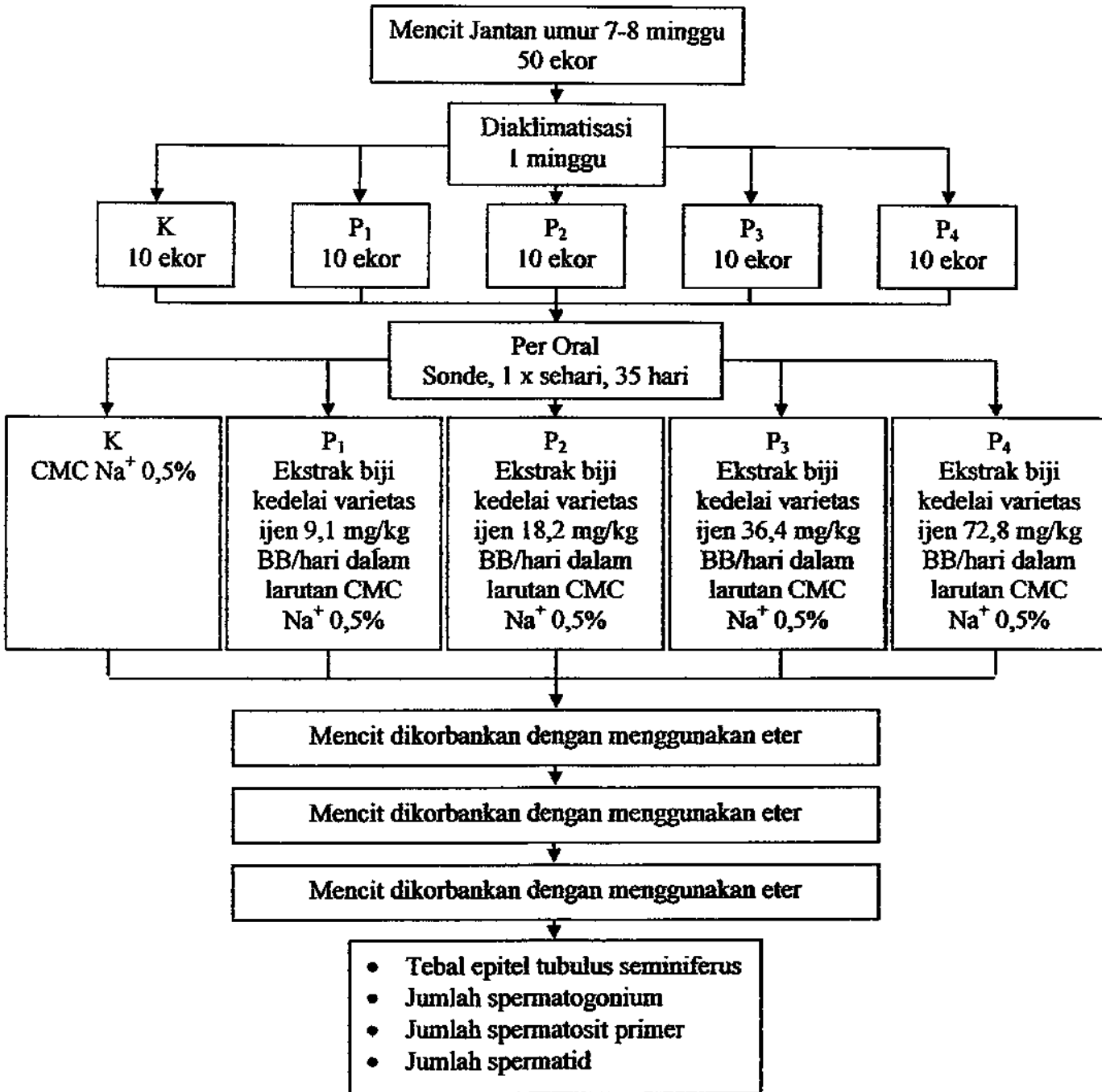
Setelah selesai perlakuan hewan coba dilakukan pembiusan dengan menggunakan ether dan ditunggu sampai mati, selanjutnya diambil jaringan testisnya yang sebelah kiri. Jaringan testis tersebut dibuat sediaan histologis dengan pewarnaan Hematoxylin-Eosin (HE) untuk melihat tebal epitel tubulus seminiferus, jumlah spermatogonium, spermatisit primer, dan spermatid di bawah mikroskop cahaya. Masing-masing testis diperlukan 10 buah potongan melintang tubulus seminiferus yang berada pada stage VII siklus epitel (Davies et al, 1974) karena pada stage VII permukaan lumennya relatif rata sehingga memudahkan pengukuran tebal epitel tubulus seminiferus disamping juga mudah dikenalnya sel pakiten spermatisit primer dan spermatid bulat. Tebal epitel tubulus seminiferus diukur menggunakan okuler mikrometer dengan pembesaran 100 kali. Jumlah spermatogonium, spermatisit primer, dan spermatid dihitung menggunakan mikroskop dengan pembesaran obyektif 400 kali.

#### 4.8 Teknik Analisis Data

Data tebal epitel tubulus seminiferus, spermatogonium, spermatisit primer, dan spermatid diuji normalitasnya terlebih dahulu menggunakan *One-sample Kolmogorov-Smirnov Test*, selanjutnya untuk mengetahui homogenitas data tersebut dilakukan uji *Lavene*. Bila data tersebut berdistribusi normal dan homogen dilakukan analisis menggunakan Anova satu arah dengan tingkat kesalahan sebesar 5%, dilanjutkan dengan uji LSD (Least Significant Difference) (Steel dan Torrie;

1991). Bila data tersebut tidak memenuhi syarat untuk dilakukan analisis menggunakan Anova, maka dilakukan uji *Kruskal-Wallis* yang dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney*.

**4.9 Kerangka Operasional**



**BAB 5****ANALISIS HASIL PENELITIAN****5.1 Data Penelitian**

Penelitian ini dilakukan pada mencit (*Mus musculus*) sebanyak 50 ekor yang terbagi dalam 5 kelompok perlakuan sehingga masing-masing kelompok terdiri dari 10 ekor. Perlakuan diberikan selama 35 hari dan selama perlakuan 4 ekor mencit mati sehingga pada akhir penelitian tinggal 46 ekor. Data yang didapat dari hasil penelitian meliputi: tebal epitel tubulus seminiferus, jumlah spermatogonium, jumlah spermatosit primer, dan jumlah spermatid.

#### 5.1.1 Pengaruh pemberian ekstrak biji kedelai terhadap tebal epitel tubulus seminiferus

Rerata tebal epitel tubulus seminiferus ( $\mu\text{m}$ ) antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan mengalami penurunan, namun tidak menunjukkan adanya hubungan *dose-response* (tabel 5.1).

Tabel 5.1 Rerata $\pm$ simpangan baku tebal epitel tubulus seminiferus mencit ( $\mu\text{m}$ ) setelah perlakuan 35 hari.

Perlakuan	Ulangan	Rerata $\pm$ Simpangan baku
K	9	49,00 <sup>a</sup> $\pm$ 4,29
P1	9	47,11 <sup>a</sup> $\pm$ 4,73
P2	10	43,63 <sup>bc</sup> $\pm$ 3,61
P3	9	41,56 <sup>b</sup> $\pm$ 4,59
P4	9	45,74 <sup>bc</sup> $\pm$ 3,99

*Superscript yang sama tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna*

#### 5.1.2 Pengaruh pemberian ekstrak biji kedelai terhadap jumlah spermatogonium

Rerata jumlah spermatogonium antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan mengalami penurunan, dan semakin tinggi dosis ekstrak biji kedelai yang diberikan jumlah spermatogonium semakin sedikit (tabel 5.2).

Tabel 5.2 Rerata±simpangan baku jumlah spermatogonium mencit setelah perlakuan selama 35 hari.

Perlakuan	Ulangan	Rerata±Simpangan baku
K	9	50,89 <sup>a</sup> ±1,08
P1	9	48,81 <sup>b</sup> ±0,08
P2	10	45,83 <sup>c</sup> ±1,17
P3	9	39,37 <sup>d</sup> ±1,31
P4	9	36,52 <sup>e</sup> ±0,60

*Superscript yang sama tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna*

### 5.1.3 Pengaruh pemberian ekstrak biji kedelai terhadap jumlah spermatosit primer

Rerata jumlah spermatosit primer antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan menunjukkan penurunan, dan menunjukkan adanya hubungan *dose-response*, yaitu semakin besar dosis ekstrak biji kedelai yang diberikan, maka jumlah spermatosit primer semakin sedikit (tabel 5.3).

Tabel 5.3 Rerata±simpangan baku jumlah spermatosit primer mencit setelah perlakuan selama 35 hari.

Perlakuan	Ulangan	Rerata±Simpangan baku
K	9	48,30 <sup>a</sup> ±0,63
P1	9	47,07 <sup>b</sup> ±0,32
P2	10	45,03 <sup>c</sup> ±0,66
P3	9	37,04 <sup>d</sup> ±0,59
P4	9	35,74 <sup>e</sup> ±0,40

*Superscript yang sama tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna*

### 5.1.4 Pengaruh pemberian ekstrak biji kedelai terhadap jumlah spermatid

Rerata jumlah spermatid antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan mengalami penurunan, menunjukkan bahwa semakin tinggi dosis ekstrak biji kedelai yang diberikan semakin menurun jumlah spermatidnya (tabel 5.4).

Tabel 5.4 Rerata±simpangan baku jumlah spermatid mencit setelah perlakuan selama 35 hari.

Perlakuan	Ulangan	Rerata±Simpangan baku
K	9	150,81 <sup>a</sup> ±2,30
P1	9	150,70 <sup>a</sup> ±2,06
P2	10	144,27 <sup>b</sup> ±3,36
P3	9	134,59 <sup>c</sup> ±1,82
P4	9	130,19 <sup>d</sup> ±3,53

*Superscript yang sama tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna*

## 5.2 Analisis dan Hasil Penelitian

Data tebal epitel tubulus seminiferus, jumlah spermatogonium, jumlah spermatis primer, dan jumlah spermatid dilakukan uji normalitas data dengan One-sample Kolmogorov-Smirnov test. Dari uji normalitas data tebal epitel tubulus seminiferus, jumlah spermatogonium, dan jumlah spermatid didapatkan  $p > 0,05$ , maka dapat disimpulkan bahwa data tersebut berdistribusi normal, sedang untuk data jumlah spermatis primer didapatkan  $p < 0,05$ , maka dapat disimpulkan bahwa data tersebut tidak berdistribusi normal (lampiran 11).

Untuk mengetahui homogenitas data-data tersebut dilakukan uji homogenitas menggunakan uji *Lavene*. Hasil uji homogenitas didapatkan  $p > 0,05$  untuk semua data (tebal epitel tubulus seminiferus, jumlah spermatogonium, spermatis primer, dan jumlah spermatid), yang berarti bahwa semua data tersebut homogen.

Untuk mengetahui perbedaan antar kelompok untuk data tebal epitel tubulus seminiferus, jumlah spermatogonium, dan jumlah spermatid dilakukan uji analisis varian (Anova) yang dilanjutkan dengan *Least Significant Different* (LSD) karena data tersebut berdistribusi normal. Sedang data jumlah spermatis primer dilakukan uji *Kruskal-Wallis* yang dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney* karena data tersebut tidak berdistribusi normal.

### 5.2.1 Pengaruh pemberian ekstrak biji kedelai terhadap tebal epitel tubulus seminiferus

Hasil uji Anova untuk tebal epitel tubulus seminiferus didapatkan  $p = 0,006$ , yang berarti terdapat perbedaan yang bermakna di antara kelompok perlakuan (tabel 5.5).

Tabel 5.5 Rangkuman Anova tebal epitel tubulus seminiferus mencit ( $\mu\text{m}$ ) setelah perlakuan 35 hari.

	Sum of squares	Df	Mean squares	F	Sig.
Between Groups	308,222	4	77,056	4,274	0,006
Within Groups	739,162	41	18,028		
Total	1047,384	45			

Untuk mengetahui kelompok yang berbeda, dilanjutkan dengan uji LSD dengan hasil tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan pemberian ekstrak biji kedelai dosis 9,1mg/KgBB/hari dan dosis 18,2mg/KgBB/hari, sedang antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan pemberian ekstrak biji kedelai dosis 18,2mg/KgBB/hari dan dosis 36,4mg/KgBB/hari terdapat perbedaan yang bermakna. Tidak terdapat perbedaan bermakna antara kelompok perlakuan pemberian ekstrak biji kedelai dosis 9,1mg/KgBB/hari dengan dosis 18,2mg/KgBB/hari dan dosis 72,8mg/KgBB/hari, sedang antara kelompok perlakuan pemberian ekstrak biji kedelai dosis 9,1mg/KgBB/hari dan dosis 36,4mg/KgBB/hari terdapat perbedaan yang bermakna. Tidak terdapat perbedaan bermakna antara kelompok perlakuan pemberian ekstrak biji kedelai dosis 18,2mg/KgBB/hari dengan dosis 9,1mg/KgBB/hari, dosis 36,4mg/KgBB/hari dan dosis 72,8mg/KgBB/hari. Terdapat perbedaan bermakna antara kelompok perlakuan pemberian ekstrak biji kedelai dosis 36,4mg/KgBB/hari dengan dosis 9,1mg/KgBB/hari dan dosis 72,8mg/KgBB/hari, sedang dengan dosis 36,4mg/KgBB/hari tidak terdapat perbedaan yang bermakna, dan tidak ada perbedaan bermakna antara kelompok perlakuan pemberian ekstrak biji kedelai dosis 72,8mg/KgBB/hari dan dosis 9,1mg/KgBB/hari dan dosis 18,2mg/KgBB/hari, sedang dengan dosis 36,4mg/KgBB/hari terdapat perbedaan yang bermakna (lampiran 11).

### 5.2.2 Pengaruh pemberian ekstrak biji kedelai terhadap jumlah spermatogonium

Hasil uji Anova didapatkan  $p=0,000$ , yang berarti terdapat perbedaan yang bermakna di antara kelompok-kelompok tersebut (tabel 5.6).

Tabel 5.6 Rangkuman Anova jumlah spermatogonium mencit setelah perlakuan 35 hari.

	Sum of squares	Df	Mean squares	F	Sig.
Between Groups	1361,342	4	340,336	322,147	0,000
Within Groups	43,315	41	1,056		
Total	1404,657	45			

Untuk mengetahui kelompok yang berbeda, dilanjutkan dengan uji LSD dengan hasil menunjukkan bahwa terdapat perbedaan bermakna antara kelompok kontrol dan semua kelompok perlakuan, demikian juga di antara kelompok satu dengan kelompok yang lain. Hasil uji LSD untuk jumlah spermatogonium selengkapnya dapat dilihat pada lampiran 11.

### 5.2.3 Pengaruh pemberian ekstrak biji kedelai terhadap jumlah spermatis primer

Untuk mengetahui adanya perbedaan di antara kelompok perlakuan dilakukan uji statistik *Kruskal-Wallis* karena data tidak berdistribusi normal.

Hasil uji *Kruskal-Wallis* didapatkan  $p=0,000$ , yang berarti terdapat perbedaan yang bermakna di antara kelompok-kelompok tersebut (tabel 5.7).

Tabel 5.7 Rangkuman uji *Kruskal-Wallis* jumlah spermatis primer mencit setelah perlakuan 35 hari.

	Jumlah spermatis primer
Chi-Square	42,733
df	4
Asymp. Sig.	0,000

Untuk mengetahui kelompok yang berbeda, dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney*. Hasil uji *Mann-Whitney* antar kelompok membuktikan ada perbedaan bermakna di antara semua kelompok, baik kelompok kontrol maupun kelompok



perlakuan, dan semakin tinggi dosis semakin sedikit jumlah spermatis primer (lampiran 11).

#### 5.2.4 Pengaruh pemberian ekstrak biji kedelai terhadap jumlah spermatid

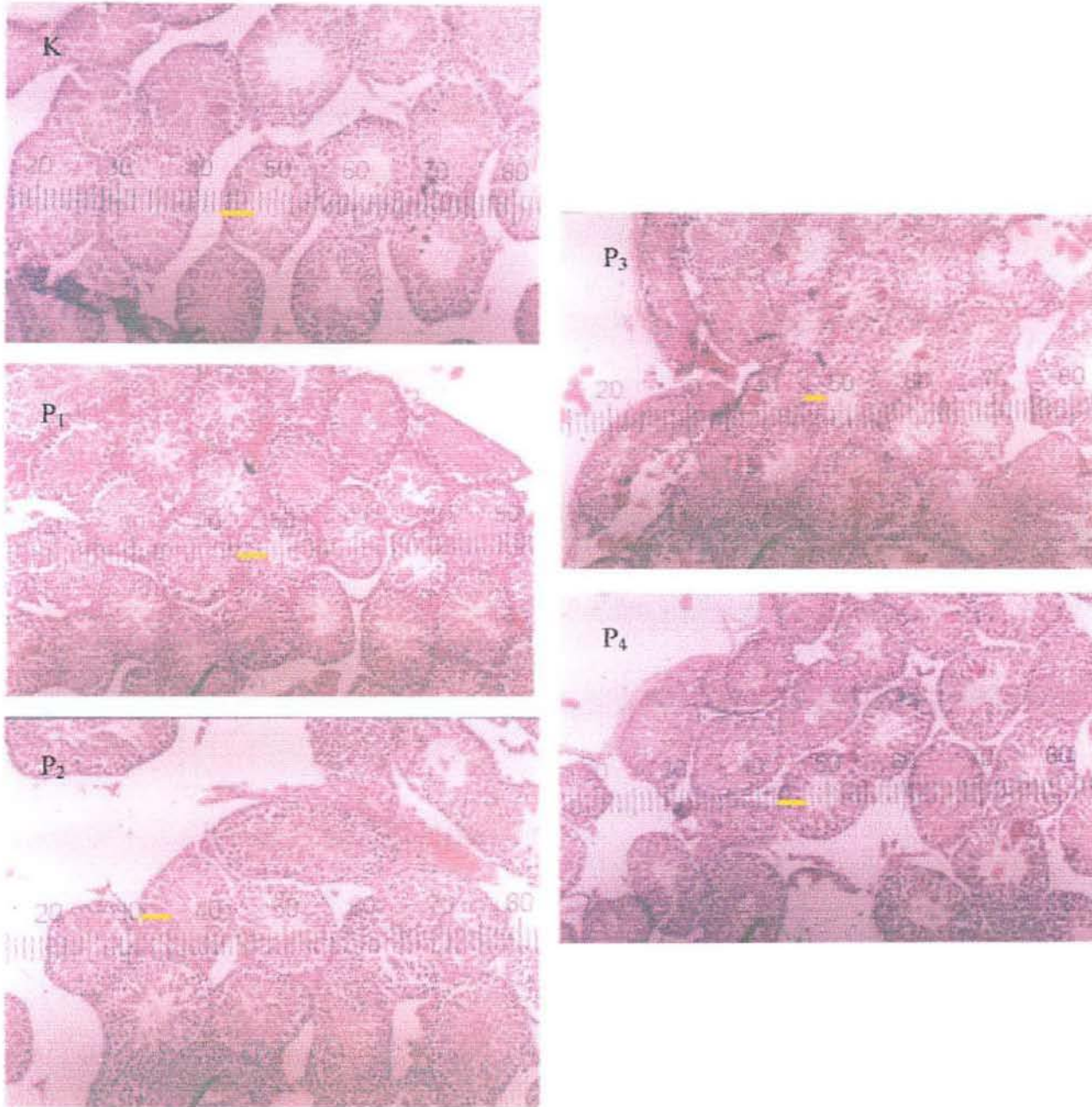
Hasil uji Anova didapatkan  $p=0,000$ , yang berarti terdapat perbedaan yang bermakna di antara kelompok-kelompok tersebut (tabel 5.8).

Tabel 5.8 Rangkuman Anova jumlah spermatid mencit setelah perlakuan 35 hari.

	Sum of squares	Df	Mean squares	F	Sig.
Between Groups	3181,443	4	795,361	107,172	0,000
Within Groups	304,277	41	7,421		
Total	3485,720	45			


Untuk mengetahui kelompok yang berbeda, dilanjutkan dengan uji LSD dengan hasil membuktikan bahwa tidak terdapat perbedaan bermakna antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan pemberian ekstrak biji kedelai dengan dosis 9,1mg/KgBB/hari sedang dengan dosis 18,2mg/KgBB/hari, dosis 36,4mg/KgBB/hari, dan dosis 72,8mg/KgBB/hari terdapat perbedaan yang bermakna, dan terdapat perbedaan yang bermakna antar masing-masing kelompok perlakuan (lampiran 11).

Gambar di bawah memperlihatkan gambaran histologis tubulus seminiferus mencit kelompok kontrol dan kelompok perlakuan

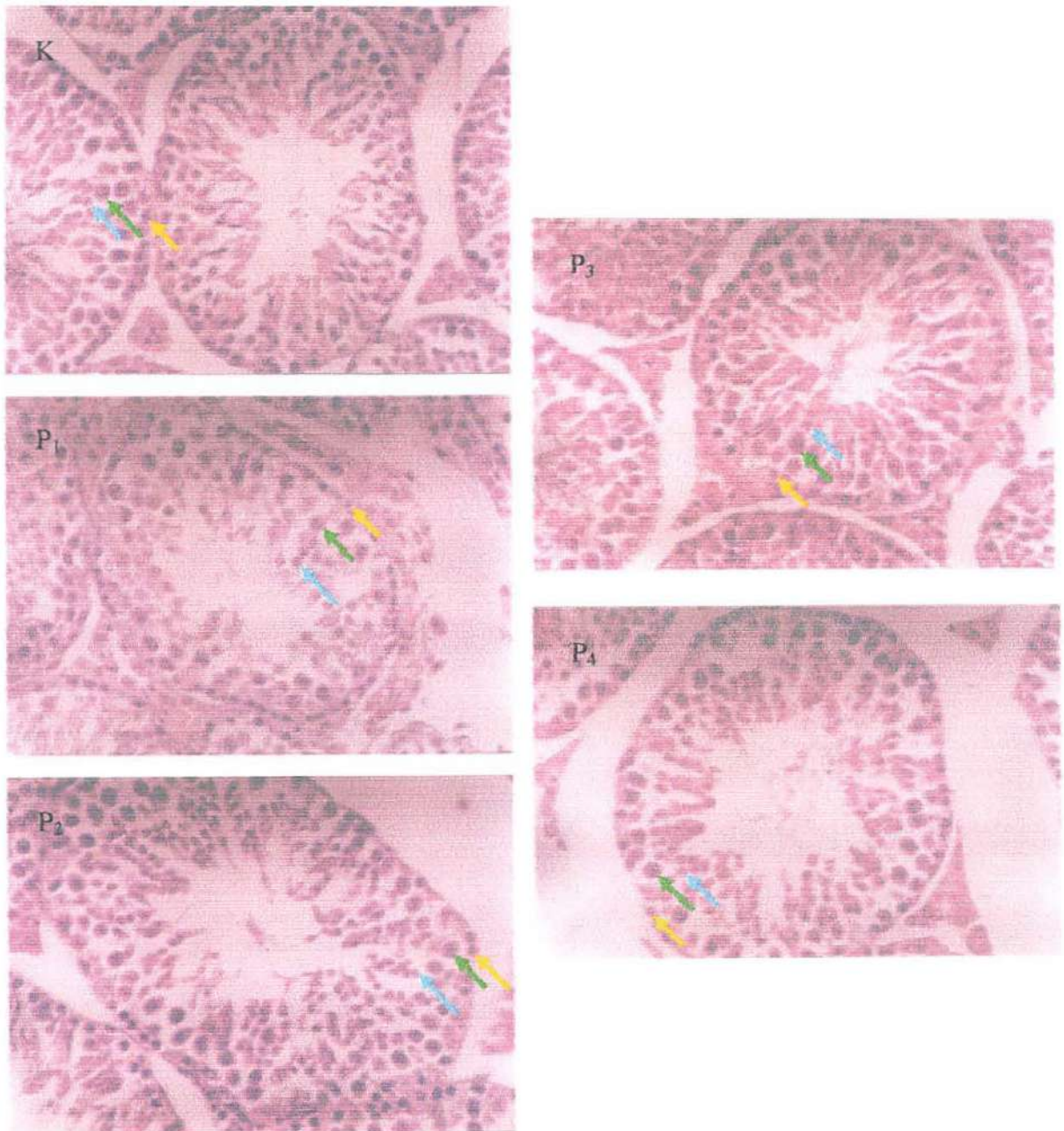


Gambar 5.1 Gambar histologis tubulus seminiferus mencit kelompok kontrol dan kelompok perlakuan dengan pembesaran 100 kali

Keterangan :

 : Tebal epitel tubulus seminiferus

Gambar di bawah memperlihatkan gambaran histologis tubulus seminiferus mencit kelompok kontrol dan kelompok perlakuan



Gambar 5.2 Gambar histologis tubulus seminiferus mencit kelompok kontrol dan kelompok perlakuan dengan pembesaran 400 kali

Keterangan :

- : Spermatogonium
- : Spermatisit
- : Spermatid

## BAB 6

### PEMBAHASAN

Kedelai merupakan salah satu sumber fitoestrogen yang dapat menyebabkan efek estrogenik dan dapat menyebabkan umpan balik negatif sekresi gonadotropin. Menurut O'Donnell *et al* (2001) komponen utama umpan balik negatif sekresi gonadotropin adalah testosteron yang mengalami aromatisasi menjadi estrogen. Peningkatan estrogen plasma dapat menyebabkan penurunan FSH dan LH dalam sirkulasi yang mengakibatkan penurunan kadar testosteron plasma dan testis, selanjutnya menurunkan spermatogenesis.

Hasil penelitian H. Mitchell *et al* (2001) membuktikan bahwa tikus jantan neonatal yang dipapar genistein (salah satu bagian dari kelompok fitoestrogen) terjadi penurunan sekresi LH dan konsentrasi testosteron plasma pada umur dewasa, sedang paparan genistein pada tikus dewasa menyebabkan penurunan konsentrasi testosteron serum dan testis, serta penurunan LH pituitari dan berat prostat.

Atanassova *et al* (1999) membuktikan bahwa pemberian genistein 4 mg/kgBB/hari subkutan pada tikus jantan PND (*Post Natal Day*) antara 2-18 secara bermakna meningkatkan apoptosis sel benih, mengurangi berat testis, FSH plasma dan perbandingan (rasio) volume spermatosit/sel Sertoli pada PND 18, tidak ada efek pada konsentrasi inhibin B dan volume inti sel Sertoli yang diamati. Hal ini dapat mempengaruhi jumlah sel spermatogenik yang selanjutnya mempengaruhi gambaran tubulus seminiferus.

Penelitian ini difokuskan pada pengaruh pemberian ekstrak biji kedelai terhadap gambaran mikroskopik tubulus seminiferus dan sel spermatogenik.

Pengamatan dilakukan terhadap preparat permanen jaringan testis mencit yang diwarnai dengan HE (Hematoxylin Eosin). Penelitian dilakukan pada satu kelompok kontrol dan empat kelompok perlakuan dengan pemberian ekstrak biji kedelai dengan berbagai dosis dalam waktu 35 hari, yaitu satu siklus spermatogenesis mencit.

#### 6.1 Pengaruh Pemberian Ekstrak Biji Kedelai terhadap Tebal Epitel Tubulus Seminiferus

Hasil uji statistik membuktikan bahwa tebal epitel tubulus seminiferus menurun secara bermakna pada pemberian ekstrak biji kedelai dosis 18,2mg/KgBB dan 36,4mg/KgBB dibanding dengan kelompok kontrol, sedang pada dosis 9,1mg/KgBB dan 72,8mg/KgBB tidak terbukti terjadi penurunan yang bermakna. Namun secara deskriptif semua kelompok perlakuan menunjukkan penurunan tebal epitel tubulus seminiferus dibandingkan dengan kontrol.

Epitel tubulus seminiferus terdiri dari sel spermatogenik dan sel Sertoli (Bloom dan Fawcett, 1994). Apabila terjadi penurunan jumlah atau volume sel-sel tersebut akan terjadi penurunan tebal epitel tubulus seminiferus. Sel Sertoli menempati 35%-40% epitel tubulus seminiferus (Niesshlag and Behre, 1997). Sel Sertoli merupakan sel kolumnar panjang, bagian dasarnya terletak di atas lamina basalis tubulus seminiferus. Bentuk sel Sertoli tidak teratur, memiliki cekungan sebagai tempat perlekatan sel spermatogenik. Ujung atas sel Sertoli ditempati oleh spermatozoa (Bloom dan Fawcett, 1994).

Kedelai merupakan salah satu sumber fitoestrogen yang dapat menimbulkan efek estrogenik di dalam tubuh bila dikonsumsi (Hughes *et al*, 2002). Telah diketahui pada penelitian terdahulu bahwa tikus jantan yang diberi makanan berisi kedelai (600 mg isoflavon/Kg) pada PND (*Post Natal Day*) 50

selama 5 minggu menunjukkan penurunan berat badan, prostat, kadar testosteron dan androstenedion plasma dibandingkan dengan tikus jantan yang diberi makanan tidak mengandung isoflavon (Weber *et al*, 2001 *cit* Hughest *et al*, 2002). H. Mitchell *et al* (2001) melaporkan bahwa tikus jantan dewasa yang dipapar genistein terjadi penurunan konsentrasi testosteron serum dan testis, serta penurunan LH pituitari dan berat prostat. FSH, LH, dan hormon testosteron diperlukan pada proses spermatogenesis baik secara kuantitatif maupun kualitatif (Wuryantari dan Moeloek, 2000), sehingga penurunan ketiga hormon tersebut dapat menurunkan spermatogenesis. Pada spermatogenesis terjadi proliferasi mitotik dan diferensiasi spermatogonia menjadi spermatosit, dan pembelahan meiotik spermatosit menjadi spermatid yang bersifat haploid (Clermont, 1972; Bloom dan Fawcett, 1994; Niederberger dan Lamb, 1997). Penurunan spermatogenesis mengakibatkan penurunan jumlah sel spermatogenik sehingga dapat menurunkan tebal epitel tubulus seminiferus.

Efek estrogenik yang ditimbulkan oleh fitoestrogen dapat melalui ikatan langsung dengan reseptor estrogen atau tidak langsung dengan meningkatkan konsentrasi estrogen endogen. Fitoestrogen dapat berikatan dengan *sex hormon binding globulin* (SHGB) pada manusia atau  $\alpha$ -fetoprotein (AFP) pada tikus sehingga mengurangi jumlah estrogen dan atau androgen yang berikatan dengan protein tersebut, dengan demikian meningkatkan jumlah hormon tersebut dalam keadaan bebas (Hughest *et al*, 2002).

Fitoestrogen telah menunjukkan menghambat *17 $\beta$ -hydroxysteroid oxidoreductases* (17 $\beta$ -HSOR) I dan II, merupakan enzim kunci dalam biosintesis dan metabolisme estrogen. 17 $\beta$ -HSOR I mengubah estron menjadi estradiol dan 17 $\beta$ -HSOR II sebaliknya, yaitu estradiol menjadi estron. Fitoestrogen selektif

dalam menghambat hormon tersebut, tergantung struktur fitoestrogen, sehingga bila yang dihambat  $17\beta$ -HSOR I menimbulkan efek antiestrogenik dan bila yang dihambat  $17\beta$ -HSOR II memberikan efek estrogenik (Hughes *et al*, 2002).

Fitoestrogen dapat merangsang produksi estrogen endogen. Efek estrogenik isoflavon melalui rangsangan sistem saraf pusat oleh GnRH hipotalamus dan selanjutnya produksi estrogen endogen diperantarai oleh gonadotropin yang dilepaskan oleh pituitari (Ashby *et al*, 2000 cit Hughes *et al*, 2002).

Pada tabel 5.2, tabel 5.3, dan tabel 5.4 menunjukkan bahwa ekstrak biji kedelai dapat menurunkan sel spermatogenik secara bermakna, sedang pada pengamatan tebal epitel tubulus seminiferus pada dosis 72,8mg/KgBB tidak menunjukkan penurunan bermakna dibanding kontrol. Hal ini dapat disebabkan tidak diamatinya jumlah sel Sertoli.

Fitoestrogen dapat merangsang dan menghambat proliferasi sel tergantung estrogen sesuai dosis pemberian. Dari penelitian yang dilakukan oleh Miodini *et al* (1999) menunjukkan bahwa fitoestrogen 0,1-10 $\mu$ M merangsang proliferasi sel, sedangkan fitoestrogen dengan konsentrasi >10 $\mu$ M menghambat proliferasi sel.

## 6.2 Pengaruh Pemberian Ekstrak Biji Kedelai terhadap Jumlah Spermatogonium

Hasil uji statistik membuktikan bahwa jumlah spermatogonium turun secara bermakna pada semua kelompok perlakuan dibanding dengan kelompok kontrol, dan semakin tinggi dosis ekstrak biji kedelai semakin kecil jumlah spermatogonium.

Telah dijelaskan sebelumnya bahwa konsumsi kedelai, salah satu sumber fitoestrogen, dapat memberikan efek estrogenik di dalam tubuh. Telah dijelaskan pula bahwa komponen utama umpan balik negatif sekresi gonadotropin adalah testosteron yang mengalami aromatisasi menjadi estrogen, sehingga dengan

peningkatan estrogen dapat terjadi penurunan FSH dan LH yang mengakibatkan penurunan testosteron dan selanjutnya menurunkan spermatogenesis.

Spermatogenesis adalah proses produksi dan maturasi sel gamet jantan yang berkembang secara progresif dari daerah basal tubulus seminiferus ke arah lumen (Wuryantari dan Moeloek, 2000). Spermatogenesis dimulai dengan pembelahan dan diferensiasi spermatogonium  $A_{dark}$  menjadi sepasang spermatogonium  $A_{dark}$  yang baru. Salah satu spermatogonium  $A_{dark}$  membelah dan berdiferensiasi menjadi sepasang spermatogonium B. Spermatogonium B aktif bermitosis membentuk spermatosit primer (Guyton and Hall, 2000).

Penurunan jumlah spermatogonium pada penelitian ini dapat disimpulkan bahwa ekstrak biji kedelai mengandung suatu senyawa yang dapat memberikan efek estrogenik sehingga memberikan umpan balik negatif terhadap sekresi testosteron yang selanjutnya menurunkan spermatogenesis. Umpan balik negatif tersebut dapat pada tingkat hipofisis yaitu dengan menurunkan sekresi LH dan dapat pada tingkat hipotalamus dengan menurunkan sekresi GnRH yang selanjutnya menurunkan sekresi LH.

Kedelai yang merupakan sumber fitoestrogen juga dimungkinkan dapat menurunkan FSH. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan Atanassova *et al* (1999) membuktikan bahwa pemberian genistein 4 mg/kgBB/hari subkutan pada tikus jantan PND (*Post Natal Day*) antara 2-18 secara bermakna meningkatkan apoptosis sel benih, mengurangi berat testis, serta FSH plasma.

Penurunan FSH dapat juga terjadi pada tingkat hipofisis dan dapat pula pada tingkat hipotalamus melalui penurunan GnRH. Nieschlag dan Behre (1997) menyatakan bahwa estrogen menekan sekresi gonadotropin dengan penurunan puncak amplitudo LH dan FSH pada tingkat pituitari.



LH dan FSH diperlukan untuk kualitas dan kuantitas spermatogenesis normal. Aksi LH terjadi melalui testosteron, suatu hormon penting dalam inisiasi spermatogenesis, sedang FSH penting terutama dalam mempertahankan produksi sperma normal (Weinbauer and Nieschlag, 1993; 1996a *cit* Nieschlag and Behre, 1997). Efek FSH bergantung pada peningkatan konsentrasi cAMP dan dikendalikan oleh *phosphatase*, *phosphodiesterase*, dan *kinase inhibitor*. Pada tikus FSH merangsang sekresi *insulin-like growth factor (IGF) binding protein 3*, *lactate*, *mullerian inhibiting substace*, androgen binding protein, inhibin, transferin, plasminogen activator, dan testibumin, serta menginduksi beberapa protein intraseluler atau kejadian metabolik, meliputi aktivitas enzimatik, sintesis perantara metabolik, stimulasi protoonkogen, dan mensintesis pengatur fungsi sel Leydig (Griswold, 1993 *cit* Nieschlag and Behre, 1997). Efek biologis FSH pada manusia hanya dapat diasumsikan dari analogi dengan model hewan coba.

FSH mengontrol spermatogenesis melalui sel Sertoli (Nieschlag and Behre, 1997). FSH mempertahankan konsentrasi hormon androgen pada tubulus seminiferus. FSH juga menyebabkan mekanisme pengangkutan sehingga hormon androgen dapat mencapai sel spermatogenik untuk tumbuh dan merangsang pematangan sel-sel tersebut (Guyton dan Hall, 2000).

Sebagaimana dijelaskan sebelumnya, fitoestrogen dapat merangsang dan menghambat proliferasi sel tergantung estrogen. Fitoestrogen dengan konsentrasi 0,1-10 $\mu$ M merangsang proliferasi sel, sedangkan fitoestrogen >10 $\mu$ M menghambat proliferasi sel (Miodini *et al*, 1999 *cit* Hughest *et al*, 2002).

### 6.3 Pengaruh Pemberian Ekstrak Biji Kedelai terhadap Jumlah Spermatisit Primer

Hasil uji statistik menunjukkan bahwa jumlah spermatisit primer turun secara bermakna pada semua kelompok perlakuan dibanding dengan kelompok

kontrol, dan semakin tinggi dosis ekstrak biji kedelai semakin sedikit jumlah spermatosit primer.

Spermatosit primer merupakan hasil pembelahan mitotik spermatogonium B, dengan demikian kromosom spermatosit primer diploid. spermatosit primer mengalami meiosis I menjadi spermatosit sekunder, kemudian pada meiosis II spermatosit sekunder dibagi menjadi spermatid (Guyton dan Hall, 2000). Pada tahap awal pembagian meiosis I, semua DNA di dalam 46 kromosom bereplikasi, kemudian masing-masing kromosom berpisah menjadi dua kromatid yang tetap berikatan bersama pada sentromer. Selanjutnya, spermatosit primer terbagi menjadi dua spermatosit sekunder, sehingga masing-masing 23 kromosom. Pada meiosis II, masing-masing spermatosit sekunder berpisah menjadi dua spermatid dengan 23 kromosom (Seeley *et al*, 1998; Guyton dan Hall,2000).

Pada pembahasan sebelumnya telah disebutkan bahwa ekstrak biji kedelai dapat menurunkan jumlah spermatogonium. Semakin besar dosis yang diberikan semakin besar penurunan. Gambaran ini sama dengan gambaran pada jumlah spermatosit primer. Hal ini disebabkan ada hubungan langsung antara spermatogonium dengan spermatosit primer. Spermatosit primer merupakan hasil pembelahan spermatogonium maka penurunan jumlah spermatogonium menyebabkan penurunan jumlah spermatosit primer.

Pengaruh ekstrak biji kedelai terhadap penurunan jumlah spermatosit primer dapat juga disebabkan gangguan pada proses pembelahan spermatogonium menjadi spermatosit primer, yaitu melalui proses penurunan kadar testosteron. Davies *et al* (1974) mengatakan bahwa di dalam tubulus seminiferus, testosteron diperlukan untuk proliferasi dan diferensiasi sel spermatogenik. Penurunan testosteron pada tubulus seminiferus dapat melalui penurunan LH yang

menyebabkan produksi dan sekresi testosteron menurun dan dapat dengan penurunan FSH yang mengakibatkan penurunan sintesis ABP (*Androgen Binding Protein*) oleh sel Sertoli sehingga pengangkutan testosteron ke tubulus seminiferus berkurang.

Penurunan jumlah spermatosit primer setelah pemberian ekstrak kedelai dapat terjadi karena proses apoptosis pada sel tersebut. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan Atanassova *et al* (1999) yang membuktikan bahwa pemberian genistein 4 mg/KgBB/hari subkutan pada tikus jantan PND antara 2-18 secara bermakna meningkatkan apoptosis sel benih.

#### 6.4 Pengaruh Pemberian Ekstrak Biji Kedelai terhadap Jumlah Spermatid

Rerata jumlah spermatid kelompok kontrol dibanding kelompok perlakuan terbukti terjadi penurunan, dan semakin tinggi dosis ekstrak biji kedelai yang diberikan rerata jumlah spermatid semakin turun.

Dari hasil statistik dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan bermakna jumlah spermatid antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan, dan terjadi penurunan yang bermakna pada dosis 18,2 mg/KgBB ke atas.

Spermatid merupakan hasil pembelahan meiosis dari spermatosit sekunder yang memiliki 23 kromosom (haploid). Spermatid selanjutnya mengalami spermiogenesis menjadi spermatozoa (Guyton dan Hall, 2000).

Bila ditinjau secara deskriptif maka gambaran rerata jumlah spermatid sama dengan gambaran jumlah spermatogonium dan jumlah spermatosit primer, yaitu ekstrak biji kedelai menurunkan jumlah sel-sel tersebut dan semakin besar dosis ekstrak biji kedelai semakin besar penurunan. Hal ini dimungkinkan hubungan langsung antara sel-sel tersebut, yaitu bila jumlah spermatosit primer

menurun maka jumlah spermatid juga menurun karena spermatid merupakan hasil pembelahan meiosis dari spermatosit.

Penurunan jumlah spermatosit primer setelah pemberian ekstrak biji kedelai secara umum dapat melalui mekanisme yang sama, yaitu melalui penurunan hormon testosteron sehingga dapat mengganggu proliferasi dan diferensiasi sel spermatogenik baik melalui penurunan LH maupun penurunan FSH. Testosteron diperlukan untuk perkembangan spermatosit menjadi spermatid, serta proliferasi dan diferensiasi sel spermatogenik (Muchtarmah, 1999). Ekspresi maksimal reseptor androgen bersamaan dengan maturasi spermatid, yaitu pada langkah 19 pada tahap VII (Nieschlag and Behre, 1997).

Sebagaimana telah dijelaskan sebelumnya bahwa penurunan jumlah spermatid dapat juga karena apoptosis terhadap sel tersebut karena paparan ekstrak biji kedelai sesuai dengan penelitian Atanassova *et al* (1999) yang membuktikan bahwa pemberian genistein 4 mg/KgBB/hari subkutan pada tikus jantan pada antara PND 2-18 secara nyata meningkatkan apoptosis sel benih.

## **BAB 7**

### **PENUTUP**

#### **7.1 Simpulan**

1. Pemberian ekstrak biji kedelai menurunkan tebal epitel tubulus seminiferus pada dosis 18,2 mg/KgBB/hari dan 36,4 mg/KgBB/hari.
2. Pemberian ekstrak biji kedelai menurunkan jumlah spermatogonium pada semua kelompok perlakuan dan menunjukkan hubungan *dose-response*.
3. Pemberian ekstrak biji kedelai menurunkan jumlah spermatosit primer pada semua kelompok perlakuan dan menunjukkan hubungan *dose-response*.
4. Pemberian ekstrak biji kedelai menurunkan jumlah spermatid pada dosis 18,2 mg/KgBB/hari, 36,4 mg/KgBB/hari, dan 72,8 mg/KgBB/hari dan menunjukkan hubungan *dose-response*.

#### **7.2 Saran**

1. Perlu penelitian lebih lanjut tentang pemberian ekstrak biji kedelai terhadap gambaran mikroskopik tubulus seminiferus dan jumlah sel spermatogenik dengan variasi waktu dan waktu lebih lama serta jumlah replikasi lebih banyak
2. Perlu penelitian lebih lanjut tentang pemberian ekstrak biji kedelai terhadap analisis sperma.

**DAFTAR PUSTAKA**

- Bagian Farmakologi FK UI, 1995. **Farmakologi dan Terapi**. Edisi 4. Jakarta.
- Bloom dan Fawcett, 1994. **A Textbook of Histology 12<sup>th</sup> Ed.** USA: Chapman & Hall.
- Clermont Y, 1972. Kinetics of Spermatogenesis in Mammals: Seminiferous Epithelium Cycle and Spermatogonial Renewal. **Physiol Rev** 52 (1): 198-236.
- Copenhover WM, DE Kelly, dan RL Wood, 1978. **Bailey's Textbook of Histology 17<sup>th</sup> Ed.** Baltimore: The Williams & Wilkins Comp.
- Cummings B, 2004. **Pearson Education**.
- Davies AG, M Courot, P Greshman, 1974. Effects of Testosterone and Follicle-Stimulating Hormone on Spermatogenesis in Adult Mice during Treatment with Oestradiol. **J Endocrinal** 60: 37-45.
- Dellman HD and EM Brown, 1992. **Buku Teks Histologi Veteriner**. Vol II. Terjemahan Hartono. Jakarta. UI-Press.
- Franson RD, 1992. **Anatomi dan Fisiologi Ternak**. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Ganong, WF. 1993. **Review of Medical Physiology**. 16<sup>th</sup> Ed. Prentice Hall Inc. New Jersey.
- Gridley MF, 1960. **Manual of Histologic and Special Staining Technics 2<sup>nd</sup> Ed.** USA: Mc Graw-Hill Book Company Inc.
- Guyton AC dan JE Hall, 1997. **Textbook of Medical Physiology 9<sup>th</sup> Ed.** Tokyo: WB Saunders Company.
- Hadley, EM. 1992. **Endocrinology**. Willey Eastern Private Ltd. New Delhi.
- H. Mitchell J, E Cawood, D Kinniburgh, A Provan, AR Collins, and DS Irvine, 2001. Effect of A Phytoestrogen Food Supplement on Reproductive Health in Normal Males. **Clinical Science**, 100: 613-618.
- Hanafiah KA, 2003. **Rancangan Percobaan, Teori & Aplikasi**. Fakultas Pertanian Universitas Sriwijaya, Palembang. Jakarta. PT Raja Grafindo Persada.
- Hughes A et al, 2002. **A Draft Report of the COT Working Group on Phytoestrogens**.

- IFST (Institute of Food Science and Technology), 2001. **Phytoestrogen**. London
- Ismudiono, 1998. **Fisiologi Reproduksi pada Ternak Edisi I**. Surabaya: Fakultas Kedokteran Hewan Unair.
- Junqueira LC, J Carneiro, and RO Kelly, 1992. **Basic Histology 7<sup>th</sup> Ed**. California: Appleton and Lande.
- Junqueira LC, J Carneiro, dan RO Kelly, 1998. **Histologi Dasar Edisi ke-8 Alih Bahasa: Jan Tambayong**. Jakarta: EGC.
- Koswara, 1992. **Teknologi Pengolahan Kedelai**. Jakarta: Pustaka Sinar Harapan.
- Kusumawati D, 2004. **Bersahabat dengan Hewan Coba**. Yogyakarta. Gadjah Mada University Press.
- Leeson CR, Thomas, and Anthony, 1989. **Buku Ajar Histologi (Text Book of Histology)**. Penerjemah: S. Koesparto Sisworo, dkk Edisi V. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Lindsay DT, 1996. **Functional Human Anatomy**. St. Louis: Mosby-Year Book Inc.
- Lullmann H, K Mohr, A Ziegler, dan D Bieger, 2000. **Color Atlas of Pharmacology 2<sup>nd</sup> edition**. New York. Thieme.
- McMichael-Phillips, DE et al, 1998. Effects of soy-protein supplementation on epithelial proliferation in the histologically normal human breast. **Am J Clin Nutr**, 68 (suppl), 1431S-1436S.
- Nair R and C Shaha, 2003. Diethylstilbestrol Induces Rat Spermatogenic Cell Apoptosis in vivo through Increased Expression of Spermatogenic Cell Fas/FasL System. **The Journal of Biological Chemistry**. Vol. 278. No. 8, pp.6470-6481.
- Nalbandov, AV. 1990. **Fisiologi Reproduksi Mamalia dan Unggas**. Universitas Indonesia Press. Jakarta.
- Neal, MJ, 2006. **At a Glance Farmakologi Medis (Medical Pharmacology at a Glance)**. Penerjemah: Juwalita Surapsari. Edisi Kelima. Jakarta. Erlangga.
- Nieschlag E and H Behre, 1997. **Andrology, Male Reproductive Health and Dysfunction**. New York: Heidelberg.
- Oakberg EF, 1956a. Duration of Spermatogenesis in the Mouse and Timing on Stages of the Cycle of the Seminiferous Epithelium. **Am J Anat** 99 (1): 507-516.

- Oakberg EF, 1956b. A Discriptions of Spermiogenesis in the Mouse and Timing its Use in Analysis of the Cycle of the Seminiferous Epitelium and Germ Cell Renewal. **Am J Anat** 99 (3): 391-413.
- O'Donnell L, KM Robertson, ME Jones, and ER Simpson, 2001. Estrogen and Spermatogenesis. **Endocrine Reviews** 22 (3): 289-318.
- Parvinen M, 1982. Regulation of the Seminiferous Epitelium. **Endocrine Review** 3 (4): 404-417.
- Ross, MH. and Ej. Reith. 1985. **Histology. A Text and Atlas**. New York. Prentice Hall Inc.
- Sari GM, 2001. Pengaruh Pemberian Ekstrak Kedelai (Glycine max) Dibanding Estrogen Konjugasi terhadap Kepadatan Tulang Tikus Putih (Rattus Norvegicus).: **Thesis Unair Surabaya**, tidak diterbitkan.
- Seeley RR, Stephens, Tale Philips, 1998. **Anatomy and Physiology 4<sup>th</sup> Ed**. USA: Mc Graw-Hill Companies, pp. 914-921.
- Setchell KDR, 2001. Soy Isoflavone – Benefits and Risk from Nature's Selective Estrogen eceptor Modulators (SERMs). **Journal of The American College of Nutrition**, Vol.20, No.5: 354S-362S.
- Steel RGD and JH Torrie, 1991. **Principles and Procedures of Statistics, a Biometrical Approach 2<sup>nd</sup>Ed**. Singapore: Mc Graw Hill Book Company.
- Strauss L, S Makela, S Joshi, I Huhtaniemi, R Santti, 1998. Genistein Exerts Estrogen-like Effects in Males Mouse Reproductive Tract. **Mol Cell Endocrinol** 144 (1-2): 83-93.
- Setchell KDR and A Cassidy, 1998. Dietary Isoflavones: Biological Effects and Relevance to Human Health. **J.Nutr.**129: 758S-767S.
- Sturm N, 2006. **Sex Steroid Hormone Biosynthesis and Action**. On line di [http://www.gravitywaves.com/chemistry/CHE452/23\\_Sex%20Steroid%20Horm.htm](http://www.gravitywaves.com/chemistry/CHE452/23_Sex%20Steroid%20Horm.htm)
- Suntoro H, 1983. **Metode Pewarnaan**. Jakarta: Bhratara Karya Aksara.
- Taylor M, 2002. **Phyto-Estrogens**. On line di <http://www.here.org/>
- Thomas A, 1992. **Tanaman Obat Tradisional**. Yogyakarta: Kanisius.
- Tienhoven, A. 1983. **Reproductive Physiology of Vertebrates, 2<sup>nd</sup> Ed**. Cornel University Press. Ithaca London.



- Tsutsui K, 1991. Pituitary and Gonadal Hormone-Dependent and Independent Induction of Follicle-Stimulating Hormone Receptors in the Developing Testis. **Endocrinology** 128 (1): 477-487.
- Turner CD and JT Bagnara, 1998. **Endokrinologi Umum (General Endocrinology)**. Penerjemah: Harsojo. Yogyakarta. University Press.
- Veldhuis J, 1991. The Hypotalamic Pituitary-Testicular Axis. In (Yen SSC and RB Jaffe,eds). **Reproductive Endocrinology 3<sup>rd</sup>**.ed. USA: WB Saunders Company.
- Vincenzo R, M Bruno, F Matteo, V Elena, and C Cesare, 2005. **Estrogens and Male Reproduction**. Endotext.com.
- Whittingham DG, MJ Wood MJ, 1993. Reproductive Physiology. In (Foster HL. JD Small, JG Fox, eds). **The Mouse in Biomedical Research Vol III**. California: Academi Press Inc.
- Wuryantari dan N Moeloek, 2000. Perkembangan Mutakhir Fisiologi Fungsi Testis: Dari Organ sampai Gen. **MKI** 50 (8): 377-384.
- Yi MA, HM Son, JS Lee, CS Kwon, JK Lim, YK Yeo, YS Park, and JS Kim, 2002. Regulation of Male Sex Hormone Levels by Soy Isoflavones on Rats. **Nutr Cancer** 42 (2): 206-10.
- Zainuddin M, 1995. **Metodologi Penelitian**. Universitas Airlangga Surabaya.

**DEPARTEMEN PERTANIAN**  
**BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN PERTANIAN**

**BALAI PENELITIAN TANAMAN KACANG-KACANGAN DAN UMBI-UMBIAN**  
**UNIT PRODUKSI BENIH SUMBER (UPBS)**

Kotak Pos 66, Kendalpayak-Malang 65101  
Telp. (0341) 801468; Fax (0341) 801496  
E-mail: upbs\_balitkabi@yahoo.com

**SURAT KETERANGAN BENIH PENJENIS (BS)**

Nomor: 2046.TP240.J.2.2.BS-KD.08.06.UPBS

Jenis Tanaman : Kedelai

Varietas	Jumlah (kg)	Tanggal Panen	Daya tumbuh (%)	Tanggal uji
Ijen	4	23-05-06	93.0	08-08-06

Asal : Balitkabi

Keterangan : Benih tersebut adalah benih penjenis sebagai sumber benih dasar (FS)

Untuk : Siti Maemonah  
Mahasiswa Pasca Sarjana Jurusan Ilmu Kedokteran Dasar  
Universitas Airlangga, Surabaya

Malang, 11 Agustus 2006

Pemulia Kedelai

Ir. M. Muchlish Adie, MS  
NIP. 080 034 556

Mengetahui  
Pgs. Kepala Balai

Prof. (Riset) Dr. Astanto Kasno  
NIP. 080 043 192



Tembusan kepada Yth:  
- Pemulia Tanaman Kedelai  
- Kepala Balitkabi  
- Arsip

## USDA-Iowa State University Database on the Isoflavone Content of Foods - 1999

s = mg/100 g edible portion for Mean, Standard error of the mean (SEM), Min, and Max; #S = the total number of means/individual values; CC=Confidence code)

Description	NutrDesc	Mean	SEM	#S	Min	Max	CC	Reference No.
9-grain bread	Daidzein	0.01		1	0.01	0.01	c	19
	Genistein	0.01		1	0.01	0.01	c	19
	Total Isofl.	0.02		1	0.02	0.02	c	19
Alfalfa seeds, sprouted, raw	Daidzein	0.00		2	0.00	0.00	b	11, 21
	Genistein	0.00		2	0.00	0.00	b	11, 21
	Glycitein	0.00		1	0.00	0.00	c	21
	Total Isofl.	0.00		2	0.00	0.00	b	11, 21
Alfalfa seeds, sprouted, raw, mixed with clover seeds, sprouted, raw	Daidzein	0.00		1	0.00	0.00	c	21
	Genistein	0.00		1	0.00	0.00	c	21
	Glycitein	0.00		1	0.00	0.00	c	21
	Total Isofl.	0.00		1	0.00	0.00	c	21
Bacon, meatless	Daidzein	2.80		1	2.80	2.80	c	36
	Genistein	6.90		1	6.90	6.90	c	36
	Glycitein	2.40		1	2.40	2.40	c	36
	Total Isofl.	12.10		1	12.10	12.10	c	36
Beans, black, mature seeds, raw	Daidzein	0.00		1	0.00	0.00	c	11
	Genistein	0.00		1	0.00	0.00	c	11
	Total Isofl.	0.00		1	0.00	0.00	c	11
Beans, great northern, mature seeds, raw	Daidzein	0.00		1	0.00	0.00	c	11
	Genistein	0.00		1	0.00	0.00	c	11
	Total Isofl.	0.00		1	0.00	0.00	c	11
Beans, kidney, all types, mature seeds, cooked, boiled, without salt	Daidzein	0.00		1	0.00	0.00	c	11
	Genistein	0.00		1	0.00	0.00	c	11
	Total Isofl.	0.00		1	0.00	0.00	c	11
Beans, kidney, all types, mature seeds, raw	Daidzein	0.02		2	0.01	0.02	b	17
	Genistein	0.04		2	0.02	0.06	b	17
	Total Isofl.	0.06		2	0.03	0.08	b	17

## USDA-Iowa State University Database on the Isoflavone Content of Foods - 1999

Units = mg/100 g edible portion for Mean, Standard error of the mean (SEM), Min, and Max; #S = the total number of means/individual values; CC=Confidence code)

ID	Description	NutrDesc	Mean	SEM	#S	Min	Max	CC	Reference No.
15	Soy-based liquid formula for adults, ROSS, JEVITY ISOTONIC	Daidzein	0.03		1	0.03	0.03	c	6
		Genistein	0.31		1	0.31	0.31	c	6
		Total Isofl.	0.34		1	0.34	0.34	c	6
12	Soybean chips	Daidzein	26.71		1	26.71	26.71	c	5
		Genistein	27.45		1	27.45	27.45	c	5
		Total Isofl.	54.16		1	54.16	54.16	c	5
19	Soybean curd cheese	Daidzein	9.00		1	9.00	9.00	c	10
		Genistein	19.20		1	19.20	19.20	c	10
		Total Isofl.	28.20		1	28.20	28.20	c	10
14	Soybean, curd, fermented	Daidzein	14.30		1	14.30	14.30	c	36
		Genistein	22.40		1	22.40	22.40	c	36
		Glycitein	2.30		1	2.30	2.30	c	36
		Total Isofl.	39.00		1	39.00	39.00	c	36
10	Soybeans, Brazil, raw	Daidzein	20.16	3.03	6	9.89	30.48	b	2
		Genistein	67.47	13.40	6	28.28	110.98	b	2
		Total Isofl.	87.63	14.51	6	42.54	141.46	b	2
12	Soybeans, Japan, raw	Daidzein	34.52	11.49	7	13.40	100.65	a	11, 37
		Genistein	64.78	13.04	8	13.00	138.24	a	11, 37
		Glycitein	13.78	1.64	6	9.10	20.40	b	37
		Total Isofl.	118.51	22.16	7	68.80	238.89	a	11, 37
13	Soybeans, Korea, raw	Daidzein	72.68	6.12	18	21.00	124.20	a	3
		Genistein	72.31	5.71	18	24.80	110.70	a	3
		Total Isofl.	144.99	10.73	18	45.80	231.70	a	3
10	Soybeans, Taiwan, raw	Daidzein	28.21		1	28.21	28.21	c	11
		Genistein	31.54		1	31.54	31.54	c	11
		Total Isofl.	59.75		1	59.75	59.75	c	11

## USDA-Iowa State University Database on the Isoflavone Content of Foods - 1999

ns = mg/100 g edible portion for Mean, Standard error of the mean (SEM), Min, and Max; #S = the total number of means/individual values; CC=Confidence code)

	Description	NutrDesc	Mean	SEM	#S	Min	Max	CC	Reference No.
9	Spices, fenugreek seed	Daidzein	0.01		1	0.01	0.01	c	17
		Genistein	0.01		1	0.01	0.01	c	17
		Total Isofl.	0.02		1	0.02	0.02	c	17
6	Sunflower seed kernels, dried	Daidzein	0.00		1	0.00	0.00	c	19
		Genistein	0.00		1	0.00	0.00	c	19
		Total Isofl.	0.00		1	0.00	0.00	c	19
7	Tea, green, Japan	Daidzein	0.01		1	0.01	0.01	c	18
		Genistein	0.04		1	0.04	0.04	c	18
		Total Isofl.	0.05		1	0.05	0.05	c	18
6	Tea, jasmine, Twinings	Daidzein	0.01		1	0.01	0.01	c	18
		Genistein	0.03		1	0.03	0.03	c	18
		Total Isofl.	0.04		1	0.04	0.04	c	18
4	Tempeh	Daidzein	17.59	3.13	6	4.67	27.30	a	5, 13, 21, 26, 35, 36
		Genistein	24.85	5.47	6	1.11	39.77	a	5, 13, 21, 26, 35, 36
		Glycitein	2.10	0.67	3	0.90	3.20	b	21, 35, 36
		Total Isofl.	43.52	8.34	6	6.88	62.50	a	5, 13, 21, 26, 35, 36
1	Tempeh burger	Daidzein	6.40		1	6.40	6.40	c	36
		Genistein	19.60		1	19.60	19.60	c	36
		Glycitein	3.00		1	3.00	3.00	c	36
		Total Isofl.	29.00		1	29.00	29.00	c	36
4	Tempeh, cooked	Daidzein	19.25		1	19.25	19.25	c	21
		Genistein	31.55		1	31.55	31.55	c	21
		Glycitein	2.20		1	2.20	2.20	c	21
		Total Isofl.	53.00		1	53.00	53.00	c	21

## Lampiran 3

**Perhitungan dosis**

Konversi perhitungan dosis ekstrak biji kedelai untuk hewan coba adalah sebagai berikut:

Dosis ekstrak biji kedelai pada tikus (Suprianto, 2004): 2,60mg/200gBB/hari

Berat badan tikus: 200 gram

Berat badan mencit: 20 gram

Faktor konversi: 0,14

maka dosis ekstrak biji kedelai untuk mencit adalah:

$$\begin{aligned} 2,60\text{mg/hari} \times 0,14 &= 0,364\text{mg}/20 \text{ gram/hari} \\ &= 18,2\text{mg}/\text{KgBB/hari} \end{aligned}$$

Kemudian dilakukan eksplorasi dengan dosis: 18,2mg/KgBB/hari, 36,4mg/KgBB/hari, 72,8mg/KgBB/hari, dan 145,6mg/KgBB/hari.

Dari hasil eksplorasi menunjukkan penurunan jumlah spermatid pada semua dosis di atas, maka dosis untuk penelitian adalah: 9,1mg/KgBB/hari, 18,2mg/KgBB/hari, 36,4mg/KgBB/hari, dan 72,8mg/KgBB/hari.

## Lampiran 4 Berat badan mencit pada awal dan akhir penelitian

Daftar: Berat badan mencit (dalam gram) pada awal dan akhir penelitian

No.	Kandang	Identitas	BB Awal	BB Akhir
1	1 (satu)	Kepala	18	28
2		Punggung	18	32
3		Ekor	22	33
4		Kaki Depan Kanan	20	29
5		Kaki Depan Kiri	25	33
6		Kaki Belakang Kanan	23	30
7		Kaki Belakang Kiri	26	
8		Telinga Kanan	20	24
9		Telinga Kiri	18	31
10		Tanpa Identitas	18	25
11	2 (dua)	Kepala	25	28
12		Punggung	16	27
13		Ekor	20	35
14		Kaki Depan Kanan	16	
15		Kaki Depan Kiri	19	28
16		Kaki Belakang Kanan	15	29
17		Kaki Belakang Kiri	17	26
18		Telinga Kanan	15	29
19		Telinga Kiri	18	27
20		Tanpa Identitas	16	30
21	3 (tiga)	Kepala	29	37
22		Punggung	17	27
23		Ekor	18	33
24		Kaki Depan Kanan	18	30
25		Kaki Depan Kiri	22	26
26		Kaki Belakang Kanan	20	21
27		Kaki Belakang Kiri	20	28
28		Telinga Kanan	18	29
29		Telinga Kiri	24	28
30		Tanpa Identitas	22	28
31	4 (empat)	Kepala	21	30
32		Punggung	20	28
33		Ekor	20	29
34		Kaki Depan Kanan	21	29
35		Kaki Depan Kiri	19	21
36		Kaki Belakang Kanan	20	31
37		Kaki Belakang Kiri	21	30
38		Telinga Kanan	22	24
39		Telinga Kiri	21	
40		Tanpa Identitas	17	26
41	5 (lima)	Kepala	25	30
42		Punggung	20	31
43		Ekor	24	
44		Kaki Depan Kanan	20	32
45		Kaki Depan Kiri	21	32
46		Kaki Belakang Kanan	23	31
47		Kaki Belakang Kiri	17	32
48		Telinga Kanan	20	31
49		Telinga Kiri	19	30
50		Tanpa Identitas	29	30

## Lampiran 5 Berat badan mencit selama periode penelitian

Daftar: Berat badan mencit selama periode penelitian

No.	Kandang	Identitas	Berat Badan (dalam gram)					
			10/11/2006	17/11/2006	24/11/2006	1/12/2006	8/12/2006	15/12/2006
1	1 (satu)	Kepala	18	24	23	23	24	27
2		Punggung	18	23	24	27	29	33
3		Ekor	22	25	25	27	28	33
4		Kaki Depan Kanan	20	24	25	25	27	30
5		Kaki Depan Kiri	25	28	29	30	32	34
6		Kaki Belakang Kanan	23	28	30	29	29	31
7		Kaki Belakang Kiri	26	27	24			
8		Telinga Kanan	20	28	26	22	22	23
9		Telinga Kiri	18	23	24	27	28	33
10		Tanpa Identitas	18	24	24	26	24	25
11	2 (dua)	Kepala	25	29	30	30	25	27
12		Punggung	16	23	23	22	24	26
13		Ekor	20	27	29	30	33	34
14		Kaki Depan Kanan	16	22	19			
15		Kaki Depan Kiri	19	26	28	23	24	28
16		Kaki Belakang Kanan	15	22	23	22	25	26
17		Kaki Belakang Kiri	17	24	24	24	25	26
18		Telinga Kanan	15	22	22	23	26	29
19		Telinga Kiri	18	23	21	18	26	17
20		Tanpa Identitas	16	23	24	24	25	29
21	3 (tiga)	Kepala	29	33	33	31	32	35
22		Punggung	17	21	22	23	25	28
23		Ekor	18	22	24	25	26	30
24		Kaki Depan Kanan	18	22	21	21	25	29
25		Kaki Depan Kiri	22	29	28	22	21	25
26		Kaki Belakang Kanan	20	24	24	22	22	23
27		Kaki Belakang Kiri	20	24	25	25	23	24
28		Telinga Kanan	18	21	23	25	26	29
29		Telinga Kiri	24	28	28	22	25	27
30		Tanpa Identitas	22	27	29	28	25	27
31	4 (empat)	Kepala	21	23	24	25	29	30
32		Punggung	20	24	24	24	25	28
33		Ekor	20	23	24	24	26	29
34		Kaki Depan Kanan	21	24	24	24	26	28
35		Kaki Depan Kiri	19	24	19	21	20	21
36		Kaki Belakang Kanan	20	25	25	24	27	30
37		Kaki Belakang Kiri	21	22	24	24	26	29
38		Telinga Kanan	22	27	26	25	25	25
39		Telinga Kiri	21	26	24	16		
40		Tanpa Identitas	17	22	23	23	25	27
41	5 (lima)	Kepala	25	27	27	28	30	31
42		Punggung	20	26	26	26	26	31
43		Ekor	24	28	28	28	29	23
44		Kaki Depan Kanan	20	26	28	29	30	34
45		Kaki Depan Kiri	21	29	31	26	28	32
46		Kaki Belakang Kanan	23	28	27	27	27	31
47		Kaki Belakang Kiri	17	22	25	25	26	31
48		Telinga Kanan	20	24	24	25	28	30
49		Telinga Kiri	19	24	25	24	27	30
50		Tanpa Identitas	29	32	29	28	29	28



## Lampiran 6 Dosis pemberian perlakuan selama periode penelitian

Daftar: Dosis pemberian perlakuan selama periode penelitian

No.	Kandang	Identitas	17s.d.23 Nop 2006		24s.d.30 Nop 2006		1s.d.7 Des 2006		8s.d.14 Des 2006		15s.d.21 Des 2006	
			BB (gr)	Dosis (ml)	BB (gr)	Dosis (ml)	BB (gr)	Dosis (ml)	BB (gr)	Dosis (ml)	BB (gr)	Dosis (ml)
1	1 (satu)	Kepala	24	0,24	23	0,23	23	0,23	24	0,24	27	0,27
2		Punggung	23	0,23	24	0,24	27	0,27	29	0,29	33	0,33
3		Ekor	25	0,25	25	0,25	27	0,27	28	0,28	33	0,33
4		K D Ka	24	0,24	25	0,25	25	0,25	27	0,27	30	0,30
5		K D Ki	28	0,28	29	0,29	30	0,30	32	0,32	34	0,34
6		K B Ka	28	0,28	30	0,30	29	0,29	29	0,29	31	0,31
7		K B Ki	27	0,27	24	0,24						
8		Telinga Kanan	28	0,28	26	0,26	22	0,22	22	0,22	23	0,23
9		Telinga Kiri	23	0,23	24	0,24	27	0,27	28	0,28	33	0,33
10		Tanpa Identitas	24	0,24	24	0,24	26	0,26	24	0,24	25	0,25
11	2 (dua)	Kepala	29	0,29	30	0,30	30	0,30	25	0,25	27	0,27
12		Punggung	23	0,23	23	0,23	22	0,22	24	0,24	26	0,26
13		Ekor	27	0,27	29	0,29	30	0,30	33	0,33	34	0,34
14		K D Ka	22	0,22	19	0,19						
15		K D Ki	26	0,26	28	0,28	23	0,23	24	0,24	28	0,28
16		K B Ka	22	0,22	23	0,23	22	0,22	25	0,25	26	0,26
17		K B Ki	24	0,24	24	0,24	24	0,24	25	0,25	26	0,26
18		Telinga Kanan	22	0,22	22	0,22	23	0,23	26	0,26	29	0,29
19		Telinga Kiri	23	0,23	21	0,21	18	0,18	26	0,26	17	0,17
20		Tanpa Identitas	23	0,23	24	0,24	24	0,24	25	0,25	29	0,29
21	3 (tiga)	Kepala	33	0,33	33	0,33	31	0,31	32	0,32	35	0,35
22		Punggung	21	0,21	22	0,22	23	0,23	25	0,25	28	0,28
23		Ekor	22	0,22	24	0,24	25	0,25	26	0,26	30	0,30
24		K D Ka	22	0,22	21	0,21	21	0,21	25	0,25	29	0,29
25		K D Ki	29	0,29	28	0,28	22	0,22	21	0,21	25	0,25
26		K B Ka	24	0,24	24	0,24	22	0,22	22	0,22	23	0,23
27		K B Ki	24	0,24	25	0,25	25	0,25	23	0,23	24	0,24
28		Telinga Kanan	21	0,21	23	0,23	25	0,25	26	0,26	29	0,29
29		Telinga Kiri	28	0,28	28	0,28	22	0,22	25	0,25	27	0,27
30		Tanpa Identitas	27	0,27	29	0,29	28	0,28	25	0,25	27	0,27
31	4 (empat)	Kepala	23	0,23	24	0,24	25	0,25	29	0,29	30	0,30
32		Punggung	24	0,24	24	0,24	24	0,24	25	0,25	28	0,28
33		Ekor	23	0,23	24	0,24	24	0,24	26	0,26	29	0,29
34		K D Ka	24	0,24	24	0,24	24	0,24	26	0,26	28	0,28
35		K D Ki	24	0,24	19	0,19	21	0,21	20	0,20	21	0,21
36		K B Ka	25	0,25	25	0,25	24	0,24	27	0,27	30	0,30
37		K B Ki	22	0,22	24	0,24	24	0,24	26	0,26	29	0,29
38		Telinga Kanan	27	0,27	26	0,26	25	0,25	25	0,25	25	0,25
39		Telinga Kiri	26	0,26	24	0,24	16	0,16				
40		Tanpa Identitas	22	0,22	23	0,23	23	0,23	25	0,25	27	0,27
41	5 (lima)	Kepala	27	0,27	27	0,27	28	0,28	30	0,30	31	0,31
42		Punggung	26	0,26	26	0,26	26	0,26	26	0,26	31	0,31
43		Ekor	28	0,28	28	0,28	28	0,28	29	0,29	23	0,23
44		K D Ka	26	0,26	28	0,28	29	0,29	30	0,30	34	0,34
45		K D Ki	29	0,29	31	0,31	26	0,26	28	0,28	32	0,32
46		K B Ka	28	0,28	27	0,27	27	0,27	27	0,27	31	0,31
47		K B Ki	22	0,22	25	0,25	25	0,25	26	0,26	31	0,31
48		Telinga Kanan	24	0,24	24	0,24	25	0,25	28	0,28	30	0,30
49		Telinga Kiri	24	0,24	25	0,25	24	0,24	27	0,27	30	0,30
50		Tanpa Identitas	32	0,32	29	0,29	28	0,28	29	0,29	28	0,28

## Lampiran 7 Hasil pengamatan tebal epitel tubulus seminiferus

Data hasil pengamatan tebal epitel tubulus seminiferus ( $\mu\text{m}$ )

No.	Kandang	Identitas	Pengamatan		
			1	2	3
1		Kepala	45	45	45
2		Punggung	60	45	45
3		Ekor	45	45	45
4		Kaki Depan Kanan	45	75	45
5	1 (satu)	Kaki Depan Kiri	45	60	53
6		Kaki Belakang Kanan	53	45	45
7		Kaki Belakang Kiri			
8		Telinga Kanan	45	60	60
9		Telinga Kiri	45	53	38
10		Tanpa Identitas	53	45	38
11		Kepala	53	60	53
12		Punggung	45	30	45
13		Ekor	53	38	60
14		Kaki Depan Kanan			
15	2 (dua)	Kaki Depan Kiri	45	45	45
16		Kaki Belakang Kanan	53	38	45
17		Kaki Belakang Kiri	53	45	38
18		Telinga Kanan	45	45	45
19		Telinga Kiri	45	45	45
20		Tanpa Identitas	60	53	45
21		Kepala	45	45	45
22		Punggung	45	38	45
23		Ekor	45	45	38
24		Kaki Depan Kanan	60	45	38
25	3 (tiga)	Kaki Depan Kiri	45	45	38
26		Kaki Belakang Kanan	38	45	45
27		Kaki Belakang Kiri	30	45	30
28		Telinga Kanan	38	53	45
29		Telinga Kiri	45	45	53
30		Tanpa Identitas	45	45	45
31		Kepala	38	38	30
32		Punggung	45	45	45
33		Ekor	60	45	45
34		Kaki Depan Kanan	45	45	38
35	4 (empat)	Kaki Depan Kiri	38	45	30
36		Kaki Belakang Kanan	45	45	45
37		Kaki Belakang Kiri	38	45	38
38		Telinga Kanan	45	38	38
39		Telinga Kiri			
40		Tanpa Identitas	45	38	30
41		Kepala	45	45	45
42		Punggung	45	45	38
43		Ekor			
44		Kaki Depan Kanan	53	53	53
45	5 (lima)	Kaki Depan Kiri	45	38	45
46		Kaki Belakang Kanan	38	45	38
47		Kaki Belakang Kiri	45	45	53
48		Telinga Kanan	53	45	53
49		Telinga Kiri	45	45	45
50		Tanpa Identitas	45	45	45

## Lampiran 8 Data hasil pengamatan jumlah spermatogonium

## Data hasil pengamatan jumlah spermatogonium

No.	Kandang	Identitas	Pengamatan		
			1	2	3
1		Kepala	50	50	53
2		Punggung	48	50	55
3		Ekor	53	54	48
4		Kaki Depan Kanan	52	52	50
5	1 (satu)	Kaki Depan Kiri	54	54	50
6		Kaki Belakang Kanan	50	52	50
7		Kaki Belakang Kiri			
8		Telinga Kanan	54	46	46
9		Telinga Kiri	50	50	52
10		Tanpa Identitas	50	50	51
11		Kepala	50	48	50
12		Punggung	48	46	50
13		Ekor	48	50	51
14		Kaki Depan Kanan			
15	2 (dua)	Kaki Depan Kiri	46	50	50
16		Kaki Belakang Kanan	48	48	48
17		Kaki Belakang Kiri	50	50	46
18		Telinga Kanan	50	47	48
19		Telinga Kiri	47	48	50
20		Tanpa Identitas	50	50	51
21		Kepala	48	48	48
22		Punggung	43	48	46
23		Ekor	43	42	46
24		Kaki Depan Kanan	48	46	46
25	3 (tiga)	Kaki Depan Kiri	48	44	48
26		Kaki Belakang Kanan	46	46	46
27		Kaki Belakang Kiri	44	46	48
28		Telinga Kanan	43	48	46
29		Telinga Kiri	44	46	45
30		Tanpa Identitas	47	43	45
31		Kepala	43	38	36
32		Punggung	44	34	38
33		Ekor	40	36	36
34		Kaki Depan Kanan	40	38	36
35	4 (empat)	Kaki Depan Kiri	44	38	36
36		Kaki Belakang Kanan	43	40	40
37		Kaki Belakang Kiri	40	45	38
38		Telinga Kanan	38	40	40
39		Telinga Kiri			
40		Tanpa Identitas	40	42	40
41		Kepala	38	35	40
42		Punggung	35	38	38
43		Ekor			
44		Kaki Depan Kanan	36	40	34
45	5 (lima)	Kaki Depan Kiri	36	36	38
46		Kaki Belakang Kanan	38	35	34
47		Kaki Belakang Kiri	38	36	34
48		Telinga Kanan	38	35	36
49		Telinga Kiri	38	36	36
50		Tanpa Identitas	36	35	37

## Data hasil pengamatan jumlah spermatisit primer

No.	Kandang	Identitas	Pengamatan		
			1	2	3
1		Kepala	49	48	48
2		Punggung	48	50	48
3		Ekor	46	45	50
4		Kaki Depan Kanan	48	48	48
5	1 (satu)	Kaki Depan Kiri	50	48	48
6		Kaki Belakang Kanan	50	47	49
7		Kaki Belakang Kiri			
8		Telinga Kanan	48	47	48
9		Telinga Kiri	48	50	48
10		Tanpa Identitas	50	49	48
11		Kepala	48	48	46
12		Punggung	45	50	47
13		Ekor	48	48	46
14		Kaki Depan Kanan			
15	2 (dua)	Kaki Depan Kiri	46	48	48
16		Kaki Belakang Kanan	48	45	48
17		Kaki Belakang Kiri	47	47	46
18		Telinga Kanan	46	48	46
19		Telinga Kiri	48	47	45
20		Tanpa Identitas	48	48	46
21		Kepala	46	46	46
22		Punggung	47	40	47
23		Ekor	45	45	45
24		Kaki Depan Kanan	43	46	46
25	3 (tiga)	Kaki Depan Kiri	43	45	48
26		Kaki Belakang Kanan	47	45	45
27		Kaki Belakang Kiri	44	44	48
28		Telinga Kanan	42	44	50
29		Telinga Kiri	42	45	45
30		Tanpa Identitas	43	44	45
31		Kepala	40	38	36
32		Punggung	40	34	35
33		Ekor	37	36	36
34		Kaki Depan Kanan	38	35	36
35	4 (empat)	Kaki Depan Kiri	40	35	36
36		Kaki Belakang Kanan	37	40	35
37		Kaki Belakang Kiri	36	34	42
38		Telinga Kanan	34	40	38
39		Telinga Kiri			
40		Tanpa Identitas	40	37	35
41		Kepala	35	35	38
42		Punggung	36	37	35
43		Ekor			
44		Kaki Depan Kanan	35	39	35
45	5 (lima)	Kaki Depan Kiri	36	36	35
46		Kaki Belakang Kanan	37	35	35
47		Kaki Belakang Kiri	38	38	32
48		Telinga Kanan	35	35	35
49		Telinga Kiri	34	36	36
50		Tanpa Identitas	35	37	35

Data hasil pengamatan jumlah spermatozoa

No.	Kandang	Identitas	Pengamatan		
			1	2	3
1		Kepala	150	148	148
2		Punggung	148	152	168
3		Ekor	154	152	148
4		Kaki Depan Kanan	153	147	148
5	1 (satu)	Kaki Depan Kiri	148	148	152
6		Kaki Belakang Kanan	145	165	142
7		Kaki Belakang Kiri			
8		Telinga Kanan	150	146	150
9		Telinga Kiri	145	148	162
10		Tanpa Identitas	145	148	162
11		Kepala	145	148	148
12		Punggung	140	170	142
13		Ekor	158	146	148
14		Kaki Depan Kanan			
15	2 (dua)	Kaki Depan Kiri	157	152	145
16		Kaki Belakang Kanan	140	164	150
17		Kaki Belakang Kiri	155	165	140
18		Telinga Kanan	150	146	148
19		Telinga Kiri	149	148	162
20		Tanpa Identitas	148	150	155
21		Kepala	146	148	145
22		Punggung	140	140	143
23		Ekor	135	150	148
24		Kaki Depan Kanan	136	136	137
25	3 (tiga)	Kaki Depan Kiri	146	137	148
26		Kaki Belakang Kanan	145	147	147
27		Kaki Belakang Kiri	132	160	148
28		Telinga Kanan	146	130	167
29		Telinga Kiri	146	143	146
30		Tanpa Identitas	149	145	142
31		Kepala	130	128	135
32		Punggung	135	133	135
33		Ekor	137	140	133
34		Kaki Depan Kanan	135	145	120
35	4 (empat)	Kaki Depan Kiri	131	135	136
36		Kaki Belakang Kanan	135	140	129
37		Kaki Belakang Kiri	133	137	139
38		Telinga Kanan	150	125	135
39		Telinga Kiri			
40		Tanpa Identitas	135	131	137
41		Kepala	130	125	128
42		Punggung	139	128	137
43		Ekor			
44		Kaki Depan Kanan	137	134	123
45	5 (lima)	Kaki Depan Kiri	135	118	143
46		Kaki Belakang Kanan	136	124	139
47		Kaki Belakang Kiri	131	127	140
48		Telinga Kanan	130	125	136
49		Telinga Kiri	128	128	117
50		Tanpa Identitas	125	125	127

## mpiran 11 Analisis Statistik

## Par Tests

## One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		tebal tubulus seminiferus	jumlah spermato gonium	jumlah Spermatisit primer	jumlah spermatid
N		46	46	46	46
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	45.3696	44.3188	42.6884	142.1594
	Std. Deviation	4.82444	5.58700	5.25987	8.80116
Most Extreme Differences	Absolute	.199	.158	.215	.161
	Positive	.199	.140	.215	.147
	Negative	-.143	-.158	-.213	-.161
Kolmogorov-Smirnov Z		1.347	1.072	1.460	1.089
Asymp. Sig. (2-tailed)		.053	.201	.028	.186

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

## neway

## Descriptives

## tebal tubulus seminiferus

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
kontrol	9	49.0000	4.28823	1.42941	45.7038	52.2962	45.00	55.00
ekstrak kedelai 9,1 mg/kgBB	9	47.1111	4.73169	1.57723	43.4740	50.7482	40.00	55.33
ekstrak kedelai 18,2 mg/kgBB	10	43.6333	3.61222	1.14228	41.0493	46.2174	35.00	47.67
ekstrak kedelai 36,4 mg/kgBB	9	41.5556	4.58561	1.52854	38.0307	45.0804	35.33	50.00
ekstrak kedelai 72,8 mg/kgBB	9	45.7407	3.98880	1.32960	42.6747	48.8088	40.33	53.00
Total	46	45.3696	4.82444	.71132	43.9369	46.8022	35.00	55.33

## Test of Homogeneity of Variances

## tebal tubulus seminiferus

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.537	4	41	.709

## ANOVA

## tebal tubulus seminiferus

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	308.222	4	77.056	4.274	.006
Within Groups	739.162	41	18.028		
Total	1047.384	45			

## Post Hoc Tests

## Multiple Comparisons

Dependent Variable: tebal tubulus seminiferus

LSD

(I) kelompok perlakuan	(J) kelompok perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
kontrol	ekstrak kedelai 9,1 mg/kgBB	1.88889	2.00157	.351	-2.1534	5.9311
	ekstrak kedelai 18,2 mg/kgBB	5.36667*	1.95089	.009	1.4268	9.3066
	ekstrak kedelai 36,4 mg/kgBB	7.44444*	2.00157	.001	3.4022	11.4867
	ekstrak kedelai 72,8 mg/kgBB	3.25926	2.00157	.111	-.7830	7.3015
ekstrak kedelai 9,1 mg/kgBB	kontrol	-1.88889	2.00157	.351	-5.9311	2.1534
	ekstrak kedelai 18,2 mg/kgBB	3.47778	1.95089	.082	-.4621	7.4177
	ekstrak kedelai 36,4 mg/kgBB	5.55556*	2.00157	.008	1.5133	9.5978
	ekstrak kedelai 72,8 mg/kgBB	1.37037	2.00157	.497	-2.6719	5.4126
ekstrak kedelai 18,2 mg/kgBB	kontrol	-5.36667*	1.95089	.009	-9.3066	-1.4268
	ekstrak kedelai 9,1 mg/kgBB	-3.47778	1.95089	.082	-7.4177	.4621
	ekstrak kedelai 36,4 mg/kgBB	2.07778	1.95089	.293	-1.8621	6.0177
	ekstrak kedelai 72,8 mg/kgBB	-2.10741	1.95089	.286	-6.0473	1.8325
ekstrak kedelai 36,4 mg/kgBB	kontrol	-7.44444*	2.00157	.001	-11.4867	-3.4022
	ekstrak kedelai 9,1 mg/kgBB	-5.55556*	2.00157	.008	-9.5978	-1.5133
	ekstrak kedelai 18,2 mg/kgBB	-2.07778	1.95089	.293	-6.0177	1.8621
	ekstrak kedelai 72,8 mg/kgBB	-4.18519*	2.00157	.043	-8.2274	-.1429
ekstrak kedelai 72,8 mg/kgBB	kontrol	-3.25926	2.00157	.111	-7.3015	.7830
	ekstrak kedelai 9,1 mg/kgBB	-1.37037	2.00157	.497	-5.4126	2.6719
	ekstrak kedelai 18,2 mg/kgBB	2.10741	1.95089	.286	-1.8325	6.0473
	ekstrak kedelai 36,4 mg/kgBB	4.18519*	2.00157	.043	.1429	8.2274

\*. The mean difference is significant at the .05 level.



neway

**Descriptives**

Jumlah spermatogonium

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
ontrol	9	50.8889	1.08012	.36004	50.0586	51.7191	48.67	52.67
ekstrak kedelai 1 mg/kgBB	9	48.8148	.80123	.26708	48.1989	49.4307	48.00	50.33
ekstrak kedelai 3,2 mg/kgBB	10	45.8333	1.16799	.36935	44.9978	46.6689	43.67	48.00
ekstrak kedelai 5,4 mg/kgBB	9	39.3704	1.30644	.43548	38.3662	40.3746	37.33	41.00
ekstrak kedelai 7,8 mg/kgBB	9	36.5185	.60349	.20116	36.0546	36.9824	35.67	37.67
total	46	44.3188	5.58700	.82376	42.6597	45.9780	35.67	52.67

**Test of Homogeneity of Variances**

Jumlah spermatogonium

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.937	4	41	.452

**ANOVA**

Jumlah spermatogonium

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1361.342	4	340.336	322.147	.000
Within Groups	43.315	41	1.056		
Total	1404.657	45			

## Post Hoc Tests

### Multiple Comparisons

Dependent Variable: jumlah spermatogonium

LSD

(I) kelompok perlakuan	(J) kelompok perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
kontrol	ekstrak kedelai 9,1 mg/kgBB	2.07407*	.48453	.000	1.0955	3.0526
	ekstrak kedelai 18,2 mg/kgBB	5.05556*	.47226	.000	4.1018	6.0093
	ekstrak kedelai 36,4 mg/kgBB	11.51852*	.48453	.000	10.5400	12.4970
	ekstrak kedelai 72,8 mg/kgBB	14.37037*	.48453	.000	13.3918	15.3489
ekstrak kedelai 9,1 mg/kgBB	kontrol	-2.07407*	.48453	.000	-3.0526	-1.0955
	ekstrak kedelai 18,2 mg/kgBB	2.98148*	.47226	.000	2.0277	3.9352
	ekstrak kedelai 36,4 mg/kgBB	9.44444*	.48453	.000	8.4659	10.4230
	ekstrak kedelai 72,8 mg/kgBB	12.29630*	.48453	.000	11.3178	13.2748
ekstrak kedelai 18,2 mg/kgBB	kontrol	-5.05556*	.47226	.000	-6.0093	-4.1018
	ekstrak kedelai 9,1 mg/kgBB	-2.98148*	.47226	.000	-3.9352	-2.0277
	ekstrak kedelai 36,4 mg/kgBB	6.46296*	.47226	.000	5.5092	7.4167
	ekstrak kedelai 72,8 mg/kgBB	9.31481*	.47226	.000	8.3611	10.2686
ekstrak kedelai 36,4 mg/kgBB	kontrol	-11.51852*	.48453	.000	-12.4970	-10.5400
	ekstrak kedelai 9,1 mg/kgBB	-9.44444*	.48453	.000	-10.4230	-8.4659
	ekstrak kedelai 18,2 mg/kgBB	-6.46296*	.47226	.000	-7.4167	-5.5092
	ekstrak kedelai 72,8 mg/kgBB	2.85185*	.48453	.000	1.8733	3.8304
ekstrak kedelai 72,8 mg/kgBB	kontrol	-14.37037*	.48453	.000	-15.3489	-13.3918
	ekstrak kedelai 9,1 mg/kgBB	-12.29630*	.48453	.000	-13.2748	-11.3178
	ekstrak kedelai 18,2 mg/kgBB	-9.31481*	.47226	.000	-10.2686	-8.3611
	ekstrak kedelai 36,4 mg/kgBB	-2.85185*	.48453	.000	-3.8304	-1.8733

\*. The mean difference is significant at the .05 level.

**Report****jumlah spermatisit primer**

kelompok perlakuan	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
kontrol	9	48.2963	.63343	47.00	49.00
ekstrak kedelai 9,1 mg/kgBB	9	47.0741	.32394	46.67	47.33
ekstrak kedelai 18,2 mg/kgBB	10	45.0333	.65640	44.00	46.00
ekstrak kedelai 36,4 mg/kgBB	9	37.0370	.58794	36.33	38.00
ekstrak kedelai 72,8 mg/kgBB	9	35.7407	.40062	35.00	36.33
Total	46	42.6884	5.25987	35.00	49.00

**Par Tests****Kruskal-Wallis Test****Ranks**

	kelompok perlakuan	N	Mean Rank
jumlah spermatisit primer	kontrol	9	41.39
	ekstrak kedelai 9,1 mg/kgBB	9	33.61
	ekstrak kedelai 18,2 mg/kgBB	10	23.50
	ekstrak kedelai 36,4 mg/kgBB	9	13.83
	ekstrak kedelai 72,8 mg/kgBB	9	5.17
	Total	46	

**Test Statistics<sup>a,b</sup>**

	jumlah Spermatisit primer
Chi-Square	42.733
df	4
Asymp. Sig.	.000

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: kelompok perlakuan

## Par Tests

### Mann-Whitney Test

Ranks

	kelompok perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
jumlah spermatisit primer	kontrol	9	13.39	120.50
	ekstrak kedelai 9,1 mg/kgBB	9	5.61	50.50
	Total	18		

Test Statistics<sup>b</sup>

	jumlah Spermatisit primer
Mann-Whitney U	5.500
Wilcoxon W	50.500
Z	-3.148
Asymp. Sig. (2-tailed)	.002
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.001 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: kelompok perlakuan

## Par Tests

### Mann-Whitney Test

Ranks

	kelompok perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
jumlah spermatisit primer	kontrol	9	15.00	135.00
	ekstrak kedelai 18,2 mg/kgBB	10	5.50	55.00
	Total	19		

**Test Statistics<sup>b</sup>**

	jumlah Spermatozoid primer
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	55.000
Z	-3.700
Asymp. Sig. (2-tailed)	.000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.000 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: kelompok perlakuan

## Par Tests

### Mann-Whitney Test

Ranks

	kelompok perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
jumlah spermatisit primer	kontrol	9	14.00	126.00
	ekstrak kedelai 36,4 mg/kgBB	9	5.00	45.00
	Total	18		

Test Statistics<sup>b</sup>

	jumlah Spermatisit primer
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	45.000
Z	-3.621
Asymp. Sig. (2-tailed)	.000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.000 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: kelompok perlakuan

## Par Tests

### Mann-Whitney Test

Ranks

	kelompok perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
jumlah spermatisit primer	kontrol	9	14.00	126.00
	ekstrak kedelai 72,8 mg/kgBB	9	5.00	45.00
	Total	18		

Test Statistics<sup>b</sup>

	jumlah Spermatisit primer
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	45.000
Z	-3.610
Asymp. Sig. (2-tailed)	.000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.000 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: kelompok perlakuan

## Par Tests

### Mann-Whitney Test

Ranks

	kelompok perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
jumlah spermatisit primer	ekstrak kedelai 9,1 mg/kgBB	9	15.00	135.00
	ekstrak kedelai 18,2 mg/kgBB	10	5.50	55.00
	Total	19		

Test Statistics<sup>b</sup>

	jumlah spermatisit primer
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	55.000
Z	-3.724
Asymp. Sig. (2-tailed)	.000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.000 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: kelompok perlakuan

## Par Tests

### Mann-Whitney Test

Ranks

	kelompok perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
jumlah spermatisit primer	ekstrak kedelai 9,1 mg/kgBB	9	14.00	126.00
	ekstrak kedelai 36,4 mg/kgBB	9	5.00	45.00
	Total	18		

**Test Statistics<sup>b</sup>**

	jumlah Spermatoosit primer
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	45.000
Z	-3.648
Asymp. Sig. (2-tailed)	.000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.000 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: kelompok perlakuan

**Par Tests****Mann-Whitney Test****Ranks**

	kelompok perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
jumlah spermatoosit primer	ekstrak kedelai 9,1 mg/kgBB	9	14.00	126.00
	ekstrak kedelai 72,8 mg/kgBB	9	5.00	45.00
	Total	18		

**Test Statistics<sup>b</sup>**

	jumlah Spermatoosit primer
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	45.000
Z	-3.637
Asymp. Sig. (2-tailed)	.000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.000 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: kelompok perlakuan



## Par Tests

### Mann-Whitney Test

Ranks

	kelompok perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
jumlah spermatisit primer	ekstrak kedelai 18,2 mg/kgBB	10	14.50	145.00
	ekstrak kedelai 36,4 mg/kgBB	9	5.00	45.00
	Total	19		

Test Statistics<sup>b</sup>

	jumlah Spermatisit primer
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	45.000
Z	-3.707
Asymp. Sig. (2-tailed)	.000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.000 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: kelompok perlakuan

## Par Tests

### Mann-Whitney Test

Ranks

	kelompok perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
jumlah spermatisit primer	ekstrak kedelai 18,2 mg/kgBB	10	14.50	145.00
	ekstrak kedelai 72,8 mg/kgBB	9	5.00	45.00
	Total	19		

**Test Statistics<sup>b</sup>**

	jumlah Spermatozoid primer
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	45.000
Z	-3.697
Asymp. Sig. (2-tailed)	.000
Exact Sig. [2*(1-tailed approx.)]	.000 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: kelompok perlakuan

**Post Hoc Tests****Mann-Whitney Test****Ranks**

kelompok perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
ekstrak kedelai 36,4 mg/kgBB	9	13.83	124.50
ekstrak kedelai 72,8 mg/kgBB	9	5.17	46.50
Total	18		

**Test Statistics<sup>b</sup>**

	jumlah Spermatozoid primer
Mann-Whitney U	1.500
Wilcoxon W	46.500
Z	-3.495
Asymp. Sig. (2-tailed)	.000
Exact Sig. [2*(1-tailed approx.)]	.000 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: kelompok perlakuan

## ieway

## Descriptives

jumlah spermatid

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
ontrol	9	150.8148	2.29801	.76600	149.0484	152.5812	148.67	156.00
ekstrak kedelai 3,1 mg/kgBB	9	150.7037	2.06454	.68818	149.1168	152.2907	147.00	153.33
ekstrak kedelai 18,2 mg/kgBB	10	144.2667	3.35842	1.06203	141.8642	146.6691	136.33	147.67
ekstrak kedelai 36,4 mg/kgBB	9	134.5926	1.82405	.60802	133.1905	135.9947	131.00	136.67
ekstrak kedelai 72,8 mg/kgBB	9	130.1852	3.53204	1.17735	127.4702	132.9002	124.33	134.67
Total	46	142.1594	8.80116	1.29766	139.5458	144.7730	124.33	156.00

## Test of Homogeneity of Variances

jumlah spermatid

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.404	4	41	.250

## ANOVA

jumlah spermatid

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3181.443	4	795.361	107.172	.000
Within Groups	304.277	41	7.421		
Total	3485.720	45			

## Post Hoc Tests

### Multiple Comparisons

Dependent Variable: jumlah spermatid

LSD

(I) kelompok perlakuan	(J) kelompok perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
kontrol	ekstrak kedelai 9,1 mg/kgBB	.11111	1.28421	.931	-2.4824	2.7046
	ekstrak kedelai 18,2 mg/kgBB	6.54815*	1.25169	.000	4.0203	9.0760
	ekstrak kedelai 36,4 mg/kgBB	16.22222*	1.28421	.000	13.6287	18.8157
	ekstrak kedelai 72,8 mg/kgBB	20.62963*	1.28421	.000	18.0361	23.2231
ekstrak kedelai 9,1 mg/kgBB	kontrol	-.11111	1.28421	.931	-2.7046	2.4824
	ekstrak kedelai 18,2 mg/kgBB	6.43704*	1.25169	.000	3.9092	8.9649
	ekstrak kedelai 36,4 mg/kgBB	16.11111*	1.28421	.000	13.5176	18.7046
	ekstrak kedelai 72,8 mg/kgBB	20.51852*	1.28421	.000	17.9250	23.1120
ekstrak kedelai 18,2 mg/kgBB	kontrol	-6.54815*	1.25169	.000	-9.0760	-4.0203
	ekstrak kedelai 9,1 mg/kgBB	-6.43704*	1.25169	.000	-8.9649	-3.9092
	ekstrak kedelai 36,4 mg/kgBB	9.67407*	1.25169	.000	7.1462	12.2019
	ekstrak kedelai 72,8 mg/kgBB	14.08148*	1.25169	.000	11.5536	16.6093
ekstrak kedelai 36,4 mg/kgBB	kontrol	-16.22222*	1.28421	.000	-18.8157	-13.6287
	ekstrak kedelai 9,1 mg/kgBB	-16.11111*	1.28421	.000	-18.7046	-13.5176
	ekstrak kedelai 18,2 mg/kgBB	-9.67407*	1.25169	.000	-12.2019	-7.1462
	ekstrak kedelai 72,8 mg/kgBB	4.40741*	1.28421	.001	1.8139	7.0009
ekstrak kedelai 72,8 mg/kgBB	kontrol	-20.62963*	1.28421	.000	-23.2231	-18.0361
	ekstrak kedelai 9,1 mg/kgBB	-20.51852*	1.28421	.000	-23.1120	-17.9250
	ekstrak kedelai 18,2 mg/kgBB	-14.08148*	1.25169	.000	-16.6093	-11.5536
	ekstrak kedelai 36,4 mg/kgBB	-4.40741*	1.28421	.001	-7.0009	-1.8139

\*. The mean difference is significant at the .05 level.