

- METHOXYETHANOL

- TESTOSTERONE

TESIS

EFEK 2-METHOXYETHANOL TERHADAP KADAR TESTOSTERON DAN HISTOLOGIS TESTIS MENCIT (*MUS MUSCULUS L*)



Ekad
Rk
140.14/11
Sop
e

SUPATMI
090710286 M

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

PROGRAM PASCA SARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2009

1957

RESEARCH REPORT ON THE
EFFECTS OF THE
MUSCULUS (MUSCULUS)



UNIVERSITY
OF SINGAPORE

RECEIVED
LIBRARY
UNIVERSITY OF SINGAPORE
SINGAPORE

UNIVERSITY OF SINGAPORE
LIBRARY
SINGAPORE

TESIS

**EFEK 2-METHOXYETHANOL TERHADAP KADAR
TESTOSTERON DAN HISTOLOGIS TESTIS MENCIT
(*MUS MUSCULUS L*)**

**SUPATMI
090710286 M**

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2009**

TESIS

**EFEK 2-METHOXYETHANOL TERHADAP KADAR
TESTOSTERON DAN HISTOLOGIS TESTIS
MENCIT (*MUS MUSCULUS L*)**

TESIS

**Untuk memperoleh Gelar Magister
Dalam Program Studi Ilmu Kesehatan Reproduksi
Pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga**

Oleh :

**SUPATMI
090710286 M**

**PROGRAM PASCA SARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

Tanggal, 14 Agustus 2009

1983

ANALISIS PASCA MARCH
UNIVERSITAS ALIBALGA
AYAHAYA

1983

ANALISIS PASCA MARCH
UNIVERSITAS ALIBALGA
AYAHAYA

1983

ANALISIS PASCA MARCH
UNIVERSITAS ALIBALGA

ANALISIS PASCA MARCH
UNIVERSITAS ALIBALGA
AYAHAYA
1983

Lembar pengesahan

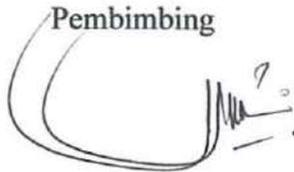
TESIS INI TELAH DISETUJUI
14 Agustus 2009

Oleh :
Pembimbing Ketua



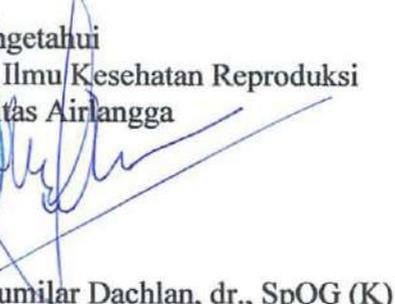
Dr. Hudi Winarso, dr., MKes. SpAnd
NIP. 131 653 739

Pembimbing



Dr. Alfiah Hayati, Dra., Mkes
NIP.130 801 398

Mengetahui
Ketua Program Studi Ilmu Kesehatan Reproduksi
Universitas Airlangga



Prof. Dr. Erry Gumilar Dachlan, dr., SpOG (K)
NIP. 140 092 103

**Tesis ini telah diuji dan dinilai
oleh panitia penguji pada
Program Pascasarjana Universitas Airlangga
Pada tanggal 14 Agustus 2009**

Panitia Penguji,

1. **Dr. Hudi Winarso,dr., MKes., SpAnd**
2. **Dr. Alfiah Hayati, Dra., MKes**
3. **Prof. Dr. Paulus Libens, dr., MS**
4. **dr. Aucky Hinting, PhD, SpAnd**
5. **Dr. Hari Basuki Notobroto, dr., MKes**

UCAPAN TERIMA KASIH

Bismilahirrahmannirrahim

Assalamu'alaikum Warahmatullohiwabarakatah

Dengan memanjatkan puji syukur kehadirat Alloh Subhanawataalla atas segala rahmad dan inayahNya sehingga saya dapat menyelesaikan penelitian

Ucapan terima kasih yang tak terhingga dan penghargaan yang setinggi-tingginya saya sampaikan kepada Dr.,Hudi Winarso, dr., MKes.,Sp.And., sebagai pembimbing ketua yang dengan penuh perhatian dan kesabaran memberikan dorongan, bimbingan dan saran dalam penyusunan proposal, persiapan dan pelaksanaan penelitian hingga selesainya tesis ini.

Terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya juga saya sampaikan kepada Dr. Alfiah hayati, dra., MKes selaku pembimbing yang dengan penuh perhatian, kesabaran untuk memberikan bimbingan dan saran dalam penyusunan proposal, persiapan dan pelaksanaan penelitian hingga selesainya tesis ini.

Dengan selesainya tesis ini , perkenankan saya mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada beberapa pihak :

1. Rektor Universitas Airlangga Prof. Dr., Fasich, Apt yang telah memberikan ijin dan kesempatan menjadi mahasiswa di Program Pascasarjana Universitas Airlangga
2. Rektor Universitas Muhammadiyah Surabaya Prof. Dr., Zainnudin Maliki MSi yang telah memberikan ijin untuk menempuh pendidikan di Program Pascasarjana Universitas Airlangga
3. Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Prof. Dr., Muhammad Amin dr SpP (K) yang telah memberikan kesempatan menjadi mahasiswa di Program Pascasarjana Universitas Airlangga
4. Dekan Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Surabaya H Sukadiono, dr., MM yang telah memberikan ijin untuk menempuh pendidikan di Program Pascasarjana Universitas Airlangga
5. Prof. Dr.Erry Gumilar Dachlan,dr.,SpOG (K) selaku Ketua Program Studi Ilmu Kesehatan Reproduksi yang telah mengijinkan saya menempuh pendidikan di Program Pascasarjana Universitas Airlangga

6. Prof Dr Paulus Liben dr MS, Dr. Hari Basuki Notobroto, dr.,MKes, dr.Aucky Hinting, PHd.,SpAnd, selaku tim penguji yang telah banyak memberikan masukan, saran dan bimbingan selama penelitian dan penyusunan tesis
7. Prof. Dr. Laba Mahaputra, drh., MSc, dan seluruh staff di Fakultas Kedokteran Hewan yang telah banyak memberikan bantuan dan dukungan dalam melaksanakan penelitian
8. Nur Mukarromah, SKM, MKes dan Pipit Festy, SKM yang telah banyak memberikan bantuan dan dukungan dalam menyelesaikan penelitian
9. Semua dosen pengajar Program Studi Ilmu Kesehatan Reproduksi yang banyak membantu selama menepuh pendidikan
10. Semua staf dan karyawan Program Pasca Sarjana Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga yang telah memberikan dukungan dan bantuan selama saya menepuh pendidikan
11. Semua staf dan karyawan Departemen Biologi Fakultas Saintek Universitas Airlangga yang telah memberikan dukungan dan bantuan selama saya melakukan penelitian
12. Semua teman- teman di FIK UM. Surabaya yang telah memberikan dukungan dan semangat dalam menyelesaikan program pendidikan
13. Kedua orang tuaku, bapak H. Kaslik dan ibu Maryam (alm) tercinta atas limpahan kasih sayang disertai ucapan terima kasih yang tiada hingga atas segala doa, jerih payah, dukungan dan pengorbanan tiada pernah terbalaskan selama saya menempuh pendidikan hingga selesai
14. Suamiku tercinta (Imam Thonthowi), atas uluran cinta dan kasih sayang juga limpahan semangat yang tiada henti selama menempuh pendidikan sehingga penulis dapat menyelesaikan Pendidikan Program Pascasarjana Universitas Airlangga
15. Kakak dan adik-adikku yang selalu memberikan dukungan dan semangat yang tiada henti selama menyelesaikan pendidikan di Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga

16. Semua pihak yang telah membantu kami yang tiada dapat kami sebut satu persatu

Akhirnya saya gelar Pasca Sarjana ini untuk agamaku, negaraku, bapak-ibu, dan suamiku. Dengan segenap kerendahan hati penulis mohon maaf atas segala kekurangan yang ada., semoga Alloh Subhanawataalla senantiasa melimpahkan rahmat, hidayah-Nya dan melapangkan jalan kita sekalian. Amin.

Wassalamu'alaikum Warohmatullohi Wabarokatuh.

Surabaya, Agustus 2009

RINGKASAN

EFEK 2-METHOXYETHANOL TERHADAP KADAR TESTOSTERON DAN HISTOLOGIS TESTIS MENCIT (*MUS MUSCULUS L*)

Senyawa 2- *Methoxyethanol* (2-ME) merupakan salah satu bahan kimia yang berasal dari hasil metabolit dari *dimethoxyetilphthalate* (DMEP) dari kelompok *phthalic acid ester* (PAEs) yang digunakan sebagai *plastizier* dalam pembuatan plastik. Senyawa ini masuk ke dalam tubuh manusia melalui makanan dan minuman yang dikonsumsi dan terkontaminasi atau diserap oleh kulit saat terjadi kontak langsung. Senyawa 2-ME yang diberikan pada hewan coba dapat menyebabkan toksisitas pada sistem reproduksinya dan testis sebagai organ sasaran utama. Terjadinya gangguan pada organ reproduksi dapat menyebabkan kerusakan sel-sel spermatogenik (spermatogenesis) dan juga proses steroidogenesis. Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji kadar testosteron dan histologis testis (jumlah spermatogonia, spermatosit primer dan spermatid oval) yang diberi 2-ME dengan cara injeksi subcutan dengan variasi dosis selama 12 hari.

Rancangan yang digunakan dalam penelitian ini adalah rancangan acak lengkap (RAL). Unit eksperimen pada penelitian ini adalah mencit jantan (*Mus musculus*) strain BALB/C dewasa, umur 6-8 minggu dan berat badan 28-30 g. Penelitian ini terdiri dari 3 kelompok dengan masing-masing 10 ekor yang terdiri dari dua kelompok perlakuan yang diberikan 2-ME dosis 50 dan 100 mg/kg BB dan satu kelompok kontrol yang diberi NaCl 0,9% secara subkutan. Dalam penelitian ini adalah dosis 2-ME sebagai variabel independen, kadar testosteron dan histologis testis (jumlah spermatogonia, spermatosit primer dan spermatid oval) sebagai variabel dependen. Pengukuran kadar testosteron dengan menggunakan *RadiolImunoAssay* terhadap serum darah mencit yang diambil secara intrakardiak. Sel spermatogonia, spermatosit primer dan spermatid oval dibuat preparat dengan pewarnaan Haematoxillin Eosin dan dihitung dengan mikroskop pembesaran 400X

Analisis data menggunakan uji Kruskal Wallis pada data dengan distribusi tidak normal (kadar testosteron) sedangkan untuk jumlah spermatogonia, spermatosit primer

dan spermatid oval berdistribusi normal dianalisis dengan Anova satu arah untuk mengetahui adanya perbedaan.

Hasil penelitian menunjukkan terjadi penurunan kadar testosteron yang signifikan dengan ($p= 0,002$), dengan rata-rata dan SD pada kelompok yang diinjeksi NaCl 0,9%, yaitu $58,70 \pm 27,14$, sedang kelompok dengan 2-ME dosis 50 dan 100 mg/ kg BB dan $124,40 \pm 174,09$ dan $19,50 \pm 11,19$ sedangkan untuk histologis testis dilihat dari jumlah spermatogonia dan spermatosit primer terjadi penurunan yang signifikan ($p = 0,008$ dan $p =0,050$) dengan rata- rata dan SD spermatogonia adalah $65,060 \pm 6,090$ (kelompok yang diinjeksi NaCl) dan untuk yang diinjeksi 2-ME dosis 50 dan 100 mg/kg BB yaitu $57,490 \pm 6,834$ dan $56,520 \pm 5,280$. Untuk spermatosit primer rata-rata dan SD kelompok yang diinjeksi NaCl 0,9% adalah $79,440 \pm 5,770$, sedangkan kelompok yang di injeksi 2-ME 50 dan 100 mg/kg BB adalah $76,740 \pm 8,462$ dan $71,820 \pm 5,302$ sedangkan jumlah spermatid meningkat dengan $p = 0,86$

Kesimpulan penelitian ini adalah pemberian 2-ME dengan dosis 50 dan 100 mg/kg BB dapat menurunkan kadar testosteron dan jumlah sel spermatogonia dan spermatosit primer

SUMMARY

EFFECT OF 2-METHOXYETHANOL ON MICE (*MUS MUSCULUS L*) TESTOSTERONE CONCENTRATION AND TESTICULAR HISTOLOGY

2-Methoxyethanol (2-ME) is one of chemical agents that is derived from the metabolite of dimethoxyethylphthalate (DMEP) from the group phthalic acid ester (PAEs) used as plastizier in producing plastics. This compound enters human body through food or drink consumed, contaminated, or absorbed by the skin in a direct contact. The compound 2-ME given to experimental animals were found to produce toxicity in reproductive system and the testis as the primary target organs. Abnormality in reproductive organs may lead to the damage of spermatogenic cells (spermatogenesis) and the steroidogenetic process as well. The objective of this study was to test testoteron concentration and the histology of the testis (the number of spermatogonia, primary spermatocyte, and oval spermatid) that was given with 2-ME through subcutaneous injection in a varied dose for 12 days.

This study used complete randomized design. The experimental unit in this study comprised adult male Balb/c strain mice (*Mus musculus*), aged 6-8 weeks with body weight of 28-30 g. The animals were classified into 3 groups, each each comprising 10 mice. Two groups served as treatment groups, receiving 2-ME of 50 and 100 mg/kg BW, and one group served as control receiving subcutaneous 0.9% NaCl. In this study, the 2-ME dose served as independent variable, while testosterone concentration and the histology of the testis (the number of spermatogonia, primary spermatocyte, and oval spermatid) served as dependent variable. The measurement of testosterone level was performed using Radiouimmunoassay to mice blood serum taken intracardially. Spermatogonia, primary spermatocyte, and oval spermatid were prepared using Hematoxylin eosin staining and microscope with magnification of 400 x. Data analysis were carried out with Kruskal Wallis test in data with abnormal distribution (testosterone concentration), while the number of spermatogonia, primary spermatocyte, and

oval spermatid that had normal distribution were analyzed with one-way Anova to find the presence of difference.

Results showed significant reduction in testosterone concentration with $p = 0.002$, with mean and SD for group receiving subcutaneous 0.9% NaCl is $58,70 \pm 27,14$, and treatment groups with receiving 2-ME of 50 and 100 mg/kg BW is $124,40 \pm 174,09$ and $19,50 \pm 11,19$ regarding testicular histology, the number of spermatogonia and primary spermatocyte showed significant reduction ($p = 0.008$ and $p = 0.050$), with mean and SD for spermatogonia is $65,060 \pm 6,090$ (group receiving subcutaneous 0.9% NaC) and treatment groups with receiving 2-ME of 50 and 100 mg/kg BW is $57,490 \pm 6,834$ and $56,520 \pm 5,280$. For primary spermatocyte. mean and SD group receiving subcutaneous 0.9% NaCl is $79,440 \pm 5,770$, while treatment groups with receiving 2-ME of 50 and 100 mg/kg BW is $76,740 \pm 8,462$ and $71,820 \pm 5,302$ while spermatid count increased with $p = 0.86$.

In conclusion, the administration of 2-ME in doses of 50 and 100 mg/kgBW can reduce testosterone concentration as well as the number of spermatogonia and primary spermatocyte.

ABSTRACT

EFFECT OF 2-METHOXYETHANOL ON MICE (*MUS MUSCULUS L*) TESTOSTERONE CONCENTRATION AND TESTICULAR HISTOLOGY

2-Methoxyethanol (2-ME) is one of chemical agents that is derived from the metabolite of dimethoxyethylphthalate (DMEP) from the group phthalic acid ester (PAEs) used as plastizier in producing plastics. The compound 2-ME given to experimental animals were found to produce toxicity in reproductive system and the testis as the primary target organs, and may lead to the damage of spermatogenic cells (spermatogenesis) and the steroidogenetic process as well. The objective of this study was to test testosterone concentration and the histology of the testis (the number of spermatogonia, primary spermatocyte, and oval spermatid) that was given with 2-ME through subcutaneous injection in a varied dose. This study used complete randomized design. The experimental unit in this study comprised adult male Balb/c strain mice (*Mus musculus*), aged 6-8 weeks with body weight of 28-30 g. The animals were classified into 3 groups, each group comprising 10 mice. Two groups served as treatment groups, receiving 2-ME of 50 and 100 mg/kg BW, and one group served as control receiving subcutaneous 0.9% NaCl for 12 days.

Results showed significant reduction in testosterone concentration with $p = 0.002$, and, regarding testicular histology, the number of spermatogonia and primary spermatocyte showed significant reduction ($p = 0.008$ and $p = 0.050$), while spermatid count increased with $p = 0.86$, with a conclusion that 2-ME reduces testosterone concentration as well as the number of spermatogonia and primary spermatocyte.

Keywords: 2-methoxyethanol, testosterone, spermatogonia,
primary spermatocyte, oval spermatid

DAFTAR ISI

Halaman

Sampul Depan	i
Sampul Dalam	ii
Prasarat Gelar	iii
Lembar persetujuan	iv
Lembar penetapan panitia penguji	v
Ucapan terima Kasih.....	viii
Ringkasan.....	x
<i>Summary</i>	xii
<i>Abstrac</i>	xiii
DAFTAR ISI	xv
DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR GAMBAR	xvii
DAFTAR LAMPIRAN	xviii
DAFTAR SINGKATAN	
BAB 1 PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.3.1 Tujuan umum	4
1.3.2 Tujuan Khusus	4
1.4 Manfaat Penelitian	5
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Senyawa 2-ME (methoxyethanol)	6
2.1.1 Toksisitas senyawa 2-ME	7
2.1.2 Mekanisme toksisitas 2-ME	8
2.2 Testosteron	10
2.2.1 Transport testosteron di dalam darah	13
2.2.2 Sistesa androgen	15
2.3 Sistem Reproduksi Mencit Jantan.....	15
2.3.1 Stuktur anatomi testis	16
2.3.2 Struktur histologis testis	16
2.4 Poros Hipotalamus – Hipofise – Testis	23
2.5 Hewan Percobaan	24
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN	
3.1 Kerangka Konseptual Penelitian	27
3.2 Penjelasan Kerangka Konseptual	28
3.3 Hipotesis Penelitian	28

MILK
PERTUNJUKAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SUBABAYA

BAB 4 MATERI DAN METODE PENELITIAN	Halaman
4.1 Rancangan Penelitian	30
4.2 Bagan Rancangan Penelitian	30
4.3 Kerangka Operasional Penelitian	31
4.4 Unit Eksperimen dan Replikasi	32
4.4 Variabel Penelitian	33
4.6 Definisi Operasional	33
4.7 Bahan Dan Alat Penelitian	34
4.7.1 Hewan coba	34
4.7.2 Bahan kimia	34
4.8 Alat Penelitian	35
4.9 Tempat Dan Waktu Penelitian	35
4.10 Prosedur Penelitian	35
 BAB 5 ANALISIS HASIL PENELITIAN	
5.1 Hasil Pengukuran Dan Analisis Kadar Testosteron.....	41
5.2 Hasil Pengukuran Dan Analisis Data Jumlah Spermatogonia, Spermatisit Primer dan Spermatid Oval.....	42
5.2.1 Hasil pengukuran dan analisis data jumlah spermatogonia.....	43
5.2.2 Hasil pengukuran dan analisis data jumlah spermatisit primer.....	45
5.2.3 Hasil pengukuran dan analisis data jumlah spermatid oval.....	46
 BAB 6 PEMBAHASAN	
6.1 Efek Pemaparan 2-ME Menurunkan Kadar Testosteron.....	47
6.2 Efek Pemaparan 2-ME Menurunkan Jumlah Spermatogonia, Spermatisit Primer Dan Spermatid Oval.....	49
 BAB 7 PENUTUP	
7.1 Kesimpulan.....	53
7.2 Saran.....	53
DAFTAR PUSTAKA	54
LAMPIRAN	58

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 4.1. Bagan penentuan lama perlakuan dan dosis 2-ME	36
Tabel 5.1. Hasil analisis data kadar testosteron untuk semua kelompok Kontrol dan kelompok perlakuan 2-ME dengan variasi dosis...	41
Tabel 5.2 Uji perbedaan kadar testosteron anatar kelompok (Wilcoxon Man Whitney).....	42
Tabel 5.3 Analisis jumlah spermatogonia untuk kelompok kontrol, kelompok perlakuan yang diinjeksi 2-ME subkutan dosis 50 dan 100 mg/kg BB	43
Tabel 5.4 Uji BNT perbedaan jumlah spermatogonia antar kelompok.....	44
Tabel 5.5 Analisis jumlah spermatisit primer untuk kelompok kontrol, kelompok perlakuan yang diinjeksi 2-ME subkutan dosis 50 dan 100 mg/kg BB	45
Tabel 5.6 Uji BNT perbedaan jumlah spermatisit primer antar kelompok	45
Tabel 5.7 Analisis jumlah spermatid oval pada kelompok kontrol, kelompok perlakuan yang diinjeksi 2-ME subkutan dosis 50 dan 100 mg/kg BB.....	46

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Biosintesis Androgen dalam sel Leydig.....	15
Gambar 2.2 Proses spermatogenesis.....	21
Gambar 2.3 Irisan tubulus seminiferus.....	22
Gambar 2.4 <i>Mus musculus</i>	25
Gambar 3.1 Kerangka Konseptual penelitian.....	27
Gambar 4.1 Bagan rancangan penelitian.....	30
Gambar 4.2 Kerangka operasional penelitian efek 2-ME terhadap Testosteron dan histologis mencit.....	31

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Konversi perhitungan dosis untuk beberapa jenis hewan Dan manusia	58
Lampiran 2. Pembuatan Sediaan Histologis Tetis	59
Lampiran 3. Pemeriksaan Kadar Testosteron	61
Lampiran 4. Hasil pemeriksaan kadar testosteron dan jumlah spermatogonia, spermatisit primer dan spermatid oval	65
Lampiran 5. Hasil Analisis Uji Statistik	67
Lampiran 6. Berat Badan Hewan coba	77
Lampiran 7. Kurva standart hormon testosteron	79

DAFTAR SINGKATAN

AR	: Androgen Reseptor
ABP	: Androgen Binding Protein
BB	: Berat Badan
BNT	: Beda Nyata Terkecil
Ca ²⁺	: Calsium
FSH	: Folikel Stimulating Hormone
FSH-RH	: Folikel Stimulating Hormone-Releasing Hormone
2-ME	: 2-Methoxyethanol
DMEP	: Dimethoxyetilphatalate
PAEs	: Phtalic Acid ester
MALD	: Methoxyacetic Aldehyd
MAA	: Methoxyacetic Acid
LH	: Luteinizing Hormone
ELP	: Endozepine like peptide
Pmods	: Peritubular modifikasi
SHBG	: Gonadotropin Releasing Hormone
LHRH	: Luteinizing Hormon Releasing Hormone
ICSH	: Interstitial Stimulating Hormon
g	: gram
RAL	: Rancangan Acak Lengkap
NaCl	: Natrium Chlorida
ml	: mililiter
NSB	: Net Spesifik Binding
mg	: miligram
ng	: nanogram
kg	: kilogram
μl	: mikroliter
α	: alfa
β	:Beta

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Senyawa 2- *Methoxyethanol* (2-ME) atau *ethylene glycol monomethyl ester* (EGME) merupakan salah satu bahan kimia yang berasal dari hasil metabolit dari *dimethoxyetilphthalate* (DMEP) dari kelompok *phthalic acid ester* (PAEs) yang digunakan sebagai *plastizier* dalam pembuatan plastik dan dalam kehidupan sehari-hari yang banyak digunakan untuk kepentingan manusia misalnya peralatan rumah tangga, pipa air, mainan anak-anak, pelarut cat, tinta dan vernis serta bahan dari berbagai peralatan kedokteran atau kesehatan. Senyawa ini mudah terbakar, bersifat labil, dan mudah larut dalam air atau pelarut organik. Selain memberikan manfaat bagi kehidupan manusia, plastik juga menimbulkan dampak negatif. Salah satu dampak negatif adalah membahayakan terhadap kesehatan manusia. Hal ini dapat terjadi karena ikatan PAEs dengan matriks polimer plastik tidak stabil sehingga dapat luruh oleh pelarut organik, serta dapat masuk kedalam tubuh hewan dan manusia lalu menyebar ke berbagai organ dalam tubuh. Senyawa ini masuk ke dalam tubuh manusia melalui makanan dan minuman yang dikonsumsi dan diserap oleh kulit saat terjadi kontak langsung. Di dalam tubuh hewan dan manusia, 2-ME dioksidasi oleh *alkohol dehidrogenase* menjadi *2-methoxyacetaldehyde* (MALD) yang kemudian dimetabolisme lebih lanjut oleh *aldehyde dehidrogenase* menjadi *2-methoxyacetic acid* (MAA) yang bersifat toksik (Moslen, 1995; Kim dan Smialowicz, 1997).

Konversi 2-ME dalam serum menjadi MAA berlangsung cepat dengan waktu paruh MAA kurang lebih 0,6 jam pada tikus. Toksisitas 2-ME pada pekerja industri kimia yang menggunakan 2-ME mempunyai resiko infertilitas 1,73 kali dari pekerja lain. Dosis aman terhadap senyawa 2-ME melalui pencemaran udara adalah 0,1-0,9 ppm dan melalui kontak langsung dengan kulit adalah 0,25-3 mg/m³. Besar dosis pencemaran 2-ME di lingkungan tempat bekerja yang telah tercatat antara lain pada pekerja reparasi mobil 3-16 mg/m³, buruh industri 1-23 mg/m³, pekerja printing 3-16 mg/m³ dan pengecat 6-137 mg/m³ (Sweeney, 2001). Mekanisme toksisitas MAA adalah melalui peningkatan permeabilitas membran sel. Keadaan ini mengakibatkan influks Ca²⁺ berlebih, sehingga mengganggu keseimbangan ionik di dalam sitoplasma sel. Keadaan ini mengakibatkan kerusakan sel dan dapat mengarah pada kematian sel (Rumanta, 2001).

Pemberian 2-ME pada tikus dengan dosis 150 mg/kgBB menginduksi terjadinya lesi pada testis, vakuolisasi sel sertoli yang disertai dengan degenerasi spermatisit pada tahap akhir (Barone, 2005). Pemaparan 2-ME dengan dosis 200 mg/kg BB dalam jangka pendek meskipun menimbulkan kerusakan pada testis namun dalam waktu kurang dari 4 minggu dapat pulih kembali (*recovery*) seperti keadaan normal (Hayati, 2005).

Penelitian lain menyatakan bahwa peningkatan kelainan spermatozoa dikarenakan senyawa MAA menurunkan aktivitas *androgen reseptor* (AR) di sel Sertoli. Gangguan ini menyebabkan terjadinya penurunan kadar *androgen binding protein* (ABP) yang diperlukan dalam perkembangan sel spermatogenik menjadi spermatozoa dewasa (Tirado, 2007). Gray (1985), juga menyatakan

senyawa MAA dapat menghambat produksi laktat pada kultur sel Sertoli yang merupakan sumber energi bagi spermatosit yang sedang tumbuh.

Dalam perkembangannya, spermatozoa terbentuk karena adanya stimulasi LH pada fungsi sel Leydig untuk menghasilkan seks hormon. Aktifitas *adenilsilase* dan meningkatnya kadar siklik AMP yang dirangsang oleh LH menyebabkan hormon ini timbulnya ikatan dengan reseptor pada dinding sel Leydig sehingga mengaktifkan testosteron. Menurut Davies (1990) testosteron dan FSH bekerja secara sinergis untuk mendorong perubahan spermatosit primer menjadi spermatosit sekunder, kemudian memasuki proses meiosis dan dilanjutkan oleh proses spermiogenesis sehingga menghasilkan spermatid .

Dengan demikian dapat dikatakan bahwa spermatogenesis dikendalikan interaksi hormon testosteron, FSH, LH akan menyebabkan gangguan pada proses spermatogenesis yang terjadi di dalam testis. Perubahan histologis pada testis merupakan salah satu penyebab terganggunya proses spermatogenesis yang pada akhirnya dapat menyebabkan infertilitas. Gangguan tersebut diantaranya disebabkan oleh bahan toksikan

Pemberian 2-ME dengan dosis 100 mg/kg BB selama 21 hari dapat menurunkan berat testis dan epididimis pada mencit, sedangkan dengan pemberian dosis 500 mg/kg BB dapat terjadi kematian (*lethal dosse*). Informasi tentang efek 2-ME dengan berbagai dosis dan lama pemberian terhadap sistem reproduksi telah banyak di informasikan, tetapi untuk pemberian dalam waktu singkat (12 hari) dan efeknya pada kadar testosteron belum diketahui. Berdasarkan uraian diatas maka perlu dilakukan penelitian untuk mengkaji kadar

testosteron dan histologis testis (jumlah spermatogonia, spermatosit primer dan spermatid oval) pada mencit yang diinduksi dengan 2- ME dengan variasi dosis .

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah dikemukakan, dirumuskan masalah sebagai berikut :

1. Apakah pemaparan 2-ME dapat menurunkan jumlah kadar testosteron mencit ?
2. Apakah pemaparan 2-ME dapat menurunkan jumlah spermatogonia, spermatosit primer dan spermatid oval pada mencit ?

1.3. Tujuan penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Mengetahui efek 2-ME terhadap kadar testosteron dan histologis testis pada mencit

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Membuktikan pemaparan 2-ME dapat menurunkan kadar testosteron pada mencit
2. Membuktikan pemaparan 2-ME dapat menurunkan jumlah spermatogonia, spermatosit primer dan spermatid oval pada mencit

1.4. Manfaat Penelitian

1. Hasil penelitian ini dapat menjadi informasi tentang efek 2-ME pada dosis 50 dan 100 mg/kgBB bagi peneliti selanjutnya dengan waktu dan obyek yang berbeda
2. Memberikan informasi bahwa zat toksikan (2- ME) dapat mempengaruhi hormon testosteron dan spermatogenesis yang dapat berakibat terjadinya gangguan fertilitas pada pria
3. Hasil penelitian ini dapat menjadi masukan dalam lingkungan industri (buruh printing, reparasi mobil, tukang vernis dan cat) untuk lebih memperhatikan keselamatan kerja dengan menggunakan alat pelindung diri seperti masker dan sarung tangan saat kontak dengan bahan toksikan (2-ME)

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Senyawa 2-Methoxyethanol (2-ME)

Di dalam tubuh, senyawa 2-ME bersifat toksik dan teratogenik (Yoon, 2001). Senyawa ini merupakan salah satu senyawa dari kelompok ester falat yaitu cairan dengan sifat yang sesuai (*plasticizer*) yang ditambahkan untuk mensintesis polimer untuk memberikan kelenturan, kemuluran, dan kemudahan untuk dikerjakan menjadi bentuk lain. Tanpa penambahan *plasticizer*, kebanyakan plastik adalah padatan yang keras dan rapuh. Penambahan *plasticizer* ini dapat menghasilkan penurunan suhu peralihan gelas sampai di bawah suhu ruang. Plastik dalam kehidupan sehari-hari sangat banyak digunakan untuk kepentingan manusia, misalnya untuk peralatan rumah tangga, bahan pengemas, pipa air, barang mainan anak-anak, dan berbagai peralatan kedokteran atau kesehatan (Connell dan Miller, 1995).

Senyawa 2-ME juga merupakan hasil metabolit dari DMEP. Senyawa ini mempunyai rumus molekul $C_3H_8O_2$. DMEP ini merupakan salah satu kelompok senyawa yang paling toksik dari PAEs. Senyawa 2-ME bersifat stabil, tidak berwarna, mudah terbakar dengan bau eter yang ringan dan memiliki titik didih pada suhu $124,6^{\circ}C$ dan titik beku pada suhu $-84^{\circ}C$ (Denkhaus *et al.*, 1990). Oleh karena itu 2-ME juga digunakan pada industri pelarut cat, pelarut selulosa asetat, fernis, cat kuku, dan pewarna kayu. Beberapa senyawa dari senyawa ini digunakan sebagai fiksatif parfum dan pembuatan *photographic film* (Sax dan Lewiss, 1989).

Senyawa 2-ME yang masuk ke dalam tubuh akan dimetabolisme lebih lanjut menjadi senyawa *dimethoxyaldehyde* (MALD) dengan katalisator *alcohol dehidrogenase*, kemudian dibiokanformasikan lagi oleh *aldehyde dehidrogenase* menjadi *methoxyacetic acid* (MAA). Metabolisme senyawa ini terjadi dalam organ hati, selanjutnya senyawa 2-ME juga dengan cepat disebarkan oleh darah ke semua sel dan jaringan kecuali jaringan adipose (lemak), karena senyawa ini tidak larut dalam lemak (Johanson, 2000).

2.1.1 Toksisitas senyawa 2-ME

Senyawa 2-ME yang diberikan pada hewan coba dapat menyebabkan toksisitas pada sistem reproduksinya. Selain organ hati, organ reproduksi jantan (testis) juga mampu melakukan metabolisme 2-ME melalui *alcohol dehidrogenase* (hanya terjadi pada tikus dan mencit tetapi tidak pada kelinci, kucing, anjing, atau manusia) dan *aldehyde dehidrogenase* menjadi MAA. Senyawa MAA ini dapat masuk ke dalam testis melalui sirkulasi darah. Senyawa ini menyebabkan stres oksidasi pada sel germinal dan sel somatik (sel Sertoli). Stres oksidasi dapat menghambat sintesis DNA dan RNA, khususnya pada sel spermatosit primer tahap pakhiten. Sel spermatosit primer merupakan sel yang aktif membelah (mitosis) sehingga sel ini sangat sensitif terhadap bahan toksik seperti 2-ME dan MAA sehingga menyebabkan degenerasi (Barone, 2005).

Pada mencit jantan, pemberian 200 mg/kg selama 21 hari menyebabkan kerusakan testis sehingga menyebabkan penurunan diameter dan tebal epitel tubulus seminiferus serta jumlah spermatosit dan spermatid dibandingkan kontrol (Hayati *et al.*, 2004). Tetapi efek 2-ME dalam jangka waktu yang pendek ini dapat

pulih kembali (*recovery*) seperti keadaan normal dalam waktu kurang lebih 4 minggu. Hal ini menunjukkan kerusakan sel yang disebabkan oleh toksikan 2-ME bersifat *reversible* pada jangka waktu pendek (Hayati, 2005). Pemaparan 2-ME pada jangka waktu panjang (lebih dari 1-1,5 tahun) menyebabkan kerusakan yang *irreversible* (Moslen *et al.*, 1995). Menurut Wang dan Chapin (2000), pemberian 500 mg/kg 2-ME dosis tunggal pada mencit, menyebabkan kerusakan pada testisnya. Kerusakan ini ditandai dengan adanya perbedaan ekspresi gen pada testis dibanding kelompok kontrol. Pemaparan senyawa 2-ME dengan dosis 150 mg/kg berat badan dapat menginduksi terjadinya lesi pada testis, vakuola sel Sertoli, dan degenerasi spermatosit pada tahap akhir (Barone, 2005). Dosis 200 mg/kg berat badan selama 3 minggu menimbulkan kerusakan sel spermatogenik, penurunan diameter dan tebal epitel tubulus seminiferus serta penurunan jumlah spermatosit (Hayati, 2004). Yoon (2001), melakukan penelitian menggunakan dosis 50, 100, 200, dan 400 mg/kg berat badan pada hewan coba tikus dan hasilnya menunjukkan adanya penurunan berat testis dan berat epididimis yang signifikan jika dibandingkan dengan kontrol.

2.1.2 Mekanisme toksisitas Senyawa 2-ME

Interaksi antara bahan toksikan dan organisme tergantung dari dua hal, yaitu organisme dan bahan toksikan. Di dalam organisme, interaksi terjadi melalui proses penyerapan, peredaran, metabolisme, dan pembuangan (Johanson, 2000). Batas pengawasan yang aman terhadap senyawa 2-ME melalui pencemaran udara adalah 0,1-0,9 ppm dan melalui kontak langsung dengan kulit adalah 0,25-3 mg/m³. Besar dosis pencemaran 2-ME di lingkungan tempat bekerja yang telah

tercatat pada penelitian sebelumnya antara lain pada pekerja reparasi mobil 3-16 mg/m³, buruh industri 1-23 mg/m³, pekerja printing 3-16 mg/m³ dan pengecat 6-137 mg/m³ (Sweeney, 2001).

Penelitian secara *in vitro* dan menunjukkan bahwa MAA dapat menghambat produksi asam laktat pada kultur sel Sertoli sehingga dapat mengganggu pertumbuhan spermatosit. Hal ini dikarenakan laktat merupakan komponen penting sebagai sumber energi spermatosit yang sedang tumbuh (Gray *et al.*, 1985). Hasil akhir setelah pemaparan senyawa ini akan mengarah pada terjadinya efek toksik dan teratogenik, melalui interaksi antara komponen protein, yaitu sebagai protein transport, protein sitoskeleton atau reseptor neurotransmitter (Rumanta, 2001).

Mekanisme toksisitas MAA antara lain adalah melalui peningkatan permeabilitas membran sel yang mengakibatkan influks ion Ca²⁺ menjadi berlebih. Melimpahnya ion Ca²⁺ dapat menghambat fosforilasi oksidatif, sehingga terjadi pengaktifan *protease* dan *fosfolipase* dapat mendegradasi protein-protein sitoskeleton yang diperlukan dalam membangun struktur sel (Rumanta *et al.*, 2001). Selain itu senyawa MAA dalam tubuh dapat menyebabkan terjadinya stres oksidasi, stres oksidasi dapat meningkatkan kadar radikal bebas dalam sel sehingga menyebabkan oksidasi protein. Oksidasi protein diawali dengan bereaksinya molekul protein dengan radikal OH*, O₂*, atau keduanya sehingga dapat mengubah struktur protein menjadi abnormal. Perubahan struktur tersebut melalui penghambatan pada proses transkripsi dan translasi pada sintesis protein baru (Dukan, 2000) dan terjadi modifikasi asam amino (Kim, 2001).

Senyawa MAA juga dapat menurunkan kadar protein (BM 29-45 kDa) dan transkrip 538 nukleotida pada sel Sertoli. Proses fosforilasi juga menurun sehingga akan menstimuli kematian sel. Pada dosis akut MAA dapat menurunkan kemampuan fertilisasi spermatozoa selama 3-4 minggu setelah perlakuan dan pada dosis kronik menyebabkan kerusakan yang luas dan permanen (Peiris dan Moore, 2001).

Tirado (2007), menyatakan bahwa senyawa MAA dapat menurunkan aktivitas *androgen reseptor* (AR) di sel Sertoli. Gangguan ini menyebabkan terjadinya penurunan kadar *androgen binding protein* (ABP) yang diperlukan dalam perkembangan sel spermatogenik menjadi spermatozoa dewasa. Selain itu, MAA menghambat sintesis protein spesifik *endozepine-like peptide* (ELP) di testis yang berperan dalam metabolisme energi di mitokondria dan merangsang steroidogenesis.

2.2 Testosteron

Testosteron merupakan hormon steroid, disekresi oleh sel- sel Leydig (sel-sel interstitial dalam testis). Testis mensekresi beberapa hormon kelamin pria, yang secara bersama disebut dengan androgen, termasuk testosteron, dehidrotestosteron dan androstenedion. Testosteron jumlahnya lebih banyak dibandingkan dengan lainnya sehingga dapat dianggap sebagai hormon testikular terpenting. Sebagian besar testosteron akan diubah menjadi hormon dehidrotestosteron (Guyton, 1997). Pada hewan jantan androgen diproduksi oleh sel interstitial atau sel Leydig dari testis, dan juga oleh kortek adrenal. Selain itu juga dihasilkan oleh sel- sel theka dari folikel de Graaf. Pada kuda testosteron

juga diproduksi di tubulus seminiferus dan epididimis dalam konsentrasi tinggi (Ismudiono, 1999).

Fungsi lain dari testoseteron adalah fungsi fisiologisnya dalam testis. Testosteron primata nonmanusia merupakan penyebab terbentuknya aktin otot halus dalam sel peritubular selama pematangan testikular prapubertas (Schlatt, 1993). Efek testosteron dikuatkan secara signifikan oleh FSH, sehingga, hormon tersebut dapat dikatakan sebagai salah satu faktor yang terkait secara fisiologis dan bekerja secara lokal dalam testis .

Testosteron menstimulasi produksi faktor-faktor lain dalam sel peritubular, yaitu senyawa peritubular modifikasi (PmodS), yang mempengaruhi sekresi produk sel Sertoli (Skinner, 1993). Meski PmodS telah terbukti sebagai mediator umum interaksi stroma-epitelial dan salah satu faktor yang mempengaruhi kerja prostat, namun dampak fisiologisnya bagi sel Sertoli belum cukup jelas diteliti.

Testosteron merupakan androgen paling penting dan paling banyak terdistribusi dalam darah. Lebih dari 95% androgen yang ada terbentuk dari testis, dan mensintesis 6-7 mg testosteron per hari. Lima persen sisanya dibentuk pada adrenal. Tempat produksi androgen dalam testis adalah sel Leydig. Baik sintesis maupun sekresi androgen, seluruhnya diatur oleh LH di bawah otak dan faktor parakrin lokal (Saez, 1994). Sintesis androgen bermula dari kolesterol, baik yang dibentuk oleh sel melalui endositosis lipoprotein berdensitas rendah maupun melalui sintesa de novo dalam sel Leydig dengan bantuan koenzim A. Di dalam sel sertoli, testosteron diikat oleh reseptor sitolasma membentuk reseptor-T-kompleks, kemudian ditransportasikan ke dalam inti sel dan terikat pada *acceptor*

site di kromatin, yang mengakibatkan terjadinya transkripsi mRNA, dan akhirnya dengan proses translasi membentuk protein khusus yang spesifik. Bahan baku untuk protein spesifik berasal dari protein yang diproduksi dari proses pengaruh FSH terhadap sel. Protein spesifik yang dibentuk oleh sel Sertoli karena pengaruh testosteron itu adalah ABP. Dengan demikian pembentukan ABP dalam pengendalian androgen. ABP yang diproduksi oleh sel Sertoli, mampu mengkonsentrasikan testosteron yang telah diikat oleh ABP diangkut ke tempat lain, misalnya untuk proses perubahan spermatid menjadi spermatozoa muda, dan untuk diangkut ke lain-lain organ, misalnya liver, otak, kulit dan jaringan-jaringan lainnya. Peranan testosteron terdapat pada beberapa tahapan spermatogenesis, misalnya meiosis, dan aktifitas spermatogonia.

Androgen berperan pada deferensiasi seks pria pada janin dan perkembangan pubertas dengan mempengaruhi anatomi atau histologi dan faal testis. Pola kerja testosteron pada sel-sel target tergantung pada perubahan molekul testosteron dalam sitoplasma sebelum diikat oleh reseptor sitoplasma dan diangkut kedalam inti sel target. Telah lama diduga, bahwa kadar testosteron mengikuti siklus diurnal. Kemudian ternyata bahwa hormon lain juga mengalami perubahan diurnal yang berbeda-beda. Menurut beberapa peneliti terdapat perubahan testosteron dalam 24 jam, yaitu rendah pada sore dan malam hari (16.00- 01.00), kemudian meningkat perlahan-lahan, mencapai puncaknya pada jam (04.00 – 09.00), kemudian berkurang pada sore dan malam hari. Sekresi testosteron bersifat *pulsatif* dengan amplitudo yang tidak sama antar individu

dengan jangka kurang lebih setiap 4 jam . Pola episodik ini disebabkan pengaruh LH yang disekresi secara periodik pula (Nieschlag, 1997).

2.2.1 Transpor Testosteron dalam Darah

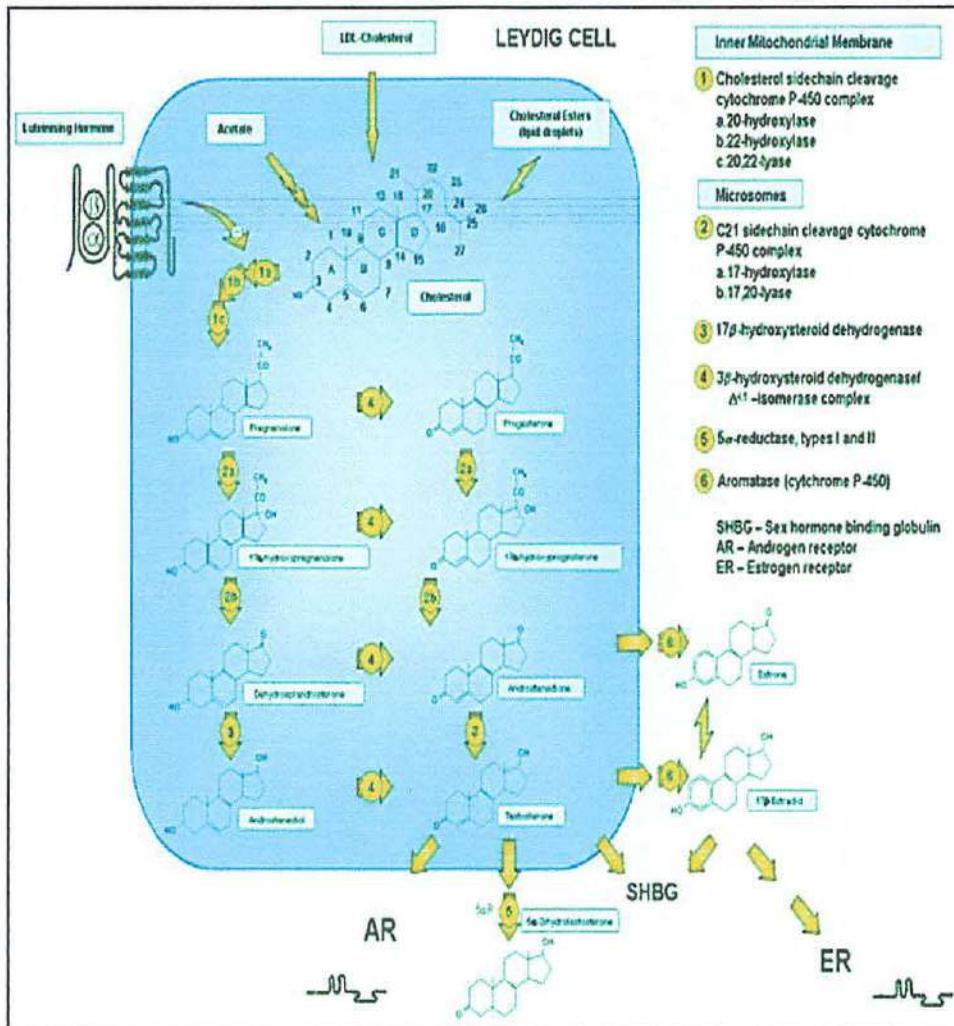
Testosteron terikat pada albumin atau globulin pengikat hormon kelamin (*sex hormone binding globulin*) atau SHBG, yang juga disebut globulin pengikat testosteron-estradiol, dan didistribusikan melalui plasma. SHBG berbentuk β -globulin yang terdiri dari beberapa jenis sub-unit protein yang berbeda. SHBG diproduksi dalam testis dan hati, 30% di antaranya terdiri dari karbohidrat. SHBG memiliki berat molekul sebesar 95 kDa, di mana setiap molekulnya memiliki tempat bagi pengikatan sebuah androgen.

Pada kondisi normal, pria hanya memiliki 2% dari total testosteron yang beredar secara bebas dalam darah, 44% testosteron terikat pada SHBG sedang 54% sisanya terikat pada albumin. Rasio antara testosteron yang terikat pada SHBG dan SHBG bebas proporsional terhadap konsentrasi SHBG. Disosiasi testosteron dari protein-protein pengikat terjadi dalam pembuluh-pembuluh kapiler. Interaksi protein pengikat dan glikokaliks endotelial menyebabkan modifikasi struktural dari titik pengikat hormonal dan dengan demikian akan mengubah afinitasnya. Oleh sebab itu, testosteron berada dalam bentuk bebas dan dapat terdifusi secara bebas dalam sel yang dituju. SHBG juga mampu mengikat estradiol sehingga dapat disebut globulin pengikat testosteron-estradiol. Tipe ikatan yang terjadi akan dipengaruhi oleh isoform SHBG yang berurutan. Konsentrasi SHBG dalam serum diatur oleh hormon. Dalam kondisi normal, pada

pria sehat dengan sendi *hypothalamus-pituitary-testicular* yang lengkap, peningkatan konsentrasi plasma SHBG akan berakibat pada penurunan testosteron bebas secara akut dan simulasi sintesa testosteron secara simultan. Proses ini akan terus berlanjut hingga tercapai konsentrasi normal. Konsentrasi SHBG sendiri berkisar antara 1/3 pada pria dan 1/2 pada wanita.

2.2.2 Sintesa Androgen

Dalam sintesa androgen, dibutuhkan proses pengkonversian kolesterol menjadi testosteron. Transformasi ini meliputi 5 langkah enzimatik dimana jumlah atom C pada kolesterol akan dipotong melalui oksidasi (dari C27 menjadi C19). Transformasi kolesterol diawali dengan pengurangan rantai melalui hidrosilase C22 dan C20, yang diikuti oleh terputusnya ikatan antara C20 dan C22 sehingga terbentuk pregnenolon. Proses selanjutnya terjadi dalam retikulum endoplasma baik melalui jalur $\Delta 4$ maupun $\Delta 5$. Sepanjang jalur $\Delta 4$, pregnenolon terdehidrasi menjadi progesteron dalam bentuk 17- α -hidroksiprogesteron, yang kemudian akan ditransformasi kembali menjadi testosteron. Dalam jalur $\Delta 5$, sintesa testosteron terjadi melalui transformasi 17-hidroksipregnenolon dan dehidroepiandrosteron. Secara umum, reaksi enzimatik dalam sintesa testosteron dipengaruhi LH melalui peningkatan sintesa sitokrom P450_{ssc}, LH juga dapat mengakibatkan efek akut sintesa testosteron melalui peningkatan asosiasi substrat (kolesterol) dengan enzim (sitokrom P450_{ssc}).



Gambar 2.1 *Steroid biosynthesis in the Leydig cell*
(<http://www.endotext.org/male/male2/male2.htm>)

2.3 Sistem Reproduksi Mencit Jantan

Sistem reproduksi mencit jantan terdiri dari organ genital primer dan sekunder. Organ genital primer berupa testis yang berbentuk bulat panjang dengan sumbu memanjang ke arah vertikal. Testis merupakan alat reproduksi utama yang dilengkapi dengan saluran reproduksi: epididimis, ductus deferens, serta kelenjar tambahan yang terdiri dari kelenjar prostat, vesika seminalis,

kelenjar bulbouretralis dan penis bagian luar (Delmann *and* Brown, 1992). Fungsi reproduksi pada jantan adalah untuk memproduksi spermatozoa (spermatogenesis) kinerja kegiatan seksual dan pengaturan fungsi reproduksi oleh berbagai hormon (Guyton, 1997)

2.3.1 Struktur Anatomi Testis

Testis berjumlah sepasang dan berbentuk bulat panjang. Parenkim testis dibungkus oleh tiga lapisan yaitu tunika vaginalis, tunika albugenia dan tunika vaskulosa. Tunika vaginalis terdiri dari dua lapisan yaitu lapisan visceral dan parietal (Gardner, 1960; Dellmann *and* Brown 1992, Junqueira, 1994). Didalam tunika albugenia terdapat trabekula-trabekula yang memanjang menuju posterior pada mediastinum sehingga membentuk septa yang membagi testis menjadi lobuli-lobuli (Copenhaver, 1978, Telford dan Bridgman, 1995, Lindsay, 1996)

Secara anatomis didalam testis mendapat vaskularisasi dari salah satu cabang arteri testikularis yang memasuki testis bagian posterior. Di dalam testis arteri ini menembus tunika albugenia dan masuk tunika vaskulosa. Cabang-cabang arteriol yang lebih kecil mengikuti septula testis masuk ke parenkim dan berakhir sebagai anyaman kapiler (Copenhaver, 1978)

2.3.2 Struktur Histologis Testis

Parenkim testis terbagi menjadi lobus-lobus piramidalis yang berisi tubuli seminiferi. Pada potongan melintang tampak banyak bentukan tubulus seminiferus, di mana satu dengan yang lain dipisahkan oleh jaringan interstitial,

tubulus seminiferus ini menempati 60-80% dari total volume testis (Lesson, 1989).

2.3.2.1 Tubulus Seminiferus

Dinding tubulus seminiferus tersusun oleh tiga lapisan yaitu tunika propia lamina basalis dan lapisan epitel. Tunika propia merupakan lapisan paling luar, yang terdiri dari jaringan ikat fibroelastis yang pipih (Copenhaver, 1978, Jaqueira, 1992). Pada rodensia, lapisan ini terdiri sel polygonal yang disebut dengan myoid. Sel ini mempunyai sifat otot polos dan dapat berkontraksi untuk mengeluarkan sperma dari tubulus seminiferus. Pada primata, tunika propia terdiri dari beberapa lapisan fibroblast (Copenhaver, 1978)

Lapisan epitel terdiri dari dua jenis sel yaitu sel germinal (spermatogenik) dan sel somatik (penyokong) atau sel Sertoli

a. Sel spermatogenik

Menurut Copenhaver (1978), Lesson (1989) Janqueira (1992), Blom dan Fawcett (1994) sel spermatogenik yang terdapat di dalam tubulus seminiferus adalah sebagai berikut :

1) Spermatogonia

Spermatogonia merupakan sel bakal spermatozoa yang terletak pada dasar tubulus seminiferus ada dua jenis spermatogonia yaitu:

- a) spermatogonia tipe A dengan inti sel lonjong berwarna pucat,
- b) spermatogonia tipe B mempunyai inti sel bulat berwarna gelap karena mengandung kromatin padat

2) Spermatisit primer

Sel ini merupakan sel gamet terbesar di dalam tubulus seminiferus. Ketika dibentuk pertama kali, sel-sel terletak di bagian asal tubulus. Dengan berdiferensiasinya sel, maka *tight junction* akan menghilang sehingga memungkinkan berpindahannya spermatisit dari bagian basal ke ruang luminal. Sel berbentuk bulat dengan inti selnya biasanya berada pada fase kariokenesis, ukuran terlihat besar dan terletak di bagian tengah sel. Spermatisit primer mengandung kromosom diploid ($2n$).

3) Spermatisit skunder

Volume spermatisit sekunder kira-kira separuh dari spermatisit primer dan lebih ke arah lumen. Sel ini jarang terlihat pada potongan melintang tubulus seminiferus. Kemudian sel spermatisit sekunder membelah lagi melalui proses meiosis II untuk menghasilkan 4 spermatid yang mengandung kromosom haploid (n).

4) Spermatid

Spermatid terletak dekat lumen, mempunyai sebuah inti bulat yang terletak di tengah sel. Segera setelah spermatid terbentuk langsung menempati permukaan sel sertoli. Spermatid berdiferensiasi menjadi spermatozoa meliputi sejumlah transformasi inti dan sitoplasma. Untuk berkembang menjadi sel spermatozoa terdapat empat tahapan asosiasi sel spermatid dalam testis. Tahapan asosiasi sel spermatid ini berbeda tiap

spesies, pada tikus terdapat 14 tahap dan mencit 12 tahap (O'Donnell, 2001)

5) 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. Spermatozoa adalah sel yang mempunyai ekor yang kuat untuk bergerak, sedikit sitoplasma dan mitokondria yang terletak di ekor sebagai sumber energi untuk bergerak. Ekor spermatozoa terletak pada bagian posterior, inti terletak di bagian kepala spermatozoa. Antara kepala dan leher dihubungkan dengan leher spermatozoa. Inti membawa informasi genetik dari induk jantan (Albert, 1994)

b. Sel Sertoli

Sel Sertoli merupakan sel kolumnar panjang, di mana bagian dasarnya terletak atas lamina basalis tubulus seminiferus. Bentuk sel Sertoli tidak teratur, memiliki cekungan sebagai tempat perlekatan sel spermatogenik. Ujung atas sel sertoli ditempati oleh spermatid (Copenhaver, 1978, Lesson, 1989 Janqueira, 1992, Blom dan Fawcett,1994). Sel sertoli pada manusia mampu memelihara \pm 4 spermatid, sedangkan pada tikus \pm spermatid (Wuryantari dan Moeloek, 2000)

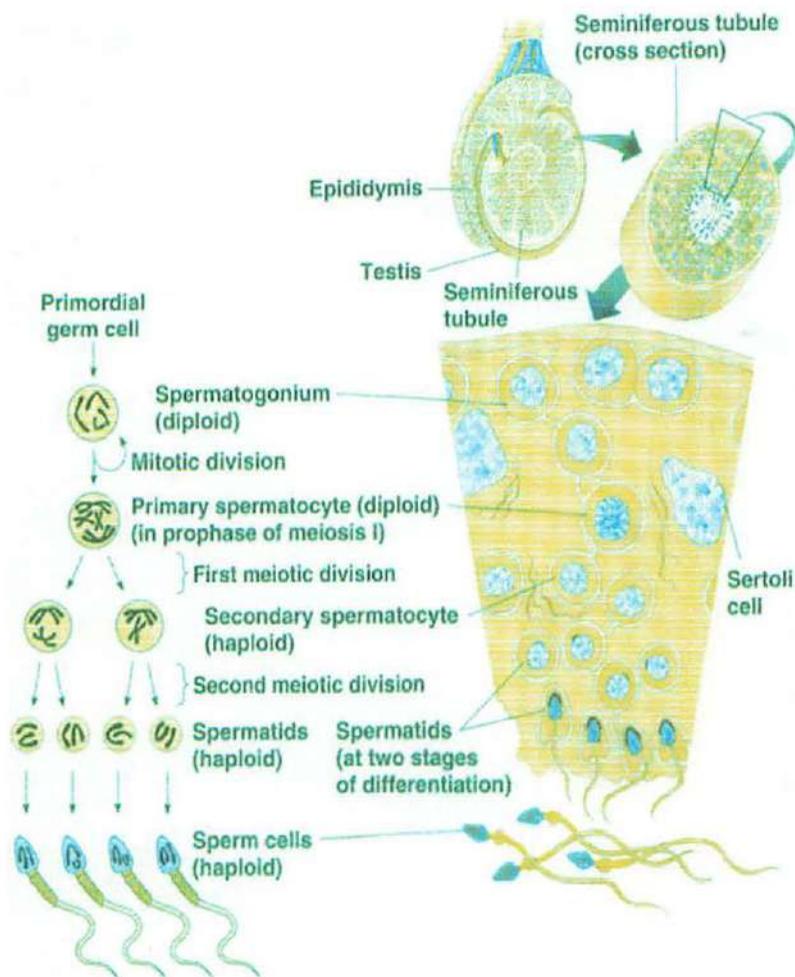
Sitoplasma sel Sertoli tidak tampak pada mikroskop cahaya, hanya inti yang tampak berbentuk polygonal (Jaquiera, 1992, Blom and Fawcet, 1994)

Pemeriksaan mikroskop elektron menunjukkan bahwa sel Sertoli banyak mengandung 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 masa kromatin basofil (Jaquiera, 1992, Blom and Fawcet, 1994).

Fungsi sel Sertoli adalah sebagai berikut :

- 1) penyokong dan penunjang lapisan epitel dan cabang dari sitoplasma sel Sertoli menyokong jembatan sitoplasma penghubung sel-sel spermatogenik
- 2) fagositosis badan-badan residu akan difagositosis dan diabsorpsi oleh lisosom sel Sertoli
- 3) mengkoordinasikan proses spermatogenesis melalui produksi dan sekresi protein, sitokinin, faktor pertumbuhan, steroid, prostaglandin dan lain-lain
- 4) menghasilkan cairan tubulus yang mengandung ion sodium dan dieksresikan ke lumen tubulus seminiferus
- 5) menentukan berat testis dan produksi sperma yaitu korelasi dengan jumlah sel sertoli pada tikus dewasa
- 6) sebagai salah satu komponen sawar darah testis (*blood testis barrier*)

- 7) mensintesis dan mensekresi *androgen binding protein* (ABP), inhibin, dan plasminogen yang merupakan substansi proteolitik yang berperan dalam mengeluarkan sperma ke dalam lumen tubulus seminiferus.



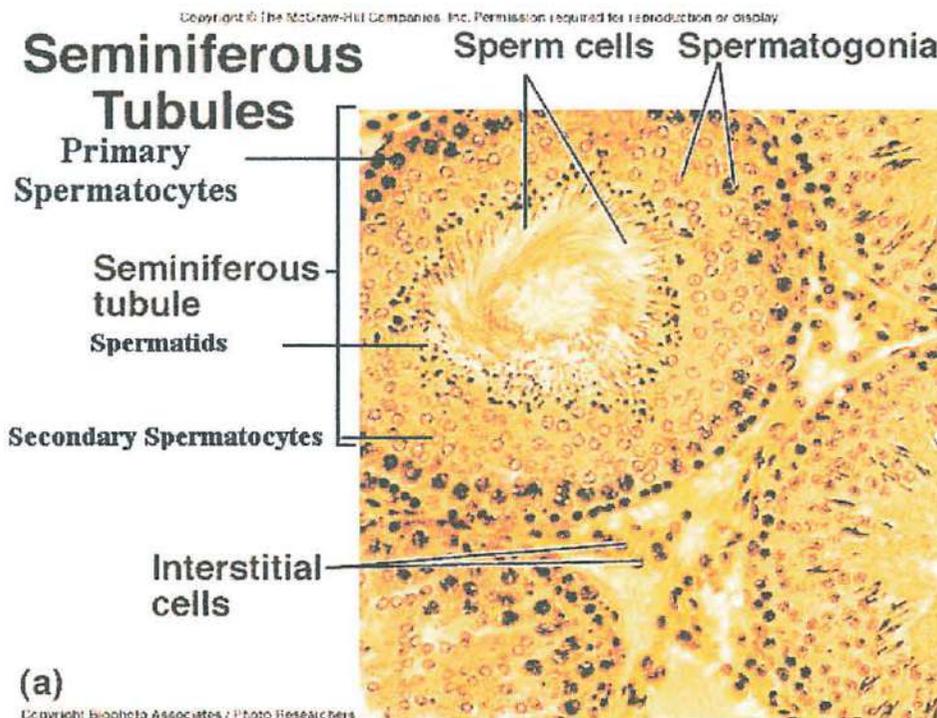
Gambar 2.2 Proses spermatogenesis (<http://iceteazeg.files.wordpress.com/2009/02/spermatogenesis>)

2.2.3.2 Jaringan Interstitial

Jaringan interstitial adalah 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 ini terdiri dari berbagai jenis sel seperti sel fibroblast, sel mesenkim , makrofag, limposit dan sel Leydig. Sel Leydig menempati 10-12% dari jaringan interstitial (Copehaver, 1978)

Di dalam jaringan interstitial sel Leydig tersusun dalam kelompok atau berbentuk tali, dan menempati sudut antara tubulus seminiferus. Sel ini berbentuk bulat atau polygonal, inti di tengah, sitoplasma eisinofil dengan butir- butir lemak sehingga dengan pewarnaan Hematosillin-Eosin tampak pucat



Gambar 2.3 . Irisan tubulus seminiferus
(<http://icetea.files.wordpress.com/2009/02>)

2.3 Poros Hipotalamus-Hipofise-Testis

Integritas sistem reproduksi pria dikendalikan oleh imbalan antara hormon yang diproduksi oleh hipotalamus, hipofise dan testis.

Hormon- hormon yang berperan di antaranya adalah:

- a. *Gonadotropic releasing Hormone (GnRH)*, yang diproduksi oleh hipotalamus
- b. *Luteinizing Hormone (LH)* hormon ini umumnya disebut pula *ICSH (Interstitial Cells Stimulating Hormone)*
- c. Androgen, hormone steroid yang diproduksi sel Leydig di antaranya adalah testosteron
- d. Inhibin, hormon yang diproduksi oleh sel Sertoli

Poros hipotalamus- hipofise- testis pada dasarnya disusun atas produk hormon oleh masing- masing komponen poros, yang satu dengan yang lain membentuk suatu jalur yang saling berpengaruh. Hipotalamus menghasilkan hormon GnRH, hormon dekaeptida yang berfungsi memacu produksi gonadotropin. GnRH menurut yang dipacu dapat berupa: *Luteinizing Hormone releasin Hormon (LHRH)* untuk memacu terbentuknya LH, *Follicle stimulating Releasing Hormone (FSH-RH)* untuk memacu terbentuknya FSH, GnRH sebagai releasing hormon bila berlebihan akan mempunyai pengaruh umpan balik pada hipotalamus agar menghambat produksinya. Selanjutnya LH akan berpengaruh terhadap sel Leydig untuk memproduksi androgen atau testosteron (T). FSH bekerjasama dengan testosteron menstimulasi sel Sertoli untuk membentuk protein khusus, yaitu *Androgen Binding Protein (ABP)* yang berguna untuk mengangkut dan mengekresikan testosteron guna porses spermatogenesis,

maupun untuk proses pematangan spermatozoa di epididimis. Kecuali membentuk ABP, sel Sertoli juga membuat membentuk inhibin, suatu hormon non steroid yang juga mempunyai mekanisme umpan balik untuk menghambat produksi FSH yang berlebihan. Hormon steroid seks juga mempunyai pengaruh umpan balik pada pengaturan produksi gonadotropin (LH dan FSH), maupun GnRH. Mekanisme umpan balik yang terdapat pada poros hipotalamus-hipofise-testis ada tiga macam. Pertama, sistem umpan balik panjang (*"long feedback system"*), penghambatan yang dilakukan oleh hormon steroid gonad.. Kedua sistem umpan balik pendek (*"short feedback system"*) yang penghambatannya dilakukan oleh hormon gonadotropin, yaitu yang mempengaruhi sekresinya sendiri. Ketiga, sistem umpan balik ultra pendek (*ultra short feedback system*), yaitu pengaruh langsung GnRH terhadap sekresinya sendiri (Speroff, 2005).

Keadaan hormonal pada poros hipotalamus-hipofise-testis berpengaruh pada proses spermatogenesis. Berbagai hal yang dapat mempengaruhi faal poros hipotalamus-hipofise-testis, akan dapat berpengaruh pada proses spermatogenesis maupun steroidogenesis.

Oleh karena steroidogenesis juga mempengaruhi potensi seks pria, maka perubahan faal poros tersebut akan pula berpengaruh pada potensi seks.

2.6 Hewan Percobaan

Beberapa hewan percobaan yang dapat digunakan dalam suatu penelitian antara lain adalah mencit, tikus putih, marmot, kelinci, dan monyet. Selain tikus, mencit (*Mus musculus*) juga sering dipakai untuk hewan coba dalam penelitian.

Hewan ini berukuran kecil, dan memiliki ukuran organ reproduksi (testis dan epididimis) yang lebih kecil dari tikus (Armitage, 2004).

Mus musculus memiliki panjang badan (hidung hingga ujung ekor) 7,5-10 cm. Memiliki warna badan putih hingga coklat, dengan rambut yang pendek. Pada telinga dan ekornya tidak memiliki rambut. Ukuran ekor kurang lebih hampir sama dengan panjang tubuhnya. Berat badan mencit lahir sekitar 0,5-1 g, sedangkan berat badan mencit jantan dewasa 20-40 g dan berat badan mencit betina dewasa 18-35 g. Waktu dewasa seksual mencit kurang lebih 60 hari, dan usia maksimum mencit adalah 1-2 tahun. Masa kebuntingan mencit 19-21 hari dan jumlah anak yang dilahirkan berkisar antara 6-15 ekor (Anonimus, 2008). *Mus musculus* dapat dilihat pada Gambar 2.4.



Gambar 2.4 *Mus musculus* (<http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/>)

Mencit jantan dan betina dapat dibedakan dengan mudah, yaitu dengan mengamati alat kelaminnya, betina memiliki jarak yang pendek antara anus dan lubang genital eksternanya sedangkan jantan memiliki jarak yang jauh antara anus dan lubang genital eksternanya. Selain itu betina memiliki 5 puting susu yang terlihat jelas (Armitage, 2004).

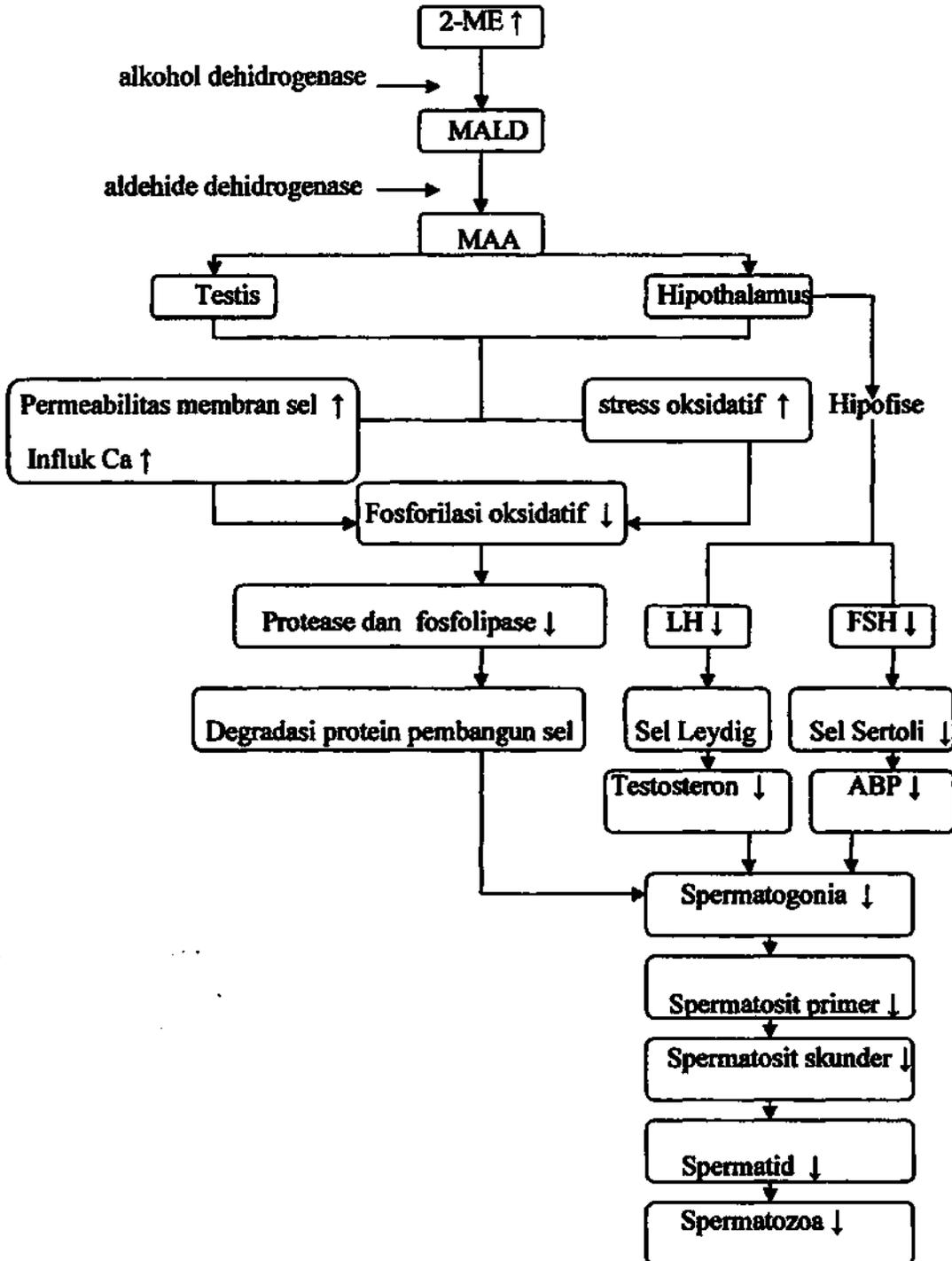
Berikut merupakan klasifikasi mencit menurut Armitage, (2004) :

Kingdom : Animalia
Phylum : Chordata
Class : Mammalia
Ordo : Rodentia
Family : Muridae
Sub family : Murinae
Genus : *Mus*
Species : *Mus musculus L*

BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1. Kerangka Konseptual Penelitian



Keterangan :

————	= diteliti
-----	= tidak diteliti
↑	= meningkat
↓	= menurun

3.2 Penjelasan kerangka Konsep

Senyawa 2-ME yang masuk kedalam tubuh melalui inhalasi, kontak langsung maupun bersamaan makanan yang terkontaminasi dan terjadi metabolisme.. Dengan katalisator *alkohol dehydrogenase* berubah menjadi MALD dan selanjutnya berubah menjadi MAA dengan katalisator *aldehyde dehydrogenase* dengan mekanisme meningkatkan permeabilitas membran sel yang mengakibatkan peningkatan influks Ca^{2+} serta menyebabkan terjadinya stress oksidatif dan meningkatkan radikal bebas (oksidan) dalam tubuh. Meningkatnya ion Ca^{2+} dan radikal bebas akan menyebabkan terjadinya penurunan fosforilasi oksidatif dan mengaktifkan protease dan fosfolipase yang akan mendegradasi protein pembangun sel yang dapat menyebabkan kerusakan dan juga kematian sel. Keadaan tersebut di atas dapat mengenai berbagai organ. seperti testis dan hipotalamus. Organ reproduksi jantan (testis) sebagai salah satu target sasaran kerusakan sel, dapat terjadi kerusakan dalam proses spermatogenesis dalam tubulus seminiferus dan menghambat sintesis protein dalam testis yang berperan dalam metabolisme energi di mitokondria dan merangsang steroidogenesis, sedangkan pada hipotalamus dapat menurunkan sekresi dari gonadotropin (LH dan FSH) yang merupakan hormon yang

mempengaruhi proses steroidogenesis. Senyawa 2- ME juga dapat menurunkan aktivitas ABP (*Androgen binding protein*) yang dihasilkan oleh Sertoli sel yang berperan dalam perubahan spermatosit primer menjadi spermatosit sekunder

3.3 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan tinjauan pustaka dan kerangka konsep yang telah diuraikan sebelumnya, maka diajukan perumusan hipotesis sebagai berikut :

- 1) Pemaparan 2-ME dapat menurunkan kadar testosteron mencit
- 2) Pemaparan 2- ME dapat menurunkan jumlah spermatogonia, spermatosit primer, spermatid oval mencit

BAB 4

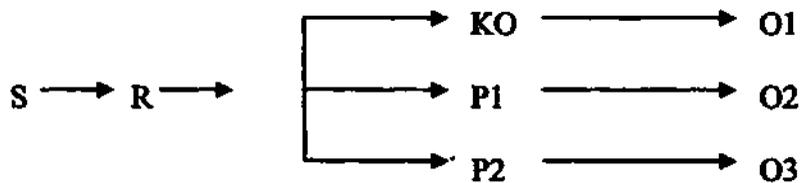
MATERI DAN METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang dilakukan di laboratorium. Rancangan yang digunakan dalam penelitian ini adalah rancangan acak lengkap (RAL).

4.2. Bagan Rancangan penelitian

Secara skematis, rancangan penelitian ini digambarkan sebagai berikut :

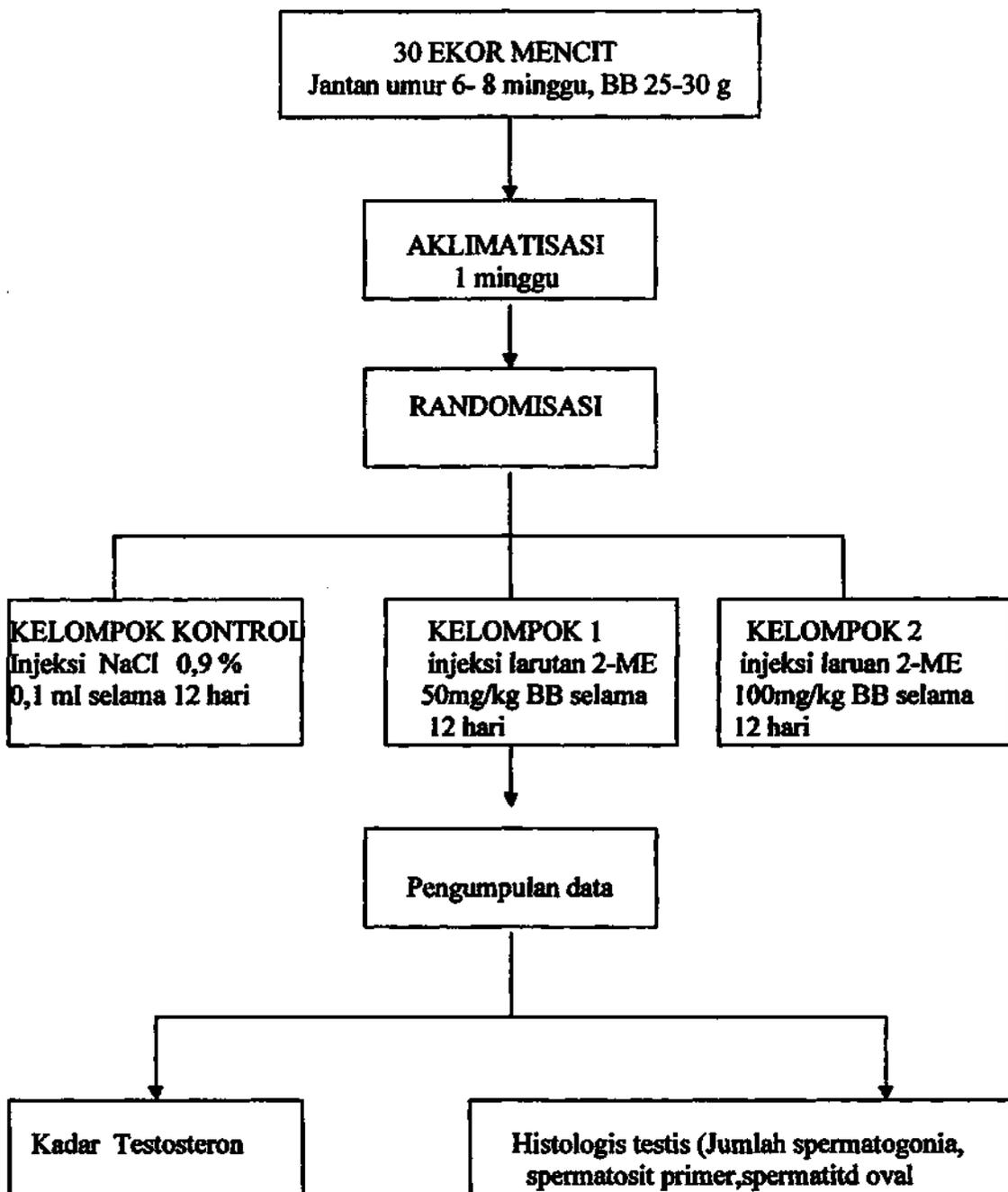


Keterangan :

- S** : sampel
- R** : randomisasi
- Ko** : Kelompok dengan pemberian injeksi subkutan larutan garam fisiologis 0,1 ml selama 12 hari sebagai kelompok kontrol
- P1** : Kelompok dengan pemberian injeksi subkutan larutan senyawa 2- ME 50mg/kg BB selama 12 hari
- P2** : Kelompok dengan pemberian injeksi subkutan larutan senyawa 2- ME 00mg/kg BB selama 12 hari
- O1, O2, O3** : data post test

Gambar 4.1. Bagan rancangan penelitian

4.3 Kerangka Operasional Penelitian



Gambar 4.2. Kerangka operasional penelitian efek 2-ME terhadap kadar testosteron dan histologis testis mencit

4.4 Unit eksperimen dan replikasi

Unit eksperimen pada penelitian ini adalah mencit jantan (*Mus musculus*) strain BALB/C dewasa namun belum pernah dikawinkan, umur 6-8 minggu dan berat badan 25-30 g. Penelitian ini terdiri dari 3 kelompok yang terdiri dari dua kelompok perlakuan dan satu kelompok kontrol dan diambil secara random. Banyaknya replikasi minimal masing-masing kelompok adalah 10 ekor. Hal ini ditentukan dengan rumus Federer (1956):

$$\begin{aligned}(t-1)(r-1) &\geq 15 \\ (3-1)(r-1) &\geq 15 \\ 2(r-1) &\geq 15 \\ r-1 &\geq 7,5 \\ r &\geq 8,5 = 9\end{aligned}$$

Faktor koreksi $\frac{1}{1-f}$ (bila ada mencit eksperimen yang luka, sakit dan mati)

$$\begin{aligned}f &= 0,1 \\ r &\geq \frac{1}{1-0,1} \times 9 = 10\end{aligned}$$

Dari perhitungan diperoleh besar replikasi sebanyak 10 ekor dengan cara penomoran dan dilotre sesuai nomor tiap-tiap mencit sehingga didapatkan tiap kelompok 10 ekor sampai 3 kelompok, sehingga jumlah hewan coba yang diperlukan secara keseluruhan adalah 30 ekor sampel

4.5 Variabel Penelitian

Variabel penelitian dalam penelitian ini adalah :

a. Variabel bebas (*independent*)

variabel bebas penelitian ini adalah dosis senyawa 2-ME.

b. Variabel tergantung (*dependent*)

variabel tergantung adalah kadar testosteron dan jumlah spermatogonia, spermatosit, primer dan spermatid oval

c. Variabel Kendali

Adalah lama waktu pemberian 2-ME, umur mencit, berat badan mencit, strain mencit, pakan, suhu, kelembaban udara ruangan dan perawatan mencit.

4.6 Definisi Operasional

- a. 2- ME adalah senyawa kimia dengan rumus molekul $C_3H_8O_2$ yang diproduksi (Wako Japan) yang dilarutkan dengan garam fisiologis dan diberikan pada mencit secara subcutan di daerah leher
- b. Kadar testosteron adalah kadar testosteron yang diukur dengan cara pengambilan serum darah mencit. Darah diambil dari ventrikel kiri jantung dengan menggunakan *disposiabile syringe* sebanyak 2 ml. Kemudian di *sentrifuge* selama 10 menit dengan kecepatan 3.000 rpm. Serum yang diperoleh disimpan dalam suhu $-20^{\circ}C$ sebelum dianalisis kadar testosteronnya
- c. Jumlah spermatogonia adalah jumlah spermatogonia dalam satu tubulus seminiferus yang dihitung dengan menggunakan mikroskop cahaya pembesaran 400 kali, pengulangan sebanyak lima lapang pandang dan sepuluh kali ulangan mencit

- d. Jumlah spermatosit adalah jumlah spermatosit dalam satu tubulus seminiferus yang dihitung dengan menggunakan mikroskop cahaya pembesaran 400 kali, pengulangan sebanyak lima lapang pandang dan sepuluh kali ulangan mencit
- e. Jumlah spermatid oval adalah jumlah dalam satu tubulus seminiferus yang dihitung dengan menggunakan mikroskop cahaya pembesaran 400 kali, pengulangan sebanyak lima lapang pandang dan sepuluh kali ulangan mencit

4.7 Bahan dan alat Penelitian

4.7.1 Hewan coba

Dalam penelitian ini, menggunakan mencit (*Mus musculus*) jantan, strain BALB/C dewasa belum pernah kawin, umur 6-8 minggu dan berat badan 25-30 g. Hewan coba diperoleh dari bagian pemeliharaan hewan percobaan, Laboratorium histologi, Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga, Surabaya. Mencit diberi minum air PDAM Surabaya dan pakan mencit secara *ad libitum* berupa pelet Hi-Pro-Vite 524-2 (PT. Charoen Pokphdan, Indonesia) setiap hari.

4.7.2 Bahan kimia

Bahan kimia untuk perlakuan pada mencit adalah senyawa 2-ME (produksi Wako Co. Japan) dan untuk kontrol digunakan larutan garam fisiologis (NaCl)

4.8 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah kandang mencit ukuran 30 cm x 40 cm x 20 cm sebagai tempat pemeliharaan mencit yang terdiri dari kandang bak plastik, kawat kasa sebagai penutup kandang, botol tempat air minum dengan selangnya dan sekam sebagai alas kandang, gelas obyek dan penutup, mikroskop binokuler dan kamera, spuit injeksi 1 ml dan 2,5 ml, tabung reaksi dan rak, timbangan digital elektrik (OHAUS), dan *sentrifuge* (Beckman, J-6B). Perangkat perlengkapan pengujian kadar testosteron adalah mikropipet 50 μ l dan 1000 μ l, pengaduk (*vortex*). Satu set alat bedah : gunting dan pinset, papan seksi untuk memfiksasi mencit yang akan dibedah, stoples kecil sebagai tempat penyimpanan larutan fiksatif testis dan seperangkat alat untuk membuat preparat histologis testis.

4.9 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan selama 4 bulan, di Laboratorium Biologi Histologi Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga, Surabaya

4.10 Prosedur Penelitian

4.10.1 Penentuan lama perlakuan dan dosis 2-ME

Lama perlakuan yang digunakan untuk kelompok kontrol dan perlakuan dalam penelitian ini adalah setiap hari mencit disuntik 2-ME selama 12 hari. Penentuan ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemaparan 2-ME dalam waktu singkat.

Dosis 2-ME yang digunakan untuk kelompok perlakuan I (P1) adalah 50 mg/kg berat badan dan kelompok perlakuan II (P2) adalah 100 mg/kg berat badan. Kelompok

kontrol (K) diberikan air garam fisiologis sebagai pembanding. Pemilihan besar dosis 50 mg/kg berat badan dan 100 mg/kg berat badan dengan lama perlakuan 12 hari berdasarkan penelitian Hayati (2007), bahwa pemberian 200 mg/kg berat badan/ hari pada tikus putih selama 2 minggu dapat mengakibatkan tidak terekspresinya protein membran spermatozoa 60 kDa, menurunnya konsentrasi protein 19 dan 24 kDa dan menurunkan kualitas spermatozoa, sedangkan menurut Yoon *et al.* (2001), pemberian 2-ME dengan dosis 50 dan 100 mg/kg berat badan dapat menurunkan berat testis dan berat epididimis yang signifikan jika dibandingkan dengan kontrol. Penentuan lama perlakuan dan dosis 2-ME dalam penelitian dapat dilihat pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1 Bagan penentuan lama perlakuan dan dosis 2-ME

Kelompok		Dosis 2-ME (mg/kg/hr)	Lama paparan (hari)
Kontrol	K	0	12
Perlakuan	P1	50	12
	P2	100	12

4.10.2 Persiapan

4.10.2.1 Hewan coba

Sebelum diberikan perlakuan dengan 2-ME, hewan coba diaklimatisasi pada kondisi kandang selama 1 minggu. Hal ini dilakukan agar hewan coba dapat beradaptasi dengan lingkungan baru sehingga dapat menghindari faktor stres.

4.10.2.2 Pembuatan Larutan 2-ME

Penghitungan Dosis *2-Methoxyethanol* (2-ME dilarutkan dengan pelarut saline /NaCl)

Berat jenis saline = 1,202

Berat jenis 2-ME = 0,96

Perbandingan 2-ME dengan pelarut = Berat jenis saline : Berat jenis 2-ME
 = 1,202 : 0,96
 = 1,252

1. Untuk P1 dengan dosis 2-ME 50 mg/kg bb

Per gram berat badan mencit diberi 2-ME :

$$\frac{50}{1000} \times 1,252 = 0,0626 \text{ ml}$$

Rata-rata berat badan mencit yang digunakan dalam penelitian adalah 25 g:

$$\frac{25}{1000} \times 0,0626 = 0,00157 \text{ ml}$$

Jadi mencit P1 dengan berat badan 25 g disuntik dengan 0,1 ml larutan yang terdiri dari 2-ME 0,00157 ml dan saline 0,09743 ml.

2. Untuk P2 dengan dosis 2-ME 100 mg/kg bb

Per gram berat badan mencit diberi 2-ME :

$$\frac{100}{1000} \times 1,252 = 0,1252 \text{ ml}$$

Rata-rata berat badan mencit yang digunakan dalam penelitian adalah 28 g:

$$\frac{25}{1000} \times 0,1252 = 0,00314 \text{ ml}$$

Jadi mencit P2 dengan berat badan 25 g disuntik dengan 0,1 ml larutan yang terdiri dari 2-ME 0,00314 ml dan saline 0,0786 ml.

4.10.3 Perlakuan hewan coba

Dalam penelitian ini, 30 hewan coba dibagi menjadi 3 kelompok yaitu kelompok kontrol (K), kelompok perlakuan I (P1) dan kelompok perlakuan II (P2), masing-masing terdiri dari 10 ekor mencit. Perlakuan terhadap hewan coba dilakukan pada minggu ke-2, setelah aklimatisasi kandang selama 1 minggu. Pemberian 2-ME atau larutan garam fisiologis setiap hari sekali. Pada kelompok kontrol (K) mencit disuntik dengan larutan

garam fisiologis sedangkan kelompok perlakuan (P1 dan P2) disuntik 2-ME dengan dosis berturut-turut 50 mg/kgBB dan 100 mg/kgBB. Penyuntikan dilakukan secara subkutan di bagian dorsal leher mencit.

4.10.4 Pembedahan

Pembedahan diawali dengan mengorbankan hewan coba dengan cara dislokasi leher. Setelah hewan coba dikorbankan ditelentangkan di atas papan seksi dan keempat anggota gerak difiksasi. Melakukan insisi dengan membuka dinding abdomen. Selanjutnya testis dikeluarkan dan dimasukkan dalam botol berisi larutan Bouin. Pembuatan preparat histologis testis menggunakan pewarnaan hematoxilin eosin.

4.10.5 Pembuatan sediaan histologis testis

Testis yang telah difiksasi dalam larutan Bouin, kemudian dibuat sediaan preparat histologis. Pembuatan sediaan histologis testis dimulai dengan *washing*, *dehidrasi*, *clearing*, *embedding*, *sectioning* dan *staining*. Proses pembuatan sediaan histologis testis dapat dilihat pada lampiran 2

4.10.6. Pengamatan dan perhitungan sel spermatogenik

Pengamatan dan perhitungan sel spermatogenik meliputi jumlah sel spermatogonium, spermatosit dan spermatid oval. Jumlah sel spermatogonium, spermatosit dan spermatid oval di hitung pada setiap tubulus seminiferus dari 5 lapang pandang. Tubulus seminiferus yang dipilih adalah tubulus yang berbentuk bundar dengan

kriteria jenis dan sel penyusun, tubulus seminiferus normal mengacu pada siklus epitel tahap VII (Tienhoven, 1983). Pengamatan dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400 kali dengan lima kali ulangan /mencit.

4.10.7. Pengukuran kadar testosteron

Kadar testosteron adalah kadar testosteron yang diukur melalui pengambilan serum darah mencit. Darah yang diambil dari ventrikel kiri jantung dengan menggunakan *disposable syringe* sebanyak 2 ml. Kemudian di *sentrifuge* selama 10 menit dengan kecepatan pada 3.000 rpm untuk dipisahkan serumnya. Serum yang diperoleh disimpan pada suhu -20°C sebelum dianalisis kadar testosteronnya. Secara kuantitatif testosteron dapat diukur dengan menggunakan teknik radio Immunoassay (RIA) fase padat. Pengukuran kadar testosteron dilakukan di laboratorium endokrin fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Prosedur pengukuran kadar testosteron meliputi empat tabung yang tidak berlapis antibody terimobilisasi (Ab testosteron) diberi label dengan tanda T (*total count*) dan pada empat tabung serupa lainnya diberi label NSB (*nonspesifik binding*). Pada seluruh tabung bertanda NSB dan tabung bertanda A ditambahkan masing-masing sebanyak 50 μl kalibrator nol A. Kemudian ditambahkan 1000 μl testosteron -I125 ke dalam seluruh tabung tanpa terkecuali. Seluruh tabung divortex selama 15 menit, tabung kemudian diinkubasi selama 3 jam pada suhu 37°C - 38°C , masing-masing tabung dicacah radioaktivitasnya selama 1 menit di dalam *gamma counter* dan dilakukan perhitungan pencacahan.

4.11 Pengumpulan Data

Data hasil penelitian adalah data kuantitatif berupa kadar testosteron dan jumlah spermatogonia, spermatosit primer, spermatid oval

4.12 Analisis Data

Data yang telah terkumpul di uji dengan menggunakan program SPSS *for Windows XP* yang meliputi analisis statistik sebagai berikut :

1. Uji statistik diskriptif untuk mengetahui karakteristik data hasil pengukuran dari masing- masing variabel.
2. Uji normalitas distribusi dengan metode non parametrik (*Uji Kolmogorov – Smirnov*), untuk memenuhi syarat lanjutan yang digunakan menggunakan analisis parametrik atau non parametrik
3. Uji univariat (ANOVA) satu arah pada taraf signifikansi $\alpha = 0,05$. Uji ini untuk mengetahui adanya pengaruh yang bermakna atau tidaknya perbedaan semua perlakuan ($p < 0,05$) untuk variabel berdistribusi normal
4. Uji analisis dengan Kruskal Wallis untuk mengetahui adanya pengaruh yang bermakna atau tidaknya perbedaan antar kelompok pada data dengan distribusi tidak normal
5. Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) untuk mengetahui bermakna tidaknya beda antar pasangan perlakuan pada data berdistribusi normal
6. Uji Wilcoxon Man Wihdney untuk mengetahui bermakna tidaknya beda antar pasangan perlakuan pada data berdistribusi tidak normal

BAB 5

ANALISIS HASIL PENELITIAN

5.1. Hasil pengukuran dan analisis data Kadar testosteron

Hasil pengukuran kadar testosteron mencit pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan dapat dilihat pada Tabel 5.1. Hasil perhitungan rata-rata kadar testosteron kelompok kontrol adalah 58,70 ng/dl, dan kelompok perlakuan yang diberi diinjeksi 2-ME dosis 50 mg/kg BB adalah 125,40 ng/ml, dan kelompok perlakuan yang di injeksi 2-ME 100mg/kg BB adalah 19,5 ng/ml. Pada tabel tersebut dapat dilihat bahwa terdapat peningkatan kadar testosteron setelah pemberian 2-ME dosis 50 mg/kg BB dibandingkan dengan kelompok kontrol. Tetapi kadar testosteron tersebut mengalami penurunan setelah pemberian 2-ME dosis 100mg/Kg BB (lampiran 4).

Tabel 5.1. Hasil analisis data kadar testosteron kelompok kontrol dan perlakuan pemberian 2-ME dengan variasi dosis

Kelompok	Rata- rata \pm SD	Kruskal Wallis
Kontrol	58,70 \pm 27,15	p = 0,002
2-ME 50 mg/kg BB	125.40 \pm 174,09	
2-ME 100 mg/kg BB	19,50 \pm 11,20	

Keterangan $\alpha = 0,05$

Hasil uji Kruskal Wallis, menunjukkan bahwa terjadi perbedaan yang signifikan antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan, dengan $p < 0,05$

. Hal ini menunjukkan bahwa H_1 diterima dan H_0 ditolak yang berarti bahwa pemberian 2-ME menurunkan kadar testosteron .

Tabel 5.2. Uji perbedaan kadar testosteron antar kelompok (Wilcoxon)

Kelompok	Kontrol	2-ME 50 mg/kg BB	2-ME 100 mg/kgBB
Kontrol		p = 0,912	p = 0,001
2-ME 50 mg/kg BB	p = 0,912		p = 0,006
2-ME 100 mg/kgBB	p = 0,001*	p = 0,006*	

Keterangan signifikan pada $\alpha = 0,05$

Hasil uji Wilcoxon Man Whitney pada tabel 5.2 menunjukkan bahwa ada perbedaan yang signifikan antara kelompok kontrol dengan perlakuan dosis 100 mg/kg BB, sedangkan kelompok kontrol dengan perlakuan dosis 50mg/kgBB tidak ada perbedaan yang signifikan. Hal ini menunjukkan bahwa kadar testosteron dengan perbandingan dosis antara kelompok tidak signifikan.

5.2. Hasil pengukuran dan Analisis Data Jumlah spermatogonia, spermatisit primer dan Spermatid oval

Hasil pengamatan mikroskop dengan pembesaran 400X menunjukan bahwa pemberian 2-ME melalui injeksi subcutan pada mencit menyebabkan penurunan jumlah sel-sel spermatogenik terutama pada sel spermatogonia dan spermatisit primer. Pengamatan terhadap tubulus seminiferus pada kelompok kontrol masih dalam kondisi normal, seiring dengan penambahan dosis 2-ME pada kelompok perlakuan (2-ME dosis 50 dan 100 mg/kg BB) penampang

histologis testis semakin jelek ditandai dengan susunan spermatogonia dan spermatisit tidak teratur dan jumlahnya semakin turun. (lampiran 4)

Untuk spermatid oval terjadi peningkatan seiring pemberian dosis 50 dan 100 mg/kg BB. Perhitungan jumlah spermatogonia, spermatisit primer dan spermatid oval dapat dilihat pada Tabel 5.3 sampai 5.7 sedangkan rata- rata hasil pengamatan, uji ANOVA satu arah, dari masing-masing variabel adalah sebagai berikut :

5.2.1 Hasil pengukuran dan analisis data jumlah spermatogonia

Hasul perhitungan rata-rata jumlah spermatogonia pada kelompok kontrol, kelompok perlakuan yang diberi injeksi subcutan 2-ME dosis 50 dan 100 mg/kg BB, jumlahnya semakin menurun seiring dengan bertambahnya pemberian dosis 2-ME. (lampiran 4)

Tabel 5.3 Analisis jumlah spermatogonia untuk kelompok kontrol, kelompok perlakuan yang diberi injeksi 2-ME subcutan dosis 50 dan 100 mg/kg BB

Kelompok	Rata- Rata ± SD	Nilai Minimum	Nilai Maksimum	ANOVA
Kontrol	65,060± 6,090	55,4	76,4	F = 5,873 p = 0,008
2-ME 50 mg/kg BB	57,490± 6,834	47,1	70,6	
2-ME 100mg/kgBB	56,520± 5,280	47,0	67,4	

Keterangan $\alpha = 0,05$

Hasil analisis variansi satu arah menunjukkan bahwa terjadi perbedaan yang signifikan terhadap seluruh kelompok perlakuan, dengan signifikansi $p < 0,05$ yaitu sebesar 0,008. Hal ini menunjukkan bahwa H_0 ditolak dan H_1 diterima, yang

berarti bahwa pemberian senyawa 2-ME dapat menurunkan jumlah spermatogonia

Tabel 5.4 Uji BNT perbedaan jumlah spermatogonia antar kelompok

Kelompok	Kontrol	2-ME 50 mg/kg BB	2-ME 100 mg/kgBB
Kontrol		d = 7,57 p = 0,030	d = 8,54 p = 0,013
2-ME 50 mg/kg BB	d = -7,57 p = 0,030		d = 0,97 p = 1,00
2-ME 100 mg/kgBB	d = -8,54 p = 0,013	d = -0,97 p = 1,00	

Keterangan signifikan pada $\alpha = 0,05$

Hasil uji BNT pada tabel 5.6 menunjukkan bahwa ada perbedaan yang signifikan antara kelompok kontrol dengan dengan semua kelompok perlakuan, kecuali pada kelompok (2-ME 50 dengan 100 mg/kg BB). Hal ini menunjukkan bahwa jumlah spermatogonia dengan perbandingan dosis antara kelompok tidak signifikan.

5.2.2 Hasil pengukuran dan analisis data jumlah spermatisit primer

Hasil perhitungan rata-rata jumlah spermatisit primer pada kelompok kontrol adalah 79.36, kelompok perlakuan yang diberi injeksi subkutan 2-ME dosis 50 dan 100 mg/kg BB, jumlahnya 76,74 dan 71.82 (semakin menurun seiring dengan bertambahnya pemberian dosis 2-ME) (lampiran 4)

Tabel 5.5 Analisis jumlah spermatis primer untuk kelompok kontrol, kelompok perlakuan yang diberi injeksi 2-ME subkutan dosis 50 dan 100 mg/kgBB

Kelompok	Rata- Rata SD	Nilai Minimum	Nilai Maksimum	ANOVA
Kontrol	79,440± 5,770	72,4	91,4	F=3,366 p= 0,050
2-ME 50 mg/kg BB	76,740± 8,462	62,8	90,0	
2-ME 100 mg/kgBB	71,820± 5,302	66,2	83,2	

Keterangan $\alpha = 0,05$

Hasil analisis variansi (ANOVA) satu arah menunjukkan bahwa terjadi perbedaan yang signifikan terhadap seluruh kelompok perlakuan, dengan signifikansi $p = \alpha$. Hal ini menunjukkan bahwa H_0 ditolak dan H_1 diterima, yang berarti bahwa senyawa 2-ME dapat menurunkan jumlah spermatis primer.

Untuk melihat pasangan kelompok yang berbeda dilakukan uji BNT. Pada uji BNT perbedaan jumlah spermatis primer antar kelompok dapat dilihat pada

Tabel 5.6

Tabel 5.6 Uji BNT perbedaan jumlah spermatis primer antar kelompok

Kelompok	Kontrol	2-ME 50 mg/kg BB	2-ME 100 mg/kgBB
Kontrol		d = 2,70 p = 1,00	d = 7,62 p = 0,049
2-ME 50 mg/kg BB	d = -2,70 p = 1,00		d = 4,92 p = 0,33
2-ME 100 mg/kgBB	d = -7,62 p = 0,049	d = -4,92 p = 0,33	

Keterangan $\alpha = 0,05$

Hasil uji BNT pada tabel 5.6 menunjukkan bahwa ada perbedaan yang signifikan (ada beda nyata) antara kelompok kontrol dengan kelompok

perlakuan, kecuali pada kelompok (kontrol dengan dosis 2-ME 50 mg/kgBB). Hal ini menunjukkan bahwa perbandingan jumlah spermatosit primer dengan dosis antara kelompok kontrol dengan perlakuan dosis 50 mg/kg BB tidak signifikan

5.2.3 Hasil pengukuran dan analisis data jumlah spermatid oval

Hasil perhitungan rata-rata jumlah spermatid oval pada kelompok kontrol, kelompok perlakuan yang diberi injeksi subkutan 2-ME dosis 50 mg/kg BB menjadi turun dan pemberian injeksi subkutan dengan dosis 100 mg/kg BB jumlahnya meningkat (lampiran 4)

Tabel 5.7 Analisis jumlah spermatid untuk kelompok kontrol, kelompok perlakuan yang diberi injeksi 2-ME subkutan dosis 50 dan 100 mg/kg BB

Kelompok	Rata-Rata SD	Nilai Minimum	Nilai Maksimum	ANOVA
Kontrol	153,820 ± 30,187	94,6	200,4	F = 0,15 p = 0,86
2-ME 50 mg/kg BB	158,040 ± 44,768	90,6	223,8	
2-ME 100 mg/kgBB	162,020 ± 19,912	129,6	192	

Keterangan $\alpha = 0,05$

Hasil analisis variansi (ANOVA) satu arah menunjukkan bahwa tidak terjadi perbedaan yang signifikan terhadap seluruh kelompok perlakuan, dengan signifikansi ($p < 0,05$) yaitu sebesar 0,86. Hal ini menunjukkan bahwa H_0 diterima dan H_1 ditolak, yang berarti senyawa 2-ME tidak menurunkan jumlah spermatid.

BAB 6

PEMBAHASAN

6.1 Efek pemaparan 2-ME dapat menurunkan kadar testosteron darah

Hasil penelitian tentang efek 2-ME terhadap kadar testosteron darah, menunjukkan ada perbedaan yang nyata pada ketiga kelompok. Uji Kruskal Wallis pada semua kelompok didapatkan perbedaan yang signifikan. Hal ini berarti fungsi sel Leydig sebagai penghasil testosteron terbesar didalam tubuh terpengaruh secara nyata oleh pemberian 2-ME sebagai oksidan berupa suntikan subcutan dengan dosis bervariasi (50 mg/ kg BB dan 100 mg/kg BB). Pada dosis 50 mg/kg BB kadar testosteron naik dibanding kelompok kontrol yang dimungkinkan karena 2-ME yang masuk sebagai stimulus dapat menimbulkan respon tubuh yang disebut stressor (Ganong, 2001). Sebagai stressor kimia 2-ME akan mengaktifkan sistem saraf simpatis dan respon adrenal. Aktivasi sistem saraf simpatis oleh stressor menyebabkan pelepasan neurotransmitter norepinefrin local pada ujung saraf simpatis postganglionik, sedang aktivasi stressor pada adrenal merangsang terlepasnya epinefrin ke dalam sirkulasi. Selain meningkatkan norepinefrin dan epinefrin, stressor juga dapat meningkatkan kortikosteroid (Sperof, 2005). Hal tersebut juga dimungkinkan karena waktu pengambilan serum tidak pada waktu bersamaan (dalam satu waktu) dan hanya satu kali saja sehingga mempengaruhi kadar testosteron yang sekresinya bersifat pulsatil, mempunyai frekuensi dan amplitudo (Nieschlag, 1997). Perbedaan stressor dapat menimbulkan respon endokrin yang berbeda. Variasi spesies

terhadap stressor dipengaruhi oleh berbagai faktor yaitu : umur, jenis kelamin, kondisi spesies, lama/waktu terjadinya stressor dan besarnya stressor.

Menurunnya kadar testosteron pada kelompok dengan dosis 100 mg/kg BB dikarenakan jumlah stressor berupa injeksi subcutan 2-ME lebih besar, hal ini dapat menjadi stimuli meningkatnya frekuensi dan amplitude GnRH. Untuk menghasilkan fungsi reproduksi yang tetap dan teratur diperlukan sekresi GnRH yang tetap dan baik (frekuensi maupun amplitudonya) dan merupakan pulsatil yang konstan (*critical range*). Peningkatan pulsasi GnRH akan mengakibatkan penurunan gonadotropin (LH dan FSH). Berdasarkan penjelasan tersebut maka akan berpengaruh terhadap sekresi testosteron di bawah kendali LH. LH akan berpengaruh terhadap sel Leydig dalam memproduksi testosteron

Penelitian secara *infitro* menunjukkan bahwa MAA dapat menghambat produksi asam laktat pada kultur sel Sertoli. Pemaparan senyawa ini akan mengarah pada efek terjadinya toksik melalui interaksi antara komponen protein yaitu sebagai protein transport, protein muskuloskeleton atau reseptor neurotransmitter (Rumanta,2001). Tirado (2007), menyatakan bahwa senyawa MAA dapat menurunkan aktivitas *androgen reseptor* (AR) di sel Sertoli. Gangguan ini menyebabkan terjadinya penurunan kadar *androgen binding protein* (ABP) yang diperlukan dalam perkembangan sel spermatogenik menjadi spermatozoa dewasa. Selain itu, MAA menghambat sintesis protein spesifik *endozepine-like peptide* (ELP) di testis yang berperan dalam metabolisme energi di mitokondria yang berperan dalam merangsang steroidogenesis.

6.2 Efek pemaparan 2- ME dapat menurunkan jumlah sel spermatogonia, spermatosit primer dan spermatid oval

Hasil penelitian tentang efek pemaparan 2-ME terhadap jumlah sel spermatogonia dan spermatosit primer menunjukkan adanya perbedaan penurunan yang nyata . Uji Anova pada ketiga kelompok didapatkan perbedaan yang signifikan. Hal ini menunjukkan bahwa semakin tinggi dosis 2-ME yang diberikan semakin turun jumlah sel spermatogeniknya terutama (spermatogonia dan spermatosit primer), sedangkan untuk spermatid oval tidak didapatkan penurunan jumlah. Dari analisis uji anova tidak terdapat perbedaan yang signifikan. Keadaan ini dikarenakan waktu pemberian 2-ME hanya 12 hari (waktu yang singkat), tidak melewati perkembangan tahap spermatogenesis pada tahap meiosis II dalam menghasilkan 4 spermatid yang mengandung kromosom haploid . Tubulus seminiferus merupakan bagian utama penyusun testis, selain jaringan ikat dan pembuluh darah testis. Di dalam tubulus ini diproduksi sel-sel spermatozoa sebagai hasil pembelahan sel- sel epitel germinalis yang berurutan, membentuk sel-sel baru yang arah perkembangan selnya menuju ke lumen tubulus seminiferus. Kemudian akan terbentuk spermatozoa yang bergerak bebas pada lumen tersebut dan berlangsung secara normal jika tidak ada gangguan.

Dalam keadaan tertentu, misalnya dengan pemberian zat yang bersifat toksik dapat mempengaruhi proses spermatogenesis sehingga terjadi gangguan pada saat pembelahan atau perkembangan dari sel germinalis sampai menjadi spermatozoa. Terganggunya proses spermatogenesis secara histologis dapat dilihat dari jumlah dan ukuran sel-sel spermatogenik penyusun tubulus seminiferus yang berkurang jumlah dan ukurannya, terputusnya perkembangan

sel pada salah satu tahapan dan terjadinya pelepasan sel- sel germinalis. Sokol et al (1994), menyatakan bahwa proses diferensiasi sel spermatogonia terjadi sangat kompleks di dalam tubulus seminiferus. Tubulus dikelilingi oleh jaringan interstitial khususnya sel Leydig yang merupakan sumber penghasil testosteron. Hormon FSH diperlukan pada saat permulaan spermatogenesis yang disebut spermatositogenesis dimana pada fase ini spermatogonia akan berkembang menjadi spermatisit dan diakhiri dengan terbentuknya spermatid. Sementara itu sel Sertoli yang merupakan sel target dari testosteron akan didorong untuk menghasilkan ABP. Penelitian invitro menunjukkan MAA dapat menghambat produksi asam laktat pada kultur sel Sertoli sehingga dapat mengganggu pertumbuhan spermatisit, hal ini dikarenakan asam laktat merupakan komponen yang penting sebagai sumber energi spermatisit yang sedang tumbuh. Ganong (2001) menyatakan bahwa fungsi utama sel Sertoli yang dipengaruhi oleh hormon testosteron antara lain adalah mendorong sintesis ABP, inhibin, glokoprotein dan metabolisme energi untuk menghasilkan asam laktat yang merupakan salah satu sumber utama sel-sel spermatogenik. Jika ada gangguan pada sel Sertoli yang merupakan sel pendukung dan pemberi nutrisi bagi sel-sel spermatogenik akan mengakibatkan terjadinya hambatan perkembangan sel spermatogenik dalam tubulus seminiferus.

Menurunnya jumlah sel spermatogenik (spermatogonia dan spermatisit primer) disebabkan karena pemberian 2- ME secara subcutan menyebabkan terganggunya proses spermatogenesis yang ditandai dengan berkurangnya jumlah sel spermatogonia dan spermatisit primer dibanding dengan kelompok kontrol,

karena MAA sebagai hasil metabolit 2-ME menyebabkan degenerasi pada sel spermatogenik yang rentan terhadap polutan terutama spermatogonia dan spermatosit pakhiten. Spermatosit primer pada kelompok dengan dosis 100mg/kg BB merupakan kelompok dengan jumlah spermatosit yang paling banyak mengalami degenerasi akibat pemberian 2-ME. Senyawa ini di dalam tubuh di metabolisme di dalam sel hepatosit oleh alkohol dehidrogenase menjadi *2-methoxyacetaldehyde* dan kemudian dimetabolisme lagi menjadi MAA yang bersifat toksik. MAA dapat menyebabkan nekrosis pada sel spermatogenik, karena nekrosis itu sendiri adalah bentuk klasik dari kematian sel, yang dikendalikan oleh lisis sel maupun kehilangan aktivitas sifat kimia sel yang terjadi bila sel mengalami kerusakan karena faktor fisik atau kekurangan oksigen (Darmanto, 1994). MAA ini dapat menghambat terbentuknya DNA dan RNA pada spermatosit primer khususnya pada tahap spermatosit pakhiten, karena sel ini paling sensitif terhadap MAA karena sel tersebut termasuk sel yang paling aktif mensintesis RNA (Rumanta, 2001). MAA juga dapat meningkatkan permeabilitas membran sel yang mengakibatkan influks ion Ca^{2+} menjadi berlebih (Ca^{2+} overload). Melimpahnya ion Ca^{2+} didalam sel akan menghambat fosforilasi oksidatif, sehingga perolehan ATP (energi) berkurang karena energi dipakai untuk memompa Ca^{2+} berlebih. Di samping itu melimpahnya ion Ca^{2+} juga mengaktifkan enzim protease dan fosfolipase yang dapat mendegradasi struktur sel, karena ion Ca^{2+} juga merupakan mediator terjadinya apoptosis. Mekanisme kematian sel karena apoptosis dan kelangsungan hidup dari sel spermatosit primer masih sedikit diketahui. Beberapa peneliti mengatakan bahwa

penurunan fungsi androgen reseptor (AR) merangsang terjadinya apoptosis spermatosit. Apoptosis sel terjadi karena kerusakan fungsi sel Leydig dan perubahan ekspresi ABP. Pemaparan MAA menghambat ekspresi AR di sel Sertoli secara signifikan setelah 3 sampai 6 jam pemaparan, yang merupakan awal terjadinya apoptosis di dalam tubulus seminiferus (Tirado et.al,2004)

Jumlah spermatid oval tidak terjadi penurunan, hal ini dikarenakan lama pemberian 2-ME tidak mempengaruhi sel spermatogenik (spermatid) dalam proses pembelahannya. Tahapan asosiasi spermatid berbeda tiap spesies dan terjadi dalam tubulus seminiferus dengan interval yang bervariasi tiap spesies, sehingga pemberian 2-ME dengan waktu yang relatif singkat (12 hari) tidak mempengaruhi pembelahan dan perkembangan sel spermatid dalam proses selanjutnya (spermiogenesis). meskipun spermatid termasuk sel spermatogenik yang rentan terhadap MAA.

BAB 7

PENUTUP

7.1 Kesimpulan

Hasil penelitian tentang pemberian 2-ME melalui injeksi subcutan terhadap kadar testosteron dan histologis testis (jumlah spermatogonia, spermatosit primer dan spermatid oval) dapat di simpulkan :

1. Pemaparan 2-ME menurunkan kadar testosteron, dengan perubahan masing-masing kelompok dibandingkan kelompok yang diinjeksi garam fisiologis adalah pada perlakuan dengan dosis 50 mg/kg BB terjadi peningkatan dan untuk dosis 100 mg/kg BB terjadi penurunan
2. Pemaparan 2-ME menurunkan jumlah sel spermatogenik khususnya spermatogonia dan spermatosit primer sedangkan pada spermatid oval terjadi peningkatan

7.2 Saran

Atas dasar hasil penelitian tentang efek 2-ME dengan variasi dosis terhadap kadar testosteron dan gambaran histologis testis maka peneliti meyarankan :

1. Menghindari bahan-bahan yang mengandung 2-ME dengan kadar diatas ambang aman / yang belum jelas kadarnya seperti plastik untuk pembungkus makanan panas
2. Dilakukan penelitian serupa dengan variasi dosis dan waktu yang lebih lama yang disertai dengan pengukuran FSH dan LH yang berguna untuk melihat pengaruh lebih lanjut pada terhadap fertilitasnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonimus. 2008. *Mus musculus*. http://id.wikipedia.org/wiki/Mus_musculus. Tanggal akses 10 Oktober 2008.
- Armitage D, 2004. Mus Musculus. *Animal Diversity Web*, dalam http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Mus_musculus. Tanggal akses 12 September 2008.
- Barone, F, S Aguanno dan A. D'Agostino. 2005. Modulation of MAA-induced Apoptosis in Male Germ Cells : Role of Sertoli Cells P/Q-type Calcium Channels. *Reproductive Biology dan Endocrinology*, pp. 3:3-13.
- Bouchard, M J, Y. Dong, B. M. McDermott, D. H. Lam, K. R. Brown, M. Shelanski, A. R. Bellve, dan V. R. Racaniello. 2000. Defects in Nuclear dan Cytoskeletal Morphology dan Mitochondrial Localization in Spermatozoa of Mice Nectin-2, a Component of Cell-Cell Adherens Junction. *Molecular Cell Biology*, 200 , pp. (8):2865-2873.
- Butterworth, M., D. Creasy, dan Timbrell J A. 1995. The Detection of Subchronic Testicular Damage Using Urinary Creatine: Studies with 2-Methoxyethanol. *Teratology*, pp.69:209-211.
- Campbell, N. A., Jane B R, dan Lawrance G M. 2004. *Biology*. Edisi kelima. Jilid III. Penerbit Erlangga. Jakarta.
- Connell, D. W., dan G. J. Miller. 1995. *Kimia dan Ekotoksikologi Pencemaran* : UI Press. Jakarta, 328-341.
- Denkhaus, W., R. J. Fielder, B. Gilbert, M. Ikeda, S. K. Kashyap, L. Rosenstein, J. Sokai, H. Veulemans, K. Miller, dan A. Cicollela. 1990. *2-Methylethanol, 2-Ethylethanol and their Acetats*, dalam http://www.inchem.org/documens/ehs/ehs/e155_1.gif. Tanggal akses 26 September 2008.
- de Kretser, D.M. 2002. *Endocrinology of the Male Reproductive System*. www.endotext.com. Tanggal akses 10 Oktober 2008.
- Dukan, S., A. Farewell, M. Ballesteros, F. Taddei, M. Radman, dan T. Nystrom. 2000. *Protein Oxidation in Response to Increased Transcriptional or Translational Errors*. Massachusetts Institute of Technology. Cambridge.
- E. Nieschlag and H.M. Behre, 1997. *Andrology*. Springer Verlag- Berlin, 43-54
- Gaudreault, C., M. E. Alfy, C. Legare, dan R. Sullivan. 2001. Expression of Hamster Sperm Protein P26h During Spermatogenesis. *Biology of Reproduction*, 65:79-86.

- Gray, T. J. B., E. J. Moss, D. M. Creasy, dan S. D. Gangolli. 1985. Studies on The Toxicity of some Glycol Ethers and Alcoxyacetic acids in Primary Testicular Cell Cultures. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 79:490–501.
- Guyton, A. C., dan J. E. Hall. 1997. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran (Textbook of Medicinal Physiology)*, alih bahasa oleh Setiawan, I., Tengadi, K. A., dan Santoso. Edisi 9. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta.
- Hafez, E. S. E. 2000. *Reproduction in Farm Animal*. Edisi 7. Lippincot Williams dan Wilkins. Philadelphia.
- Hayati, A. 2009. *Spermatologi*, Departemen Biologi, F.Saintek Unair, Surabaya
- Hayati, A., B. Yunaida, I. B. Rai Pidada, W. Darmanto, dan D. Winarni. 2004. Efek 2-Methoxyethanol terhadap Struktur Histologi Testis Mencit. *Penelitian Hayati*, 10 (1):7-12.
- Hayati, A., D. Any, dan I. B. Rai Pidada. 2005. Spermatozoa Motility and Morphological Recovery Process in Mice after The Induction of 2-methoxyethanol. *Folia Medica Indonesia*, 41 (2):90-95.
- Hayati, A. 2007. Kajian Kualitas dan Protein Membran Spermatozoa Tikus (*Rattus norvegicus*) Akibat Pemaparan 2-Methoxyethanol. *Disertasi*. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Ismudiono, 1999. *Fisiologi reproduksi pada ternak*. Edisi 2, Surabaya; Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.
- Johanson, G. 2000. Toxicity Review of Monomethyl Ether and its Acetate Ester. *Critical review in Toxicology*, 30 (3):307-345.
- Junquiera, C.L. Carniero dan O. Kelley, 1997. *Histologi Dasar*, Edisi ke-8, Alih bahasa r. Jan tambayong, Jakarta, EGC, hal 423-424
- Kim, Y. H., A. H. Berry, D. S. Spencer, dan W. E. Stites. 2001. Comparing the Effect on Protein Stability of Methionine Oxidation Versus Mutagenesis : Steps Toward Engineering Oxidative Resistance in Proteins. *Protein engineering*, 14 (5):343-347.
- Kusumawati, Diah, 2003. *Bahan ajar tentang Hewan coba*, fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Surabaya, pp 11-22,67,87
- Leon Speroff and Marc A.Fritz. 2005. *Clinical Gynecologic Endocrinology and Fertility*, Lippincot William , Philadelphia.USA , 146-147
- Mc.Donald's, 2003. *Veterinary Endokrinology and Reproduction*, fifth edition

- Moslen, M. T., L. Kaphalia, H. Balasubramanian, Y. M. Yin, dan W. W. Au. 1995. Species Differences in Testicular and Hepatic Biotransformation of 2-Methoxyethanol. *Toxicology*, 96: 217-224.
- Murray, R. K., K. D. Grammer, A. P. Mayes dan V. W. Rodwell. 2001. *Biokimia Harper*. Alih bahasa dr. Danry Hartono. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta.
- Partodiharjo, S., 1980. *Ilmu Reproduksi Hewan*, Jakarta : Penerbit Mutiara
- Peiris LDC. dan HDM. Moore. 2001. *Effects of Acute Chronic of Methoxyacetic acid on Hamster Sperm Fertilising Ability*. *Asian Journal of Andrology*, 3:185-191.
- Rajesh, P., dan R. K. Naz. 2005. *Novel Testis / Sperm-specific Contraceptive Targets Identified Using Gene Knockout Studies*. <http://www.informatics.jax.org>. Tanggal akses 12 September 2008.
- Rumanta, M., TW. Surjowo dan S. Sudarwati 2001. Pengaruh Asam Methoxoacetat terhadap Organ Reproduksi Mencit (*Mus musculus*) Swiss Webster Jantan. *Proceeding Institute Technology Bandung*. Bandung.
- Salisbury, G. W. dan N. L. van Demark. 1985. *Fisiologi Reproduksi dan Inseminasi Buatan pada Sapi*. UGM Press. Yogyakarta.
- Sax, N. I. dan R. J. Lewiss. 1989. *Dangerous Properties of industrial Materials*, 7th edition. Van Nostrand Reinhold, Melbourne, US.
- Sweeney, L. M. 2001. Proposed of Occupational Exposure Limits for Select Ethylene Glycol Ether using PBPK Models and Monte Carlo Simulation. *Toxicology Science*, 62:124-139.
- Sugiyono, 2007. *Metodologi Penelitian Kuantitatif dan Kualitatif*. Bandung, Alfabeta, hal 82
- Tirado, O.M., D. M. Selva, N. Toran, C. A. Suarez-Quian, M. Jansen, D. P. McDonnell, J. Reventos, dan F. Munell. 2004. Increased Expression of Estrogen Receptor β in Pachytene Spermatocytes After Short-Term Methoxyacetic Acid Administration. *Journal of Andrology*, 25 (1):119-129.
- Wang, W. dan R. E. Chapin. 2000. Differential Gene Expression Detected by Suppression Subtractive Hybridization in the Ethylene Glycol 56:165-174.

Yoon, C. Y., C. M. Hong, J. Y. Song, Y. Y. Cho, K. S. Choi, B. M. Lee, dan C. K. Kim. 2001. Effect of Ethylene Glycol Monoethyl Ether on the Spermatogenesis in Pubertal and Adult Rats. *Veteranary Science*, 2 (1):47-51.

Lampiran 1

**KONVERSI PERHITUNGAN DOSIS PADA HEWAN UNTUK BEBERAPA
JENIS HEWAN DAN MANUSIA (Kusumawati, 2004)**

	Mencit 20 g	Tikus 200 g	Marmot 400 g	Kelinci 1.5 g	Kucing 2 kg	Kera 4 kg	Anjing 12 g	Manusia 70 kg
Mencit 20 g	1.0	7.0	2.25	27.8	29.7	64.1	124.2	387.9
Tikus 200 g	0.14	1.0	1.74	3.9	4.2	9.2	17.8	56.0
Marmot 400 g	0.08	0.57	1.0	2.25	2.4	5.2	10.2	31.5
Kelinci 1.5 g	0.04	0.25	0.44	1.0	1.08	2.4	4.5	14.2
Kucing 2 kg	0.03	0.23	0.41	0.92	1.0	2.2	4.1	13.0
Kera 4 kg	0.016	0.11	0.19	0.42	0.45	1.0	1.9	6.1
Anjing 12 g	0.008	0.06	0.10	0.22	0.24	0.52	1.0	3.1
Manusia 70 kg	0.0026	0.018	0.031	0.07	0.076	0.16	0.32	1.0

Lampiran 2

PEMBUATAN SEDIAAN HISTOLOGIS TESTIS

1. *Washing*

Organ testis dimasukkan dalam larutan alkohol 70% yang mengandung litium karbonat *overnight*

2. *Dehydrasi*

Organ testis berturut- turut dimasukkan dalam alkohol 70% (selama 4x 30 menit), alkohol 80% (2x 30menit), alkohol 90% (1 x 30menit) dan terakhir alkohol absolute 1 x 30 menit

3. *Clearing*

Organ testis berturut- turut dimasukkan dalam xylol bekas (selama 15 menit) dan xylol murni (*overnight*). Kemudian dilanjutkan dengan proses infiltrasi yaitu dengan memasukan organ testis berturut-turut pada xylol ; parafin 1 : 1 (selama 30 menit), parafin murni I (1 jam), parafin murni II (1 jam), terakhir parafin murni III (1jam)

4. *Embedding*

Dari parafin III diatas, lalu dibuat blok- blok parafin, dengan cara memasukan parafin cair III ke dalam kotak- kotak kecil, dan organ dimasukan ke dalamnya kemudian dibiarkan hingga dingin dan mengeras

5. *Sectioning*

Spesimen dipotong dengan ketebalan 4 μm menggunakan mikrotomi, hingga membentuk pita. Pita disusun dalam gelas obyek (*affixing*) yang sebelumnya diolesi dengan Mayer's Albumin. Setelah pita melekat, dimasukkan dalam oven bersuhu 40 -50° c *overnight*.

6. *Staining*

Setelah dioven, preparat dimasukkan dalam xylol selama (2 x 10 menit), lalu berturut-turut dimasukkan dalam etanol absolute, etanol 96 %, etanol 8% dan etanol 70%, masing-masing selama 15 menit. Lalu dimasukkan kedalam larutan Haematoxylin (10 menit). Kemudian digelontorkan kedalam air mengalir, kemudian dimasukkan dalam etanol 70% + HCL selama 5-10 detik, kemudian dimasukkan kedalam Eosin (5 menit). Kemudian berturut-turut dimasukkan dalam etanol 70%, 80%, 90% masing- masing selama 5 menit dan dimasukkan dalam xylol 2 x 10 menit. Setelah itu gelas penutup diberi perekat transparan berupa entellan (*mounting*). Dan terakhir preparat diberi label

Lampiran 3

TAHAP PEMERIKSAAN KADAR TESTOSTERON DARAH

Secara kuantitatif hormon teststeron dapat dipantau dengan menerapkan tehnik radio imunoassay (RIA) fase padat. Tehnik ini dilakukan dengan melalui tahap- tahap sebagai berikut :

1. Empat tabung yang tidak berlapis antibody terimmobilisasi (Ab testosteron) diberi label NSB (*nonspesific binding*). 12 tabung berlapis Ab testostoron dipersiapkan untuk keperluan kalibrasi dengan memberikan tanda A (untuk tabung yang akan menunjukkan jumlah ikatan maksimum) sampai dengan F dan masing-masing duplikasinya
2. Pada seluruh tabung bertanda NSB dan tabung bertanda A di tambahkan masing-masing sebanyak 50 μ l kalibrator nol A. Pada setiap tabung kalibrator yang lain (B sampai F) ditambah larutan kalibrator masing-masing yang sesuai sebanyak 50 μ l.Seluruh sampel serum baik kontrol maupun perlakuan dimasukkan kedalam masing-masing tabung sesuai dan duplikasinya.
3. Kemudian ditambahkan 1000 μ l Testosteron-1125 kedalam seluruh tabung tanpa kecuali. Setelah penambahan ini, yang dimiliki adalah sebagai
(1) Tabung bertanda T hanya berisi antigen berlabel (Testosteron-1125):
(2) Tabung bertanda A sampai F berisi Ab- Testosteron ditambah larutan

stok standart kalibrasi dan ditambah testosteron -1125 dengan kalibrator A adalah memiliki kadar testosteron sebesar nol. (3) 54 tabung lainnya berisi Ab- Testosteron ditambah sampel serum dan ditambah testosteron -1125 Adapun konsentrasi testosteron pada larutan- larutan stok standar kalibrasi telah ditentukan dan dapat dilihat pada tabel dibawah ini.

Tabel kadar testosteron dalam larutan kalibrator

Kalibrator	Kadar Testosteron (ng/dl)
A (MB)	0
B	20
C	100
D	400
E	800
F	1600

4. Seluruh tabung divorteks selama 15 menit
5. Seluruh tabung kemudian dinkubasi selama 3 jam pada suhu 37-38°C
6. Tabung bertanda T disisihkan dari yang lain terlebih dahulu, setelah itu seluruh tabung (kecuali tabung bertanda T) dibalik dengan hati- hati selama 2 – 3menit sehingga cairan didalamnya terbuang agar lebih kering. Tabung-tabung kemudian dihentikan agak keras diatas helaian kertas tissue atau kertas penghisap untuk menghilangkan sisa- sisa cairan.

7. Masing-masing tabung dicacah radioaktivitasnya selama 1 menit di dalam *gama counter*

8. Kemudian dilakukan hasil pencacahan

Untuk mendapatkan kurva standar, mula-mula dihitung konsentrasi testosteron total dari setiap tabung kalibrator, dan juga dengan mengetahui terlebih dahulu rata-rata jumlah cacah per menit (*count per minute* = CPM) tabung-tabung berstandart NSB

Net counts = Rata-rata CPM tiap kalibrator- Rata-rata NSB tiap kalibrator

Kemudian menentukan besar ikatan setiap pasang tabung sebagai nilai persentase (*percent count*) dari jumlah ikatan maksimum (MB) pada tabung betanda A, dengan menentukan bahwa nilai cacah NSB pada tabung A tersebut sebagai nilai 100%-nya

Ikatan persentase = $\frac{\text{Net count}}{\text{Net MB count}} \times 10\%$

Dengan menggunakan kertas grafik logaritma, persentase-persentase ikatan tiap kalibrator diaas diplotkan pada sisi verikal terhadap konsentrasi testosteron pada sisi horisonal untuk setiap hasil dari kalibrator B,C,D,E an F dan kemudian dapat digambarkan suatu garis lurus yang dapat mewakili lima titik yang ada. Dengan demikian telah didapatkan suatu kurva

standar. Konsentrasi testosteron suatu sampel dapat diestimasi dengan melakukan interpolasi pada garis tersebut

Lampiran 4

Lampiran 4.1 Kadar testosteron mencit pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan (2-ME)

Replikasi	Kelompok		
	Kontrol (ng)	2-ME 50 mg/kg BB (ng)	2-ME 100 mg/kg BB (ng)
1	62	580	26
2	32	25	30
3	54	105	19
4	115	47	19
5	86	105	30
6	70	60	18
7	42	30	0
8	24	40	0
9	40	250	25
10	62	12	28
Σ	587	1254	195
Rata-Rata	58,700	125,400	19,500
SD	27,145	174,093	11,197

Lampiran 4.2 Jumlah spermatogonia mencit pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan (2-ME)

Replikasi	Kelompok		
	Kontrol	2-ME 50 mg/kg BB	2-ME 100 mg/kgBB
1	70,2	57,4	57
2	67,2	55,8	60
3	76,4	70,6	54,2
4	70	65,2	57,4
5	60	47,1	67,4
6	61,8	60	57,2
7	62,8	58,2	57,2
8	55,4	50,6	51,8
9	61,2	57,4	56
10	65,6	52,6	47
Σ	650,06	574,9	565,2
Rata-Rata	65,060	57,490	56,520
SD	6,090	6,834	5,280

Lampiran 4.3 Jumlah spermatosit primer mencit pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan (2-ME)

Replikasi	Kelompok		
	Kontrol	2-ME 50 mg/kg BB	2-ME 100 mg/kgBB
1	91,4	77	75,8
2	76,4	81	69,6
3	81,6	90	74,2
4	72,4	87,4	83,2
5	77,2	62,8	66,4
6	73,4	71,6	66,2
7	78,4	69,8	68,8
8	79,2	69,4	68
9	78	78,2	75,2
10	86,4	80,2	70,8
Σ	793,6	767,4	718,2
Rata-Rata	79,36	76,74	71,2
SD	5,770	8,462	5,302

Lampiran 4.4 Jumlah spermatid oval mencit pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan (2-ME)

Replikasi	Kelompok		
	Kontrol	2-ME 50 mg/kg BB	2-ME 100 mg/kgBB
1	200,4	184,6	177
2	154,8	156,4	159,2
3	186	223,8	181
4	164,4	210	176,4
5	142,6	90,6	129,6
6	135,8	149,6	157,4
7	172,8	195,4	192
8	94,6	105	163,4
9	156,6	141,8	141
10	130,2	123,2	143,2
Σ	1538,2	1580,4	125,8
Rata-Rata	153,83	158,04	174,6
SD	30,187	44,768	19,912

Lampiran 5

Descriptives

status penelitian			Statistic	Std. Error	
testosteron kontrol	Mean		58,700	8,5843	
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	39,281		
		Upper Bound	78,119		
	5% Trimmed Mean		57,500		
	Median		58,000		
	Variance		736,900		
	Std. Deviation		27,1459		
	Minimum		24,0		
	Maximum		115,0		
	Range		91,0		
	Interquartile Range		36,0		
	Skewness		,690		,687
	Kurtosis		,796		1,334
	perlakuan1	Mean			125,400
95% Confidence Interval for Mean		Lower Bound	,861		
		Upper Bound	249,939		
5% Trimmed Mean			106,444		
Median			53,500		
Variance			30308,489		
Std. Deviation			174,0933		
Minimum			12,0		
Maximum			580,0		
Range			568,0		
Interquartile Range			112,5		
Skewness			2,399	,687	
Kurtosis			5,974	1,334	
perlakuan2		Mean		19,500	3,5410
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	11,490		
		Upper Bound	27,510		
	5% Trimmed Mean		20,000		
	Median		22,000		
	Variance		125,389		
	Std. Deviation		11,1977		
	Minimum		,0		
	Maximum		30,0		
	Range		30,0		
	Interquartile Range		15,0		
	Skewness		-1,134	,687	
	Kurtosis		,123	1,334	

Descriptives

status penelitian			Statistic	Std. Error		
spermatogonia	kontrol	Mean	65,060	1,9260		
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound 60,703 Upper Bound 69,417			
		5% Trimmed Mean	64,967			
		Median	64,200			
		Variance	37,094			
		Std. Deviation	6,0905			
		Minimum	55,4			
		Maximum	76,4			
		Range	21,0			
		Interquartile Range	9,2			
		Skewness	,363	,687		
		Kurtosis	,035	1,334		
		perlakuan1		Mean	57,490	2,1611
				95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound 52,601 Upper Bound 62,379	
5% Trimmed Mean	57,339					
Median	57,400					
Variance	46,703					
Std. Deviation	6,8340					
Minimum	47,1					
Maximum	70,6					
Range	23,5					
Interquartile Range	9,2					
Skewness	,504			,687		
Kurtosis	,424			1,334		
perlakuan2				Mean	56,520	1,6689
				95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound 52,742 Upper Bound 60,298	
		5% Trimmed Mean	56,444			
		Median	57,100			
		Variance	27,886			
		Std. Deviation	5,2807			
		Minimum	47,0			
		Maximum	67,4			
		Range	20,4			
		Interquartile Range	4,5			
		Skewness	,331	,687		
		Kurtosis	2,088	1,334		

Descriptives

status peneltan				Statistic	Std. Error
spermatoosit	kontrol	Mean		79,440	1,8247
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	75,312	
			Upper Bound	83,568	
		5% Trimmed Mean		79,167	
		Median		78,200	
		Variance		33,296	
		Std. Deviation		5,7703	
		Minimum		72,4	
		Maximum		91,4	
		Range		19,0	
		Interquartile Range		7,2	
		Skewness		1,045	,687
		Kurtosis		,924	1,334
		perlakuan1		Mean	
95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound			70,686	
	Upper Bound			82,794	
5% Trimmed Mean				76,778	
Median				77,600	
Variance				71,618	
Std. Deviation				8,4628	
Minimum				62,8	
Maximum				90,0	
Range				27,2	
Interquartile Range				12,9	
Skewness				,021	,687
Kurtosis				-,585	1,334
perlakuan2				Mean	
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	68,027	
			Upper Bound	75,613	
		5% Trimmed Mean		71,500	
		Median		70,200	
		Variance		28,120	
		Std. Deviation		5,3028	
		Minimum		66,2	
		Maximum		83,2	
		Range		17,0	
		Interquartile Range		7,8	
		Skewness		1,078	,687
		Kurtosis		1,006	1,334

Descriptives

status penelitian			Statistic	Std. Error			
spermatid oval	kontrol	Mean	153,820	9,5462			
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound 132,225 Upper Bound 175,415				
		5% Trimmed Mean	154,522				
		Median	155,700				
		Variance	911,293				
		Std. Deviation	30,1878				
		Minimum	94,6				
		Maximum	200,4				
		Range	105,8				
		Interquartile Range	41,7				
		Skewness	-,433		,687		
		Kurtosis	,563		1,334		
		perlakuan1			Mean	158,040	14,1572
					95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound 126,014 Upper Bound 190,066	
5% Trimmed Mean	158,133						
Median	153,000						
Variance	2004,256						
Std. Deviation	44,7689						
Minimum	90,6						
Maximum	223,8						
Range	133,2						
Interquartile Range	80,4						
Skewness	-,012			,687			
Kurtosis	-1,156			1,334			
perlakuan2				Mean	162,020	6,2968	
				95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound 147,776 Upper Bound 176,264		
		5% Trimmed Mean	162,156				
		Median	161,300				
		Variance	396,502				
		Std. Deviation	19,9124				
		Minimum	129,6				
		Maximum	182,0				
		Range	62,4				
		Interquartile Range	35,4				
		Skewness	-,176	,687			
		Kurtosis	-,929	1,334			

UJI NORMALITAS

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		testosteron	spermatogonia	spermatoosit	spermatid oval
N		30	30	30	30
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	67.867	59.690	76.000	157.980
	Std. Deviation	107.9388	7.0525	7.1820	32.2409
Most Extreme Differences	Absolute	.292	.127	.073	.066
	Positive	.292	.127	.073	.054
	Negative	-.265	-.071	-.060	-.066
Kolmogorov-Smirnov Z		1.600	.697	.398	.382
Asymp. Sig. (2-tailed)		.012	.716	.997	.999

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Kruskal-Wallis Test

Ranks

status peneltan		N	Mean Rank
testosteron	kontrol	10	19.85
	perlakuan1	10	19.30
	perlakuan2	10	7.35
	Total	30	

Test Statistics^{a,b}

	testosteron
Chi-Square	12.904
df	2
Asymp. Sig.	.002

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: status peneltan

Mann-Whitney Test

Ranks

status peneltan		N	Mean Rank	Sum of Ranks
testosteron	kontrol	10	10.35	103.60
	perlakuan1	10	10.65	106.50
Total		20		

Test Statistics^b

	testosteron
Mann-Whitney U	48.500
Wilcoxon W	103.500
Z	-.114
Asymp. Sig. (2-tailed)	.910
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.912 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: status penelitian

Mann-Whitney Test**Ranks**

status penelitian	N	Mean Rank	Sum of Ranks
testosteron kontrol	10	15.00	150.00
perlakuan2	10	6.00	60.00
Total	20		

Test Statistics^b

	testosteron
Mann-Whitney U	5.000
Wilcoxon W	60.000
Z	-3.407
Asymp. Sig. (2-tailed)	.001
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.000 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: status penelitian

Mann-Whitney Test

Ranks

status penelitian		N	Mean Rank	Sum of Ranks
testosteron	perlakuan1	10	14.15	141.50
	perlakuan2	10	6.85	68.50
Total		20		

Test Statistics^b

	testosteron
Mann-Whitney U	13.500
Wilcoxon W	68.500
Z	-2.767
Asymp. Sig. (2-tailed)	.008
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.004 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: status penelitian

Oneway

ANOVA

spermatogonia

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	437,258	2	218,629	5,873	,008
Within Groups	1005,149	27	37,228		
Total	1442,407	29			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: spermatogonia

Bonferroni

(I) status peneliti	(J) status peneliti	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
kontrol	perlakuan1	7,5700*	2,7287	,030	,605	14,535
	perlakuan2	8,5400*	2,7287	,013	1,575	15,505
perlakuan1	kontrol	-7,5700*	2,7287	,030	-14,535	-,605
	perlakuan2	,9700	2,7287	1,000	-5,995	7,935
perlakuan2	kontrol	-8,5400*	2,7287	,013	-15,505	-1,575
	perlakuan1	-,9700	2,7287	1,000	-7,935	5,995

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

Oneway

ANOVA

spermatisit

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	298,536	2	149,268	3,366	,050
Within Groups	1197,304	27	44,345		
Total	1495,840	29			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: spermatisit

Bonferroni

(I) status peneltan	(J) status peneltan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
kontrol	perlakuan1	2,7000	2,9781	1,000	-4,901	10,301
	perlakuan2	7,6200*	2,9781	,049	,019	15,221
perlakuan1	kontrol	-2,7000	2,9781	1,000	-10,301	4,901
	perlakuan2	4,9200	2,9781	,330	-2,681	12,521
perlakuan2	kontrol	-7,6200*	2,9781	,049	-15,221	-,019
	perlakuan1	-4,9200	2,9781	,330	-12,521	2,681

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

Oneway

ANOVA

spermatid oval

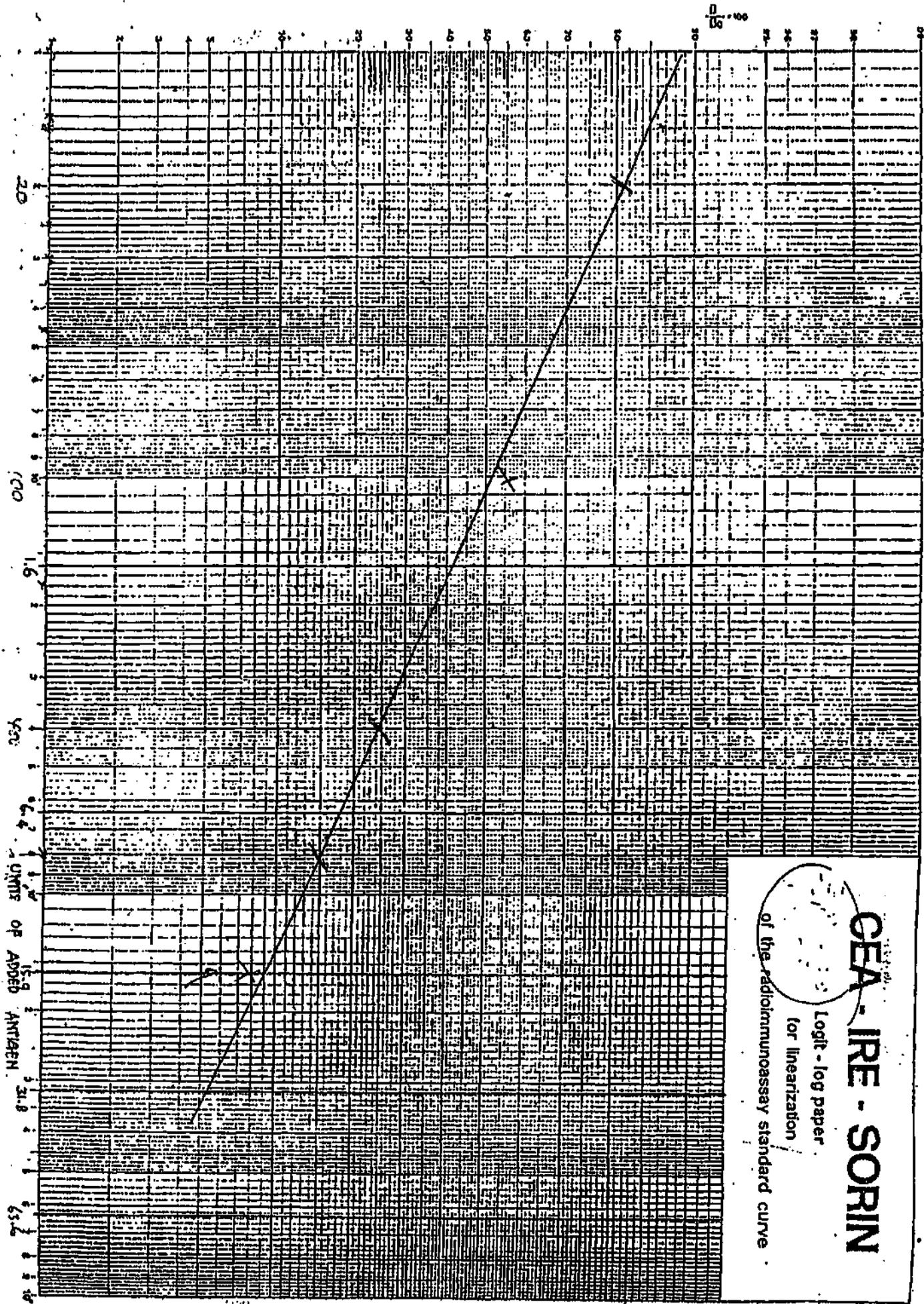
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	336,296	2	168,148	,152	,859
Within Groups	29808,456	27	1104,017		
Total	30144,752	29			

Lampiran 6

A. Tabel berat badan hewan coba

Kontrol	Perlakuan Hari ke-											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	24,5	25,8	24,2	26,1	26,2	27,7	26,8	27,4	26,3	27,9	25,8	26,4
2	25,9	26,3	24,8	27,8	27,3	28,2	23,5	27,7	27,1	26,8	28	28,1
3	25,8	26,2	23,3	25,9	26,4	26,7	28,1	27,7	27,4	26,4	26,2	26,5
4	23,1	24,8	22,9	27,5	27,3	27,5	26,7	28,3	27,2	28,6	28	28,2
5	25	23,7	28,2	24,3	26,8	23,2	24,6	24,1	27	27,8	27,8	27,9
6	22,9	24,5	31	26,6	28	25,9	28,8	27	30	28	27,7	28,5
7	24,7	26,8	27,9	25,4	25,9	22	25,8	23,2	27,6	30,6	30,5	31,2
8	25,3	26,5	26,2	27,7	27,6	28,7	28,1	28,4	27,6	29,4	28,9	30
9	24,8	23,4	22,7	25	22,2	28,1	23,7	23,3	22,1	30,4	29,3	30
10	25,2	27,5	30	28,3	27,3	30,1	25,5	26,1	24,8	30,6	31,3	29
Jumlah	244,2	250,3	261,2	264,6	265	268,1	261,6	263,2	267,1	286,5	283,5	285,8
Rat-rata	24,42	25,03	26,12	26,6	26,5	26,81	26,16	26,32	26,9	28,64	28,35	28,58
Pemaparan Dosis 50 mg/kg BB	Perlakuan Hari ke-											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	24,7	25,4	25,3	26,8	27,2	26,6	25	24,9	24,4	24,5	29	24
2	25,5	25,2	24,6	23	23,8	23,5	24,9	23,8	26,7	25,6	21,9	26,3
3	28,3	25,7	25,7	22,4	24,7	26,8	26,3	23,8	25,2	26,4	22,7	24,4
4	26,2	27,8	26,8	25,4	26,4	27,6	24,3	21	28	27,9	23,2	22,6
5	27,5	29,8	26,2	28,8	28,9	29,1	28,9	27,7	29,4	28,6	29	26,5
6	24,9	24,3	22,7	21,6	21,3	21,6	20,8	22,6	17,7	18,3	20,3	22
7	26,3	24,1	25	24,2	22,2	21,4	24,3	22,5	23,4	23,4	23	22,2
8	25,1	24,4	23,6	22,7	21,9	19,8	25,7	23,9	22,9	20,2	22,4	24,1
9	24,6	25,1	25,1	22,6	21,6	24,1	23,3	24,9	22,2	26,3	20,3	25,2
10	27,3	25,4	25,6	24,3	23,6	25	26,4	28	22,4	24,4	21,5	24,7
Jumlah	260,40	257,2	250,6	241,8	241,8	245,5	249,9	243,1	242,3	245,6	234,3	242
Rata-rata	26,04	25,72	25,06	24,18	24,18	24,55	24,99	24,310	24,23	24,56	23,43	24,2

Pemaparan Dosis 100 mg/kg BB	Perlakuan Hari ke-											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	25,4	27,1	25,6	26	23,9	23,6	21	22,5	22,9	23,4	19,8	19,4
2	25,4	24	24,6	24,5	24,5	22,4	22,2	24,3	18,1	25,8	19,4	18,5
3	33,5	19,6	25,3	25,3	24,8	24,4	23,8	22,1	24,1	19,5	24,3	24
4	31,4	26,9	27,7	28,2	31	32,1	30	27,4	28,5	23,4	28,1	25,3
5	33	33,3	32,3	33,3	30,3	33	32,5	30	30,3	32,7	29,4	27,5
6	29,1	32	31,8	31	28,8	30,4	32,3	29,2	30	29,6	30,2	29,8
7	28,4	32,6	32,5	32,6	30,3	31,1	31,5	28,9	28,5	29,3	27,8	26,7
8	27	23,3	21,2	22	23,7	21,2	20,1	22,4	21,6	25,1	21,9	21
9	25,5	24,7	23,4	20,9	23,8	21,9	21,9	22,69	22,7	22,4	20,3	21,4
10	30,3	27,2	25,2	24,1	22,5	22,4	23,4	24,6	26,3	21,5	21,6	22,4
Jumlah	289	270,7	268,60	271,90	263,60	266,50	258,70	254,09	253	252,70	242,80	238
Rat-rata	28,90	27,07	26,86	27,19	26,36	26,65	25,87	25,40	25,30	25,27	24,28	23,80




GEA - IRE - SORIN
 Logit - log paper
 for linearization
 of the radioimmunoassay standard curve