

**PENGARUH ASAM METOKSIASETAT
TERHADAP ORGAN REPRODUKSI DAN FERTILITAS MENCIT
ALBINO (*Mus musculus*) SWISS WEBSTER JANTAN**

**TESIS
PASCASARJANA PROGRAM MAGISTER**

Oleh :
**MAMAN RUMANTA
20692506**



**INSTITUT TEKNOLOGI BANDUNG
1994**

**PENGARUH ASAM METOKSIASETAT
TERHADAP ORGAN REPRODUKSI DAN FERTILITAS MENCIT
ALBINO (*Mus musculus*) SWISS WEBSTER JANTAN**

TESIS
Sebuah tesis sebagai salah satu syarat dalam
Program Pascasarjana Magister Biologi



Oleh :
MAMAN RUMANTA
20692506

Pembimbing: 1. Prof. Dr. Sri Sudarwati
2. Dra. Tien W. Suryono, MS.

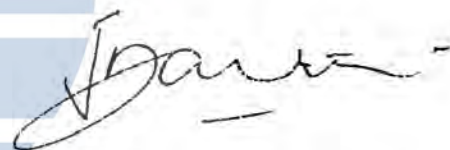
INSTITUT TEKNOLOGI BANDUNG
1994

**PENGARUH ASAM METOKSLASETAT
TERHADAP ORGAN REPRODUKSI DAN FERTILITAS MENCIT
ALBINO (*Mus musculus*) SWISS WEBSTER JANTAN**

Oleh :
MAMAN RUMANTA
20692506

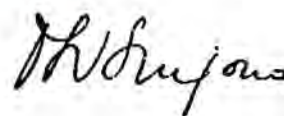
Diperiksa dan diterima oleh :

Pembimbing I :



Prof. Dr. Sri Sudarwati

Pembimbing II :



Dra. Tien W. Suryono, MS.

Bandung, September 1994



PEDOMAN PENGGUNAAN TESIS

Tesis Pascasarjana Program Magister ini tidak dipublikasikan namun terbuka untuk umum, dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada pengarang. Referensi kepustakaan diperkenankan dicatat, tetapi pengutipan atau ringkasan hanya dapat dilakukan seizin pengarang dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutkan sumbernya.



UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur kehadiran Allah SWT yang telah memberikan berkat serta karunia-Nya, sehingga pada kesempatan yang berbahagia ini penulis telah menyelesaikan sebuah tesis sebagai salah satu syarat dalam menempuh Program Magister di Institut Teknologi Bandung.

Dengan setulus hati, penulis mengucapkan terima kasih kepada Prof. Dr. Sri Sudarwati dan Dra. Tien W. Suryono, MS. yang telah membimbing penulis dengan penuh perhatian dan kesabaran mulai dari perencanaan, pelaksanaan penelitian, dan penulisan tesis ini.

Penulis pun tidak lupa mengucapkan terima kasih kepada:

Tim Manajemen Program Doktor Departemen Pendidikan dan Kebudayaan RI yang telah memberi bantuan berupa beasiswa selama mengikuti Program Magister di Institut Teknologi Bandung.

Direktur Program Pascasarjana ITB beserta staf, yang telah memberikan bantuannya selama mengikuti Program Magister di Institut Teknologi Bandung.

Pengelola program dan staf pengajar di Jurusan Biologi yang telah membekali ilmu, serta karyawan yang telah membantu penulis selama mengikuti pendidikan di ITB.

Rektor dan Dekan FKIP Universitas Terbuka yang telah mem-

berikan kesempatan kepada penulis untuk mengikuti Program Magister di ITB.

Tim penilai tesis yang telah mengoreksi dan memberikan masukan untuk perbaikan isi tesis ini.

Ayahanda (alm), Ibunda, Istriku, Ananda, Kakak, serta adik-adikku yang telah memberikan doa, semangat, dan bantuan baik moral maupun material.

Rekan-rekan seperjuangan yang telah membantu penulis dengan kritik, saran atau bantuan lainnya yang sangat membantu penulis dalam menyelesaikan tesis ini.

Sahabatku Achmad Nur Effendhi dan Aminuddin Juhairi yang telah membantu dalam mencari beberapa literatur yang sangat diperlukan dalam penyelesaian tesis ini.

Akhir kata semoga semua amal baik tersebut senantiasa mendapat balasan yang lebih dari Allah SWT.



A B S T R A K

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh asam metoksiasetat (MAA) terhadap organ reproduksi dan fertilitas mencit (*Mus musculus*) Swiss Webster jantan. Perlakuan MAA diberikan kepada mencit jantan umur tujuh minggu secara "gavage", sehari sekali selama empat minggu dengan satu hari istirahat pada setiap akhir minggu. Penelitian ini dilakukan dalam dua tahap percobaan. Percobaan I adalah untuk mengetahui pengaruh MAA dosis 100, 150, 225 dan 300 mg/kg bb terhadap organ reproduksi dan struktur testis. Percobaan II untuk mengetahui pengaruh MAA dosis 100, 125, 150, dan 175 mg/kg bb terhadap fertilitas dan pemulihan fertilitas mencit jantan. Mencit kontrol hanya diberi akuabides steril. Sehari setelah perlakuan MAA terakhir, mencit pada percobaan I dibunuh dan dibedah. Dilakukan pengamatan terhadap berat testis, epididimis, dan vesikula seminalis; jumlah, motilitas dan morfologi spermatozoa; diameter, tinggi epitel, dan kondisi tubulus seminiferus, serta struktur testis. Mencit pada percobaan II, sehari setelah perlakuan terakhir dikawinkan dengan mencit betina dara tanpa perlakuan. Uji pemulihan (40 hari pasca-perlakuan) hanya dilakukan pada mencit perlakuan dosis 125, 150, dan 175 mg/kg bb. Mencit betina dibunuh dan dibedah pada umur kebuntingan 18 hari. Dilakukan pengamatan terhadap kemampuan kawin, daya fertilisasi, indeks gestasi, dan penampilan reproduksi mencit betina pasangannya. Hasil percobaan I menunjukkan bahwa MAA dapat menurunkan berat testis dan berat epididimis, tetapi tidak menurunkan berat vesikula seminalis. Jumlah dan motilitas spermatozoa

epididimis kauda menurun, sedangkan spermatozoa abnormal meningkat sejalan dengan peningkatan dosis MAA. Perlakuan MAA menyebabkan penurunan diameter tubulus seminiferus, tebal epitel tubulus, dan persentase tubulus normal fase VII, serta meningkatkan jumlah tubulus yang abnormal. Spermatogonium A dan spermatosit praleptoten lebih tahan terhadap pengaruh MAA dibandingkan dengan sel spermatogenik lainnya. Jumlah sel Sertoli dan sel Leydig tidak terpengaruh oleh perlakuan MAA, meskipun sel Sertoli menampilkan gejala toksik yang diperlihatkan dengan adanya vakuolisasi. Pada percobaan II tampak, bahwa fertilitas mencit jantan perlakuan menunjukkan penurunan yang diperlihatkan oleh meningkatnya kehilangan praimplantasi yang nyata pada mencit betina pasangannya. Perlakuan MAA pada mencit jantan tidak menyebabkan kelainan eksternal pada generasi F_1 . Masa pemulihan selama 40 hari belum cukup untuk memulihkan kembali fertilitas mencit jantan perlakuan dosis tertinggi. Perlakuan MAA bersifat toksik terhadap mencit jantan yang ditandai dengan lebih rendahnya berat badan mencit perlakuan dibandingkan dengan kontrol. Dapat disimpulkan bahwa MAA mengganggu spermatogenesis mencit Swiss Webster, sehingga dapat menurunkan fertilitasnya, dan untuk dosis 175mg/kg bb waktu 40 hari pascaperlakuan belum cukup untuk memulihkan fertilitasnya.

A B S T R A C T

EFFECTS OF METHOXYACETIC ACID ON REPRODUCTIVE ORGANS AND FERTILITY OF SWISS WEBSTER ALBINO MALE MICE (*Mus musculus*)

The aim of this study was to observe the effects of methoxyacetic acid (MAA) on reproductive organs and fertility of Swiss Webster albino male mice. Seven week old mice were given a daily gavage dose of MAA, during four consecutive weeks with a weekend interruption. The experiment was divided into two stages. Experiment I was performed to observe the effects of MAA at doses of 100, 150, 225 and 300 mg/kg body weight on the weight of reproductive organs and testicular structure. Experiment II was performed to observe the effects of MAA at doses of 100, 125, 150 and 175 mg/kg body weight on the fertility of male mice and its recovery. Control mice were given sterile aquabidest only. In experiment I mice were sacrificed one day after the last MAA treatment and the observation was performed on the weight of the testis, epididymis, and seminal vesicle; the number, motility and morphology of caudal epididymal spermatozoa; diameter, epithelial thickness, and condition of seminiferous tubules; and also the testicular structure. In experiment II mice were mated with untreated virgin females one day after the last MAA treatment. Recovery fertility test (40 days posttreatment) was performed on the mice at doses of 125, 150, and 175 mg/kg body weight. The dams were sacrificed on gestation day 18 and the observation was done to determine the mating ability, fertilization ability, gestation index, and the reproductive performance of the female. The result of experiment I showed that MAA decreased the weight

of testis and epididymis but not the seminal vesicle. The number and motility of caudal epididymal spermatozoa also decreased, while the percentage of abnormal spermatozoa increased in relation to the doses given. MAA treatment decreased the diameter, epithelial thickness, and the percentage of stage VII seminiferous tubules, while the percentage of abnormal seminiferous tubules increased. Spermatogonia A and preleptotene spermatocytes were more resistant than other spermatogenic cells. The number of Sertoli and Leydig cells were not affected by MAA treatment, despite toxic phenomenon of Sertoli cell characterized by vacuolizations were shown. The result of experiment II showed that MAA decreased the fertility of male mice, which was shown by increasing preimplantation lost. External malformations were not found in the F_1 generation. Forty days posttreatment was not enough for the male mice treated with highest dose to recover its fertility. MAA treatment was toxic indicated by lower body weight compared to the controls. It could be concluded that MAA interferes the spermatogenesis of the mice, consequently decreases its fertility. The fertility of male mice treated with MAA at 175 mg/kg body weight does not recover within forty days posttreatment.

DAFTAR ISI

	Halaman
UCAPAN TERIMA KASIH	vii
ABSTRAK	ix
ABSTRACT	xi
DAFTAR ISI	xiii
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR TABEL	xvii
DAFTAR LAMPIRAN	xviii
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar belakang masalah	1
1.2 Tinjauan pustaka	5
1.2.1 Ester ftalat	5
1.2.2 Metabolisme dimetoksietil ftalat (DMEP) dan penyebarannya dalam tubuh hewan	6
1.2.3 Toksisitas dan teratogenisitas DMEP serta metabolitnya	9
BAB II BAHAN DAN PROSEDUR PENELITIAN	
2.1 Bahan	13
2.1.1 Hewan percobaan	13
2.1.2 Zat yang digunakan	13
2.2 Cara kerja	14
2.2.1 Rancangan percobaan	14
Pengelompokan hewan uji	15
2.2.2 Penentuan dosis	16

Konversi dosis	16
Percobaan pendahuluan	16
2.2.3 Pelaksanaan penelitian	17
Percobaan I	17
Percobaan II	24
2.3 Analisis dan interpretasi data	28
BAB III HASIL PENELITIAN	29
3.1 Percobaan I	29
3.1.1 Berat organ reproduksi mencit jantan	29
3.1.2 Pengaruh MAA terhadap spermatozoa epididimis kauda	31
3.1.3 Pengaruh MAA terhadap struktur testis dan aktivitas tubulus seminiferus	37
3.2 Percobaan II	46
3.2.1 Kemampuan kawin mencit jantan yang diberi perlakuan selama 4 minggu dan indeks gestasi mencit betina pasangannya pada uji kawin-1 dan uji kawin-2	46
3.2.2 Fertilitas mencit jantan yang diberi perlakuan MAA selama 4 minggu dan penampilan reproduksi mencit betina pasangannya pada uji kawin-1	46
3.2.3 Fertilitas mencit jantan yang diberi perlakuan MAA selama 4 minggu dan penampilan reproduksi mencit betina pasangannya pada uji kawin-2	48
3.3 Pengaruh MAA terhadap berat badan mencit jantan selama percobaan dan setelah mengalami masa pemulihan	52
BAB VI PEMBAHASAN	
4.1 Pengaruh MAA terhadap berat organ reproduksi mencit jantan	56
4.2 Pengaruh MAA terhadap spermatozoa epididimis kauda	58

4.3 Pengaruh MAA terhadap struktur testis	59
4.4 Pengaruh MAA terhadap fertilitas mencit jantan dan penampilan reproduksi mencit betina pasangannya pada uji kawin-1 dan uji kawin-2	62
4.5 Pengaruh MAA terhadap berat badan mencit jantan selama percobaan dan setelah mengalami masa pemulihan	65
BAB V KESIMPULAN	68
DAFTAR PUSTAKA	69



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Perbandingan pertumbuhan produksi plastik dengan komoditi lain	1
2. Pertumbuhan volume produksi tahunan plastik dan beberapa jenis logam	2
3. Metabolisme DMEP pada tubuh mammalia	7
4. Metabolisme dan ekskresi dimetoksietanol pada tikus jantan	8
5. Histogram pola penurunan berat organ reproduksi mencit jantan yang diberi perlakuan MAA selama 4 minggu	32
6. Histogram persentase motilitas dan spermatozoa abnormal mencit yang diberi perlakuan MAA selama 4 minggu	35
7. Histogram jumlah spermatozoa epididimis kauda mencit yang diberi perlakuan MAA selama 4 minggu	35
8. Histogram persentase komponen spermatozoa abnormal mencit yang diberi perlakuan MAA selama 4 minggu	36
9. a. Kelainan-kelainan kepala spermatozoa mencit yang diberi perlakuan MAA selama 4 minggu.....	38
b. Kelainan-kelainan pada bagian tengah dan ekor spermatozoa mencit yang diberi perlakuan MAA selama 4 minggu	38
10. Histogram diameter tubulus dan tebal epitel tubulus seminiferus mencit yang diberi perlakuan MAA selama 4 minggu	40
11. Kondisi tubulus seminiferus mencit yang diberi perlakuan MAA selama 4 minggu	41
12. Kondisi sel spermatogenik dan sel Sertoli mencit yang diberi perlakuan MAA selama 4 minggu	45

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Pengelompokan hewan uji	15
2. Skema pemberian zat	18
3. Faktor konversi untuk menghitung konsentrasi spermatozoa	21
4. Berat testis, epididimis, dan vesikula seminalis mencit jantan yang diberi perlakuan MAA selama 4 minggu	30
5. Jumlah, motilitas, dan morfologi spermatozoa epididimis kauda mencit yang diberi perlakuan MAA selama 4 minggu	33
6. Diameter dan tebal epitel tubulus, persentase tubulus fase VII, dan tubulus abnormal testis mencit yang diberi perlakuan MAA selama 4 minggu	39
7. Jumlah sel spermatogenik, sel Sertoli, dan sel Leydig testis mencit per kisi-kisi ($64 \mu\text{m}^2$) yang diberi perlakuan MAA selama 4 minggu	43
8. Kemampuan kawin mencit jantan yang diberi perlakuan MAA selama 4 minggu dan indeks gestasi mencit betina pasangannya pada uji kawin-1 dan uji kawin-2	47
9. Fertilitas mencit jantan yang diberi perlakuan MAA selama 4 minggu dan penampilan reproduksi mencit betina pasangannya pada uji kawin-1	49
10. Fertilitas mencit jantan yang diberi perlakuan MAA selama 4 minggu dan penampilan reproduksi mencit betina pasangannya pada uji kawin-2	50
11. Berat badan mencit jantan selama diberi perlakuan MAA secara "gavage"	53
12. Berat badan mencit pada akhir perlakuan MAA dan sesudah mengalami masa pemulihan selama 40 hari pascaperlakuan	55

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Komposisi dan bahan untuk pakan mencit CP 551 produksi PT Charoen Pokphand Indonesia	73
2. Kemampuan kawin mencit jantan dan indeks gestasi mencit betina pasangannya pada studi pendahuluan	74
3. Pembuatan sediaan awetan spermatozoa epididimis kauda dengan menggunakan metode dari Krzanowska (1981) yang dimodifikasi	75
4. Pembuatan larutan uji	76

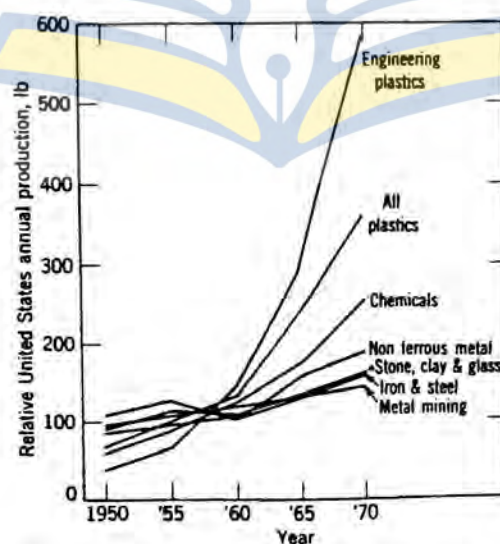


BAB I

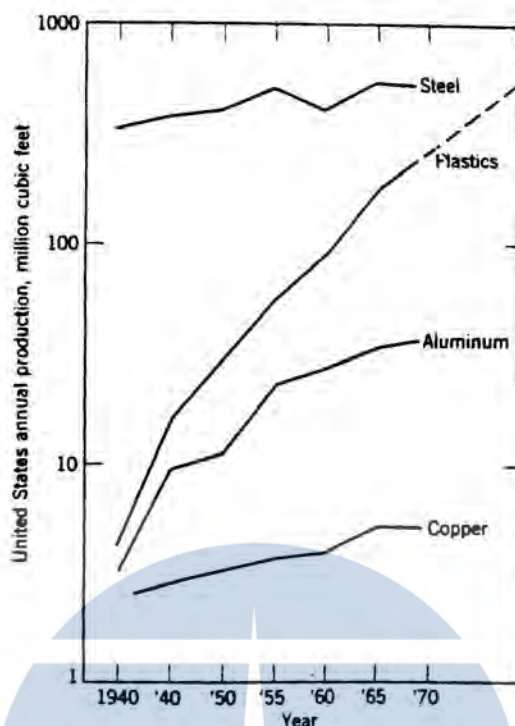
PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang masalah

Plastik merupakan bahan sintetis yang dirasakan sangat banyak manfaatnya bagi kehidupan manusia. Penggunaan plastik saat ini sudah sangat mendominasi kehidupan umat manusia, yaitu mulai dari peralatan rumah tangga, alat tulis-menulis, alat-alat kedokteran dan kesehatan, serta pengemas barang dan makanan. Hal ini terjadi karena plastik merupakan produk yang serba guna bagi kesejahteraan manusia. Dengan demikian, tidak mengherankan jika produksi plastik dari tahun ke tahun semakin meningkat dengan lingkup penggunaan yang semakin meluas. Sebagai gambaran, peningkatan produksi plastik sampai tahun 1970-an di Amerika Serikat dapat kita lihat seperti pada gambar 1 dan 2.



Gambar 1. Perbandingan pertumbuhan produksi plastik dengan komoditi lain (Guttoff, 1969 dalam Billmeyer, 1971)



Gambar 2. Pertumbuhan volume produksi tahunan plastik dan beberapa jenis logam (Guttoff, 1969 dalam Billmeyer, 1971)

Selain manfaat yang banyak dirasakan akibat penemuan plastik bagi kepentingan manusia, ternyata tidak sedikit pula dampak negatifnya. Hal ini terjadi, karena dalam industri plastik banyak digunakan ester ftalat (phthalate ester) sebagai bahan pelentur plastik (plasticizer). Seperti diungkapkan oleh Billmeyer (1962) penggunaan ester ftalat dalam industri plastik menempati urutan teratas, yaitu lebih dari setengah jumlah total pelentur plastik yang digunakan. Selebihnya menggunakan ester fosfat, adipat, epoksi, ester asam lemak, dan lain-lain. Semakin banyaknya penggunaan plastik dalam kehidupan manusia, telah banyak menimbulkan pencemaran ester ftalat pada beberapa sungai di AS (Hites dan Biemann, 1972 dalam

Suminarsih, 1992). Pencemaran ester ftalat juga dijumpai di teluk Meksiko dan perairan Atlantik utara (Giam et al., 1978 dalam Suminarsih, 1992). Ester ftalat ini banyak jenisnya, antara lain dimetoksietil ftalat (DMEP), dietoksietil ftalat, dietilheksil ftalat (DEHP), butil ftalat, amil ftalat, oktil ftalat, dietil ftalat, dikarbitol ftalat, dan sebagainya (Mellan, 1947).

Di antara ester-ester ftalat, yang paling toksik dan bersifat teratogenik adalah DMEP. Dari hasil penelitian terdahulu ternyata, bahwa teratogenisitas dan toksisitas DMEP disebabkan oleh metabolisme DMEP di dalam tubuh menjadi asam metoksiasetat (methoxyacetic acid atau MAA). Miller et al. (1982) menyimpulkan, bahwa penggunaan MAA dosis tinggi (300 mg/kg bb) dapat menurunkan berat badan tikus, degenerasi epitel germinal testis, penurunan ukuran timus, dan reduksi sel-sel sumsum tulang. Selain itu Ghanayem dan Chapin (1990) menyimpulkan, bahwa 2-metoksietanol (2-ME) dimetabolisasi di dalam tubuh menjadi MAA yang bersifat toksik pada testis tikus. Menurut Ritter et al. (1985), MAA dosis 2,07 mmol/kg bb yang diberikan secara oral menyebabkan embrio tikus mengalami kelainan berupa hidronefrosis, kelainan jantung, kelainan tungkai, dan ekor pendek. Masih banyak penelitian yang menyatakan bahwa MAA bersifat teratogenik terhadap embrio tikus. Namun sejauh pustaka yang berhasil ditelusuri, belum ada penelitian pada mencit jantan yang menguji pengaruh MAA terhadap organ reproduksi dan fertilitasnya.

Tujuan penelitian:

1. Untuk mengetahui pengaruh MAA terhadap organ reproduksi mencit Swiss Webster jantan.
2. Untuk mengetahui pengaruh MAA terhadap fertilitas mencit Swiss Webster jantan dan pemulihannya setelah diistirahatkan.

Hipotesis

1. MAA dapat mempengaruhi berat organ reproduksi dan struktur testis.
2. Berubahnya struktur testis dapat menyebabkan penurunan fertilitas mencit jantan.
3. Fertilitas mencit jantan akan pulih kembali setelah diistirahatkan selama satu siklus spermatogenesis.

1.2 Tinjauan pustaka

1.2.1 Ester ftalat

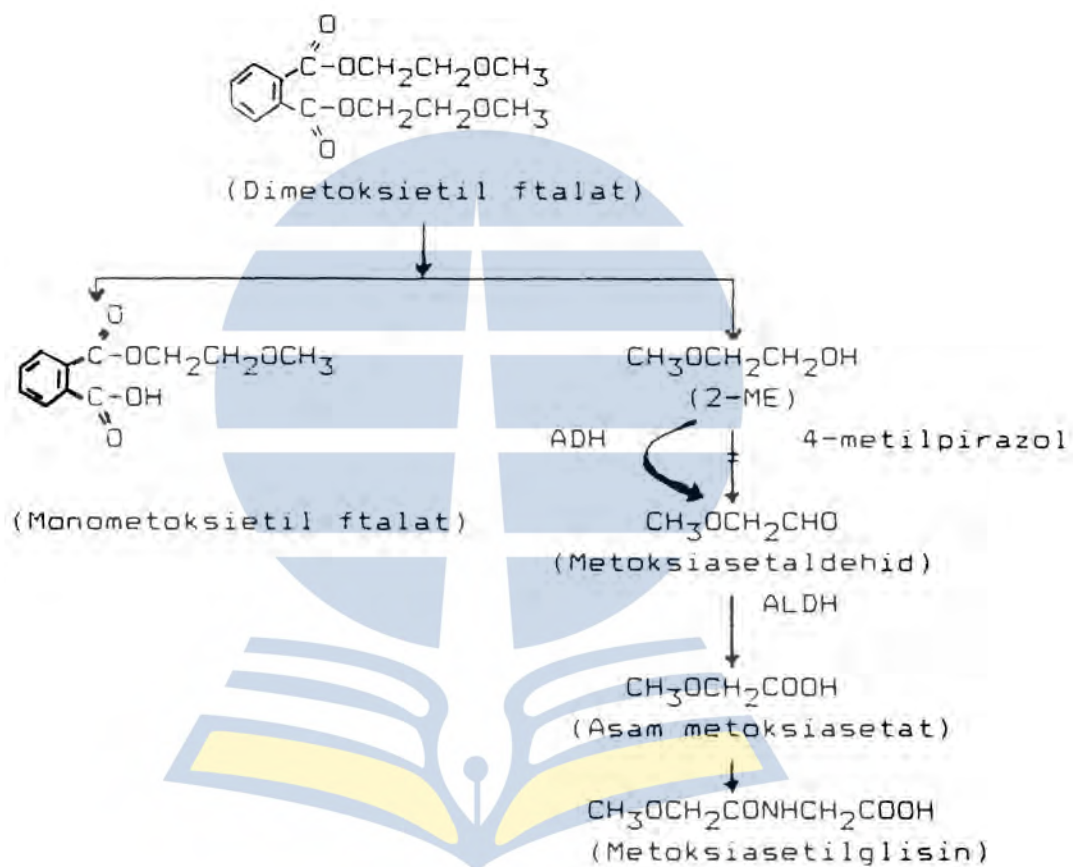
Ester ftalat merupakan zat yang berperan penting dalam industri plastik, karena sebagian besar industri plastik menggunakannya sebagai pelentur plastik. Ester ftalat memang merupakan bahan kimia yang cukup potensial untuk berbagai industri. Seperti dijelaskan oleh Parkie *et al* (1982), bahwa ester ftalat ditemukan dalam bahan campuran pembuatan ubin, berbagai jenis peralatan rumah tangga, pakaian kedap air, industri pipa plastik, pengemas makanan, industri peralatan kedokteran dan kesehatan. Di bidang kedokteran terdapat pada berbagai peralatan plastik, seperti katup jantung dan bahan untuk cangkakan pembuluh darah, IUD, kateter, perangkat untuk hemodialisis dan penyimpan darah, serta alat suntik sekali pakai. Selain itu ester ftalat juga banyak digunakan dalam industri insektisida seperti "polychlorinated biphenyl" (PCB) dan diklorodifeniltriikloroetan (DDT). Dengan demikian pencemaran ester ftalat di lingkungan selain berasal dari limbah plastik juga berasal dari sejumlah insektisida. Ester ftalat tidak saja merupakan pencemar di lingkungan, tetapi juga dapat langsung masuk ke dalam tubuh manusia melalui berbagai cara. Seperti dilaporkan oleh Jaeger & Rubin (1972), Gibson *et al.* (1976, dalam Lewandowski *et al.*, 1980), dan Sjoberg *et al.* (1986), ester ftalat (DEHP) yang merupakan pelentur utama pada pembuatan plastik polivinil klori-

da (PVC), dapat larut dalam plasma darah, selama darah tersebut disimpan dalam kantung plastik PVC dan selama proses pencucian darah. Dengan demikian, tidak mengherankan jika ester ftalat dapat masuk secara langsung ke dalam tubuh pasien selama transfusi dan pencucian darah. Pemberian DEHP pada tikus galur Sprague-Dawley dapat menyebabkan abnormalitas pada hati dan kerusakan testis (Patty, 1967 dan Verrett, 1969 dalam Sjoberg *et al.*, 1986). Selain itu Gray dan Gangolli (1986) menyimpulkan bahwa DEHP menyebabkan atrofi pada tubulus seminiferus dan mereduksi berat vesikula seminalis serta prostat pada tikus jantan galur Sprague-Dawley. Atrofi tubulus seminiferus mungkin terjadi akibat hambatan zat tersebut terhadap fungsi respirasi mitokondria sel Sertoli (Oishi, 1990).

1.2.2 Metabolisme dimetoksietil ftalat (DMEP) dan penyebarannya dalam tubuh hewan

Ester ftalat banyak sekali jenisnya dan sebagai pelentur plastik vinil saja diperkirakan ada 20 jenis (Parkhie *et al.*, 1982). Dari sejumlah ester ftalat yang ada, yang paling berbahaya adalah DMEP, karena selain bersifat toksik juga teratogenik terhadap embrio hewan. DMEP dalam tubuh mammalia akan dihidrolisis menjadi 2-metoksietanol (2-ME) yang selanjutnya akan dioksidasi dengan bantuan alkohol dehidrogenase (ADH) menjadi metoksiasetaldehid. Metoksiasetaldehid ini akan dioksidasi lebih lanjut dengan bantuan enzim aldehid dehidrogenase (ALDH)

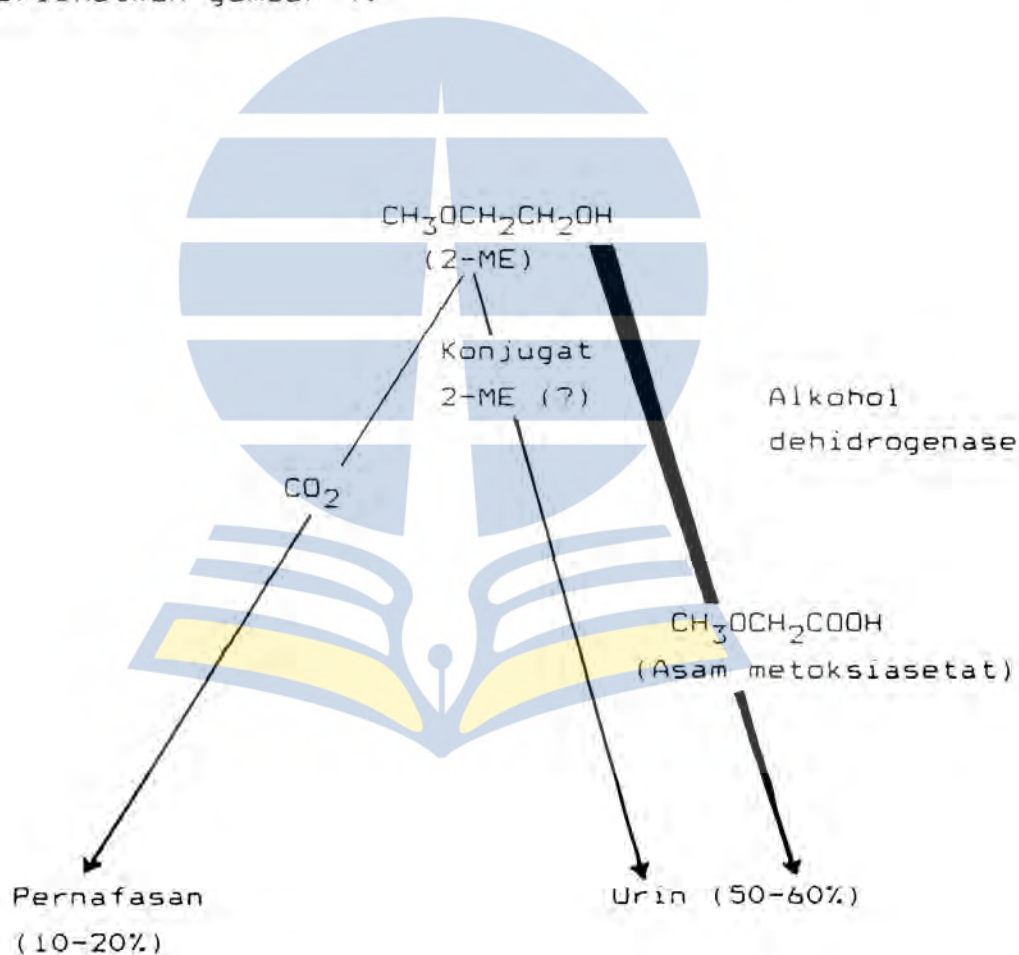
menjadi asam metoksiasetat (MAA). MAA dalam tubuh dapat bergabung dengan asam amino glisin menjadi metoksiasetilglisin, yang tidak toksik. Secara singkat proses penguraian DMEP di dalam tubuh mammalia dapat dirangkum dalam bagan berikut.



Gambar 3. Metabolisme DMEP pada tubuh mammalia (Miller *et al.*, 1983, Moss *et al.*, 1985, dan Ritter *et al.*, 1985)

Asam metoksiasetat dan metoksiasetilglisin hasil metabolisme tersebut terutama diekskresikan bersama urin. Miller *et al.* (1983) yang melakukan penelitian mengenai

ekskresi (^{14}C)2-ME oleh tikus Fischer jantan yang diberi perlakuan zat tersebut dengan dosis tunggal 8,7 mmol/kg bb menyatakan, bahwa 48 jam setelah perlakuan lebih kurang 50-60% karbon radioaktif tersebut diekskresikan melalui urin, kira-kira 12% dieliminasi melalui pernafasan dalam bentuk karbondioksida, dan melalui feses lebih kurang 2,7%. Untuk lebih jelasnya, metabolisme dan ekskresi 2-ME diperlihatkan gambar 4.



Gambar 4. Metabolisme dan ekskresi 2-ME pada tikus jantan (Miller et al., 1983)

Hal tersebut menunjukkan bahwa ekskresi utama metabolisme 2-ME adalah melalui urin. Selebihnya bisa melalui kulit, paru-paru, dan feses.

Penyebaran 2-ME dan metabolitnya (MAA) dalam tubuh sangat luas, karena zat-zat tersebut masuk ke dalam sirkulasi darah. Hasil penelitian menunjukkan bahwa organ target utamanya adalah testis, limpa, timus, dan sumsum tulang. Miller *et al.* (1983) dengan menggunakan (^{14}C)2-ME yang diberikan pada tikus Fischer344 menjelaskan, bahwa setelah pemberian zat tersebut, karbon radioaktif ditemukan dalam jumlah kecil pada organ target (testis, limpa, dan timus). Hal ini menunjukkan bahwa 2-ME dan metabolitnya tidak mungkin diakumulasi dalam jaringan tubuh hewan.

1.2.3 Toksisitas dan teratogenisitas DMEP serta metabolitnya

Campbell *et al.* (1984, dalam Ritter *et al.*, 1985) melaporkan bahwa MMEP sebagai metabolit DMEP tidak bersifat teratogenik, tetapi 2-ME sangat teratogenik. Dimetoksi-etanol (2-ME) banyak digunakan dalam berbagai industri, antara lain sebagai pelarut resin, tinta, dan bahan celup. Brown *et al.* (1984) dan Campbell *et al.* (1984, dalam Ritter *et al.*, 1985) menjelaskan bahwa teratogenisitas DMEP dan 2-ME sebenarnya disebabkan oleh penguraian zat-zat tersebut menjadi MAA.

Bahaya DMEP dan metabolitnya bagi hewan telah dilaporkan oleh banyak peneliti. Pemberian MAA secara intra-

peritoneal (ip) pada tikus Wistar pada umur kebuntingan 8, 10, 12, dan 14 hari menyebabkan kematian dan kelainan pada embrio (Brown *et al.*, 1984).

Feuston *et al.* (1990) melaporkan, bahwa pemberian 2-ME melalui kulit tikus Sprague-Dawley betina pada umur kebuntingan 12 hari menyebabkan peningkatan malformasi pada fetus, penurunan berat badan fetus, tetapi tidak menyebabkan kematian embrio. Hal ini terjadi karena 2-ME sangat cepat menembus kulit. Hal serupa dilaporkan Ohi dan Wegman (1978), Zavan (1963, dalam Feuston *et al.*, 1990) bahwa 2-ME menimbulkan efek toksik pada manusia melalui pendedahan zat tersebut pada kulit.

Scott (1987) melaporkan bahwa pemberian 2-ME pada tikus umur kebuntingan 12 hari menyebabkan kelainan pada fetus, yaitu duplikasi ventral autopodium, yang disebabkan oleh metabolitnya (MAA). Scott *et al.* (1989) melaporkan bahwa pemberian 2-ME pada *Macaca fascicularis* selama periode organogenesis (umur kebuntingan 20-45 hari) dengan dosis 0,45 mmol/kg bb. menyebabkan kematian fetus pada semua kebuntingan. Satu di antara embrio yang mati tersebut abnormal, yakni kehilangan satu jari pada setiap anggota depan. Pada pemberian dosis 0,32 mmol/kg bb., tiga dari 10 betina bunting berakhir dengan kematian embrio. Tiga dari 13 betina bunting mengalami hal yang serupa pada pemberian dengan dosis 0,16 mmol/kg bb. Hal ini menunjukkan, bahwa 2-ME merupakan toksin yang potensial terhadap perkembangan embrio primata. Greene *et al.* (1987) melaporkan pula bahwa pemberian 2-ME pada mencit CD-1 umur kebuntingan 11 hari

menyebabkan kelainan pada jari.

Ghanayem dan Chapin (1990) menjelaskan, bahwa pemberian 2-ME dosis tunggal yaitu 200 atau 300 mg/kg bb pada tikus F344 dapat mengakibatkan kerusakan pada testis, yang ditandai dengan kematian sel spermatosit pakiten pada tubulus tahap XIV. Bagaimana mekanisme 2-ME sampai menyebabkan kerusakan pada sel spermatosit pakiten tersebut belumlah jelas. Tetapi Foster *et al.* (1983) dan Hobson *et al.* (1986), keduanya dalam Ghanayem dan Chapin (1990), menjelaskan bahwa membengkak dan lisisnya mitokondria merupakan gejala awal dari rusaknya spermatosit pakiten oleh zat tersebut. Kerusakan mitokondria tersebut terjadi, karena 2-ME mengganggu keseimbangan kalsium dalam sel.

Ratnasooriya dan Sharpe (1989) menjelaskan, bahwa pemberian MAA dosis tinggi (650 mg/kg bb) pada tikus Sprague-Dawley jantan menyebabkan pengosongan spermatosit fase pakiten dan tahap lebih lanjut dari tubulus seminiferus, penurunan jumlah spermatozoa di epididimis kauda, dan menurunkan motilitas spermatozoa 4-7 minggu pascaperlakuan.

Foster *et al.* (1987) melaporkan terjadinya pengurangan berat testis secara nyata pada tikus jantan yang diberi perlakuan MAA. Pengamatan histologis menunjukkan adanya kerusakan spermatosit yang sedang melakukan pembelahan meiosis 24 jam setelah pemberian MAA secara oral. Sedangkan Foster *et al.* (1983, dalam Foster *et al.*, 1987) mengemukakan, bahwa spermatosit pakiten dan spermatosit

sekunder merupakan tahapan spermatogenik yang paling sensitif terhadap perlakuan 2-ME yang diberikan secara oral.

Miller *et al.* (1982) menjelaskan, bahwa pemberian MAA dosis 300 mg/kg bb setiap hari pada tikus jantan selama 2 minggu menyebabkan penurunan berat badan, degenerasi epitel germinal testis, pengosongan elemen-elemen limfoid dalam korteks timus, dan reduksi sel-sel sumsum tulang.



BAB II

BAHAN DAN CARA KERJA

2.1 Bahan

2.1.1 Hewan percobaan

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit albino Swiss Webster. Hewan tersebut diperoleh dari Laboratorium Pemeliharaan Hewan, Jurusan Farmasi ITB yang selanjutnya dikembangkan di rumah hewan Jurusan Biologi ITB. Untuk penelitian ini hewan jantan dan betina dipelihara dalam kandang terpisah dan diberi penerangan selama 12 jam (jam 06.00–18.00). Selama pemeliharaan mencit, rata-rata suhu ruangan minimum 23,6 °C dan maksimum 26 °C, serta kelembaban relatif rata-rata 80,6 %. Dalam penelitian ini mencit diberi pakan standar untuk anak babi (CP 551) dalam bentuk butiran produksi PT Charoen Pokphand Indonesia (komposisi pakan lihat lampiran 1) dan air minum berupa air ledeng yang diberikan secara *ad libitum*.

2.1.2 Zat yang digunakan

Zat yang digunakan dalam penelitian ini adalah asam metoksiasetat (MAA), buatan Wako Pure Chemical Industries, Ltd., dengan rumus kimia $\text{CH}_3\text{OCH}_2\text{COOH}$. Zat ini mempunyai berat jenis 1,172–1,180, kandungan air maksimum 3,0%, dan kemurnian 95,0%.

2.2 Cara kerja

2.2.1 Rancangan percobaan

Mencit yang akan diberi perlakuan ditempatkan dalam suatu ruangan yang sudah dikondisikan sedemikian rupa, sehingga kondisinya dapat dianggap seragam baik suhu ruangan, kelembaban, pakan dan kandang, maupun penerangannya. Selanjutnya mencit dikelompokkan secara acak sesuai dengan keperluan. Oleh karena itu rancangan penelitian yang digunakan adalah rancangan acak lengkap (RAL).

Adapun model linear rancangan acak lengkap menurut Totowarsa & Cucu (1982):

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \epsilon_{ij}$$

t --- i = 1, 2, 3,

r --- j = 1, 2, 3,

Y_{ij} = respons hewan percobaan terhadap perlakuan ke-i, ulangan ke-j; μ = rata-rata respons; α_i = pengaruh perlakuan ke-i yang akan diuji; ϵ_{ij} = pengaruh faktor acak.

Dalam penelitian ini percobaan dilakukan dalam dua tahap, yaitu:

Percobaan I

Percobaan ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh MAA terhadap organ reproduksi mencit jantan, serta kondisi spermatozoa di epididimis kauda.

Percobaan II

Tujuannya untuk mengetahui pengaruh MAA terhadap fertilitas mencit jantan dan pemulihannya.

Pengelompokan hewan uji

Dalam penelitian ini hewan yang diberi perlakuan adalah mencit jantan berumur tujuh minggu dengan berat antara 26,5 - 31,5 g. Mencit jantan dikelompokkan ke dalam dua tahap percobaan dengan cara acak. Untuk lebih jelasnya, cara pengelompokan mencit jantan yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah seperti pada tabel berikut.

Tabel 1. Pengelompokan hewan uji

Tahap percobaan	Kelompok	Dosis MAA (mg/kg bb)	Jumlah hewan (ekor)
I	- Kontrol	0	n
	- Perlakuan _{1-i}	d_{1-i}	
II	- Kontrol	0	n
	- Perlakuan _{1-i}	d_{1-i}	

i = perlakuan dan dosis ke- i

Konversi dosis

Dosis yang akan digunakan dalam penelitian ini didasarkan pada percobaan Miller *et al.* (1982) yang menggunakan dosis efektif MAA 300 mg/kg bb secara "gavage" pada tikus. Untuk diberikan pada mencit, dosis tersebut dikonversikan menurut Laurence & Bacharach (1964, dalam Sugiarto, 1986), dengan cara sebagai berikut:

Rata-rata berat tikus yang digunakan Miller *et al.* (1982) adalah 258,5 g dan dosis yang digunakannya 300 mg/kg bb, maka dosis absolut MAA untuk tikus tersebut adalah:

$$\frac{258,5}{1000} \times 300 \text{ mg} = 77,55 \text{ mg}$$

Rata-rata berat mencit Swiss Webster jantan umur tujuh minggu adalah 29 gram. Faktor konversi dari tabel Laurence & Bacharach (1964, dalam Sugiarto, 1986) adalah 0,14, sehingga dosis absolut MAA untuk mencit percobaan ini:

$$77,55 \times 0,14 = 10,857 \text{ mg MAA}$$

Dosis MAA untuk setiap kilogram mencit adalah:

$$\frac{1000}{29} \times 10,857 = 374,4 \text{ mg MAA } (\approx 375 \text{ mg MAA}).$$

Dengan demikian dosis tertinggi yang akan digunakan dalam pencarian dosis pada percobaan ini dimulai dengan dosis tertinggi 375 mg/kg bb.

Percobaan pendahuluan

Dosis hasil konversi belum tentu merupakan dosis efektif bagi mencit. Oleh karena itu, dicobakan lima dosis MAA, yaitu 100, 150, 225 mg/kg bb, 300 mg/kg bb, dan 375 mg/kg bb. Hasil percobaan ini menunjukkan bahwa dosis 375 mg/kg bb bersifat letal bagi mencit jantan umur tujuh minggu, bila diberikan secara berturut-turut selama empat minggu dengan satu hari istirahat pada setiap akhir minggu.

Berdasarkan percobaan pendahuluan ini, maka dosis MAA untuk percobaan I adalah 100 mg/kg bb, 150 mg/kg bb, 225 mg/kg bb, dan 300 mg/kg bb. Untuk percobaan II dosis MAA yang digunakan adalah 100 mg/kg bb, 125 mg/kg bb, 150 mg/kg bb, dan 175 mg/kg bb. Sebagai kontrol digunakan mencit yang hanya diberi pelarut MAA saja, yaitu akuabides steril. Dua dosis tertinggi pada percobaan I, yaitu 225 mg/kg bb dan 300 mg/kg bb tidak digunakan dalam percobaan II karena menyebabkan infertilitas pada mencit jantan (lampiran 2).

2.2.3 Pelaksanaan penelitian

Percobaan I

a. Cara pemberian MAA

Mencit jantan berumur tujuh minggu dikelompokkan secara acak menjadi lima kelompok seperti tersebut di atas. Pemberian MAA dilakukan dengan cara "gavage", dengan

volume pemberian 0,1 ml/10 gram berat badan mencit dan dilakukan setiap hari selama empat minggu berturut-turut, dengan satu hari istirahat pada setiap akhir minggu (tabel 2). Dosis MAA yang diberikan adalah 100 mg/kg bb, 150 mg/kg bb, 225 mg/kg bb, dan 300 mg/kg bb. Kelompok kontrol hanya diberi akuabides steril dengan volume pemberian yang sama. Berat badan mencit jantan ditimbang sebelum di-"gavage".

Tabel 2. Skema pemberian zat

Kelompok mencit	Minggu/hari ke:			
	I	II	III	IV
	1234567	1234567	1234567	123456
a. Kontrol (akuabides steril)	+++++--	+++++--	+++++--	+++++
b. Perlakuan (MAA)	+++++--	+++++--	+++++--	+++++

+ = pemberian zat
- = istirahat

b. Pembedahan dan penimbangan berat organ reproduksi

Sehari setelah pemberian zat terakhir, semua mencit jantan baik kelompok perlakuan maupun kontrol dibunuh dengan cara dislokasi leher. Testis, epididimis, dan vesikula seminalis diangkat, selanjutnya dibersihkan dari darah dan lemak dalam larutan salin (NaCl 0,9 %). Setelah itu setiap pasang organ ditimbang dan hasilnya dirata-ratakan.

c. Pengamatan kondisi spermatozoa epididimis kauda

Pembuatan suspensi semen

Setelah epididimis ditimbang, bagian kauda dipisahkan. Selanjutnya setiap epididimis kauda dimasukkan ke dalam cawan Petri yang sudah berisi 10 ml larutan "Dulbecco's phosphate buffered saline (solution A)" atau PBSA (Fresney, 1986). Kemudian diiris-iris dengan menggunakan pisau yang tajam atau gunting bedah mata. Dengan menggunakan pipet, suspensi tersebut diaduk dengan jalan menyedot dan menyembrotkan kembali secara berulang-ulang.

Menghitung motilitas spermatozoa

Segera setelah suspensi semen dibuat, satu tetes suspensi tersebut dibubuhkan pada ruang hitung hemasitometer tipe "Neubauer improved" dengan menggunakan pipet Pasteur, kemudian diamati di bawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 400X dan segera diamati pergerakan spermatozoanya. Jika jumlah spermatozoa terlalu banyak sehingga menyulitkan dalam pengamatan, dilakukan pengenceran sediaan dengan menambahkan larutan PBSA sehingga pergerakan spermatozoa mudah diamati.

Spermatozoa pada setiap segi empat makro dengan cepat ditentukan motilitasnya dengan kriteria sebagai berikut:

- (A) Spermatozoa bergerak cepat dan lurus kemuka.
- (B) Spermatozoa bergerak lamban atau sulit maju atau bergerak tidak lurus.
- (C) Spermatozoa bergerak di tempat.

(D) Spermatozoa tidak bergerak.

Motilitas setiap sampel spermatozoa minimal ditentukan dari 100 spermatozoa. Persentase motilitas spermatozoa dihitung dengan cara sebagai berikut:

$$\text{Persentase motilitas} = \frac{(A) + (B)}{(A)+(B)+(C)+(D)} \times 100 \%$$

(WHO, 1988)

Menghitung konsentrasi spermatozoa epididimis kauda

Suspensi semen ditetaskan pada kaca objek, ditutup dengan kaca penutup, selanjutnya diamati di bawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 400X. Jika dalam satu lapangan pandang ditemukan 10 spermatozoa, ini berarti bahwa secara kasar jumlah spermatozoa dalam suspensi tersebut 10 juta/ml (WHO, 1988).

Pengenceran sampel untuk menghitung spermatozoa yang lebih teliti dilakukan sebagai berikut (WHO, 1988). Jika secara kasar ditemukan spermatozoa:

- a) < 20 juta/ml suspensi maka satu bagian suspensi ditambah dengan sembilan bagian larutan PBSA.
- b) 20 juta-100 juta/ml suspensi, maka satu bagian suspensi ditambah dengan 19 bagian larutan PBSA.
- c) > 100 juta/ml suspensi, maka satu bagian suspensi ditambah dengan 49 bagian PBSA.

Setelah dilakukan pengenceran sesuai dengan jumlah spermatozoa yang tercacah pada penghitungan konsentrasi

secara kasar, selanjutnya pencacahan konsentrasi spermatozoa dilakukan dalam ruang hitung hemasitometer tipe "Neubauer improved". Caranya satu tetes sediaan hasil pengenceran diletakkan pada ruang hitung hemasitometer, selanjutnya spermatozoa yang ada dalam satu segi empat makro dihitung jumlahnya. Jika dalam satu segi empat makro jumlah spermatozoa kurang dari 10, maka jumlah spermatozoa di seluruh segi empat makro (25 segi empat makro) harus dihitung; jika dalam satu segi empat makro terdapat 10-40 spermatozoa, maka jumlah spermatozoa dihitung pada 10 segi empat makro; jika jumlah spermatozoa yang tercacah pada satu segi empat makro berjumlah lebih dari 40, maka jumlah spermatozoa dihitung pada lima segi empat makro. Menentukan jumlah spermatozoa dalam setiap ml suspensi (juta/ml suspensi) ialah dengan cara membagi jumlah spermatozoa yang ditemukan dengan faktor konversi berikut:

Tabel 3. Faktor konversi untuk penghitungan konsentrasi spermatozoa

Pengenceran (suspensi semen + PBSA)	Jumlah segi empat makro yang dihitung :		
	25	10	5
1 + 9	10	4	2
1 + 19	5	2	1
1 + 49	2	0,8	0,4

(Mortimer, 1985 dalam WHO, 1988)

Misalnya, jika dari 25 segi empat makro ditemukan 10 spermatozoa dalam sediaan yang diencerkan 1 + 49, hal ini berarti bahwa 1 ml suspensi mengandung $10 : 2 = 5$ juta spermatozoa.

Menghitung persentase spermatozoa normal dan abnormal

Pengamatan persentase spermatozoa dengan morfologi normal atau abnormal dihitung dari 200 spermatozoa. Dari yang abnormal ini dikelompokkan lagi menjadi spermatozoa yang mempunyai kelainan kepala, bagian tengah, dan bagian ekor. Penghitungan dilakukan dari sediaan segar dan sediaan awetan (Yatim, 1988, WHO, 1988). Cara membuat sediaan awetan spermatozoa dapat dilihat pada lampiran 3.

d. Pengamatan histologis testis

Pembuatan sediaan histologis testis

Testis difiksasi dalam larutan Bouin selama tiga hari. Setelah itu organ tersebut didehidrasi melalui seri normal-Butil Alkohol atau n-BA (Brauer, 1961).

Selesai didehidrasi dan dijernihkan selanjutnya organ tersebut diinfiltrasi dan ditanam dalam parafin, disayat dengan mikrotom dengan ketebalan 6 μ m, kemudian ditempel pada kaca objek. Sayatan yang sudah ditempel diwarnai dengan pewarnaan Hematoksin & Eosin atau H&E (Sutasurya, 1985).

Parameter yang diamati

Kondisi tubulus seminiferus

Morfologi tubulus yang normal dan abnormal diamati dengan cara mengamati sediaan histologis testis di bawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 200X. Persentase tubulus yang normal dan abnormal diamati dari 200 tubulus yang sayatannya berbentuk bulat. Pengamatan tubulus yang normal dibatasi pada tubulus fase VII, sedangkan tubulus yang abnormal adalah tubulus yang asosiasi selnya tidak lengkap dan tubulus yang bervakuola.

Diameter tubulus dan tinggi epitel

Rata-rata diameter tubulus dan lumen dihitung dari 40 tubulus dengan menggunakan mikrometer di bawah mikroskop perbesaran 400 X. Tinggi epitel tubulus dihitung dengan cara sebagai berikut:

$$\text{Tinggi epitel} = \frac{\text{diameter tubulus} - \text{diameter lumen}}{2}$$

Jumlah sel Leydig

Jumlah sel Leydig diamati di bawah mikroskop cahaya perbesaran 400X dengan menggunakan kisi-kisi (grid) khusus. Jumlah sel Leydig ini diamati pada daerah pengamatan yang tubulusnya tersayat bulat dan untuk setiap sampel

dihitung dari 64 kisi-kisi, kemudian dihitung rata-ratanya untuk setiap kisi-kisi.

Jumlah sel spermatogenik dan sel Sertoli

Jumlah sel spermatogenik dan sel Sertoli diamati pada tubulus yang sedang berada dalam fase VII. Untuk memudahkan pengamatan, sel spermatogenik yang diamati hanya spermatogonium A, spermatosit praleptoten, spermatosit pakiten, dan spermatid 7, sedangkan spermatid 19 tidak diamati. Sel spermatogenik dan sel Sertoli dihitung seperti pada pengamatan jumlah sel Leydig, tetapi dengan menggunakan mikroskop cahaya perbesaran 1000X.

Percobaan II

a. Cara pemberian MAA

Mencit jantan yang telah dikelompokkan menjadi lima kelompok menurut dosis pemberian MAA, yaitu 100 mg/kg bb, 125 mg/kg bb, 150 mg/kg bb, 175 mg/kg bb dan kontrol, kemudian diberi perlakuan sesuai dengan dosis yang telah ditentukan. Cara pemberian MAA sama dengan pada percobaan I.

b. Uji kawin-1

Sehari setelah pemberian MAA yang terakhir, semua mencit jantan dikawinkan dengan betina dara tanpa perlakuan. Caranya adalah segera setelah pemberian MAA yang terakhir, semua mencit jantan ditempatkan dalam kandang

baru, setiap kandang diisi satu ekor jantan. Uji kawin dilakukan pada sore hari (pukul 16.00–18.00) dengan cara menambahkan satu ekor betina yang sedang dalam tahap proestrus atau estrus ke dalam kandang yang telah berisi mencit jantan. Keberhasilan kopulasi ditandai dengan terjadinya sumbat vagina pada keesokan paginya. Adanya sumbat vagina dinyatakan sebagai hari kebuntingan ke nol (Brown *et al.*, 1984, Taylor, 1986, Manson & Kang, 1989). Setelah dikawinkan, mencit jantan dipisahkan dari betinanya. Selanjutnya mencit jantan dipelihara selama 40 hari setelah perlakuan MAA terakhir. Mencit betina yang bersumbat vagina dipelihara sampai hari kebuntingan ke-18.

c. Uji kawin-2 (uji pemulihan)

Setelah mencit jantan dipelihara selama 40 hari sejak pemberian MAA dihentikan, mencit dengan perlakuan MAA dosis 125, 150, dan 175 mg/kg bb ditimbang. Selanjutnya dilakukan uji pemulihan dengan cara yang sama seperti pada uji kawin-1.

d. Pengamatan hasil uji kawin

Berat badan mencit betina pasangan uji kawin dicatat pada hari kebuntingan ke-0 dan ke-18. Pada hari kebuntingan ke-18, mencit betina pada uji kawin-1 dan uji kawin-2 dibunuh dengan cara dislokasi leher, kemudian dibedah dan

ovarium serta uterusnya diangkat.

Setiap ovarium dibersihkan dengan larutan salin (NaCl 0,9%), selanjutnya diamati di bawah mikroskop bedah dan jumlah korpus luteum pada ovarium kiri dan kanan dihitung.

Setiap uterus dibedah pada sisi yang berlawanan dengan tempat implantasi, kemudian isinya didedahkan. Selanjutnya diamati jumlah fetus hidup, fetus mati, embrio yang diresorpsi, dan jumlah implantasi. Kelainan-kelainan eksternal yang terjadi dan adanya perdarahan pada fetus diamati, kemudian berat setiap fetus ditimbang.

Pengamatan dan penghitungan untuk setiap parameter dilakukan per induk, kecuali untuk kemampuan kawin dan indeks gestasi. Jenis parameter dan cara menghitungnya adalah sebagai berikut.

Kemampuan kawin:

Jumlah jantan kawin	
Jumlah jantan yang dikawinkan	X 100 %

Indeks gestasi:

Jumlah betina bunting	
Jumlah betina bersumbat vagina	X 100 %

Daya fertilisasi:

Jumlah implantasi	
Jumlah korpus luteum	X 100 %

(Ford *et al.*, 1979 dalam Yatim, 1988)

Kehilangan praimplantasi:

$$\frac{\text{Jumlah korpus luteum} - \text{Jumlah implantasi}}{\text{Jumlah korpus luteum}} \times 100\%$$

(Ujhazy *et al.*, 1992, Manson & Kang, 1989)

Kematian pascaimplantasi:

$$\frac{\text{Jumlah implantasi} - \text{Jumlah fetus hidup}}{\text{Jumlah implantasi}} \times 100\%$$

(Ujhazy *et al.*, 1992, Manson & Kang, 1989)

Persentase fetus hidup:

$$\frac{\text{Jumlah fetus hidup}}{\text{Jumlah implantasi}} \times 100\%$$

(Manson dan Kang, 1989)

Persentase fetus mati:

$$\frac{\text{Jumlah fetus mati}}{\text{Jumlah implantasi}} \times 100\%$$

(Manson dan Kang, 1989)

Persentase embrio yang diresorpsi:

$$\frac{\text{Jumlah embrio yang diresorpsi}}{\text{Jumlah implantasi}} \times 100\%$$

Rata-rata berat fetus:

$$\frac{\text{Berat seluruh fetus hidup}}{\text{Jumlah fetus hidup}}$$

Persentase fetus yang mengalami perdarahan:

$$\frac{\text{Jml fetus dengan perdarahan}}{\text{Jumlah fetus hidup}} \times 100 \%$$

Persentase fetus yang mengalami malformasi eksternal:

$$\frac{\text{Jumlah fetus dengan cacat eksternal}}{\text{Jumlah fetus hidup}} \times 100 \%$$

Rasio seks:

$$\frac{\text{Jumlah fetus jantan}}{\text{Jumlah fetus betina}}$$

(Manson dan Kang, 1989)

Fertilitas mencit jantan diukur dari kemampuan kawin dan daya fertilisasi, serta secara tidak langsung dari indeks gestasi mencit betina pasangannya.

2.3 Analisis dan interpretasi data

Dalam penelitian ini data yang bersifat parametrik diuji dengan menggunakan uji analisis variansi (Anava) satu arah (Walpole & Myers, 1986, Sudjana, 1989). Jika terjadi perbedaan yang nyata, maka dilanjutkan dengan uji LSD (Totowarsa & Cucu, 1982).

Untuk data nonparametrik dilakukan pengujian dengan menggunakan uji Kruskal-Wallis. Jika terdapat perbedaan yang nyata dilanjutkan dengan uji jumlah peringkat Wilcoxon (Walpole & Myers, 1986, Ritonga, 1987). Khusus untuk indeks gestasi dan kemampuan kawin mencit jantan, digunakan uji khi-kuadrat (Ritonga, 1987).

BAB III

HASIL PENGAMATAN

3.1 Percobaan I

3.1.1 Berat organ reproduksi mencit jantan

Berat testis, epididimis, dan vesikula seminalis mencit yang diberi perlakuan MAA selama 4 minggu berturut-turut ditampilkan pada tabel 4.

Pada tabel tersebut dapat dilihat bahwa organ yang paling utama terpengaruh oleh MAA adalah testis. Hal ini terlihat dengan sudah menurunnya berat testis secara nyata ($p \leq 0,05$) dari kontrol mulai dosis paling rendah (100 mg/kg bb), sedangkan pada dosis yang lebih tinggi dari 100 mg/kg bb penurunannya sangat nyata ($p \leq 0,01$). Selain itu penurunan berat testis sejalan dengan peningkatan dosis MAA.

Epididimis merupakan organ reproduksi kedua yang terpengaruh oleh MAA. Hal ini terlihat dengan menurunnya berat epididimis secara berarti dibandingkan dengan kontrol mulai dosis MAA 150 mg/kg bb. Pada mencit yang diberi dosis MAA 150 mg/kg bb dan 225 mg/kg bb perbedaan berat epididimis terjadi secara nyata ($p \leq 0,05$), sedangkan pada dosis yang paling tinggi (300 mg/kg bb) perbedaannya sangat nyata ($p \leq 0,01$) dibandingkan dengan kontrol. Semakin tinggi dosis MAA yang diberikan, semakin rendah berat epididimisnya.

Berbeda dengan testis dan epididimis, berat vesikula seminalis tampaknya tidak banyak terpengaruh oleh perla-

Tabel 4. Berat testis, epididimis, dan vesikula seminalis mencit jantan yang diberi perlakuan MAF selama 4 minggu.

Dosis (mg/kg bb)	Jumlah hewan (n)	Berat organ reproduksi (g) $\bar{x} \pm SD$		
		Testis	Epididimis	Vesikula seminalis
0 (kontrol)	5	0,11334 $\pm$ 0,006	0,04288 $\pm$ 0,010	0,06483 $\pm$ 0,008
100	5	0,09804 $\pm$ 0,013*	0,04020 $\pm$ 0,011	0,05626 $\pm$ 0,010
150	5	0,08478 $\pm$ 0,013**	0,03143 $\pm$ 0,005*	0,04392 $\pm$ 0,009
225	5	0,05446 $\pm$ 0,012**	0,02654 $\pm$ 0,006*	0,04496 $\pm$ 0,014
300	5	0,03758 $\pm$ 0,013**	0,02405 $\pm$ 0,006**	0,04519 $\pm$ 0,019

Berbeda dari kontrol:

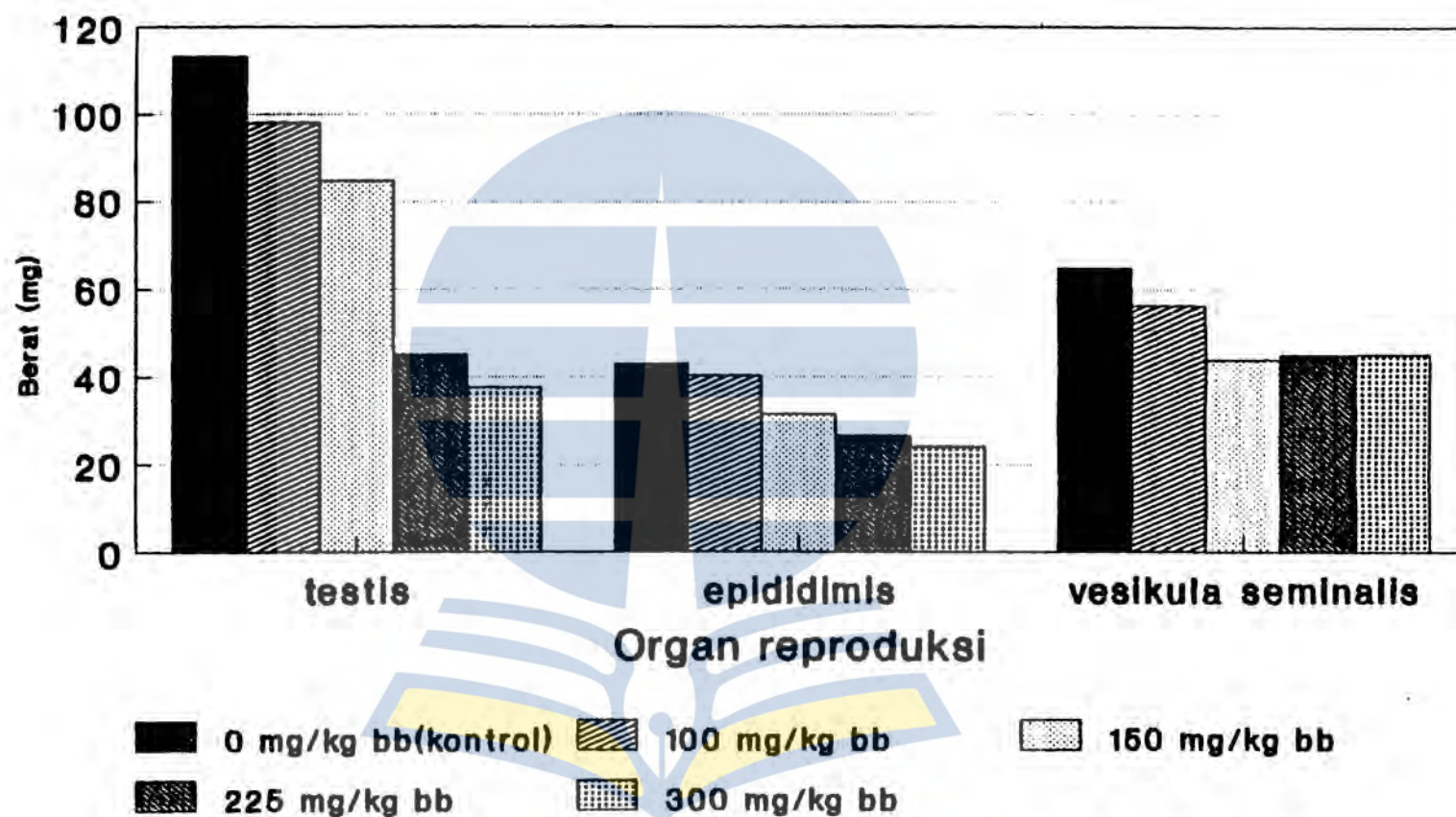
* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ (Uji Anava dilanjutkan dengan uji LSD)

kuan MAA. Walaupun rata-rata berat vesikula seminalis tampak menurun dibandingkan dengan kontrol, tetapi secara statistik penurunan berat vesikula seminalis tersebut tidak berarti. Pola penurunan berat organ reproduksi mencit jantan dapat dilihat pada gambar 5. Dari gambar tersebut terlihat bahwa pola yang sama hanya terjadi pada testis dan epididimis, yaitu beratnya menurun sejalan dengan peningkatan dosis MAA. Sedangkan berat vesikula seminalis mempunyai pola yang berbeda dari testis dan epididimis, yaitu walaupun pada dosis 100 mg/kg bb dan 150 mg/kg bb menunjukkan penurunan, tetapi pada dosis 225 mg/kg bb dan 300 mg/kg bb meningkat lagi sedikit.

3.1.2 Pengaruh MAA terhadap spermatozoa epididimis kauda

Data mengenai jumlah, motilitas, dan morfologi spermatozoa dari mencit yang diberi pelakuan MAA selama 4 minggu disajikan pada tabel 5.

Dari tabel tersebut tampak dengan jelas bahwa jumlah spermatozoa epididimis kauda pada dosis 100 mg/kg bb mengalami penurunan yang nyata ($p \leq 0,05$) dibandingkan dengan kontrol. Sedangkan pada dosis 150 mg/kg bb, 225 mg/kg bb, dan 300 mg/kg bb penurunannya sangat nyata ($p \leq 0,01$) dibandingkan dengan kontrol. Penurunan jumlah spermatozoa epididimis kauda tersebut sejalan dengan peningkatan dosis MAA. Pada dosis 300 mg/kg bb jumlah spermatozoa sangat menurun hingga lebih kurang menjadi 10% dari jumlah spermatozoa pada mencit kontrol.



Gambar 5. Histogram pola penurunan berat organ reproduksi mencit jantan yang diberi perlakuan MAA selama 4 minggu.

Tabel 5. Jumlah, motilitas, dan morfologi spermatozoa dari epididimis kauda mencit yang diberi perlakuan MAA selama 4 minggu.

Dosis MAA (mg/kg bb)	Jumlah epididi- mis kau- da (n)	Spermatozoa epididimis kauda		
		Jumlah (10^6 /ml sus- pensi) (a) $\bar{x} \pm SD$	Motilitas (%)	Yang abnormal (%)
0 (kontrol)	5	1,3310 $\pm$ 0,145	73,34	13,44
100	5	1,1780 $\pm$ 0,081*	69,10#	19,90#
150	5	0,8000 $\pm$ 0,060**	59,86##	37,60##
225	5	0,3120 $\pm$ 0,056**	45,30##	78,08##
300	5	0,1288 $\pm$ 0,039**	24,18##	83,44##

Berbeda dari kontrol:

* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ (Uji Anava dilanjutkan dengan uji LSD)

$p \leq 0,05$; ## $p \leq 0,01$ (Uji Kruskal-Wallis dilanjutkan dengan uji jumlah peringkat Wilcoxon)

(a) Suspensi = semen dari satu epididimis kauda dalam 10 ml PBSA

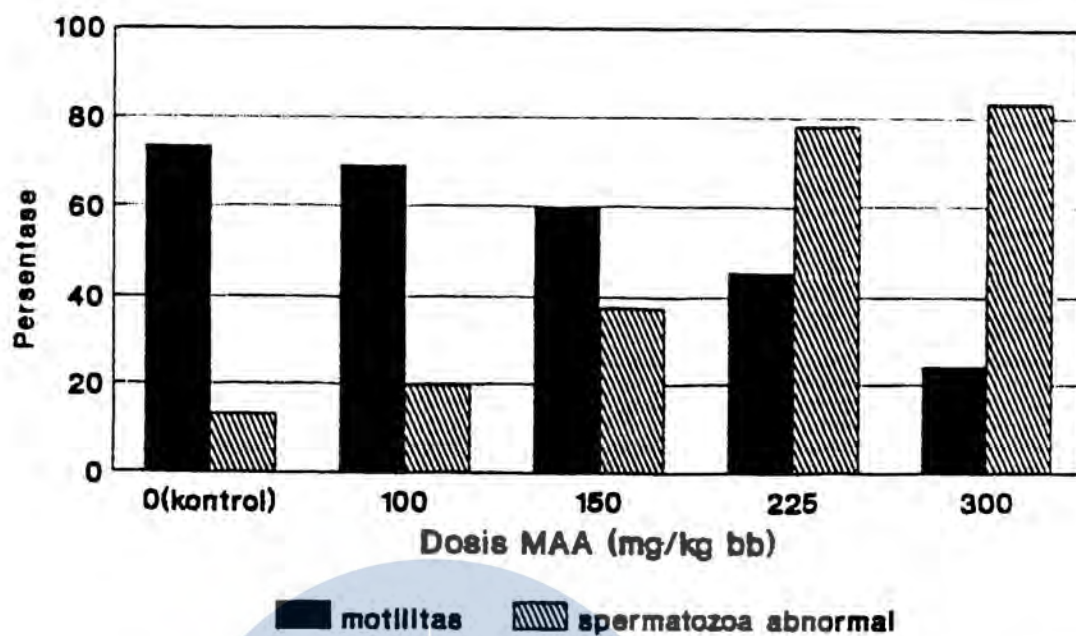
Motilitas spermatozoa juga menunjukkan hal yang serupa dengan jumlah spermatozoa. Mulai dosis MAA yang paling rendah (100 mg/kg bb), motilitas spermatozoa sudah menunjukkan penurunan yang nyata ($p \leq 0,05$) dibandingkan dengan kontrol. Semakin tinggi dosis MAA, motilitas spermatozoa semakin rendah.

Dari segi morfologi spermatozoa, tampak pula bahwa banyaknya spermatozoa abnormal menunjukkan peningkatan yang berarti sejalan dengan peningkatan dosis MAA. Hal ini terlihat bahwa mulai dosis yang terendah (100 mg/kg bb) sudah terdapat perbedaan yang nyata ($p \leq 0,05$) dari kontrol. Sedangkan persentase spermatozoa abnormal dari mencit yang diberi perlakuan dengan dosis MAA yang lebih tinggi (150 mg/kg bb ke atas) menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ($p \leq 0,01$) dari kontrol.

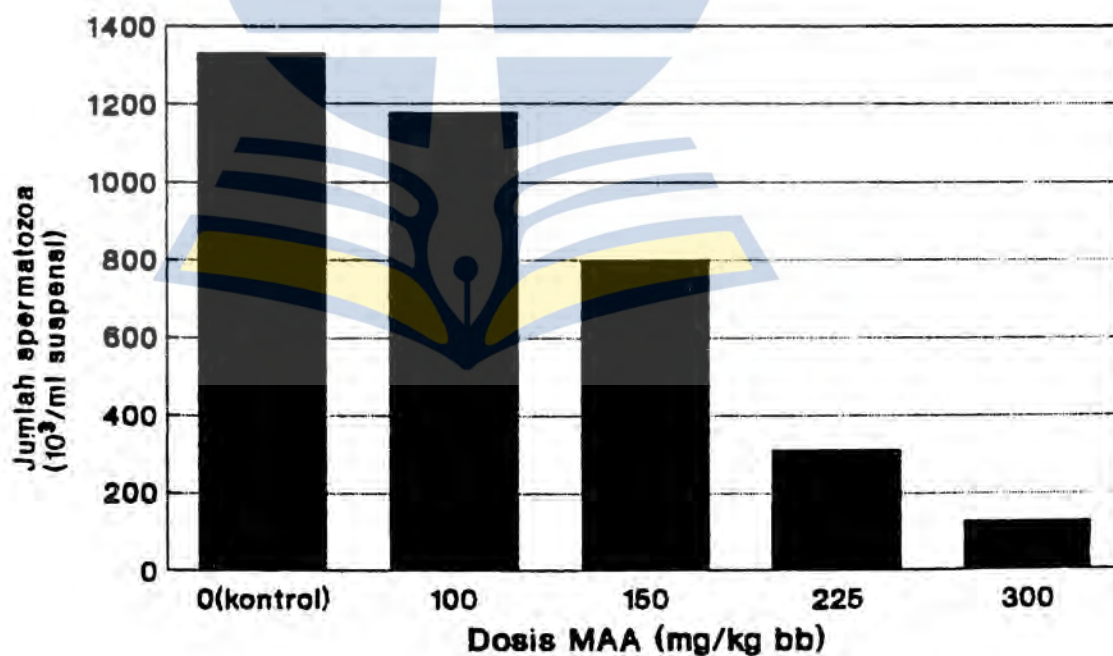
Perbandingan persentase motilitas, abnormalitas, dan jumlah spermatozoa epididimis kauda secara lebih jelas dapat dilihat pada gambar 6 dan 7.

Hasil pengamatan menunjukkan pula bahwa kelainan spermatozoa yang disebabkan oleh MAA terjadi terutama pada ekor (gambar 8). Tetapi tampak pula bahwa kelainan kepala dan bagian tengah spermatozoa meningkat sejalan dengan peningkatan dosis MAA sampai dengan dosis 225 mg/kg bb, walaupun persentase kejadiannya tidak pernah mencapai 25%. Pada dosis 300 mg/kg bb kedua jenis kelainan tersebut menunjukkan penurunan.

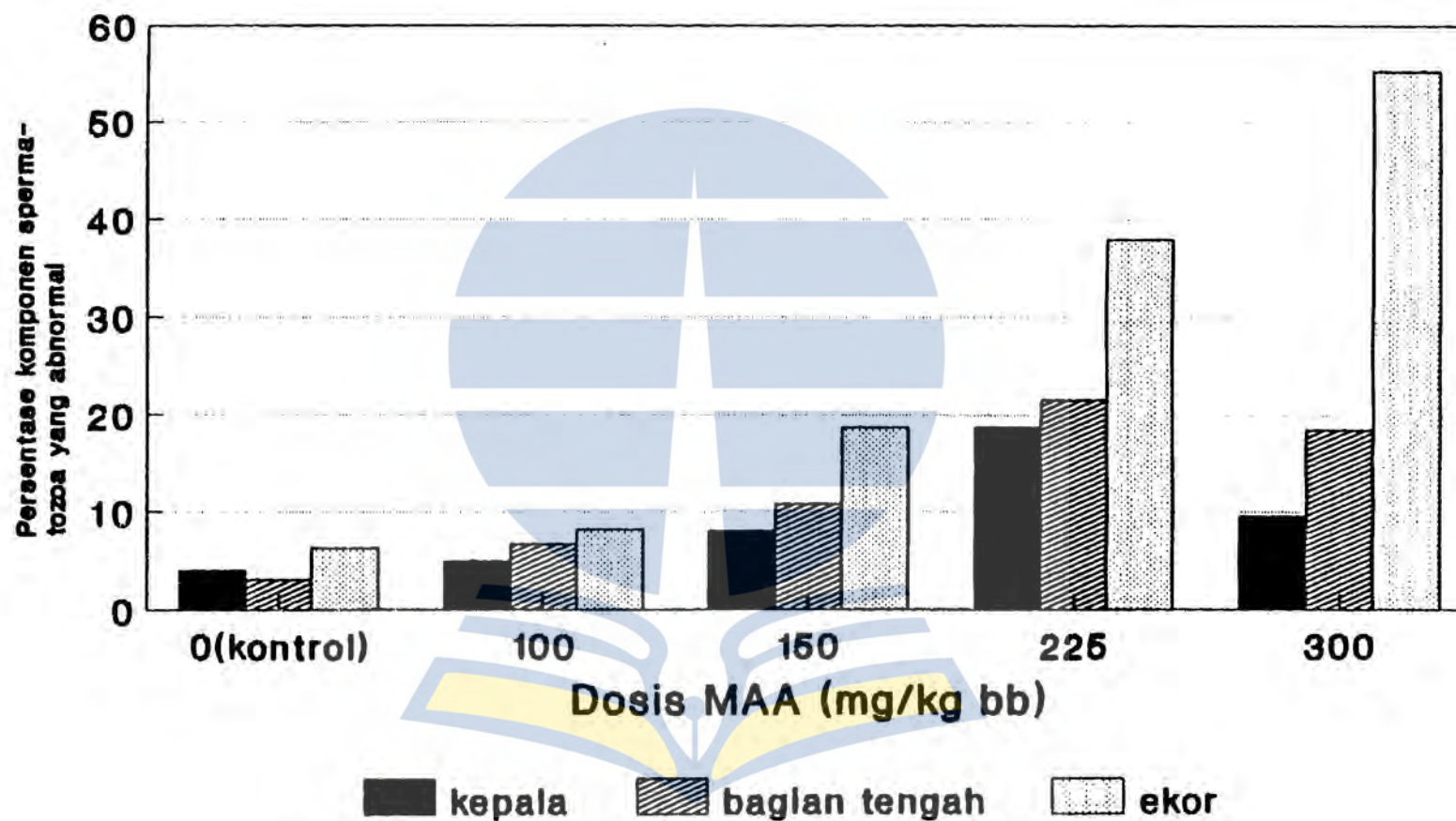
Kelainan-kelainan spermatozoa akibat perlakuan MAA



Gambar 6. Histogram persentase motilitas dan spermatozoa abnormal mencit yang diberi perlakuan MAA selama 4 minggu.



Gambar 7. Histogram jumlah spermatozoa epididimis kauda mencit yang diberi perlakuan MAA selama 4 minggu.



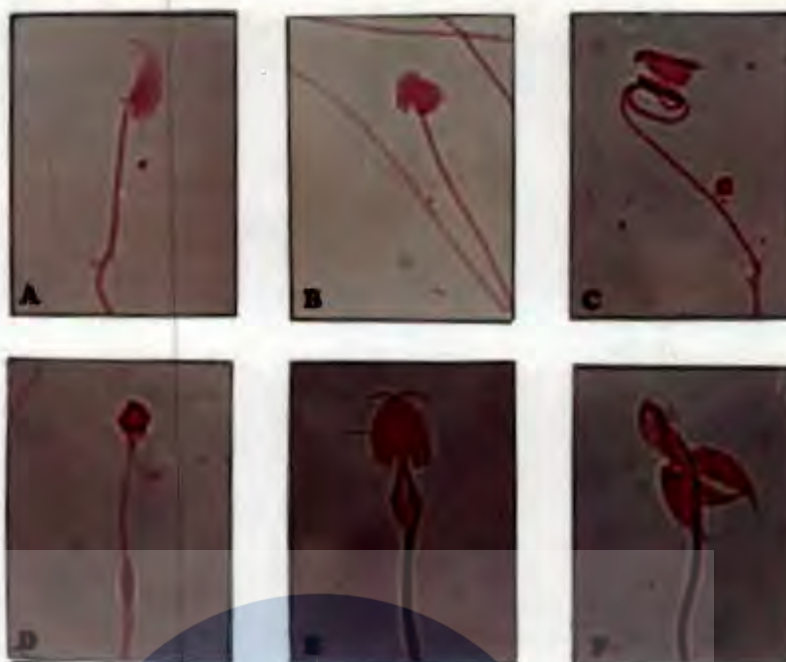
Gambar 8. Histogram persentase komponen spermatozoa abnormal dari mencit yang diberi perlakuan MAA selama 4 minggu.

yang ditemukan selama pengamatan disajikan pada gambar 9. Kelainan kepala spermatozoa yang ditemukan antara lain kepala bulat kecil memadat, kepala berduplikasi dan berfusi, serta kepala kembar tiga. Sedangkan kelainan ekor dan bagian tengah spermatozoa yang ditemukan antara lain ekor menekuk, ekor dan bagian tengah menggulung, ekor dua spermatozoa berfusi, serta ekor duplikasi dengan bagian tengah menekuk.

3.1.3 Pengaruh MAA terhadap struktur testis dan aktivitas tubulus seminiferus

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa MAA sangat toksik terhadap testis mencit. Hal ini terlihat dari sangat tereduksinya diameter tubulus seminiferus akibat perlakuan MAA (tabel 6). Pada tabel tersebut terlihat bahwa diameter tubulus seminiferus semakin mengecil sejalan dengan peningkatan dosis MAA (gambar 10 dan 11). Walaupun pada kelompok mencit yang diberi perlakuan MAA dengan dosis 100 mg/kg bb secara statistik tidak berbeda nyata dari kelompok kontrol, ternyata rata-rata diameter tubulusnya cenderung lebih kecil. Pada dosis 150 mg/kg bb, 225 mg/kg bb, dan 300 mg/kg bb diameter tubulus menurun sangat nyata ($p \leq 0,01$) dibandingkan dengan kontrol.

Tebal epitel tubulus seminiferus mengalami penurunan yang serupa dengan penurunan diameter tubulus. Semakin tinggi dosis MAA, semakin menurun ketebalan epitel tubu-



Gambar 9a. Kelainan-kelainan kepala spermatozoa mencit yang diberi perlakuan MAA selama 4 minggu (pewarnaan eosin, perbesaran 1000X).

- | | |
|------------------------------------|------------------------------------|
| A. Kepala normal | E. Kepala berduplikasi dan berfusi |
| B dan C. Kepala berbentuk abnormal | F. Kepala kembar tiga |
| D. Kepala bulat, memadat, kecil. | |



Gambar 9b. Kelainan-kelainan pada bagian tengah dan ekor spermatozoa mencit yang diberi perlakuan MAA selama 4 minggu (pewarnaan eosin, perbesaran 1000X)

- | | |
|--------------------------------------|--|
| A. Ekor menekuk | C. Ekor dua spermatozoa berfusi |
| B. Ekor dan bagian tengah menggulung | D. Ekor duplikasi dengan bagian tengah menekuk |

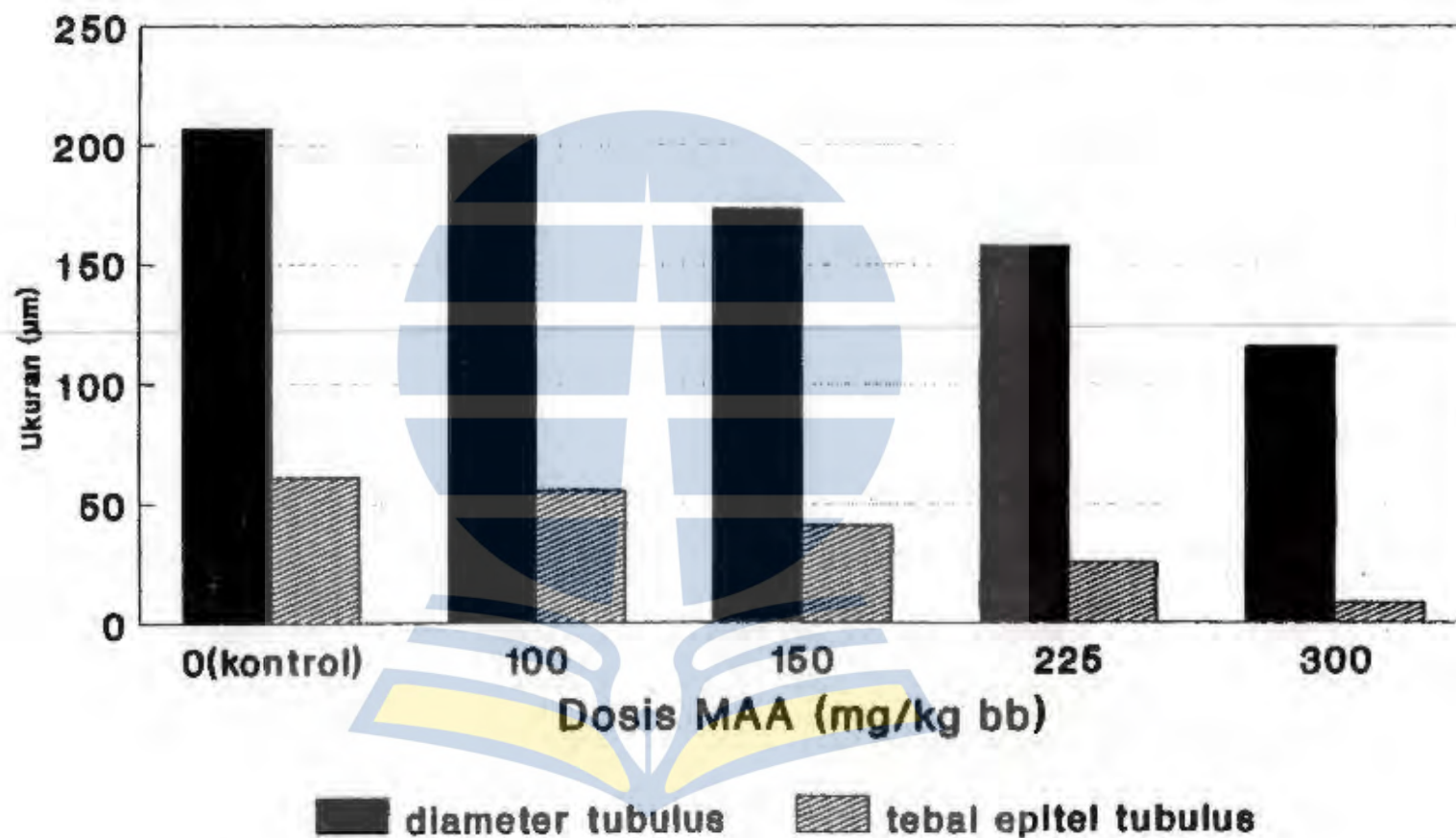
Tabel 6. Diameter dan tebal epitel tubulus seminiferus; persentase tubulus fase VII dan tubulus abnormal dari testis mencit yang diberi perlakuan MPA selama 4 minggu.

Dosis (mg/kg bb)	Jumlah testis (n)	Diameter tubulus seminiferus (μ m) $\bar{x} \pm SD$	Tebal epitel tubulus seminiferus (μ m) $\bar{x} \pm SD$	Persentase tubulus seminiferus			
				Normal fase VII	A b n o r m a l		
					Tidak bervakuola	Bervakuola	Total
0 (kontrol)	5	206,68 $\pm$ 15,26	61,24 $\pm$ 6,04	31,68	0,00	0,00	0,00
100	5	203,94 $\pm$ 18,95	55,72 $\pm$ 4,22	28,08	0,33	0,42	0,75
150	5	173,38 $\pm$ 16,98**	40,83 $\pm$ 12,93**	17,40**	10,13*	20,39*	30,52*
225	5	157,82 $\pm$ 22,22**	25,25 $\pm$ 11,35**	12,00**	30,40**	42,04**	72,44**
300	5	115,72 $\pm$ 6,38**	8,29 $\pm$ 1,20**	0,00**	0,00	100,00**	100,00**

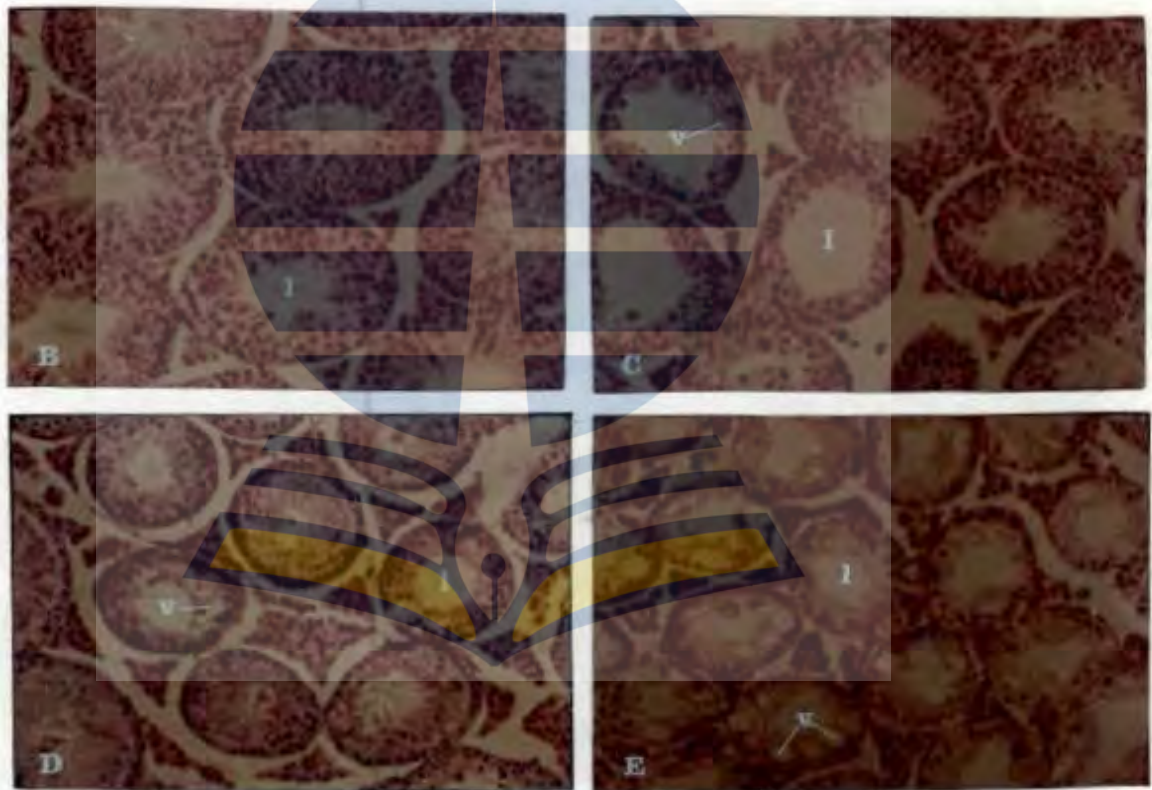
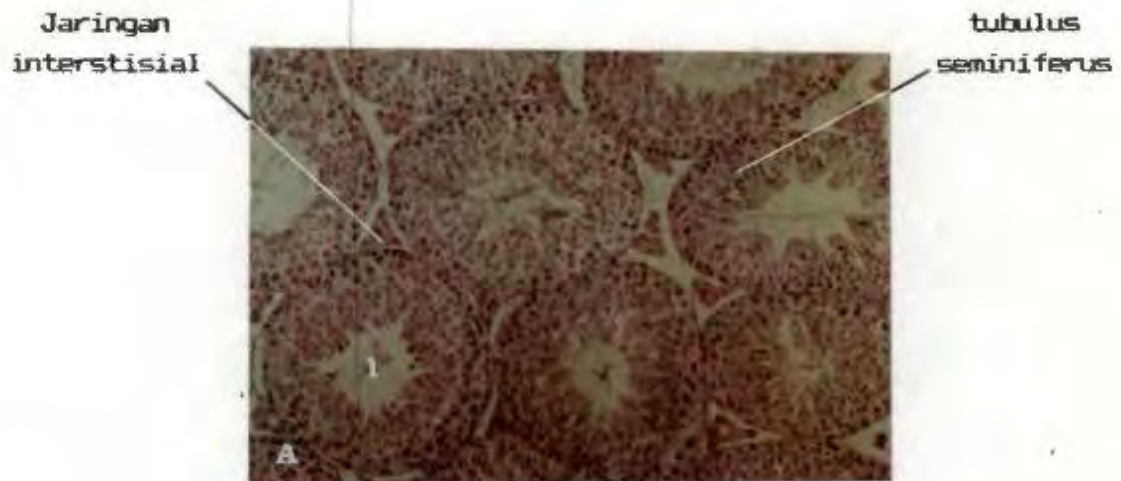
Berbeda dari kontrol:

* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ (Uji Anava dilanjutkan dengan uji LSD)

$p \leq 0,05$; ## $p \leq 0,01$ (Uji Kruskal-Wallis dilanjutkan dengan uji jumlah peringkat Wilcoxon)



Gambar 10. Histogram diameter tubulus dan tebal epitel tubulus seminiferus mencit yang diberi perlakuan MAA selama 4 minggu.



Gambar 11. Kondisi tubulus seminiferus mencit yang diberi perlakuan MPA selama 4 minggu (pewarnaan H&E, perbesaran 200X).

- | | |
|-------------------------------|-----------------------|
| A. Kontrol | D. Dosis 225 mg/kg bb |
| B. Dosis 100 mg/kg bb | E. Dosis 300 mg/kg bb |
| C. Dosis 150 mg/kg bb | |
| v = vakuola | |
| l = lumen tubulus seminiferus | |

lusnya.

Persentase tubulus seminiferus normal fase VII menunjukkan penurunan yang sejalan dengan peningkatan dosis MAA. Walaupun pada dosis 100 mg/kg bb persentasenya tidak berbeda nyata dari kontrol, tetapi cenderung lebih rendah. Pada dosis 150 mg/kg bb, 225 mg/kg bb, dan 300 mg/kg bb persentase tubulus fase VII menunjukkan penurunan yang sangat nyata ($p \leq 0,01$) dibandingkan dengan kontrol.

Persentase tubulus yang abnormal secara keseluruhan (total) semakin meningkat sejalan dengan meningkatnya dosis MAA. Peningkatannya secara nyata ($p \leq 0,05$) terlihat pada dosis 150 mg/kg bb, sedangkan pada dosis 225 mg/kg bb dan 300 mg/kg bb terjadi peningkatan yang sangat nyata ($p \leq 0,01$) dari kontrol. Tubulus seminiferus abnormal yang bervakuola menunjukkan hal yang serupa dengan tubulus abnormal keseluruhan. Sedangkan persentase tubulus abnormal yang tidak bervakuola menunjukkan pola yang berbeda dari tubulus abnormal bervakuola. Hal ini terlihat dari tidak ditemukannya tubulus abnormal yang tidak bervakuola pada dosis MAA tertinggi (300 mg/kg bb).

Data mengenai jumlah sel-sel spermatogenik, sel Sertoli, dan sel Leydig dari testis mencit yang diberi perlakuan MAA selama 4 minggu disajikan pada tabel 7.

Tabel tersebut memperlihatkan bahwa pada dosis MAA 100 mg/kg bb, 150 mg/kg bb, dan 225 mg/kg bb jumlah spermatogonium A dan spermatosit praleptoten tidak berbeda nyata dibandingkan dengan kontrol. Tetapi jumlah spermatosit pra-

Tabel 7. Jumlah sel spermatogenik, sel Sertoli, dan sel Leydig testis menoit per kisi-kisi (64 μm^2) yang diberi perlakuan MAA selama 4 minggu.

Dosis (mg/kg bb)	Jumlah testis (n)	Jumlah sper- matogonium A ($\bar{x} \pm SD$)	Jumlah spermatosit ($\bar{x} \pm SD$)			Jumlah sper- matid tahap 7 ($\bar{x} \pm SD$) A	Jumlah sel Sertoli ($\bar{x} \pm SD$) A	Jumlah sel Leydig ($\bar{x} \pm SD$) B
			Präleptoten A	Pakiten (N) A	Pakiten (D) A			
0 (kontrol)	5	0,63 $\pm$ 0,09	4,00 $\pm$ 0,41	6,78 $\pm$ 0,73	0,11 $\pm$ 0,07	14,74 $\pm$ 0,82	2,47 $\pm$ 0,29	9,54 $\pm$ 0,33
100	5	0,58 $\pm$ 0,07	3,95 $\pm$ 0,57	6,24 $\pm$ 0,64	0,16 $\pm$ 0,11	13,24 $\pm$ 1,01	2,37 $\pm$ 0,40	9,36 $\pm$ 0,75
150	5	0,56 $\pm$ 0,02	3,07 $\pm$ 0,56	4,12 $\pm$ 1,15**	0,54 $\pm$ 0,46**	7,73 $\pm$ 3,89**	2,40 $\pm$ 0,40	9,14 $\pm$ 0,79
225	5	0,58 $\pm$ 0,08	2,95 $\pm$ 1,17	2,43 $\pm$ 1,07**	0,75 $\pm$ 0,30**	3,58 $\pm$ 3,35**	2,85 $\pm$ 0,80	9,52 $\pm$ 1,81
300	5	0,38 $\pm$ 0,20**	1,29 $\pm$ 1,41**	0,32 $\pm$ 0,37**	0,15 $\pm$ 0,17	0,00 $\pm$ 0,00**	4,30 $\pm$ 1,52**	17,38 $\pm$ 1,24**

A : Pengamatan menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 1000X.

B : Pengamatan menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400X.

Berbeda dari kontrol:

* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ (Uji Anava dilanjutkan dengan uji LSD).

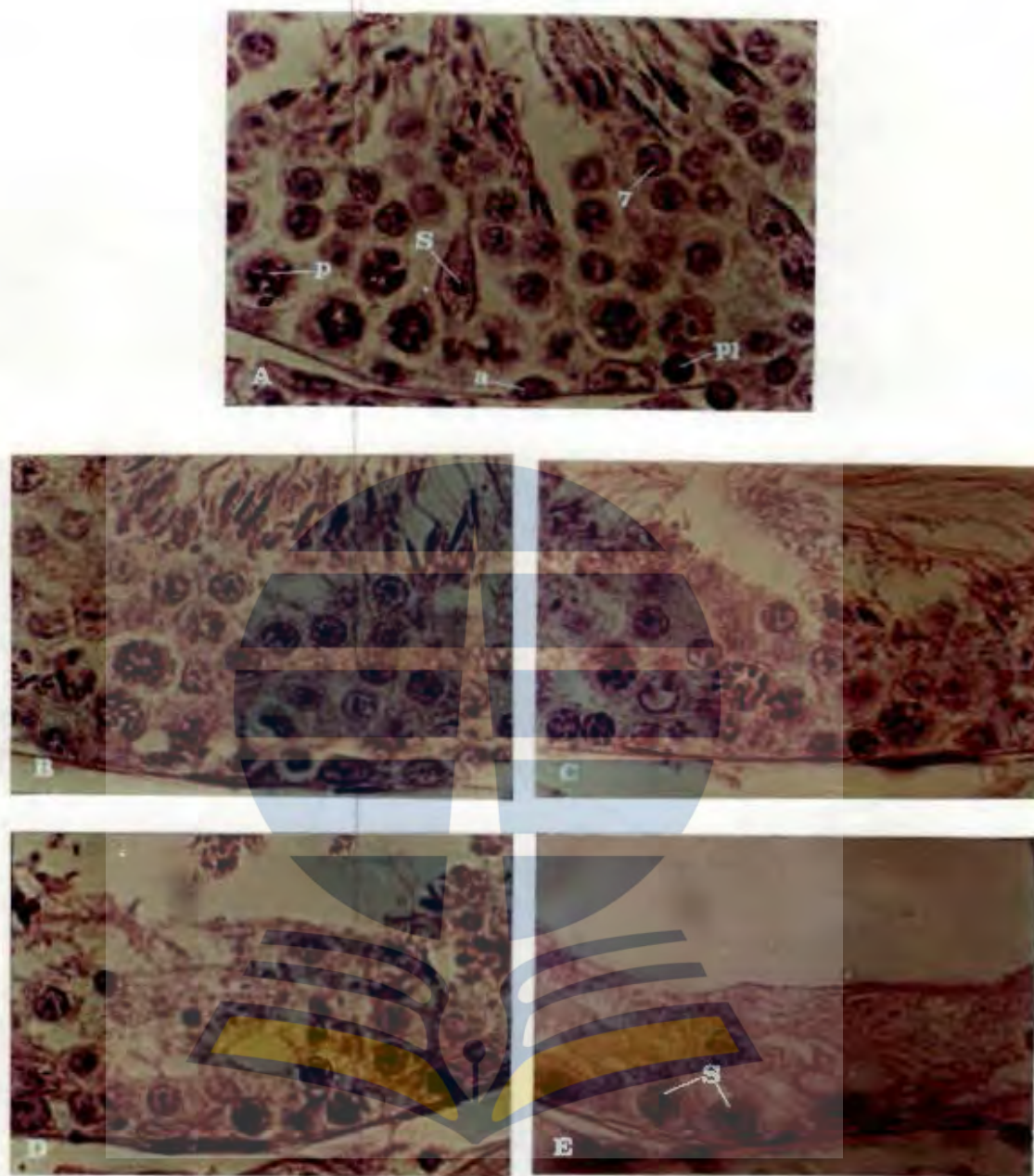
Pakiten: (N)= normal; (D) = berdegenerasi

leptoten cenderung menurun sejalan dengan peningkatan dosis MAA. Pada dosis 300 mg/kg bb kedua jenis sel tersebut menunjukkan penurunan yang sangat nyata ($p \leq 0,01$) dibandingkan dengan kontrol.

Jumlah spermatosit pakiten normal menunjukkan penurunan yang sejalan dengan peningkatan dosis MAA, walaupun pada dosis 100 mg/kg bb tidak berbeda nyata dari kontrol. Mulai perlakuan MAA dosis 150 mg/kg bb, perbedaannya sangat nyata ($p \leq 0,01$) dibandingkan dengan kontrol. Berbeda dengan jumlah spermatosit pakiten normal, jumlah spermatosit pakiten yang mengalami degenerasi tampak meningkat sejalan dengan meningkatnya dosis MAA, kecuali pada dosis 300 mg/kg bb. Peningkatan yang nyata terlihat pada dosis 150 mg/kg bb dan sangat nyata pada dosis 225 mg/kg bb.

Jumlah spermatid tahap 7 menunjukkan penurunan yang sangat nyata mulai dosis 150 mg/kg bb sampai dengan dosis 300 mg/kg bb dan penurunannya sejalan dengan peningkatan dosis MAA. Pada dosis 300 mg/kg bb spermatid tahap 7 tidak ditemukan (gambar 12).

Jumlah sel Sertoli dan sel Leydig dari mencit yang diberi perlakuan MAA dosis 100 mg/kg bb sampai dengan 225 mg/kg bb tidak berbeda nyata dibandingkan dengan kontrol. Pada dosis 300 mg/kg bb jumlah kedua jenis sel tersebut mengalami peningkatan yang sangat nyata ($p \leq 0,01$) dibandingkan dengan kontrol.



Gambar 12. Kondisi sel spermatogenik dan sel Sertoli mencit yang diberi perlakuan MAA selama 4 minggu (pewarnaan H&E, perbesaran 1000X).

A. Dosis 0 mg/kg bb
(kontrol)

B. Dosis 100 mg/kg bb

C. Dosis 150 mg/kg bb

D. Dosis 225 mg/kg bb

E. Dosis 300 mg/kg bb

a = spermatogonium A
pl = spermatosit praleptoten
p = spermatosit pakiten
7 = spermatid tahap 7
S = sel Sertoli

3.2 Percobaan II

3.2.1 Kemampuan kawin mencit jantan yang diberi perlakuan MAA selama 4 minggu dan indeks gestasi mencit betina pasangannya pada uji kawin-1 dan uji kawin-2

Data mengenai kemampuan kawin mencit jantan dan indeks gestasi mencit betina pasangannya pada uji kawin-1 dan uji kawin-2 diperlihatkan pada tabel 8.

Dari tabel tersebut tampak bahwa pada uji kawin-1 dan uji kawin-2 kemampuan kawin mencit jantan perlakuan dan indeks gestasi mencit betina pasangannya tidak menunjukkan perbedaan yang nyata dibandingkan dengan kontrol. Walaupun demikian pada uji kawin-1, kemampuan kawin mencit jantan memperlihatkan penurunan pada dosis 125 dan 175 mg/kg bb (80%). Sedangkan penurunan indeks gestasi mencit betina pasangannya hanya terjadi pada dosis 175 mg/kg bb (75%). Setelah masa pemulihan selama 40 hari pascaperlakuan, kemampuan kawin mencit jantan dan indeks gestasi mencit betina pasangannya pada semua dosis perlakuan sama dengan kelompok kontrol (100 %).

3.2.2 Fertilitas mencit jantan yang diberi perlakuan MAA selama 4 minggu dan penampilan reproduksi mencit betina pasangannya pada uji kawin-1

Data yang lengkap mengenai fertilitas jantan yang diperlihatkan oleh penampilan reproduksi mencit betina

Tabel 8. Kemampuan kawin mencit jantan yang diberi perlakuan MRA selama 4 minggu dan indeks gestasi mencit betina pasangannya pada uji kawin-1 dan uji kawin-2.

Uji kawin	Dosis MRA (mg/kg bb)	Jumlah mencit jantan			Kemampuan kawin (%)	Betina hasil perkawinan			Indeks gestasi (%)
		DK	K	TK		SV	B	TB	
1	0 (kontrol)	5	5	0	100	5	5	0	100
	100	5	5	0	100	5	5	0	100
	125	5	4	1	80	4	4	0	100
	150	5	5	0	100	5	5	0	100
	175	5	4	1	80	4	3	1	75
2	125	4 †	4	0	100	4	4	0	100
	150	5	5	0	100	5	5	0	100
	175	4 ††	4	0	100	4	4	0	100

† = 1 ekor mati 22 hari pascaperlakuan ; †† = 1 ekor mati 5 hari pascaperlakuan;
 DK = dikawinkan; K = kawin ; TK = tidak kawin
 SV = bersumbat vagina; B= bunting; TB = tidak bunting

pasangannya pada uji kawin-1 dapat dilihat pada tabel 9.

Daya fertilisasi mencit perlakuan ternyata cenderung menunjukkan penurunan yang sejalan dengan kenaikan dosis MAA. Meskipun demikian penurunan daya fertilisasi yang nyata ($p \leq 0,05$) dibanding dengan kontrol hanya berlaku untuk dosis 150 dan yang sangat nyata ($p \leq 0,01$) pada dosis 175 mg/kg bb.

Persentase kehilangan praimplantasi cenderung meningkat sejalan dengan peningkatan dosis MAA. Walaupun demikian perbedaan yang nyata ($p \leq 0,05$) dari kontrol hanya terdapat pada dosis 150 mg/kg bb, dan perbedaan yang sangat nyata ($p \leq 0,01$) terdapat pada dosis 175 mg/kg bb.

Jumlah implantasi tampak menunjukkan penurunan, walaupun penurunan yang nyata hanya terjadi pada dosis tertinggi yaitu 175 mg/kg bb. Parameter lainnya tampak tidak menunjukkan perbedaan yang nyata dari kontrol.

3.2.3 Fertilitas mencit jantan yang diberi perlakuan MAA selama 4 minggu dan penampilan reproduksi mencit betina pasangannya pada uji kawin-2

Fertilitas mencit jantan yang dicerminkan oleh penampilan reproduksi mencit betina pasangannya pada uji kawin-2 diperlihatkan pada tabel 10.

Tabel tersebut memperlihatkan bahwa mencit jantan yang diberi perlakuan MAA dosis 125 mg/kg bb pada akhir masa pemulihan tidak menunjukkan perubahan fertilitas yang tercermin dari belum berubahnya penampilan reproduksi

Tabel 9. Fertilitas mencit jantan yang diberi perlakuan MARA selama 4 minggu dan penerimaan reproduksi mencit betina pasangannya pada uji kawin-1.

No urut	Parameter	Dosis MARA (mg/kg bb)				
		0 (kontrol)	100	125	150	175
1	Daya fertilisasi (%)	93,40	94,40	88,95	79,50#	35,70##
2	Kehilangan praimplan- tasi (%)	6,60	5,60	11,10	20,50#	64,30##
3	Kematian pascaimplan- tasi (%)	8,72	9,74	16,20	21,20	8,30
4	Embrio yang diresorpsi (%)	8,70	8,30	14,40	17,70	8,30
5	Fetus mati (%)	0,00	1,42	1,78	3,48	0,00
6	Fetus hidup (%)	91,30	90,30	83,80	78,80	91,70
7	Jumlah implantasi ($\bar{x} \pm SD$)	13,80 $\pm$ 2,17	12,40 $\pm$ 0,89	11,00 $\pm$ 4,24	11,40 $\pm$ 0,55	4,67 $\pm$ 1,16*
8	Jumlah korpus luteum ($\bar{x} \pm SD$)	14,80 $\pm$ 2,49	13,20 $\pm$ 1,64	12,25 $\pm$ 4,50	14,40 $\pm$ 0,89	13,00 $\pm$ 1,00
9	Berat fetus (g) ($\bar{x} \pm SD$)	1,1812 $\pm$ 0,085	1,1738 $\pm$ 0,080	1,1883 $\pm$ 0,085	1,0545 $\pm$ 0,080	1,1055 $\pm$ 0,064
10	Fetus yang mengalami perdarahan (%)	4,57	9,28	4,78	8,36	5,30
11	Rasio seks fetus	0,52	0,86	1,50	0,96	1,33

Berbeda dari kontrol:

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (Uji Anava dilanjutkan dengan uji LSD)

$p < 0,05$; ## $p < 0,01$ (Uji Kruskal-Wallis dilanjutkan dengan uji jumlah peringkat Wilcoxon)

Tabel 10. Fertilitas mencit jantan yang diberi perlakuan MAA selama 4 minggu dan penampilan reproduksi mencit betina pasangannya pada uji kawin-2.

No urut	Parameter	Dosis MAA (mg/kg bb)						
		0 (kontrol) (1)	125		150		175	
			(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)
1	Daya fertilisasi (%)	93,40	88,95	89,30	79,50%	84,10	35,70**	60,90**
2	Kehilangan praim- plantasi (%)	6,60	11,10	10,72	20,50%	15,90	64,30**	39,00**
3	Kematian pascaim- plantasi (%)	8,72	16,20	7,98	21,20	6,93#	8,30	28,48#
4	Embrio yang dire- sorpsi (%)	8,70	14,40	7,98	17,70	6,93#	8,30	18,09
5	Fetus mati (%)	0,00	1,78	0,00	3,48	0,00	0,00	2,08
6	Fetus hidup (%)	91,30	83,80	92,03	78,80	93,08#	91,70	73,60
7	Jumlah implantasi ($\bar{x} \pm SD$)	13,80 $\pm$ 2,17	11,00 $\pm$ 4,24	13,25 $\pm$ 3,40	11,40 $\pm$ 12,20	11,40 $\pm$ 1,95	4,67 $\pm$ 1,16~	9,25 $\pm$ 3,77*~
8	Jumlah korpus lu- teum ($\bar{x} \pm SD$)	14,80 $\pm$ 2,49	12,25 $\pm$ 4,50	14,75 $\pm$ 3,30	14,40 $\pm$ 0,89	13,00 $\pm$ 1,00	13,00 $\pm$ 1,00	15,00 $\pm$ 0,82
9	Berat fetus (g) ($\bar{x} \pm SD$)	1,1812 $\pm$ 0,085	1,1883 $\pm$ 0,085	1,1167 $\pm$ 0,083	1,0545 $\pm$ 0,080	1,1096 $\pm$ 0,094	1,1055 $\pm$ 0,064	1,0978 $\pm$ 0,072
10	Fetus yang menga- lami perdarahan(%)	4,57	4,78	6,47	8,36	5,65	5,30	4,55
11	Rasio seks fetus	0,52	1,50	0,83	0,96	0,78	1,33	0,83

(1) = uji kawin 1 ; (2) = uji kawin 2

Berbeda antara (1) dan (2): * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ (Uji Anava dilanjutkan dengan uji LSD)

$p \leq 0,05$; ## $p \leq 0,01$ (Uji Kruskal-Wallis dilanjutkan dengan uji jumlah peringkat Wilcoxon)

Berbeda dari kontrol: ~ $p \leq 0,05$; ~~ $p \leq 0,01$ (Uji Anava dilanjutkan dengan uji LSD)

* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ (Uji Kruskal-Wallis dilanjutkan dengan uji jumlah peringkat Wilcoxon)

mencit betina pasangannya. Hal ini terlihat dari tidak adanya perbedaan yang nyata untuk semua parameter pada uji kawin-2 baik dibandingkan dengan kontrol, maupun dengan hasil uji kawin-1.

Mencit jantan yang diberi perlakuan MAA dosis 150 mg/kg bb memperlihatkan pemulihan fertilitas, yang diperlihatkan oleh pulihnya daya fertilisasi dan kehilangan praimplantasi pada betina pasangannya. Adanya pemulihan pada kedua parameter tersebut tampak dari hasil uji kawin-1, bahwa daya fertilisasinya lebih rendah dan kehilangan praimplantasi lebih tinggi secara nyata ($p \leq 0,05$) dari kontrol, sedangkan pada uji kawin-2 kedua parameter tersebut menjadi tidak berbeda nyata dari kontrol. Selain itu terjadi pula perbaikan dalam hal persentase kematian pascaimplantasi, embrio yang diresorpsi, dan fetus hidup. Hal ini terlihat dari hasil uji kawin-2, bahwa persentase kematian pascaimplantasi dan embrio yang diresorpsi menurun, serta persentase fetus hidup meningkat secara nyata ($p \leq 0,05$) dibandingkan dengan hasil uji kawin-1, tetapi ketiga parameter tersebut tidak berbeda nyata dari kontrol. Sedangkan parameter lainnya pada uji kawin-2 tidak memperlihatkan perbedaan yang nyata baik dari kontrol maupun dari hasil uji kawin-1.

Berbeda dengan mencit perlakuan dosis 150 mg/kg bb, mencit jantan yang diberi perlakuan MAA dosis 175 mg/kg bb pada akhir masa pemulihan tampak belum memperlihatkan pemulihan fertilitas. Hal ini terlihat dari daya fertilisasi

dan kehilangan praimplantasi, yang pada uji kawin-1 dan uji kawin-2 berbeda sangat nyata dari kontrol. Sedangkan kedua parameter tersebut pada uji kawin-2 tidak berbeda nyata dibandingkan dengan hasil uji kawin-1. Kematian pascaimplantasi semakin meningkat, walaupun peningkatannya hanya berbeda nyata dari uji kawin-1. Jumlah implantasi juga menunjukkan peningkatan yang nyata ($p \leq 0,05$) dari uji kawin-1, tetapi berbeda nyata ($p \leq 0,05$) lebih rendah dibandingkan dengan kontrol. Parameter lainnya tidak menunjukkan perbedaan yang nyata dibandingkan dengan hasil uji kawin-1 maupun dari kontrol.

3.3 Pengaruh MAA terhadap berat badan mencit jantan selama percobaan dan setelah mengalami masa pemulihan

Berat badan mencit merupakan parameter yang dapat digunakan untuk mengetahui adanya efek toksik MAA secara umum terhadap mencit jantan.

Pada pemberian MAA hari pertama, berat badan mencit baik perlakuan maupun kontrol tidak menunjukkan perbedaan yang nyata. Sedangkan pada hari ke-6, pemberian MAA ini sudah menunjukkan pengaruhnya terhadap berat badan mencit (tabel 11). Hal ini terlihat dari lebih rendahnya berat badan mencit secara statistik dibandingkan dengan kontrol pada dosis 175 mg/kg bb, 225 mg/kg bb, dan 300 mg/kg bb. Pada hari perlakuan ke-13 sampai dengan hari perlakuan terakhir, semua kelompok mencit perlakuan berat badannya lebih rendah

Tabel 11. Berat badan mencit jantan selama diberi perlakuan MAA secara oral (gavage)

Berat badan (g) $\bar{x} \pm SD$; perlakuan hari ke	Dosis (mg/kg bb)	0 (kontrol) n = 10	100 n = 10	125 n = 5	150 n = 10	175 n = 5	225 n = 5	300 n = 5
1		28,80 $\pm$ 1,32	28,46 $\pm$ 1,46	28,42 $\pm$ 1,55	28,72 $\pm$ 1,35	29,30 $\pm$ 1,64	27,82 $\pm$ 1,37	29,06 $\pm$ 1,70
6		30,57 $\pm$ 2,70	29,00 $\pm$ 2,37	28,50 $\pm$ 2,32	29,71 $\pm$ 1,84	26,50 $\pm$ 4,02**	26,82 $\pm$ 2,64*	26,10 $\pm$ 3,36**
13		32,95 $\pm$ 2,68	29,70 $\pm$ 3,51*	29,40 $\pm$ 2,30*	29,32 $\pm$ 2,88*	26,54 $\pm$ 4,29**	28,22 $\pm$ 2,23**	26,44 $\pm$ 3,66**
20		32,95 $\pm$ 2,25	29,78 $\pm$ 4,16*	28,98 $\pm$ 3,51*	28,30 $\pm$ 2,61**	26,50 $\pm$ 3,52**	27,40 $\pm$ 0,65**	25,70 $\pm$ 2,59**
27		31,55 $\pm$ 2,36	28,25 $\pm$ 2,00*	28,20 $\pm$ 4,72*	28,30 $\pm$ 1,06*	26,60 $\pm$ 2,22**	26,90 $\pm$ 2,88**	25,60 $\pm$ 3,31**

Berbeda dari kontrol: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ (Uji Anava dilanjutkan dengan uji LSD)

dibandingkan dengan kontrol. Mulai hari perlakuan ke-6 sampai dengan hari perlakuan terakhir, pada tiga dosis MAA tertinggi (175 mg/kg bb, 225 mg/kg bb, dan 300 mg/kg bb) terdapat perbedaan yang sangat nyata ($p \leq 0,01$) dari kontrol, kecuali dosis 225 mg/kg bb berbeda nyata ($p \leq 0,05$) dari kontrol pada hari perlakuan ke-6. Sedangkan pada tiga dosis terendah (100 mg/kg bb, 125 mg/kg bb, dan 150 mg/kg bb) hanya menunjukkan perbedaan yang nyata ($p \leq 0,05$) mulai hari perlakuan ke-13 sampai dengan hari perlakuan terakhir, kecuali pada perlakuan dosis 150 mg/kg bb berbeda sangat nyata dari kontrol pada hari perlakuan ke-20.

Pada akhir masa pemulihan, yaitu 40 hari pascaperlakuan, berat badan mencit pada uji kawin-2 menunjukkan peningkatan yang berarti dibandingkan dengan berat badannya pada akhir perlakuan (tabel 12). Berat badan mencit yang diberi perlakuan MAA dosis 125 mg/kg bb dan 150 mg/kg bb setelah mengalami masa pemulihan, meningkat dan berbeda sangat nyata ($p \leq 0,01$) dibandingkan dengan berat badannya pada akhir perlakuan, sedangkan pada dosis 175 mg/kg bb meningkat dan berbeda nyata ($p \leq 0,05$). Meskipun demikian, berat badannya pada akhir masa pemulihan masih lebih rendah dibandingkan dengan hewan kontrol. Pada dosis 125 mg/kg bb perbedaan berat badan adalah nyata ($p \leq 0,05$) lebih rendah, sedangkan pada dosis 150 mg/kg bb dan 175 mg/kg bb perbedaannya sangat nyata ($p \leq 0,01$) lebih rendah dibandingkan dengan kontrol.

Tabel 12. Berat badan mencit pada akhir perlakuan MPA dan sesudah mengalami masa pemulihan selama 40 hari pascaperlakuan.

Dosis (mg/ kg bb) Pa- rameter	0 (kontrol) (2)	125		150		175	
	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)
Berat badan ($\bar{x} \pm SD$)	38,30 $\pm 1,68$	28,20 $\pm 4,72$	34,38 $\pm 0,48^{**}$	28,30 $\pm 1,06$	33,60 $\pm 2,49^{**\sim}$	26,60 $\pm 2,22$	30,88 $\pm 2,02^{*\sim}$

(1) = Akhir perlakuan ; (2) = Uji kawin-2

Berbeda antara (2) dengan (1) : * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ } (Uji Anava dilanjutkan dengan

Berbeda antara (2) dengan kontrol: ~ $p \leq 0,05$; ~~ $p \leq 0,01$ } uji LSD)

BAB IV

P E M B A H A S A N

4.1 Pengaruh MAA terhadap berat organ reproduksi mencit jantan

Perlakuan MAA selama 4 minggu berturut-turut pada mencit jantan umur 7 minggu dapat menyebabkan penurunan berat organ reproduksi terutama testis dan epididimis (tabel 4 dan gambar 5). Penurunan berat testis dan epididimis sejalan dengan peningkatan dosis MAA.

Penurunan berat testis terjadi karena MAA mengganggu proses spermatogenesis yang akhirnya menyebabkan kerusakan sel-sel germinal pada tubulus seminiferus. Dari tabel 6 dan 7 serta gambar 10 dan 11 jelas terlihat bahwa perlakuan MAA pada mencit dapat menyebabkan rusaknya sel-sel spermatogenik pada tubulus seminiferus. Keadaan tersebut dapat menyebabkan turunnya berat testis. Hal serupa diungkapkan pula oleh Foster *et al.* (1987), Miller *et al.* (1982), dan Ratnasooriya & Sharpe (1989), bahwa MAA dapat menurunkan berat testis tikus secara berarti dan menimbulkan kerusakan pada sel-sel germinal testis.

Penurunan berat epididimis mungkin terjadi karena akumulasi spermatozoa dalam epididimis mencit perlakuan

lebih rendah dari kontrol. Seperti terlihat pada tabel 5, jumlah spermatozoa epididimis kauda mencit perlakuan sangat nyata lebih rendah dibandingkan dengan kontrol. Selain jumlah spermatozoa di epididimis berkurang, perlakuan MAA mungkin juga mengganggu fungsi sekresi sel Sertoli, sehingga memungkinkan berkurangnya cairan tubulus yang diproduksi oleh sel Sertoli. Seperti diungkapkan oleh Gray & Gangolli (1986), beberapa ester ftalat dapat mengganggu dua fungsi utama sel Sertoli, yaitu dalam hal sekresi cairan tubulus dan ABP (androgen binding protein). Dengan demikian, kemungkinan besar cairan tubulus yang mengalir bersama spermatozoa ke epididimis pun berkurang. Dengan berkurangnya kandungan spermatozoa dan mungkin juga berkurangnya cairan yang menyertainya dalam epididimis tersebut, maka berat epididimis akan berkurang pula.

Tampaknya perlakuan MAA pada mencit jantan tidak banyak mempengaruhi berat vesikula seminalis. Hal ini didukung oleh fakta bahwa jumlah sel Leydig yang merupakan sel penghasil testosteron tampak tidak berbeda nyata lebih rendah dibandingkan dengan kontrol (tabel 7). Dengan demikian kemungkinan besar produksi testosteron masih pada taraf normal untuk memelihara organ asesori, seperti vesikula seminalis.

4.2 Pengaruh MAA terhadap spermatozoa epididimis kauda

Pemberian MAA pada mencit jantan sangat mempengaruhi kualitas spermatozoa yang dihasilkan, baik dari segi jumlah, motilitas, maupun morfologi spermatozoa (tabel 5, gambar 6, dan gambar 7). Jumlah dan motilitas spermatozoa menurun, sedangkan persentase spermatozoa abnormal meningkat sejalan dengan peningkatan dosis MAA.

Menurunnya motilitas spermatozoa mungkin disebabkan oleh meningkatnya jumlah spermatozoa abnormal pada mencit perlakuan. Dari tabel 5 tampak jelas bahwa semakin tinggi dosis MAA, semakin tinggi pula jumlah spermatozoa yang abnormal. Jika dilihat dari tipe abnormalitasnya ternyata kebanyakan kelainannya terjadi pada bagian tengah dan ekor (gambar 8), padahal bagian tengah dan ekor merupakan alat gerak utama spermatozoa.

Menurunnya jumlah spermatozoa dan meningkatnya spermatozoa abnormal yang sejalan dengan peningkatan dosis MAA, merupakan bukti adanya gangguan spermatogenesis. Seperti diungkapkan oleh Ratnasooriya & Sharpe (1989), perlakuan MAA dosis 650 mg/kg bb pada tikus dapat menurunkan motilitas spermatozoa dan mengganggu proses spermatogenesis, sehingga menyebabkan pengosongan spermatosit fase pakiten dan tahap lanjut dari tubulus seminiferus. Dengan demikian

jelaslah bahwa MAA dapat mengganggu spermatogenesis. Terganggunya proses spermatogenesis merupakan faktor penyebab turunnya jumlah spermatozoa yang diproduksi dan meningkatnya jumlah spermatozoa abnormal, yang pada akhirnya juga dapat menurunkan motilitas spermatozoa.

4.3 Pengaruh MAA terhadap struktur testis

MAA dapat menyebabkan reduksi diameter tubulus, tebal epitel tubulus, dan persentase tubulus normal fase VII, serta meningkatkan persentase tubulus yang abnormal (tabel 6). Hal ini dapat terjadi karena perlakuan MAA menyebabkan banyaknya sel spermatogenik yang berdegenerasi. Dengan semakin berkurangnya jumlah sel spermatogenik sejalan dengan peningkatan dosis MAA (tabel 7), maka ketebalan epitel tubulus akan semakin berkurang pula. Selain itu rusaknya sel-sel spermatogenik dapat menurunkan persentase tubulus normal fase VII, serta meningkatkan persentase tubulus yang abnormal. Menurunnya diameter tubulus mungkin disebabkan oleh menipisnya epitel tubulus dan berkurangnya cairan tubulus yang dihasilkan oleh sel Sertoli akibat perlakuan MAA.

Jumlah spermatogonium A dan spermatosit praleptoten tampak tidak begitu terpengaruh oleh perlakuan MAA sampai dengan dosis 225 mg/kg bb. Pengaruhnya tampak nyata pada

perlakuan MAA dosis 300 mg/kg bb (tabel 7). Hal ini terjadi karena spermatogonium A dan spermatosit praleptoten terdapat pada kompartemen basal testis, yang terlindung dari pengaruh lingkungan adluminal oleh barier yang dibentuk oleh sel Sertoli (Daust & Clermont, 1953, Stefanini *et al.*, 1985, Zenick & Clegg, 1989). Ratnasooriya dan Sharpe (1989) mengungkapkan, bahwa MAA dapat menyebabkan rusaknya spermatosit terutama fase pakiten. Sedangkan hilangnya jenis sel spermatogenik tertentu dapat mempengaruhi fungsi sekretoris sel Sertoli. Terganggunya fungsi sekretoris sel Sertoli menyebabkan berubahnya lingkungan adluminal (Sjöberg *et al.*, 1986). Akibatnya, sel-sel spermatogenik lainnya yang berada dalam kompartemen adluminal akan terganggu pula. Dengan demikian jelaslah bahwa spermatogonium A dan spermatosit praleptoten yang berada pada kompartemen basal akan terhindar dari gangguan lingkungan adluminal, kecuali bila barier yang dibentuk oleh sel Sertoli sudah tidak berfungsi dengan baik, seperti halnya pada perlakuan dosis 300 mg/kg bb dalam penelitian ini.

Jumlah spermatosit pakiten dan spermatid tahap 7 menurun sejalan dengan peningkatan dosis MAA. Hal ini terjadi karena spermatosit pakiten merupakan sel target MAA, sehingga sangat sensitif terhadap perlakuan MAA (Foster *et al.*, 1987). Akibat terganggunya spermatosit pakiten, maka jumlah spermatid tahap 7 akan menurun.

Degenerasi spermatosit pakiten tampak semakin meningkat dengan meningkatnya dosis MAA. Hal ini terjadi karena

MAA dapat mengkonsentrasikan ion kalsium di dalam sel tersebut. Keadaan ini menyebabkan mitokondria membengkak yang akhirnya mengakibatkan kematian sel (Bowen & Lockshin, 1981, Trump *et al.*, 1989 dalam Ghanayem & Chapin, 1990).

Jumlah sel Sertoli dan sel Leydig tampak tidak banyak terpengaruh dengan adanya perlakuan MAA, bahkan dalam setiap kisi-kisi ($64 \mu\text{m}^2$) pada dosis 300 mg/kg bb jumlahnya lebih banyak dibandingkan dengan kontrol (tabel 7). Walaupun demikian, tidak berarti jumlah keseluruhan sel Leydig dan sel Sertoli pada dosis 300 mg/kg bb menjadi lebih banyak. Hal ini terjadi, karena diameter tubulus menjadi semakin kecil (tabel 6). Mengecilnya ukuran tubulus mengakibatkan jumlah kedua sel tersebut dapat teramati lebih banyak dalam setiap kisi-kisi.

Tidak banyaknya pengaruh MAA terhadap jumlah sel Sertoli dan jumlah sel Leydig menunjukkan, bahwa kedua jenis sel tersebut lebih tahan terhadap pengaruh MAA dibandingkan dengan sel-sel spermatogenik. Walaupun demikian tubulus bervakuola semakin banyak dengan meningkatnya dosis MAA (tabel 6). Karena vakuola tersebut sebenarnya terdapat pada sel Sertoli, maka hal tersebut menunjukkan bahwa MAA bersifat toksik bagi sel Sertoli. Bahkan Sjöberg *et al.* (1986) mengemukakan, bahwa sel Sertoli merupakan target utama metabolit toksik dari ester ftalat. Dengan terganggunya sel Sertoli, sel-sel spermatogenik yang keberadaannya sangat tergantung pada sel Sertoli akan terganggu pula.

4.4 Pengaruh MAA terhadap fertilitas mencit jantan dan penampilan reproduksi mencit betina pasangannya pada uji kawin-1 dan uji kawin-2

Dari data mengenai uji fertilitas tampak jelas bahwa MAA sangat berpengaruh terhadap fertilitas mencit jantan. Pada tabel 8 terlihat bahwa kemampuan kawin mencit jantan perlakuan dan indeks gestasi mencit betina pasangannya pada uji kawin-1 dan uji kawin-2 secara statistik tidak berbeda nyata dari kontrol. Walaupun demikian, pada uji kawin-1 kemampuan kawin mencit jantan dosis 125 mg/kg bb dan 175 mg/kg bb hanya 80%, sedangkan penurunan indeks gestasi mencit betina pasangannya hanya terjadi pada dosis 175 mg/kg bb (75%). Hasil studi pendahuluan menunjukkan bahwa mencit jantan perlakuan dengan dosis 225 mg/kg bb dan 300 mg/kg bb tidak mampu membuntingi betinanya, walaupun kopulasi terjadi (lampiran 2). Hal ini menunjukkan bahwa MAA sangat menurunkan fertilitas mencit jantan terutama pada dosis yang cukup tinggi.

Daya fertilisasi mencit perlakuan cenderung menurun sejalan dengan peningkatan dosis MAA (tabel 9). Hal ini mungkin terjadi, karena kualitas spermatozoa pada mencit jantan perlakuan sudah sangat menurun, baik dilihat dari jumlah, motilitas, maupun morfologinya (tabel 5). Menurut Moeloek (1979) semen yang berkualitas baik pada manusia mempunyai beberapa persyaratan, antara lain motilitas

spermatozoanya harus lebih dari 50%, spermatozoa abnormalnya kurang atau sama dengan 40%. Sedangkan dari tabel 4 ternyata mencit jantan yang diberi perlakuan MAA dosis 225 mg/kg bb motilitas spermatozoanya 45,3% dan persentase spermatozoa abnormalnya 78,1%, bahkan pada perlakuan MAA dosis 300 mg/kg bb motilitas spermatozoanya hanya 24,18% dan persentase spermatozoa abnormalnya 83,4%. Selain itu jumlah spermatozoa mencit perlakuan MAA dosis 225 dan 300 mg/kg bb juga jauh lebih rendah dibandingkan dengan kontrol (tabel 5). Dengan demikian jelaslah bahwa mencit jantan tersebut tidak dapat membuntingi betinanya.

Tampaknya kehilangan praimplantasi cenderung meningkat sejalan dengan peningkatan dosis MAA, walaupun perbedaan yang nyata dari kontrol hanya terdapat pada dosis 150 dan 175 mg/kg bb. Kematian pascaimplantasi, embrio yang diresorpsi, persentase fetus mati, persentase fetus hidup, berat fetus, dan persentase fetus yang mengalami perdarahan tidak berbeda nyata dibandingkan dengan kontrol. Hal ini menunjukkan bahwa menurunnya fertilitas pada mencit jantan perlakuan lebih banyak diperlihatkan oleh kehilangan praimplantasi pada mencit betina pasangannya. Apakah kehilangan praimplantasi ini disebabkan oleh banyaknya embrio yang mati sebelum implantasi atau karena adanya sejumlah telur yang tidak dibuahi, belumlah jelas. Tetapi tampaknya kehilangan praimplantasi ini lebih disebabkan oleh adanya sejumlah telur yang tidak dibuahi, karena MAA dapat menurunkan kualitas spermatozoa baik dari segi jumlah, motil-

itas, maupun morfologinya (tabel 5).

Dari hasil uji kawin tidak ditemukan adanya fetus yang mengalami malformasi eksternal. Mengapa hal ini terjadi belumlah jelas, mungkin karena spermatozoa yang mampu membuahi hanya spermatozoa yang berkualitas baik, dari segi fisik maupun genetik. Hal tersebut ditunjang oleh data bahwa kelainan spermatozoa terutama terjadi pada bagian tengah dan ekor spermatozoa (gambar 8), sehingga mungkin sangat mengganggu pergerakannya. Dengan demikian spermatozoa abnormal tidak mungkin dapat bersaing dengan spermatozoa yang normal untuk dapat membuahi sel telur. Untuk membuktikan apakah MAA mengganggu atau tidaknya struktur DNA perlu diadakan penelitian yang lebih mendalam mengenai bagaimana struktur DNA dan kromosom spermatozoa tersebut.

Rasio seks mencit perlakuan pada uji kawin-1 dan uji kawin-2 tidak berbeda nyata dibandingkan dengan kontrol. Hal ini menunjukkan bahwa efek toksik MAA tidak spesifik pada jenis seks tertentu.

Setelah mengalami masa pemulihan 40 hari pascaperlakuan, kemampuan kawin mencit jantan perlakuan dan indeks gestasi mencit betina pasangannya menunjukkan perbaikan, sehingga sama dengan kontrol (100%; tabel 8). Dalam hal daya fertilisasi, pemulihan yang nyata hanya dijumpai pada mencit perlakuan dosis 150 mg/kg bb (tabel 10). Pada dosis 175 mg/kg bb belum menunjukkan peningkatan daya fertilisasi yang nyata. Keadaan ini menunjukkan bahwa efek toksik MAA dosis tinggi pada testis mencit dapat bertahan cukup lama.

Mengapa hal itu terjadi belumlah jelas, karena menurut Miller *et al.* (1983) MAA tidak diakumulasi pada organ target. Kemungkinan besar keadaan tersebut disebabkan oleh lambatnya kemampuan sel Sertoli untuk pulih ke kondisi normal, terutama jika kerusakannya cukup parah. Hal ini mungkin terjadi, karena sel Sertoli pada hewan dewasa sudah tidak membelah diri (Stefanini *et al.*, 1985).

4.5 Pengaruh MAA terhadap berat badan mencit selama percobaan dan setelah mengalami masa pemulihan

Perlakuan MAA pada mencit jantan dapat menyebabkan berat badan mencit perlakuan secara statistik lebih ringan dibandingkan dengan kontrol (tabel 11). Keadaan serupa diungkapkan pula oleh Miller *et al.* (1982) bahwa perlakuan MAA dosis 300 mg/kg bb selama 5 hari berturut-turut pada tikus jantan menyebabkan penurunan berat badan yang nyata. Lebih ringannya berat badan mencit perlakuan dibandingkan dengan kontrol menunjukkan adanya gejala toksik MAA pada hewan tersebut. Seperti telah diketahui, MAA mengganggu berbagai organ tubuh terutama testis dan organ yang berfungsi dalam sistem pertahanan tubuh seperti limpa, timus, dan sumsum tulang (Miller *et al.*, 1982). Bahkan mungkin mengganggu organ lainnya, seperti diungkapkan oleh Bell (1982) bahwa ester ftalat dapat mengganggu metabolisme normal dari hati, jantung, kelenjar adrenal, dan otak. Terganggunya fungsi organ-organ tubuh, dapat menyebabkan

gangguan pertumbuhan yang akhirnya dapat mengganggu pertambahan berat badan hewan.

Menurut Parkie *et al.* (1982), DMEP dapat mengganggu mobilisasi Zn^{2+} dalam tubuh tikus, dengan demikian tubuhnya akan mengalami defisiensi Zn^{2+} . Defisiensi Zn^{2+} dalam tubuh hewan dapat menyebabkan hambatan pertumbuhan (Miller *et al.*, 1960 dalam Oishi & Hiraga, 1980). Hal ini terjadi karena Zn^{2+} berperan penting dalam metabolisme asam nukleat. Menurut Vallee (1985) defisiensi Zn^{2+} dapat menyebabkan penurunan aktivitas polimerase RNA dan polimerase DNA. Dengan menurunnya aktivitas kedua enzim tersebut, maka pertumbuhan dan pembelahan sel akan terhambat yang akibatnya pertumbuhan organisme akan terhambat pula.

Setelah mengalami masa pemulihan selama 40 hari pascaperlakuan, berat badan mencit menampilkan peningkatan yang berarti dibandingkan pada akhir perlakuan (tabel 12). Walaupun demikian, berat badan mencit perlakuan setelah mengalami pemulihan secara statistik masih lebih rendah dibandingkan dengan kontrol. Keadaan ini menunjukkan, bahwa masa pemulihan selama 40 hari pascaperlakuan belum cukup untuk memulihkan berat badan mencit perlakuan ke kondisi tubuhnya yang normal. Selain itu ternyata tidak semua mencit mampu meningkatkan kondisi tubuhnya akibat perlakuan MAA. Hal ini ditunjukkan dengan adanya 2 ekor mencit yang mati selama masa pemulihan (tabel 8). Kejadian ini mungkin disebabkan oleh melemahnya daya tahan tubuh mencit perlakuan terhadap penyakit. Hal tersebut terjadi karena

organ target utama MAA adalah organ-organ yang berhubungan dengan sistem pertahanan tubuh (Miller *et al.*, 1982).



BAB V

K E S I M P U L A N

Dari hasil penelitian yang dilakukan dalam dua tahap percobaan menggunakan asam metoksiasetat (MAA) yang diberikan secara "gavage" dengan dosis masing-masing 100, 150, 225, dan 300 mg/kg bb untuk percobaan I dan 100, 125, 150, dan 175 mg/kg bb untuk percobaan II dapat disimpulkan, bahwa perlakuan MAA pada mencit albino Swiss Webster jantan menyebabkan:

1. Penurunan berat organ reproduksi terutama testis dan epididimis, sedangkan berat vesikula seminalis tidak menunjukkan penurunan yang nyata.
2. Reduksi diameter tubulus, tebal epitel tubulus, dan jumlah tubulus normal fase VII, serta meningkatkan jumlah tubulus yang abnormal.
3. Kerusakan sel-sel spermatogenik, terutama spermatosit pakiten dan tahap lanjut, sedangkan jumlah sel Sertoli dan sel Leydig tidak terpengaruh oleh perlakuan MAA, meskipun sel Sertoli menampilkan gejala keracunan yang ditandai dengan adanya yakuolisasi.
4. Penurunan fertilitas, yang diperlihatkan oleh penurunan daya fertilisasi dan peningkatan kehilangan praimplantasi yang nyata pada mencit betina tanpa perlakuan yang menjadi pasangannya.
5. Masa pemulihan selama 40 hari pascaperlakuan belum cukup untuk memulihkan fertilitas mencit perlakuan dosis tertinggi (175 mg/kg bb), tetapi mencit perlakuan dosis 150 mg/kg bb telah menunjukkan pemulihan yang nyata.
6. Gejala toksik, yang ditandai oleh lebih rendahnya berat badan mencit perlakuan dibandingkan dengan kontrol.

DAFTAR PUSTAKA

- Bell, F.P. 1982. Effects of phthalate esters on lipid metabolism in various tissues, cells and organelles in mammals. *Environ. Health Perspect.* 45: 41-50.
- Billmeyer Jr, F.W. 1971. *Textbook of polymer science*. 2nd edition. Wiley Interscience. New York, Chichester, Brisbane, Toronto. p. 242-251.
- . 1962. *Textbook of polymer science*. Interscience Publ. New York and London. p. 499-506.
- Bowen, I.D. & Lockshin, R.A. 1981. *Cell death in biology and pathology*. Chapman and Hall. London and New York. p. 209-237.
- Brauer, A. 1961. *Laboratory directions for histological technique*. Burgess Publ. Co. Minnesota. p. 5-28.
- Brown, N.A., Holt, D. & Webb, M. 1984. The teratogenicity of methoxyacetic acid in the rat. *Toxicol. Lett.* 22: 93-100.
- Daust, R. & Clermont, Y. 1953. Distribution of nucleic acids in germ cells during the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Am. J. Anat.* 96: 255-283.
- Feuston, M.H., Kerstetter, S.L. & Wilson, P.D. 1990. Teratogenicity of 2-methoxyethanol applied as a single dermal dose to rats. *Fundam. Appl. Toxicol.* 15: 418-456.
- Foster, P.M.D., Lloyd, S.C. & Blackburn, D.M. 1987. Comparison of the *in vivo* and *in vitro* testicular effects produced by methoxy-, ethoxy- and n-butoxyacetic acid in the rat. *Toxicology*. 43 :17-30.
- Fresney, R.I. 1986. *Culture of animal cells. A manual of basic technique*. 2nd edition. Alan R. Liss, Inc. New York. p. 69-70.
- Ghanayem, B.I. & Chapin, R.E. 1990. Calcium channel blockers protect against ethylene glycol monomethyl ether (2-methoxyethanol) induced testicular toxicity. *Exp. Mol. Pathol.* 52: 279-290.
- Gray, T.J.B. & Gangolli, S.D. 1986. Aspects of the testicular toxicity of phthalate esters. *Environ. Health Perspect.* 65: 229-235.

- Greene, J.A., Sleet, R.B., Morgan, K.T. & Welsch, F. 1987. Cytotoxic effects of ethylene glycol monomethyl ether in forelimb bud of the mouse embryo. *Teratology*. 36: 23-34.
- Krzanowska, H. 1981. Sperm head abnormalities in relation to the age and strain of mice. *J. Reprod. Fert.* 62: 385-392.
- Lewandowski, M., Fernandes, J. & Chen, T.S. 1980. Assessment of the teratogenic potential of plasma-soluble extracts of diethylhexyl phthalate plasticized polyvinyl chloride plastics in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 54: 141-147.
- Manson, J.M. & Kang, Y.J. 1989. Test methods for assessing female reproductive and development toxicology. *Principles and methods of toxicology*. 2nd edition. Ed. Hayes, W.A. Raven Press Ltd. New York. p. 311-357.
- Mellan, I. 1947. *Modern plastic encyclopedia*. Vol. 1. Ed. Frados, J. Preskin Publ. Inc. New York. p. 207-213.
- Miller, R.R., Carreon, R.E., Young, J.T. & McKenna, M.J. 1982. Toxicity of methoxyacetic acid in rats. *Fundam. Appl. Toxicol.* 2: 158-160.
- Miller, R.R., Hermann, E.A., Langvardt, P.W., McKenna, M.J. & Schewtz, B.A. 1983. Comparative metabolism and disposition of ethylene glycol monomethyl ether and propylene glycol monomethyl ether in male rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 67: 229-237.
- Moeloek, N. 1979. Andrologi. *Majalah Ginekologi Indonesia*. UI. Jakarta. p. 136-144.
- Moss, E.J., Thomas, L.V., Cook, M.W., Walters, D.G., Foster, P.M.D., Creasy, D.M. & Grav, T.J. 1985. The role of metabolism in 2-methoxyethanol induced testicular toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 79: 480-489.
- Oishi, S. 1990. Effects of phthalic acid esters on testicular mitochondrial functions in the rat. *Arch. Toxicol.* 64(2): 143-147.
- Oishi, S. & Hiraga, K. 1980. Testicular atrophy induced by phthalic acid esters: effect on testosterone and zinc concentrations. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 53: 35-41.
- Parkhie, M.R., Webb, M. & Norcross, M.A. 1982. Dimethoxyethyl phthalate: embryopathy, teratogenicity, fetal metabolism and the role of zinc in the rat. *Environ. Health Perspect.* 45: 89-97.

- Ratnasooriya, W.D. & Sharpe, R.M. 1989. Evaluation of the effect of selective germ cell depletion on subsequent spermatogenesis and fertility in the rat. *Int. J. Androl.* 12: 44-47.
- Ritter, E.J., Scott Jr., W.J., Randall, J.L. & Ritter, J.M. 1985. Teratogenicity of dimethoxyethyl phthalate and its metabolites methoxyethanol and methoxyacetic acid in the rat. *Teratology.* 32: 25-31.
- Ritonga, A. 1987. *Statistika terapan untuk penelitian*. UI. Jakarta. p. 317-324.
- Scott, Jr, W.J., Nau, H., Wittfoht, W. & Merker, H.J. 1987. Ventral duplication of the autopod: chemical induction by methoxyacetic acid in rat embryos. *Development.* 99: 127-136.
- Scott, W.J., Fradkin, R., Wittfoht, W. & Nau, H. 1989. Teratologic potential of 2-methoxyethanol and trans-placental distribution of its metabolite, 2-methoxyacetic acid, in non-human primates. *Teratology.* 39: 363-373.
- Sjoberg, P., Lindqvist, N.G. & Ploen, L. 1986. Age-dependent response of the rat testes to di(2-ethylhexyl) phthalate. *Environ. Health Perspect.* 65: 237-242.
- Stefanini, M., Conti, M., Geremia, R. & Ziparo, E. 1985. Regulatory mechanisms of mammalian spermatogenesis. In: *Biology of fertilization*. Eds. Metz, C.B. & Monroy, A. Vol. 2. Academic Press, Inc. Orlando. p. 59-92.
- Sudjana. 1991. *Desain dan analisis eksperimen*. Tarsito. Bandung. p. 15-30.
- Sugiarso, N.C. 1986. *Toksistas obat tradisional*. PPOM Depkes RI. Jakarta. p.15-16.
- Suminarsih, R. 1992. *Pengaruh asam metoksiasetat terhadap perkembangan embrio mencit (Mus musculus) albino Swiss Webster*. Tesis S-1. ITB. Bandung.
- Sutasurya, L.A. 1985. *Penuntun praktikum mikroteknik hewan*. Jurusan Biologi ITB. Bandung.
- Taylor, P. 1986. *Practical teratology*. Academic Press. Harcourt Brace Jovanovich Publ. London. p. 7-8.
- Totowarsa & Cucu. 1982. *Teknik perancangan percobaan*. UNPAD. Bandung. p. 25-33.
- Ulhazy, E., Balonova, T., Vargova, T., Jansak, J. & Derkova, L. 1992. Teratological study of stobadin

after single and repeated administration in rats.
Teratogen. Carcinogen. & Mutagen. 12: 211-221.

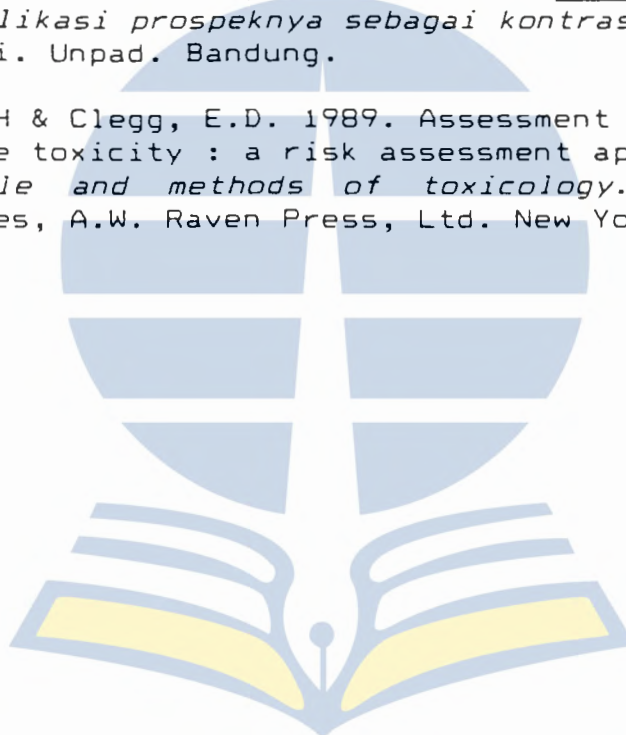
Vallee, B.L. 1985. Zinc in biology and biochemistry. In: *Zinc enzyme*. Ed. Spiro, T.G. John Wiley & Son, Inc. Canada. p. 3-22.

Walpole, R.E. & Myers, R.H. 1986. *Ilmu peluang dan statistika untuk insinyur dan ilmuwan*. Terjemahan Sembiring, R.K. Terbitan ke-2. ITB. Bandung. p. 506-532.

WHO. 1988. *Penuntun lab. WHO untuk pemeriksaan semen manusia dan interaksi semen-getah servik*. Fak. Kedokteran UI. Jakarta. p. 3-14.

Yatim, W. 1988. *Efek anti-fertilitas gosipol dan gula berkhlor terhadap tikus Wistar (*Ratus norvegicus*) dan implikasi prospeknya sebagai kontrasepsi pria*. Disertasi. Unpad. Bandung.

Zenick, H & Clegg, E.D. 1989. Assessment of male reproductive toxicity : a risk assessment approach. In: *Principle and methods of toxicology*. 2nd edition. Ed. Hayes, A.W. Raven Press, Ltd. New York. p. 275-306.



Lampiran 1

Komposisi dan bahan untuk pakan mencit CP 551 produksi PT Charoen Pokphand Indonesia

Komposisi :

Kadar air.....	maks.	13	%
Protein	min.	20	%
Lemak	min.	4,5	%
Serat	maks.	4	%
Abu	maks.	6	%
Kalsium	min.	0,7	%
Fosfor	min.	0,6	%

Bahan-bahan yang digunakan, antara lain:

Jagung, dedak, tepung ikan, bungkil kedelai, bungkil kelapa, tepung daging dan tulang, pecahan gandum, bungkil kacang tanah, tepung daun, canola, vitamin, kalsium, fosfor, dan mineral.

Lampiran 2.

Kemampuan kawin mencit jantan dan indeks gestasi mencit betina pasangannya pada studi pendahuluan.

Dosis MAA (mg/kg bb.)	Jumlah mencit jantan			Kemampuan kawin (%)	Betina hasil perkawinan			Indeks gestasi (%)
	DK	K	TK		SV	B	TB	
Kontrol (0)	2 †	2	0	100	2	2	0	100
100	3	3	0	100	3	3	0	100
150	2 †	2	0	100	2	1	1	50
225	2 †	2	0	100	2	0	0	0
300	3	3	0	100	3	0	0	0
375 *>	-	-	-	-	-	-	-	-

† = 1 ekor mati karena kesalahan "gavage"; *> = semua mencit mati karena perlakuan MAA; DK = dikawinkan; K = kawin; TK = tidak kawin; SV = bersumbat vagina; B = bunting; TB = tidak bunting

Lampiran 3.

Cara pembuatan sediaan awetan spermatozoa dengan menggunakan metode dari Krzanowska (1981) yang dimodifikasi

1. Setetes suspensi semen dari epididimis kauda diletakkan di atas kaca objek yang bersih, kemudian tetesan sampel tersebut diratakan dengan menggunakan kaca objek lain dengan cara mengapushya dengan baik, hingga tetesan sampel tadi merata pada permukaan kaca objek.
2. Sediaan dikeringkan di udara hingga kering. selanjutnya difiksasi dengan menggunakan fiksatif alkohol asetat (3 bagian etanol absolut : 1 bagian asam asetat glasial) selama 1 jam.
3. Sediaan dicuci dengan air ledeng, dikeringkan sebentar, selanjutnya diwarnai dengan larutan eosin 5% dalam air selama 2-3 menit.
4. Sediaan dicuci kembali dengan air untuk menghilangkan kelebihan zat warna, kemudian dikeringkan.
5. Setelah sediaan mengering, kemudian ditutup dengan kaca penutup dengan perekat entelan.

Lampiran 4

Pembuatan larutan uji

Larutan MAA dosis 300 mg/kg bb:

Volume untuk pemberian zat secara "gavage" dalam penelitian ini ditentukan sebanyak 0,1 ml larutan MAA/10 g bb mencit = 10 ml larutan MAA/kg bb mencit.

Jadi dosis 300 mg/kg bb = 300 mg MAA murni/10 ml larutan
= 0,300 g MAA murni/10 ml larutan
MAA murni pada suhu kamar berbentuk cair dengan berat jenis 1,172. Dari rumus :

$$\text{volume} = \text{massa} : \text{berat jenis}$$

maka untuk mendapatkan 0.300 gram MAA diperlukan cairan MAA murni dengan volume = $0,300 : 1,172$

$$= 0,26 \text{ ml}$$

Jadi untuk setiap 10 ml larutan MAA dosis 300 mg/kg bb diperlukan MAA murni sebanyak 0,26 ml dan akuabides sebanyak 9,74 ml. Banyaknya larutan MAA yang dibuat disesuaikan dengan keperluan.

Untuk membuat larutan MAA dosis 100, 125, 150, 175, dan 225 mg/kg bb. digunakan cara yang sama.