

PENGARUH PAPARAN OBAT NYAMUK PADA KELAINAN GAMBARAN HISTOLOGI SEL LEYDIG TESTIS TIKUS SPRAGUE DAWLEY

Anindyo Abshar Andar¹, Tri Indah Winarni², Ika Pawitra Miranti³

¹ Mahasiswa Program Pendidikan S-1 Kedokteran Umum, Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro

² Staf pengajar Bagian Anatomi Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro

³ Staf pengajar Bagian Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro
Jl. Prof. H. Soedarto, SH., Tembalang -Semarang 50275, Telp. 02476928010

ABSTRAK

Latar belakang : Insektisida merupakan bahan kimia yang sering dijumpai dalam kehidupan sehari-hari. Zat ini dapat mengganggu keseimbangan hormon Endokrin tubuh sehingga disebut Endocrine Disrupting Chemicals (EDC). EDC bekerja mengganggu aksis hipotalamus-hipofisis-testis sehingga dapat mempengaruhi sel Leydig

Tujuan : Untuk mengetahui ada tidaknya perubahan gambaran histologi sel Leydig akibat pengaruh paparan insektisida yang mengandung estrogen.

Metode : Penelitian true experimental dengan rancangan parallel post test only control group design. Menggunakan tikus strain Sprague Dawley jantan usia 3 hari post natal (n=25) yang secara random dibagi menjadi 5 kelompok (kelompok kontrol (n=5), 25 µg β estradiol 3-benzoat (n=5), obat nyamuk bakar lingkar (n=5), 3 ml obat nyamuk cair (n=5), dan 4 ml obat nyamuk cair (n=5)). Paparan dilakukan selama 28 hari. Pada usia ke 100 hari, testis diambil dan diperiksa histopatologi keganasan sel Leydig menggunakan pengecatan HE. Uji statistik yang digunakan uji Kruskal-Wallis dan dilanjutkan uji Mann-Whitney.

Hasil : Pada penelitian ini didapatkan peningkatan jumlah kelompok sel Leydig testis pada masing-masing kelompok perlakuan dibanding kelompok kontrol. Terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok kontrol dengan perlakuan 25 µg β estradiol 3-benzoat (p=0,007), obat nyamuk bakar (p=0,008), dan obat nyamuk cair 4 ml (p= 0,008). Akan tetapi terdapat perbedaan yang tidak bermakna antara kelompok perlakuan obat nyamuk cair 3 ml dibandingkan dengan kelompok kontrol (p=0,827.)

Simpulan : Paparan obat nyamuk dapat mengakibatkan peningkatan jumlah kelompok sel Leydig.

Kata Kunci : Insektisida, Endocrine Disrupting Chemicals, keganasan sel Leydig testis.

ABSTRACT

EFFECTS OF MOSQUITO REPELLENT'S EXPOSURE TO HISTOLOGICAL APPEARANCE OF TESTICULAR LEYDIG CELLS OF SPRAGUE DAWLEY RATS

Background: Insecticides are chemicals that are often encountered in everyday life. These substances can disrupt the body's endocrine hormonal balance so that it's called Endocrine Disrupting Chemicals (EDCs). EDC works by disrupting the hypothalamic-pituitary-testicular axis. Thus, it can affect the Leydig cell.

Aim: To determine the effect of exposure of estrogen-containing insecticides to testicular Leydig cell histological appearance.

Methods: This was a true experimental study with parallel post-test only control group design. It used Sprague Dawley rat aged 3 days post-natal (n = 25) which were randomly

divided into 5 groups (control group (n = 5); 25 mg β estradiol 3-benzoate (n = 5); burning mosquito repellent (n = 5); 3 ml of liquid mosquito repellent (n = 5); and 4 ml of liquid mosquito repellent (n = 5)). Exposure is given for 28 days. At the age of 100 days, testes were taken and examined their histopathological appearance of Leydig cell malignancies using HE staining. The statistical test used Kruskal-Wallis and Mann-Whitney test.

Results: In this study, there was an increase in the number of testicular Leydig cell groups in each treatment group as compared to control group. There was significant difference between control group with 25 mg β estradiol 3-benzoate (p = 0.007), burning mosquito repellent (p = 0.008), and liquid repellent 4 ml (p = 0.008) treated group. However, there was no significant difference between the treatment groups of 3 ml liquid repellent as compared to the control group (p = 0.827).

Conclusion: Exposure to insecticides may lead to increase in the number of Leydig cell groups.

Key words: Insecticides, Endocrine Disrupting Chemicals, testicular Leydig cell malignancy

PENDAHULUAN

Insiden keganasan testis mengalami peningkatan di negara-negara industri seperti Eropa, Amerika, dan Oceania. Peningkatan ini dikaitkan dengan peningkatan polutan dari lingkungan yang bersifat menyerupai hormon yang disebut sebagai *endocrine disrupting chemical* (EDC).¹ EDC adalah bahan/zat sintetis atau natural dan beberapa kelompok lainnya yang diketahui aksinya pada androgen dan mengganggu perkembangan saluran reproduksi dan organ genitalia pria. EDC banyak ditemukan pada beberapa bahan kimia seperti phthalates, dioxins, phytoestrogen dan insektisida. Didapatkan peningkatan gangguan pembentukan organ reproduksi seperti *cryptorchidism*, *hypospadias*, infertilitas, dan juga kanker testis yang dikaitkan dengan paparan EDC.^{2,3}

Terdapat hubungan antara paparan kronis bahan kimia lingkungan dengan peningkatan insiden hiperplasia sel Leydig dan adenoma. Mekanisme akibat EDCs yang melibatkan gangguan pada *hipotalamus-hipofisis-testis* (HHT) axis dimungkinkan terjadi pada berbagai titik antara lain *androgen receptor antagonis*, *testosteron biosynthesis inhibitor*, *5 alfa-reductase inhibitor*, *aromatase inhibitor*, *estrogen agonist*. Intinya mekanisme aksi EDCs dapat bekerja mengganggu HHT axis dan meningkatkan level luteinizing hormone (LH), peningkatan level LH dapat menyebabkan hiperplasia sel Leydig dan adenoma.⁴

Dari penelitian-penelitian terdahulu yang menunjukkan adanya hubungan antara keganasan testis dengan paparan EDCs antara lain pestisida, dan insektisida. Pada penelitian ini dilakukan paparan obat nyamuk selama 20 hari pada periode neonatal untuk mengetahui pengaruh paparan terhadap jumlah kelompok sel Leydig.

METODE

Jenis penelitian ini adalah *true experimental* dengan rancangan *parallel control group post test only design*. Sampel penelitian ini adalah Tikus jantan Sprague Dawley usia 3 hari dengan berat 6-8 gram dan tidak memiliki kelainan anatomi. Pada penelitian ini terdapat 5 grup (1 grup kontrol dan 4 grup perlakuan). Penelitian dilakukan pada bulan Februari sampai bulan Juni 2015 di Laboratorium Kering Gedung E Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, dan Laboratorium Patologi Anatomi Rumah Sakit dr. Kariadi Semarang.

Pemeliharaan dan perlakuan pada hewan coba dilakukan oleh Dr. dr. Tri Indah Winarni M.Si.Med dengan judul *Alteration of Rat Reproductive Organ in Adulthood caused by the Exposure of foreign Estrogenic Compunds (Mosquito Insecticides) during Early Life* di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu Universitas Gadjah Mada Yogyakarta pada tahun 2005. Tikus pada grup 1 (grup kontrol) dipelihara sesuai standar sampai usia 100 hari. Pada grup 2 tikus disuntikkan $25 \mu\text{g } \beta \text{ estradiol } 3\text{-benzoat}$ secara subkutis selama 20 hari sebanyak 2 hari sekali kemudian di pelihara sampai usia 100 hari. Grup 3 dipaparkan asap obat nyamuk bakar bentuk lingkaran selama 20 hari selama 8 jam perhari kemudian dipelihara sampai usia 100 hari. Grup 4 (3ml) dan grup 5 (4ml) di paparkan obat nyamuk cair yang diuapkan dengan nebulizer selama 20 hari setiap 2 menit sekali kemudian dipelihara sampai usia 100 hari.

Pada usia 100 hari tikus dilakukan anestesi kemudian diterminasi dengan *cervical dislocation*, diambil organ testis dan di proses secara histopatologi dengan pengecatan Haematoxylin dan eosin. Penghitungan kelompok sel Leydig dilakukan dengan perbesaran 100X. *Ethical clearance* diperoleh dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan FK Undip/ RSUP dr. Kariadi Semarang.

HASIL

Tabel 1. Uji Kruskal-Wallis untuk melihat signifikansi perubahan jumlah kelompok sel Leydig pada masing-masing perlakuan

Kelompok Perlakuan	Rerata ± SB (Min-Maks)	p
K (Kontrol)	1,00 ± 0,707 (0-2)	0,001*
P1 (Injeksi estradiol)	6,60 ± 0,548 (6-7)	
P2 (Obat nyamuk bakar)	5,60 ± 1,140 (4-7)	
P3 (Obat nyamuk cair 3ml)	1,60 ± 1,817 (0-4)	
P4 (Obat nyamuk cair 4ml)	4,60 ± 1,140 (3-6)	

Keterangan : * Signifikan $p < 0,05$

Hasil uji *Kruskal-Wallis* didapatkan nilai $p = 0,001$, karena $p < 0,05$ maka dapat disimpulkan terdapat perbedaan bermakna pada kelompok perlakuan dan dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney* untuk mengetahui perbedaan antara masing-masing kelompok.

Tabel 2. Uji nonparametrik *Mann-Whitney* untuk melihat signifikansi perbedaan jumlah kelompok sel Leydig pada masing-masing perlakuan

Variabel	P1	P2	P3	P4
K	0,007*	0,008*	0,827	0,008*
P1	–	0,119	0,008*	0,013*
P2		–	0,011*	0,197
P3			–	0,026*

Keterangan : * signifikan $p < 0,05$

P1 = Grup 1

P2 = Grup 2

P3 = Grup 3

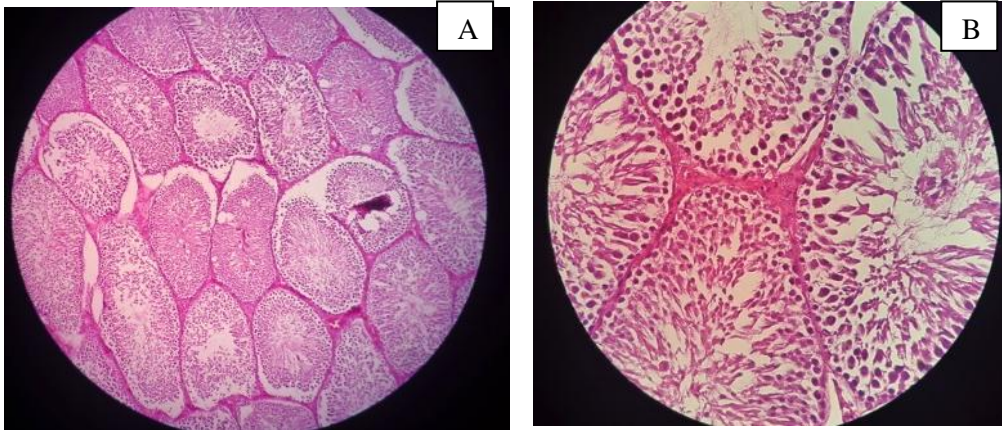
P4 = Grup 4

P5 = Grup 5

K = Kontrol

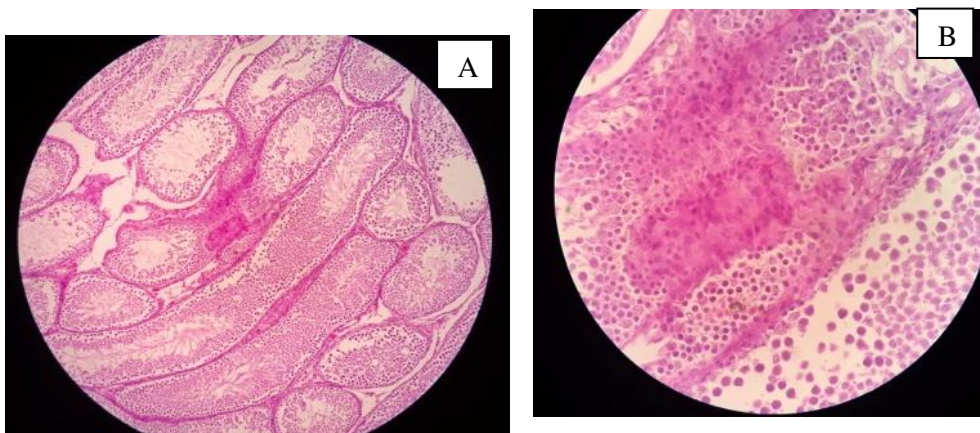
Dari tabel hasil uji *Mann-Whitney* didapatkan antara kelompok K terhadap P1, P2 dan P4 mempunyai nilai $p < 0,05$ atau signifikan sedangkan antara kelompok K terhadap P3 mempunyai nilai $p > 0,05$ atau tidak signifikan. Antara kelompok P1 terhadap P3 dan P4 mempunyai nilai $p < 0,05$ atau signifikan sedangkan kelompok P2 terhadap P2 mempunyai nilai $p > 0,05$ atau tidak signifikan. Antara kelompok P2 terhadap P3 mempunyai nilai $p < 0,05$ atau signifikan sedangkan kelompok P2 terhadap P4 mempunyai nilai $p > 0,05$ atau tidak signifikan. Sedangkan kelompok P3 terhadap P4 mempunyai nilai $p < 0,05$ atau signifikan.

Gambaran histopatologi sel Leydig



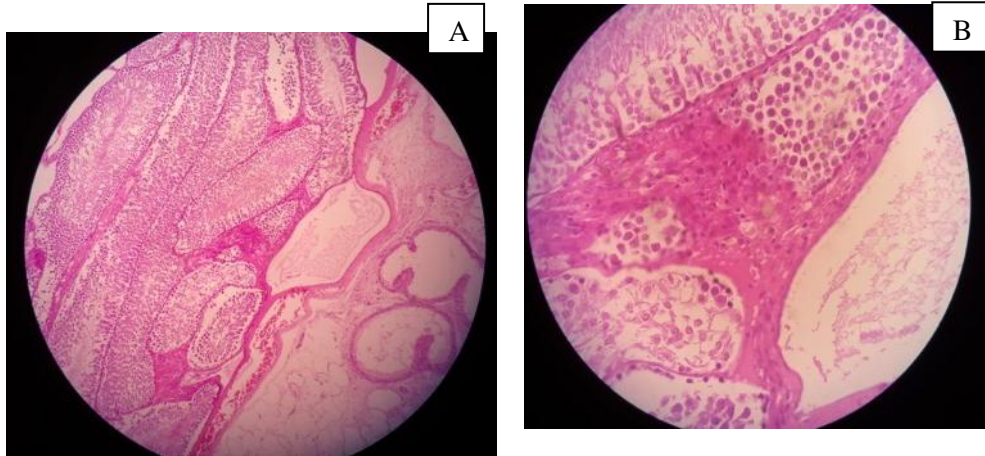
Gambar 1 : Gambar histopatologis kelompok kontrol dengan perbesaran (A) 100X, (B) 400X.

Gambar di atas menunjukkan sel Leydig pada interstitial yang masih terlihat normal, tidak terlihat adanya perubahan morfologi berupa gerombolan sel Leydig.



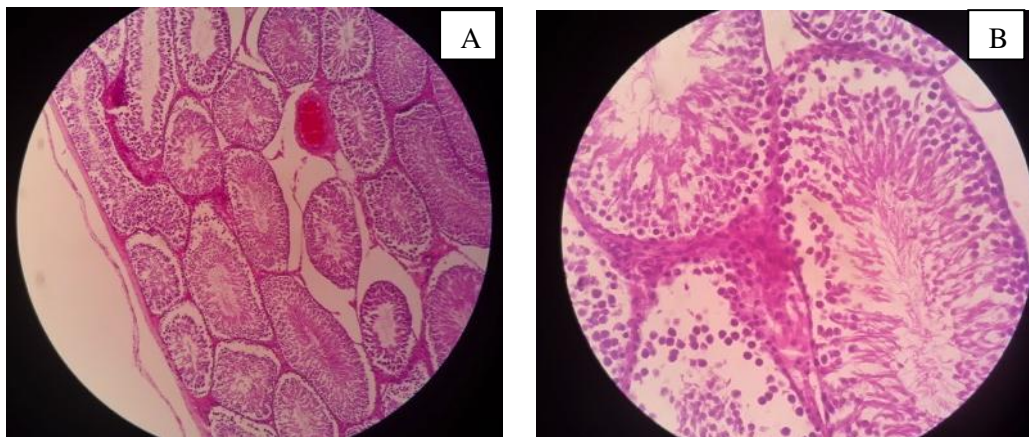
Gambar 2 : Gambar histopatologis kelompok perlakuan 1 dengan perbesaran (A) 100X, (B) 400X.

Gambar di atas menunjukkan perubahan morfologi berupa peningkatan jumlah kelompok Sel Leydig pada paparan estradiol.



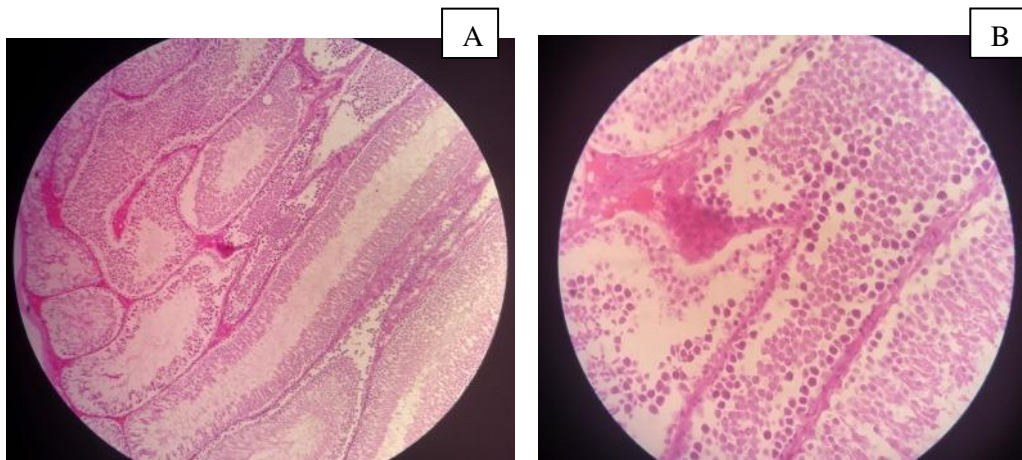
Gambar 3 : Gambar histopatologis kelompok perlakuan 2 dengan perbesaran (A) 100X, (B) 400X.

Gambar di atas menunjukkan perubahan morfologi berupa peningkatan jumlah kelompok Sel Leydig pada paparan obat nyamuk bakar.



Gambar 4 : Gambar histopatologis kelompok perlakuan 3 dengan perbesaran (A) 100X, (B) 400X.

Gambar di atas menunjukkan perubahan morfologi berupa peningkatan jumlah kelompok Sel Leydig pada paparan obat nyamuk cair 3 ml.



Gambar 5 : Gambar histopatologis kelompok perlakuan 4 dengan perbesaran (A) 100X, (B) 400X.

Gambar di atas menunjukkan perubahan morfologi berupa peningkatan jumlah kelompok Sel Leydig pada paparan obat nyamuk cair 4 ml.

PEMBAHASAN

Seiring dengan perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi, saat ini manusia sangat mudah dan cenderung menggunakan berbagai macam bahan kimia di dalam kehidupan sehari-harinya. Salah satu bahan kimia yang sering digunakan ialah obat nyamuk. Berdasarkan penelitian ternyata obat nyamuk mengandung bahan kimia yang dapat mengganggu regulasi hormon endokrin tubuh. Zat tersebut dikenal sebagai *Endocrine Disrupting Chemicals* (EDC).^{5,6} Telah diketahui bahwa kandungan EDC menyerupai hormon estrogen tubuh dan mempunyai kemampuan untuk berikatan dengan reseptor tubuh, salah satunya reseptor estrogen (ER).⁶

Dalam penelitian ini terjadi perubahan histopatologi testis sesuai dengan hipotesis yang telah disampaikan oleh peneliti. Hasil tersebut menunjukkan bahwa pemberian obat nyamuk selama 20 hari sejak usia 3 hari postnatal dapat mempengaruhi gambaran histologi sel Leydig dibandingkan kelompok yang tidak dipaparkan obat nyamuk. Terlihat adanya perubahan gambaran histologi berupa peningkatan jumlah kelompok sel Leydig.

Pada penelitian ini didapatkan peningkatan jumlah kelompok sel Leydig yang bermakna pada kelompok perlakuan yang dipapar oleh estradiol, obat nyamuk bakar dan obat nyamuk cair pada tikus Sprague Dawley selama 20 hari sejak usia 3 hari postnatal dibandingkan dengan kelompok kontrol.

Normalnya aksis pituitari hipofisis testis dapat mengeluarkan LH untuk menstimulasi testis mengeluarkan testosteron. Untuk mencegah sekresi yang berlebih, terdapat umpan balik negatif pada aksis hipotalamus-pituitari-testis sehingga LH akan turun.⁷ Pada penelitian ini tikus Sprague Dawley yang terpapar obat nyamuk (EDC) menyebabkan gangguan pada mekanisme umpan balik negatif. Akibat dari gangguan umpan balik akan meningkatkan sekresi LH secara berlebih sehingga menyebabkan Hiperplasia sel Leydig.⁸ Pada penelitian sebelumnya dikatakan bahwa peningkatan LH secara kronis menyebabkan sel Leydig mudah membelah.⁴ Terbukti bahwa LH mempunyai peranan dalam mitogenik, dimana pemberian LH secara kronis pada tikus akan menyebabkan adenoma sel Leydig.⁴

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Terdapat peningkatan jumlah kelompok sel Leydig yang bermakna antara grup kontrol dan grup perlakuan. Obat nyamuk bakar memiliki hasil dengan jumlah kelompok sel Leydig paling banyak dibanding perlakuan lain.

Saran

Peneliti mengharapkan adanya penelitian lebih lanjut dengan menggunakan pengecatan imunohistokimia pada sel Leydig untuk melihat karsinogenesis pada reseptor estrogen.

UCAPAN TERIMAKASIH

Peneliti mengucapkan terima kasih kepada Dr. dr. Tri Indah Winarni, PA, M.Si, Med, dan dr. Ika Pawitra M., M.kes., Sp.PA selaku dosen pembimbing yang telah membantu dalam penyusunan Karya Tulis Ilmiah ini. Peneliti juga berterimakasih kepada semua pihak yang telah membantu dalam proses penulisan Karya Tulis Ilmiah ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Huyghe E, Plante P, Thonneau PF. Testicular Cancer Variations in Time and Space in Europe. *Eur. Urol.* 2007;51(3):621-628.
doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.eururo.2006.08.024>.
2. Svechnikov K, Izzo G, Landreh L, Weisser J, Söder O. Endocrine disruptors and Leydig cell function. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010;2010. doi:10.1155/2010/684504.
3. Virtanen HE, Adamsson A. Cryptorchidism and endocrine disrupting chemicals. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2012;355(2):208-20. doi:10.1016/j.mce.2011.11.015.
4. Clegg ED, Cook JC, Chapin RE, Foster PMD, Daston GP. Leydig cell hyperplasia and adenoma formation: Mechanisms and relevance to humans. *Reprod. Toxicol.* 1997;11(I):107-121. doi:10.1016/S0890-6238(96)00203-1.
5. Diamanti E. Endocrine-Disrupting Chemicals: An Endocrine Society Scientific Statement. *Endocr. Soc.* 2009.
6. Jeng HA. Exposure to endocrine disrupting chemicals and male reproductive health. *Front. public Heal.* 2014;2(June):55. doi:10.3389/fpubh.2014.00055.
7. Sherwood L. *Introduction to Human Physiology*. 8th ed. Australia: Brooks/cole; 2013.
8. Naughton CK, Nadler RB, Basler JW, Humphrey PA. Leydig Cell Hyperplasia. *British J. Urol.* 1998;81:282-289.