

PENGARUH PAPARAN INSEKTISIDA PADA TESTIS TIKUS SPRAGUE DAWLEY: KAJIAN RISIKO KEGANASAN SEL GERMINAL

Milzam Auzan Aziman¹, Tri Indah Winarni², Ika Pawitra Miranti³

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

² Staf Pengajar Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro

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

ABSTRAK

Latar belakang : Insektisida seperti obat nyamuk memiliki kandungan senyawa yang digolongkan sebagai *Endocrine Disrupting Chemicals* (EDCs). EDCs berperan sebagai *estrogen like hormones*. Senyawa ini dapat berikatan dengan reseptor estrogen yang berada di sel germinal testis yang dapat memediasi karsinogenesis melalui kerusakan oksidatif DNA.

Tujuan : Membuktikan pengaruh paparan insektisida terhadap gambaran histologi sel germinal testis

Metode : Penelitian *true experimental* dengan rancangan *parallel post test only control group design* ini 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 lingkaran (n=5), 3 ml obat nyamuk cair (n=5), dan 4 ml obat nyamuk cair (n=5)). Pada usia ke 100 hari, testis diambil dan diperiksa histopatologi keganasan sel germinal menggunakan pengecatan HE. Uji statistik yang digunakan uji *Kruskal-Wallis* dan dilanjutkan uji *Mann-Whitney* untuk melihat perbedaan antar kelompok perlakuan.

Hasil : Pada penelitian ini didapatkan peningkatan jumlah sel germinal testis yang mengarah keganasan pada masing-masing kelompok perlakuan dibanding kelompok kontrol. Terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok perlakuan 25 µg β estradiol 3-benzoat (p=0,008), obat nyamuk bakar (p=0,019), dan obat nyamuk cair 4 ml (p=0,025) dibandingkan dengan kelompok kontrol. Akan tetapi terdapat perbedaan yang tidak bermakna antara kelompok perlakuan obat nyamuk cair 3 ml (p=0,589) dibandingkan dengan kelompok kontrol.

Simpulan : Paparan insektisida dapat mengakibatkan perubahan yang bermakna gambaran histologi sel germinal testis yang mengarah keganasan.

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

ABSTRACT

THE EFFECT OF INSECTICIDE EXPOSURE TO TESTICULAR OF SPRAGUE DAWLEY RAT: RISK ASSESSMENT OF GERM CELL MALIGNANCY

Background: Insecticides, such as insecticide repellents, contain compounds that are classified as Endocrine Disrupting Chemicals (EDCs). EDCs act as estrogen-like hormones. These compounds can bind to estrogen receptors located in testicular germ cells and mediate carcinogenesis through DNA oxidative damage.

Objective: To determine the effect of insecticides exposure on testicular germ cell

Methods: This true experiment research design with parallel post test only control group design using Sprague Dawley rat strain 3 days post-natal age (n=25) which were randomly divided into 5 groups (control group (n=5), 25 mg β estradiol 3-benzoate (n=5), burn mosquito repellent (n=5), 3 ml of liquid mosquito repellent (n=5), and 4 ml of liquid mosquito

repellent (n=5)). After 100 days, testicular was taken and examined its germ cell malignancies histopathologically using HE staining. Kruskal-Wallis and continued using Mann-Whitney statistical analysis were done to seek the difference between control and treatment groups.

Results: There was an enhancement in the number of testicular germ cells that lead to malignancy in each treatment group compared to those of control group. There were significant differences between treatment groups 25 mg β estradiol 3-benzoate ($p=0.008$), burning mosquito repellent ($p=0.019$), and liquid repellent 4 ml ($p=0.025$) compared to those of control group. However, the difference was found not significant between 3 ml liquid repellent ($p=0,589$) compared to those of control group.

Conclusions: Exposure to insecticides may result in significant changes in testicular germ cell histology that leads to malignancy.

Keywords: Insecticides, testicular germ cell malignancy, Endocrine Disrupting Chemicals.

PENDAHULUAN

Kanker testis adalah keganasan yang jarang ditemukan, tetapi merupakan keganasan yang umum dijumpai laki-laki usia muda di banyak negara. Keganasan ini 90-95% berasal dari *Germ Cell*, sehingga sering pula disebut *Testicular Germ Cell Tumors* (TGCT),^{1,2} Salah satu faktor risiko dari TGCT adalah ketidakseimbangan hormonal tubuh, salah satunya disebabkan oleh paparan *Endocrine Disrupting Chemicals* (EDCs). Berdasarkan studi epidemiologi ditemukan adanya hubungan antara TGCT terhadap paparan EDCs pada masa fetus atau pada neonatus. Paparan EDCs yang terjadi pada masa perkembangan organ seperti pada saat fetus atau neonatus akan memberikan efek yang lebih buruk dibandingkan paparan yang terjadi pada saat dewasa. Hal ini dikarenakan pada saat masa perkembangan organ, sistem pertahanan tubuh juga masih belum sempurna sehingga lebih rentan apabila terpapar senyawa kimia yang mirip dengan hormon yang berada di dalam tubuh.^{3,4}

EDCs dapat berperan sebagai *estrogen like hormones* di dalam tubuh manusia, sehingga dapat berikatan dengan reseptor estrogen. Penelitian terbaru menunjukkan bahwa paparan estrogen dari luar tubuh akan menyebabkan kerusakan oksidatif DNA pada sel germinal melalui reseptor estrogen β (ER- β). Melalui proses inilah memungkinkan terjadinya perubahan sel germinal testis menuju kearah keganasan.^{5,6}

Insektisida seperti obat nyamuk dipercaya memiliki kandungan senyawa yang dapat berperan sebagai EDCs. Peningkatan penggunaan insektisida ini menyebabkan manusia lebih sering terpapar oleh EDCs dan meningkatkan risiko terjadinya penyakit akibat ketidakseimbangan hormonal.⁷ Penelitian ini bertujuan melihat pengaruh paparan insektisida

yang mengandung transflutrin dan propoxur selama 20 hari pada testis tikus *Sprague Dawley* neonatus untuk mengetahui perubahan sel germinal testis menuju kearah keganasan.

METODE

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode *true experimental* dengan rancangan *parallel post test only control group design*. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Rumah Sakit dr. Kariadi Semarang dan Laboratorium Histologi Gedung E Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro selama bulan Maret-Mei 2015. Penelitian ini menggunakan sampel blok parafin testis tikus *Sprague Dawley* yang merupakan penelitian sebelumnya oleh Mohammad Ali Akbar dengan judul *Pengaruh Paparan Insektisida Bakar Bentuk Lingkar dan Insektisida Cair Terhadap Spermatogenesis Tikus Sprague Dawley Dilihat Secara Histopatologis* dan dilakukan pemeliharaan hewan coba di Unit Pemeliharaan Hewan Percobaan (UPHP) Universitas Gadjah Mada di Yogyakarta.

Pada penelitian ini terdapat 5 kelompok (1 kelompok kontrol dan 4 kelompok perlakuan) dan tiap kelompok terdapat 5 tikus yang memiliki kriteria yaitu tikus jenis kelamin jantan, 3 hari post natal, berat 6-8 gram, dan tidak ada kelainan anatomi. Tikus pada kelompok kontrol (kelompok 1) dipelihara sesuai standar sampai usia 100 hari. Pada kelompok 2 tikus disuntikkan 25 µg β estradiol 3-benzoat secara subkutis 2 hari sekali selama 20 hari dan kemudian dipelihara sampai usia 100 hari. Kelompok 3 dipaparkan asap obat nyamuk bakar bentuk lingkar mengandung transflutrin 0.03% selama 8 jam perhari selama 20 hari kemudian dipelihara sampai usia 100 hari. Kelompok 4 dan kelompok 5 di paparkan obat nyamuk cair yang diuapkan dengan nebulizer setiap 2 menit sekali selama 20 hari (Kelompok 4 : 3 ml (mengandung transfultrin 0.486 mg dan propoxur 12.15 mg) , Kelompok 5 : 4 ml (mengandung transfluthrin 0.648 mg dan propoxur 16.20 mg)) dan kemudian dipelihara sampai usia 100 hari. Pada usia 100 hari semua tikus dianastesi dengan ether kemudian diterminasi dengan *cervical dislocation*. Testis tikus diambil dan dipotong kemudian di rendam dalam formalin 10%. Testis dikirim ke laboratorium Patologi Anatomi untuk dilakukan proses pembuatan blok parafin. Blok parafin dipotong dan dilakukan pengecatan menggunakan Hematoksilin dan Eosin (HE).

Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop *Olympus CX21* dengan perbesaran 100X dan 400X. Sel germinal yang mengarah keganasan yaitu sel germinal neoplastik yang

memiliki sitoplasma jernih, nukleus yang atipikal dengan kromatin kasar, dan nukleoli yang prominen dan ireguler.⁸ Sel ini diamati pada 5 lapangan pandang dengan menggunakan perbesaran 100X. Di mana per tiap lapangan pandang dicari 5 tubulus seminiferus yang bulat dan hampir sama ukurannya. Dengan menggunakan perbesaran 400X, 1 tubulus seminiferus akan dihitung jumlah sel germinal yang mengarah keganasan.

Uji statistik yang digunakan uji *Kruskal-Wallis* dan dilanjutkan uji *Mann-Whitney* untuk melihat perbedaan antar kelompok perlakuan

HASIL

Tabel 1. Uji nonparametrik *Kruskal-Wallis*

Kelompok Perlakuan	Rerata \pm SB (Min-Maks)	p
K (Kontrol)	1,60 \pm 0,894 (1-3)	0,024*
P1 (Injeksi estradiol)	23,00 \pm 26,944 (4-68)	
P2 (Obat nyamuk bakar)	5,60 \pm 2,510 (2-8)	
P3 (Obat nyamuk cair 3ml)	4,40 \pm 6,107 (0-15)	
P4 (Obat nyamuk cair 4ml)	5,00 \pm 2,739 (2-9)	

P : nilai kebermaknaan; * : uji nonparametrik *Kruskal-Wallis*

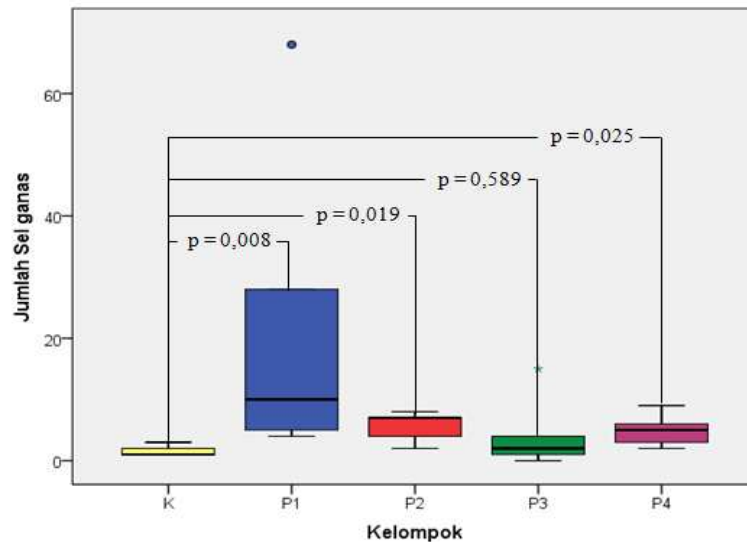
Berdasarkan uji nonparametrik *Kruskal-Wallis*, didapatkan nilai $p = 0,024$ maka dapat disimpulkan terdapat perbedaan bermakna pada jumlah sel antara semua kelompok perlakuan. Untuk melihat perbedaan pada tiap kelompok perlakuan maka dilakukan uji lanjutan yaitu uji *Mann-Whitney* yang ditampilkan dalam tabel berikut :

Tabel 2. Perbedaan jumlah sel germinal yang mengarah keganasan antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan

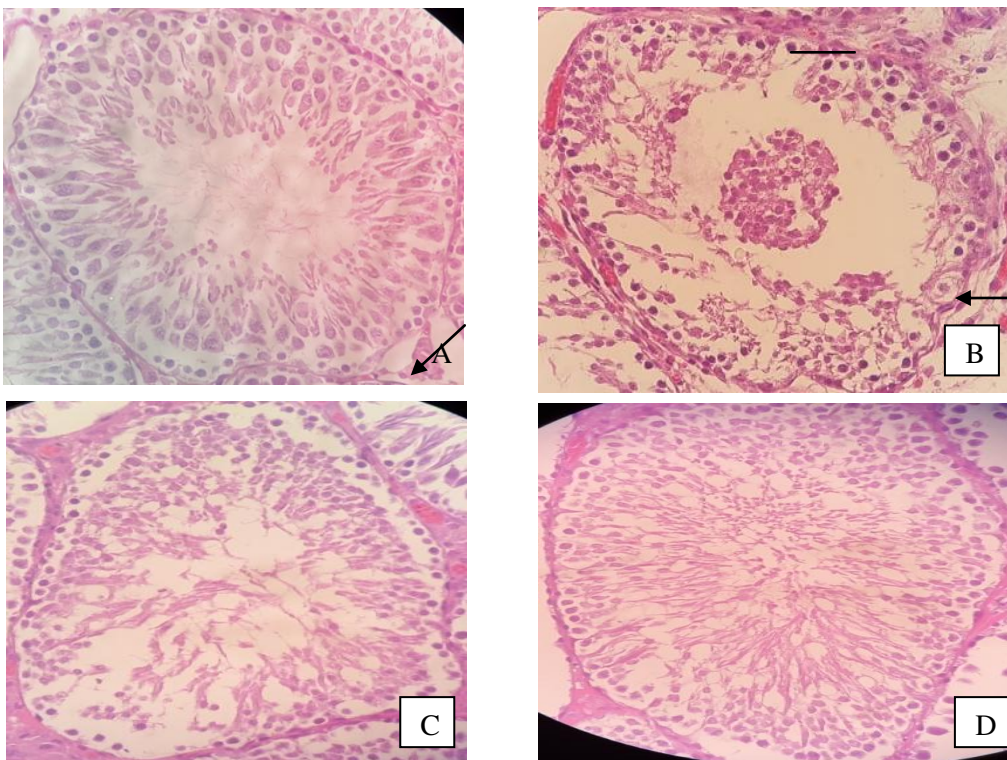
Kelompok	P1	P2	P3	P4
K	$p = 0,008^*$	$p = 0,019^*$	$p = 0,589$	$p = 0,025^*$
P1	-	$p = 0,207$	$p = 0,059$	$p = 0,142$
P2	-	-	$p = 0,246$	$p = 0,674$
P3	-	-	-	$p = 0,295$

p = nilai kebermaknaan

Tabel 2 menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna antara kelompok kontrol dengan kelompok P1 ($p=0,008$), P2 ($p=0,019$), dan P4 ($p=0,025$). Sedangkan terdapat perbedaan yang tidak bermakna antara kelompok kontrol dengan kelompok P3 ($p=0,589$). Perbedaan jumlah sel germinal yang mengarah keganasan antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan dapat dilihat pada gambar di bawah ini.



Gambar 1. Diagram boxplot perbedaan jumlah sel germinal yang mengarah keganasan antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan.





Gambar 2. Gambar histopatologi testis perbesaran 400X

Kelompok : A (Kontrol); B (Kelompok P1); C (Kelompok P2);

D (Kelompok P3); E (Kelompok P4)

Tanda panah (←→) pada gambar B menunjukkan perubahan sel germinal menuju kearah keganasan

PEMBAHASAN

Hasil penelitian ini menunjukkan terdapat perbedaan yang bermakna antara jumlah sel germinal yang mengarah keganasan pada kelompok perlakuan yang dipapar 25 μg β estradiol, obat nyamuk bakar, dan 4 ml obat nyamuk cair pada tikus *Sprague Dawley* selama 20 hari sejak usia 3 hari postnatal dibandingkan dengan kelompok kontrol. Tidak didapatkan peningkatan jumlah sel germinal yang mengarah keganasan yang bermakna secara statistik dibandingkan dengan kelompok kontrol pada kelompok perlakuan 3 yang dipapar dengan 3 ml obat nyamuk cair, hal ini dapat disebabkan karena dosis yang rendah, sehingga belum dapat merubah gambaran histopatologi sel germinal menuju ke arah keganasan. Perubahan sel germinal menuju kearah keganasan dikarenakan tikus strain *Sprague Dawley* neonatus terkena paparan obat nyamuk yang bekerja sebagai EDCs, di mana EDCs akan berikatan dengan ER- β pada sel spermatogonia yang berperan sebagai sel germinal. Ikatan ini dapat menyebabkan terjadinya kerusakan oksidatif DNA, sehingga dapat merubah sel germinal ini menuju kearah keganasan, kesimpulan ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan Anja Wellejus dkk (2002) dan Vernon Pais dkk (2003).^{5,6}

Transflutrin dan propoxur merupakan senyawa kimia yang terdapat pada insektisida seperti obat nyamuk bakar ataupun obat nyamuk cair. Kedua senyawa ini sering kali ditemukan pada produk obat nyamuk yang diproduksi oleh Baygon[®] dan Raid[®].⁹⁻¹¹

Transflutrin dan propoxur merupakan senyawa kimia yang memiliki efek estrogenik pada tubuh manusia. Penelitian ini juga menunjukkan bahwa paparan transflutrin dan propoxur pada testis tikus Sprague Dawley neonatus sampai dewasa muda meningkatkan perubahan sel germinal menuju kearah keganasan, hal ini juga membuktikan bahwa paparan insektisida pada waktu janin atau neonatus akan memberikan efek yang lebih buruk yaitu menuju kearah keganasan.^{3,4,12}

Jumlah sel germinal yang mengarah keganasan lebih banyak pada kelompok yang diberi paparan obat nyamuk bakar yang mengandung transflutrin 0,03% dibanding dengan kelompok yang diberi paparan obat nyamuk cair 3 ml dan 4 ml. Asap transflutrin dari obat nyamuk bakar akan meningkatkan kadar radikal bebas, hal ini dapat membuat kerusakan pada membran lipid sel dan integritas dari inti sel. Kerusakan ini dapat membuat sel germinal lebih mudah terpapar oleh senyawa kimia sistemik, dan melalui proses inilah memungkinkan paparan obat nyamuk bakar yang mengandung transflutrin 0,03% menyebabkan perubahan sel germinal menuju kearah keganasan.¹³

Keterbatasan penelitian ini adalah pada ditemukan banyak tubulus yang rusak dan tidak berbentuk bulat. Peneliti juga kesulitan untuk mengidentifikasi perubahan morfologi dari sel germinal yang mengarah keganasan karena keterbatasan lensa objektif mikroskop yang hanya 100X dan 400X. Penelitian ini juga memiliki keterbatasan, di mana perubahan sel germinal testis menuju keganasan belum merata pada tiap tubulus seminiferus, hal ini mungkin saja dikarenakan paparan insektisida terjadi pada masa neonatus. Peneliti menyarankan untuk diadakan penelitian eksperimental pada tikus hamil untuk melihat pengaruh paparan insektisida secara *in utero* terhadap keganasan sel germinal testis pada keturunan tikus tersebut. Penelitian ini juga tidak menunjukkan perubahan sel germinal yang mengarah keganasan melalui paparan insektisida pada reseptor estrogen, maka peneliti mengharapkan ada penelitian selanjutnya yang dapat mengamati perubahan yang terjadi pada sel germinal dengan menggunakan pengecatan imunohistokimia, sehingga dapat melihat lebih jelas sel germinal yang sudah mengarah keganasan akibat paparan insektisida pada reseptor estrogen.

KESIMPULAN

Terdapat hubungan yang bermakna antara paparan insektisida terhadap perubahan gambaran histologi sel germinal testis menuju kearah keganasan.

SARAN

Peneliti mengharapkan adanya penelitian lebih lanjut dalam hal pengecatan preparat dengan pengecatan imunohistokimia dan usia paparan insektisida.

DAFTAR PUSTAKA

1. Mcglynn KA, Cook MB. The Epidemiology of Testicular Cancer. In: Foulkes WD, Cooney KA, eds. *Male Reproductive Cancers: Epidemiology, Pathology, and Genetics*. New York, NY: Springer New York; 2010:51-83. doi:10.1007/978-1-4419-0449-2.
2. Albers P, Albrecht W, Algaba F, Bokemeyer C, Fizazi K, Horwich A, et al. Guidelines on Testicular Cancer. *Eur Assoc Urol*. 2012.
3. Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon J-P, Giudice LC, Hauser R, Prins GS, Soto AM, et al. Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocr Rev*. 2009;30(4):293-342. doi:10.1210/er.2009-0002.
4. Schug TT, Janesick a, Blumberg B, Heindel JJ. Endocrine disrupting chemicals and disease susceptibility . *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2011;127(3-5):204-215. doi:10.1016/j.jsbmb.2011.08.007.
5. Wellejus A, Loft S. Receptor-mediated ethinylestradiol-induced oxidative DNA damage in rat testicular cells. *FASEB J*. 2002;16:195-201.
6. Pais V, Leav I, Lau K. Estrogen Receptor- β Expression in Human Testicular Germ Cell Tumors. *Clin Cancer Res*. 2003:4475-4482.
7. Winarni TI. Alteration of Rat Reproductive Organ in Adulthood Caused By The Exposure of Foreign Estrogenic Compounds (Mosquito Insecticides) During Early Life. 2004.
8. Tannenbaum M, Madden JF. *Diagnostic Atlas of Genitourinary Pathology*. 1st ed. Churchill Livingstone; 2006.
9. Vesin A, Glorennec P, Le Bot B, Wortham H, Bonvallot N, Quivet E. Transfluthrin indoor air concentration and inhalation exposure during application of electric vaporizers. *Environ Int*. 2013;60:1-6. doi:10.1016/j.envint.2013.07.011.

10. Joharina AS, Alfiah S. Analisis Deskriptif Insektisida Rumah Tangga yang Beredar di Masyarakat. *J Vektora*. IV(1):23-32.
11. Sanil D, Shetty NJ. Genetic Study of Propoxur Resistance-A Carbamate Insecticide in the Malaria Mosquito, *Anopheles stephensi* Liston. *Malar Res Treat*. 2010;2010(3):502824. doi:10.4061/2010/502824.
12. Almstrup K, Mlynarska O, Meyts ER-D. Germ Cell Cancer, Testicular Dysgenesis Syndrome and Epigenetics. In: Rousseaux S, Khochbin S, eds. *Epigenetics and Human Reproduction*. Springer; 2011:372. doi:10.1007/978-3-642-14773-9.
13. Madhubabu G, Yenugu S. Effect of continuous inhalation of allethrin-based mosquito coil smoke in the male reproductive tract of rats. *Inhal Toxicol*. 2012;24(3):143-152. doi:10.3109/08958378.2011.649189.