

POTENSI TEPUNG KEDELAI YANG DIPAPARKAN SECARA BERULANG TERHADAP HISTOLOGI TESTIS MENCIT (*Mus musculus*)

Cicilia Novi Primiani¹, Aida Fitria²

^{1,2} Pendidikan Biologi FP MIPA IKIP PGRI MADIUN, Jl. Setiabudi 85 Madiun

Email: primianibiomipa@yahoo.co.id

ABSTRAK

Isoflavon merupakan senyawa aktif biji kedelai dengan struktur kimia menyerupai 17β -estradiol dan mampu berikatan dengan reseptor estrogen pada sel Leydig dalam tubulus seminiferus testis. Berdasarkan struktur kimia isoflavon mirip dengan hormon estrogen, maka aktivitas kerjanya menyerupai hormon estrogen, sehingga memberikan aktivitas fisiologis sebagai hormon estrogen. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perubahan jaringan tubulus seminiferus testis mencit setelah paparan tepung kedelai secara berulang. Penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap yang terdiri dari satu faktor yaitu dosis tepung kedelai 0,369 g/kg; 0,74 g/kg dan 1,47 g/kg. Parameter yang diamati adalah perubahan jaringan tubulus seminiferus testis setelah paparan berulang tepung kedelai selama 36 hari. Analisis data perubahan jaringan tubulus seminiferus testis dianalisis secara diskriptif. Hasil penelitian menunjukkan bahwa spermatogenesis tidak dapat berkembang, fase proliferasi sel-sel germinal sampai stadium spermatosit primer.

Kata kunci: kedelai, isoflavon, tubulus seminiferus testis

PENDAHULUAN

Kedelai (*Glycine max Merr.*) merupakan salah satu tanaman *Leguminoceae*, yang sudah dikenal dan sering dikonsumsi manusia. Masyarakat memanfaatkan kedelai sebagai makanan sehari-hari baik kedelai yang sudah diolah menjadi berbagai produk makanan maupun berupa tepung dan larutan kedelai. Beberapa waktu terakhir ini banyak dilakukan penelitian keistimewaan tanaman *Leguminoceae*. Biji, daun, dan bunganya sering dimanfaatkan manusia, bahkan penelitian berkembang sangat luas karena tanaman tersebut mempunyai sejumlah senyawa yang telah berhasil diisolasi dan mempunyai banyak peran penting dalam kehidupan manusia. Bidang farmakologi dan kedokteran banyak dimanfaatkan sebagai tanaman dalam pencegahan dan terapi penyakit.

Hasil-hasil penelitian manfaat kedelai sebagai makanan kesehatan telah banyak dilakukan, tetapi masih sangat sedikit informasi terkait manfaat kedelai sebagai salah satu bahan alam yang dapat memengaruhi sistem reproduksi jantan. Pernyataan tersebut dibuktikan dengan beberapa hasil penelitian yang sudah dilakukan, menyatakan bahwa biji kedelai mengandung senyawa isoflavon (Pelissero *et al.*, 2000; Delmonte dan Rader, 2006). Isoflavon berasal dari produk kedelai mempunyai berbagai aktivitas di dalam tubuh. Berdasarkan struktur kimianya menyerupai 17β -estradiol (Gruber *et al.*, 2002; Delmonte & Rader, 2006; Barlow *et al.*, 2007) menyebabkan kemampuannya berikatan dengan reseptor estrogen. *Daily intake* kedelai dalam tubuh menyebabkan akumulasi dan mempengaruhi berbagai proses biologi dalam tubuh khususnya pada sistem reproduksi.

Isoflavon sebagai kandungan senyawa aktif kedelai merupakan salah satu senyawa metabolit sekunder yang disintesis oleh tanaman. Isoflavon termasuk kelompok flavonoid yang mempunyai aktivitas estrogenik potensial. Aktivitas biologi senyawa tersebut tergantung pada struktur kimianya. Jika diperhatikan strukturnya ada kemiripan dengan hormon estrogen. Kandungan senyawa isoflavon pada biji kedelai adalah 9,4 mg/g diduga memiliki kemampuan antifertilitas (Barlow *et al.*, 2007).

Sejumlah penelitian mengenai potensi senyawa isoflavon yang telah dilakukan oleh Setchell *et al.*, (1998) menyatakan bahwa isoflavon menginduksi abnormalitas sistem reproduksi jantan. Chevarro *et al.*, (2008) dalam hasil penelitiannya menyatakan bahwa isoflavon yang diberikan secara per oral pada manusia dapat menurunkan konsentrasi sperma. Hasil penelitian yang dilakukan oleh Cardoso *et al.*, (2007) menyatakan bahwa isoflavon yang diberikan dengan dosis 2,5 mg/kg dan 10 mg/kg dapat menurunkan volume semen pada kelinci. Penelitian yang telah dilakukan oleh Kuntana (2009) menyatakan bahwa pemberian ekstrak kedelai dapat menurunkan kualitas sperma pada kelinci (*Oryctolagus cuniculus*). Pemberian tepung kedelai berpengaruh terhadap berat testis, motilitas, viabilitas sperma, kadar testosteron dan abnormalitas morfologi sperma yang meliputi kaput, dan ekor sperma (Adeeyo, *et al.*, 2011). Kurzer *et al.*, (1997) menyatakan bahwa pemberian fitoestrogen pada pria dalam waktu lama dapat menurunkan jumlah reseptor estrogen

Struktur kimia senyawa isoflavon yang mirip dengan hormon estrogen maka hasil penelitian Handelsman *et al.*, (2000) menjelaskan bahwa keberadaan estradiol dapat meningkatkan hambatan pada



proses spermatogenesis. Aktivitas genistein yang menyerupai hormon estrogen mampu menurunkan sekresi *Luteinizing Hormone* (LH) dan *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) sehingga dapat menghambat spermatogenesis. Hal tersebut juga akan mempengaruhi proses maturasi spermatozoa dalam epididimis, sehingga dapat menurunkan motilitas dan viabilitas spermatozoa.

Berdasarkan kenyataan bahwa kedelai mempengaruhi sistem reproduksi jantan maka dipandang perlu untuk menguji potensi kedelai terhadap jaringan testis pada hewan coba mencit (*Mus musculus*). Hasil penelitian dapat dimanfaatkan sebagai referensi salah satu pengembangan sarana antifertilitas dengan memanfaatkan bahan alam.

METODE PENELITIAN

Rancangan Penelitian

Penelitian dilakukan menggunakan pendekatan eksperimen dengan rancangan penelitian Rancangan Acak Lengkap (RAL), perlakuan pemberian tepung kedelai dosis 0 mg/g; 0,369 g/kg; 0,74 g/kg dan 1,47 g/kg. Pengamatan terhadap perubahan struktur jaringan tubulus seminiferus testis.

Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan: alat sonde (*gavage tube*); kandang mencit terbuat dari plastik ukuran 50 x 30 x 20 cm; botol minum untuk mencit; timbangan digital merek HM-200; alat suntik/*syringe* 1 ml dengan *disposable needle* ukuran 3 ml (G23) buatan Terumo Europe; inkubator; mikroskop cahaya (Olympus CH21) Japan; kamera optilab mikroskop digital produksi Miconos Transdata Nusantara; timbangan *triple beam balance ohaus 700 series* buatan Florham Perk USA, neraca analitik tipe HM-200 Japan dengan kapasitas 210 gram tingkat ketelitian 0,1 mg; mikrotom PR-50 buatan Yamamoto Kohki Japan; peralatan bedah; papan bedah; kaca benda dan kaca penutup, *beaker glas*, lampu spiritus, kubus dari kertas kalender, pipet tetes, dan *couple*.

Bahan yang digunakan: biji kedelai varietas lokon diperoleh dari Karangjati Kabupaten Ngawi, jaringan testis, pakan mencit jenis *pelled* susu A produksi PT. Charoen Pokphand Indonesia Tbk, sekam, kapas, kertas tissue, aquadestilata, air PDAM; parafin, NaCl fisiologis 0,9%, larutan fiksatif Bouin, alkohol 50%, 70%, 90% dan alkohol absolut; xylol murni; campuran xylol-alkohol dengan perbandingan xylol:alkohol masing-masing 1:3, 2:2, dan 3:1, larutan Li_2CO_3 , HCl 1%; formalin 3% dan perekat *haupt*.

Hewan percobaan

Hewan coba yang digunakan adalah mencit (*Mus musculus*) galur Balb/c jantan, dalam kondisi sehat, berumur 9 minggu, berjumlah 24 ekor. Semua mencit mempunyai bobot badan awal perlakuan berkisar 20-25 gram, dipelihara dalam kandang mencit di Program Studi Pendidikan Biologi IKIP PGRI Madiun.

Pemeliharaan mencit dan pembuatan bahan uji

Mencit ditempatkan dalam kandang mencit, diberi makan dan minum secara *ad libitum* dan diaklimatisasi selama 14 hari sebelum perlakuan induksi. Mencit dipelihara pada suhu ruang ($\pm 27^\circ \text{C}$), kelembaban relatif antara 50-60% dan siklus pencahayaan 12 jam. Setiap hari mencit ditimbang, sebagai dasar untuk menentukan pemberian tepung kedelai. Hasil penelitian Purnamasari (2009) pemberian tepung kedelai pada kelinci dengan dosis 246 mg/kg dan 490 mg/kg dikonversikan berdasarkan angka konversi dosis menurut Harminta (2005) untuk mencit, diperoleh dosis tepung kedelai yang diberikan pada mencit 0,369 g/kg; 0,74 g/kg dan 1,47 g/kg.

Pemberian tepung kedelai, pembuatan preparat histologi testis

Pemberian tepung kedelai dilakukan dengan cara induksi langsung ke dalam lambung dengan menggunakan alat sonde (*gavage tube*) sebanyak satu kali dalam sehari selama 36 hari. Mencit didislokasi pada hari ke-37, kemudian dibedah dan dilakukan pengambilan organ testis. Pembuatan preparat histologi testis dengan metode parafin untuk menentukan perubahan struktur jaringan testis.

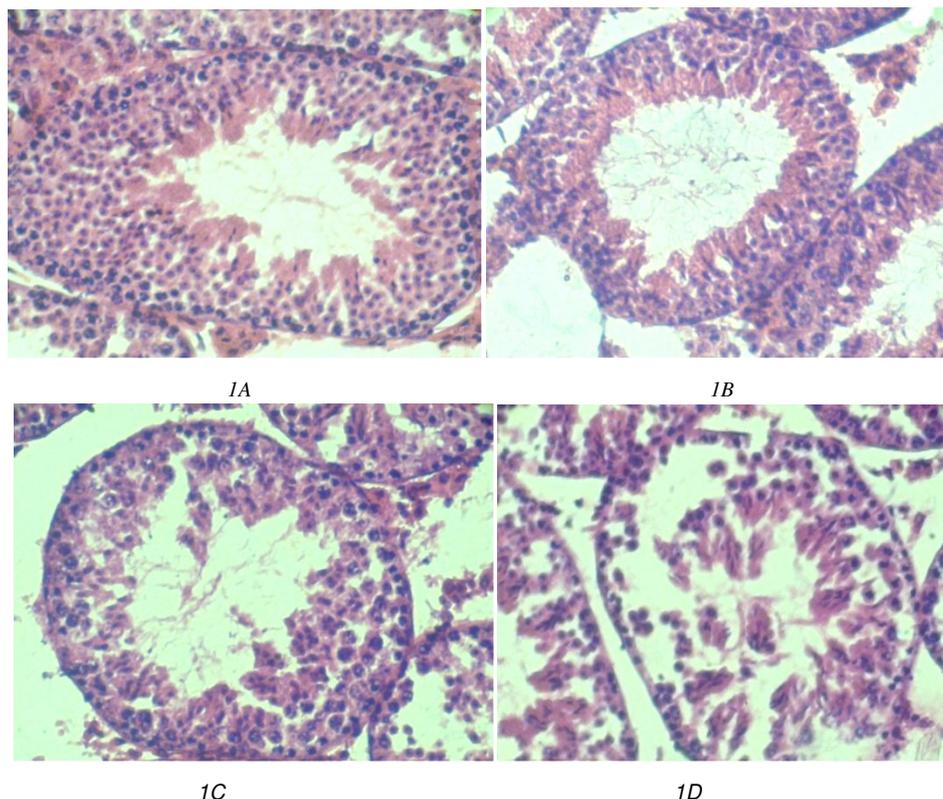
Analisis Data

Data perubahan struktur histologi testis dianalisis secara diskriptif berdasarkan perubahan yang terjadi pada sel-sel germinal, meliputi spermatogonia, spermatosit primer, spermatosit sekunder, spermatid, dan spermatozoa.



HASIL DAN PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil pengamatan terhadap histologi tubulus seminiferus testis, maka diperoleh hasil adanya perubahan spermatogenesis terhadap sel-sel germinal dalam tubulus seminiferus testis, stratum basale, stratum miodeum, dan stratum fibrosum (Gambar 1).



Gambar 1. Tubulus Seminiferus Testis Mencit (*Mus musculus*) dengan Pewarnaan HE, Perbesaran 400X (Sumber : Primiani, 2012)
Keterangan: 1) Kontrol (P1); 2) Dosis 0,369 g/kg (P2); 3) Dosis 0,74 g/kg; (P3); 4) Dosis 1,47 g/kg (P4).

1A. Tubulus seminiferus testis tidak mengalami perubahan, sel-sel germinal (spermatogonia, spermatosit primer, spermatosit sekunder, spermatid dan spermatozoa) tampak jelas. Lumen tubulus penuh karena terisi spermatozoa.

1B. Tubulus seminiferus testis mengalami perubahan, spermatogonia dengan kromatinum bergumpal jelas, spermatosit primer dan spermatosit sekunder tampak jelas, tetapi lumen tubulus melebar.

1C. Spermatogonia dapat ditemukan secara jelas, terdapat beberapa spermatosit primer dan spermatosit sekunder. Lumen tubulus semakin melebar.

1D. Formasi sel-sel germinal tidak teratur, beberapa spermatogonia dan spermatosit primer.

Penampang melintang tubulus seminiferus testis dengan pewarnaan Hematoksin-Eosin (HE) menunjukkan tubulus seminiferus dikelilingi oleh jaringan ikat kolagen yang terdapat pada permukaan posterior testis yaitu tunika albuginea. Tubulus seminiferus dikelilingi oleh membran basale merupakan lapisan terdalam berupa jaringan ikat. Stratum miodeum berupa sel-sel kontraktif yang saling berhubungan, dan stratum fibrosum merupakan lapisan terluar.

Hasil pengamatan terhadap histologi tubulus seminiferus testis perlakuan kontrol (P1) ketiga stratum tidak mengalami perubahan, jajaran sel germinal berkembang penuh, tampak jelas adanya spermatogonia, spermatosit primer, spermatosit sekunder, spermatid dan spermatozoa. Lumen tubulus sempit, karena terisi spermatozoa, spermatogenesis dapat berkembang secara normal. Spermatogonium dengan kromatinum bergumpal jelas, spermatosit primer aktif dalam pembelahan mitosis, spermatosit sekunder berada ke arah lumen, spermatid memanjang dengan inti ovoid, spermatozoa mengisi lumen tubulus (Gambar 1A).

Pemaparan tepung kedelai dosis 0,369 g/kg (P2) spermatogenesis tidak sempurna ditandai dengan perkembangan spermatogonia, spermatosit primer, spermatosit sekunder, tetapi spermatid dan spermatozoa tidak ditemukan, sehingga lumen tubulus melebar (Gambar 1B). Stratum basale, stratum miodeum dan stratum fibrosum tidak terlihat jelas.

Gambar 1C menunjukkan bahwa pemaparan tepung kedelai dosis 0,74 g/kg terjadi proliferasi spermatogonia. Fase maturasi spermatosit primer menjadi spermatosit sekunder tidak terjadi. Demikian juga



fase transformasi spermatosit sekunder menjadi spermatid serta perubahan morfogenesis spermatozoa tidak terjadi, sehingga menyebabkan lumen tubulus seminiferus semakin luas.

Proliferasi spermatogonia terdapat pada lamina basale, meskipun tidak rata dan tidak teratur. Perkembangan sel-sel germinal sampai pada stadium spermatosit primer, spermatosit sekunder, spermatid dan spermatozoa tidak ditemukan. Stratum basale, stratum miodeum, dan stratum fibrosum tidak terlihat jelas (Gambar 1D).

Kemampuan estrogenik isoflavon menunjukkan adanya kemampuannya berikatan dengan reseptor estrogen pada sel Leydig (Kuiper *et al.*, 1998). Hasil penelitian Sharpe *et al.*, (1998) menyatakan bahwa pemberian estrogen fase dewasa kelamin tikus jantan dapat menyebabkan kerusakan permanen pada perkembangan sel-sel germinal dalam testis. Tsutsumi *et al.*, (1987) menyatakan bahwa estrogen dapat menyebabkan defisiensi enzim aromatase sebagai enzim yang melakukan konversi perubahan testosteron menjadi estradiol. Akibat defisiensi aromatase ini maka terjadi kerusakan pada spermatid dan menurunkan maturasi spermatid.

Senyawa isoflavon pada umumnya berupa senyawa kompleks atau konjugasi dengan senyawa gula melalui ikatan glukosida. Selama proses pengolahan baik melalui proses fermentasi maupun bukan fermentasi, senyawa isoflavon dapat mengalami transformasi terutama melalui proses hidrolisa sehingga dapat diperoleh senyawa isoflavon bebas disebut aglikon yang lebih tinggi aktifitasnya (Delmonte & Rader 2006).

Reseptor hormon yang telah berikatan dengan suatu hormon akan mengekspresikan beberapa pengaturan fisiologis jantan seperti diferensiasi dan maturasi seks, perkembangan testis, spermatogenesis, produksi testosteron, dan fertilisasi (Hadelsman, 2008). Berdasarkan hasil penelitian yang telah banyak dipublikasikan menyatakan bahwa interaksi reseptor estrogen yang terdapat pada organ reproduksi jantan dapat menimbulkan kerusakan pada sistem reproduksi itu sendiri.

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan menyatakan bahwa reseptor hormon estrogen terdapat pada berbagai organ reproduksi jantan berkembang sejak fetus hingga dewasa. Menurut Donnell *et al.* (2001) beberapa lokasi reseptor estrogen yang pernah diteliti adalah reseptor estrogen pada manusia, primata, dan mencit. Menurut Shibayama *et al.* (2001) reseptor estrogen α (ER α) terdapat dalam nukleus sel Leydig, reseptor estrogen β (ER β) dapat ditemukan dalam nukleus sel Sertoli, sedangkan reseptor androgen (AR) pada fase dewasa terdapat di dalam nukleus sel Sertoli, pada fase pubertas AR dapat ditemukan dalam sel Leydig dan *myeloid peritubular*.

Selanjutnya dijelaskan, bahwa ER α dan AR merupakan faktor penting dalam peristiwa spermatogenesis dan perkembangan fungsi normal organ reproduksi. Jumlah estrogen yang terlalu tinggi dapat menyebabkan terganggunya proses-proses fisiologis yang terjadi pada sistem reproduksi jantan (Donnell *et al.* 2001). Penelitian tentang perubahan yang terjadi pada sistem reproduksi jantan akibat pemaparan biji kedelai telah banyak dilakukan pada hewan percobaan. Kerusakan pada sistem reproduksi jantan akibat pemaparan biji kedelai terjadi lebih dahulu pada tingkat molekuler, kemudian seluler, jaringan, dan organ.

Hasil penelitian yang telah dipublikasikan oleh Kuntana (2009) dampak pemberian fitoestrogen selama periode yang panjang telah mempengaruhi sistem reproduksi jantan pada kelinci yang menyebabkan terjadinya abnormalitas spermatozoa dan perubahan spermatogenesis. Menurut Daika (1998) secara *in vitro*, isoflavon dapat menyebabkan terjadinya penghambatan pada proses proliferasi dan apoptosis pada *cell lines*.

KESIMPULAN DAN SARAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemaparan tepung kedelai selama periode spermatogenesis dapat mempengaruhi sel-sel germinal dan stratum dalam tubulus seminiferus testis. Spermatogenesis tidak terjadi, fase proliferasi sampai pada spermatogonia. Menindaklanjuti kebutuhan tersebut, maka perlu pengkajian tingkat molekuler pada sel-sel germinal dalam tubulus seminiferus testis. Diperlukan adanya uji fertilisasi baik secara *in vitro* dan *in vivo* mulai dari hewan coba sampai dengan manusia sehingga konsumsi kedelai dapat dipertanggungjawabkan keefektifitasannya, sehingga dapat direkomendasikan sebagai senyawa antifertilitas.



DAFTAR PUSTAKA

- Adeeyo, O.A., Salawu, E.O., Ola, I.J., Saka, W.A., Adeleke, G.E., Adeniyi, O.S. (2011). Effects of Soya Beans Supplements on Fertility in Male Wistar Rats. *Macedonian Journal of Medical Sciences*. 4(1): 54-59.
- Barlow, J., Johnson, J.A., Scofield, L. (2007). *Fact Sheet on The Phytoestrogen Genistein*. NIEHS/NCI Environment Research Centers, (Online), <http://cerhr.niehs.nih.gov/chemicals/genistein>, 8/08/2010.
- Cardoso, J.R., Mondadori, R.G., Bianchini, E., Nair, S. (2007). Effect of Chronic Treatment with Soy Derived Isoflavones on Reproductive Health of Male Rabbits. *Journal Biology Science*, 23(1): 75-82.
- Chevarro, J.E., Toth, T.L., Sado, S.M., Hauser, R. (2008). Soy Food and Isoflavone Intake in Relation to Semen Quality Parameters Among Men from an Infertility Clinic. *Human Reproduction*, 23(1): 2584-259.
- Daika, J.K., Rodriguez, R., Goudaze, G. (1998). Influence of Genistein (4',5,7-trihydroxyisoflavone) on The Growth and Proliferation of Testicular Cell Lines. *Journal Biology of the Cell*, 90(3): 349-354.
- Delmonte, P., & Rader, J. (2006). Analysis of Isoflavones in Foods and Dietary Supplements. *Journal of AOAC International*, 89(4): 1138-1146.
- Donnell, L., Robertson, M.K., Jones, M.E., Simpson, E.R. (2001). Endocrine Reviews: Estrogen and Spermatogenesis. *J. Endocrinol*, 22(3): 289-318.
- Gruber, C.J., Tschugguel, W., Schneeberger, C., Huber, J.C. (2002). Production and Actions of Estrogens. *The New England Journal of Medicine*, 346(5): 340-352.
- Handelsman, D., Wishart, S., Conway, A.J., (2000). Oestradiol Enhances Testosterone-Induced Suppression of Human Spermatogenesis. *Human Reproduction*, 15(3): 672-679.
- Harminta, Radji, M. (2005). *Analisis Hayati*. Jakarta: Departemen Farmasi FMIPA Universitas Indonesia.
- Kuiper, G.G.J.M., Lemmen, G.J., Carlsson, B., Corton, C.J., Safe, S.H., Saag, P.T., Burg, B., Gustafsson, J.A. 1998. Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor β . *Endocrinology*, 139:4252-4263.
- Kuntana, Y.P. (2009). Pengaruh Pemberian Phytoestrogen Terhadap Kualitas Spermatozoa, Spermatogenesis dan Luas Jaringan Interstitial pada Kelinci (*Oryctolagus cuniculus*). *Jurnal Bionatura*, 11(1): 47-58.
- Kurzer, M.S., Xu, X. (1997). Dietary Phytoestrogens. *Annu. Rev.Nutr.*, Palo Alto, 17(2): 353-381.
- Pelissero, C.B., Latonnelle, K., Sequeira, A., Lamothe, V. (2000). Phytoestrogens, Endocrine Disrupters from Food. *Analisis*. 28:763-776.
- Purnamasari, Y. (2009). Pengaruh Pemberian Phytoestrogen Terhadap Kualitas Spermatozoa, Spermatogenesis dan Luas Jaringan Interstitial pada Kelinci (*Oryctolagus cuniculus*). *Jurnal Bionatura*. 11(1):47-58.
- Sharpe, R.M., Attanasova, N., McKinnell, C., Parte, P., Turner, K.J., Fisher, J.S., Kerr, J.B., Groome, N.P., Macpherson, S., Millar, M.R., Saunders, P.T.K. (1998). Abnormalities in Functional Development of the Sertoli Cells in Rats Treated Neonatally with Diethylstilbestrol: A Possible Role for Estrogens in Sertoli Cell Development, *J. Biol Repro*, 59(5):1084-1094.
- Setchell, K., Nechemias, L.Z., Cai, J., Heubi, J. (1998). Isoflavone Content of Instant Formulas and the Metabolic Fate of These Phytoestrogens in Early Life. *American Journal Society for Clinical Nutrition*, 68:1453-1461.
- Tsutsumi, I., Toppari, J., Campeau, J.D., Zerega, G.S. (1987). Reduction of Fertility in Male Rat by Systemic Treatment with Follicle Regulatory Protein. *J. Fertil Steril*, 47(7):689-695.

DISKUSI

Penanya 1 (Novi Febrianti – Prodi Biologi FKIP Universitas Ahmad Dahlan)

1. Pemberian tepung kedelai secara berulang yang bagaimana?
2. Bagaimanakah kalkulasi pemberian tepung kedelai secara berulang pada manusia? Amankah bila itu dilakukan pada manusia?

Jawab:

1. Berulang yaitu dilakukan secara terus menerus dalam satu proses reproduksi. Pada mencit satu reproduksi yaitu 36 hari jadi pemberian tepung kedelai dilakukan berulang pada 36 hari tersebut.
2. Penelitian ini belum selesai, jadi masih dilanjutkan penelitian selanjutnya yang nantinya akan diteliti tentang perilaku kawinnya, dan lain-lain. Dan masih akan diteliti pada manusia. Apabila tepung kedelai dikonsumsi setiap hari itu aman. Jika tidak melebihi batas dan tidak selama satu proses reproduksi, yang mana pada laki-laki dewasa yaitu 72 hari.

Penanya 2 (Fitriyatno – Universitas Muhammadiyah Surakarta)

1. Apakah tepung kedelai mempengaruhi viabilitas spermatozoid?
2. Apakah hal itu juga mempengaruhi fisiologis jaringan?

Jawab:

1. Pada kedelai terdapat kandungan flavonoid yang akan mengganggu kerja hormon testosteron. Jadi, pembentukan spermatozoid di tubulus seminiferus tidak sempurna (banyak yang gagal) yang juga akan menurunkan libido.
2. Dalam hal ini juga mempengaruhi fisiologis jaringan.

