



**TOKSISITAS BIOFUNGISIDA YANG MENGANDUNG *Trichoderma sp.*
TERHADAP TESTIS DAN PROSES SPERMATOGENESIS MENCIT
(*Mus musculus*)**

Berliana Naomi Rumondang Sari Aritonang^{1*}

¹Akademi Kesehatan John Paul II Pekanbaru

*Email: berliana.aritonang@gmail.com

ABSTRAK

Penggunaan pestisida kimiawi dikalangan pertanian dapat menimbulkan berbagai macam masalah pada bidang kesehatan oleh karena itu para ahli telah menemukan bahan alternatif berupa pestisida alami yaitu biofungisida. Pengaruh kontaminasi penggunaan biofungisida yang mengandung spora *Trichoderma sp* terhadap bidang kesehatan belum diketahui. Biofungisida yang mengandung *Trichoderma sp* yang menghasilkan antibiotika berupa gliotoksin dan viridin dimana zat tersebut bersifat toksik dan dapat terakumulasi di dalam tubuh manusia maupun hewan. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui toksisitas biofungisida terhadap gambaran histopatologi testis. Penelitian ini menggunakan hewan uji mencit albino (*Mus musculus*) berumur 12 minggu, dan dibagi menjadi 5 kelompok, masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor mencit. Pemberian biofungisida dilakukan secara oral dengan dosis 0 cc/Kg BB, 16 cc/Kg BB, 24 cc/Kg BB, 36 cc/Kg BB, dan 54 cc/Kg BB setiap hari selama 14 hari. Data dianalisis dengan ANOVA dan dilanjutkan dengan uji lanjut Bonferroni dengan taraf signifikan $p < 0,05$. Hasil penelitian menunjukkan penurunan berat testis, diameter tubulus seminiferus, tebal epitel germinal tubulus seminiferus, diameter inti sel leydig, jumlah sel leydig dan jumlah sel sertoli terjadi perbedaan bermakna antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan. Untuk indeks spermatogenesis kelompok kontrol menunjukkan perbedaan yang bermakna dengan perlakuan penurunan terbesar pada dosis 54 cc/Kg BB sebesar 66,032%. Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa pemberian biofungisida mempengaruhi berat testis dan histopatologi testis, jadi biofungisida tersebut bersifat toksik terhadap organ reproduksi mencit jantan albino (*Mus musculus*).

Kata kunci : Biofungisida, Testis, *Trichoderma sp.*

ABSTRACT

*Due to the fact that the use of pesticides in agriculture has potential health effects, expert have invented a viable alternative like biofungicides. However, the potential risk of biofungicides contamination on human health is still unknown. Biofungicide containing *Trichoderma sp* spore produce antibiotic like gliotoxin and viridian which could be toxic, and they could accumulate over time in the bodies of human and animal. The purpose of this study was to measure the toxicity of biofungicide on histopathology of male reproductive system. The study was an experimental study which used twelve-week-old male albino laboratory mice (*Mus musculus*). Those mice were divided into five groups. Each group consisted of five mice. Biofungiced were orally administered in the dose of 0, 16, 24, 36, and 54 cc per kilogram body weight daily for 14 days. The data were analyzed using Analysis of Variance and Bonferoni test, difference was considered significant when P value was < 0.05 . The result showed a decrease in testis weight, diameter of seminiferus tubules, nuclear diameter of leydig cell, the number of leydig cell, and the number of certoly cell. There were significant differences between control groups and treatment groups. The comparison of average spermatogenic index showed significant difference between control group and treatment groups; the greatest decrease (66,032%) was found in the dose 54 cc per kilogram body weight. In conclusion, biofungicide affects the testis weight and histopathology of testes. Consequently, it is toxic to the male reproductive system of albino laboratory mice (*Mus musculus*).*

*Keywords : Biofungicide, Testes, *Trichoderma sp.**

PENDAHULUAN

Selama ini penggunaan pestisida kimiawi di kalangan pertanian dapat menimbulkan berbagai macam masalah pada bidang kesehatan oleh karena itu para ahli telah menemukan bahan alternatif berupa pestisida alami yaitu biofungisida. Biofungisida dengan bahan aktif cendawan *Trichoderma* sp. memiliki banyak manfaat untuk membunuh berbagai macam patogen penyakit tanaman seperti jamur akar putih (JAP) pada tanaman advokad juga pada sayuran seperti pada tanaman selada, jagung, kedelai, cabai keriting (Suwahyono *et al.*, 2001). Layu fusarium pada semangka, melon, tomat, kentang, antraknose, busuk buah dan akar pada cabe, busuk pangkal umbi dan lodoh daun pada bawang merah. Spesies *Trichoderma* sp dapat menghasilkan racun berupa Gliotoxin dan Viridin sebagai zat antibiotika dimana zat tersebut mampu membunuh cendawan patogen yang menyebabkan penyakit (Suryono, 2006).

Spermatogenesis adalah suatu proses differensiasi sel yang bersifat kompleks dimana terjadi perubahan sel-sel spermatogonium menjadi sperma yang prosesnya dipengaruhi oleh regulasi hormonal (hormonal dependent) (Arsyad, 1980). Apabila terjadi gangguan pada proses spermatogenesis akan terjadi

infertilitas pada individu jantan. Gangguan spermatogenesis disebabkan oleh banyak faktor, salah satunya adalah toksikan (Lu, 1995).

Leilani *et al.* (2006) melaporkan bahwa biofungisida yang diberikan secara oral pada mencit mengakibatkan hepatotoksik pada dosis 21 cc/kg BB, 32 cc/kg BB, 48 cc/kg BB dan 72 cc/kg BB. Bramono (2005) melaporkan bahwa ditemukannya *Candida* dari kelompok *Deuteromycetes* pada kultur semen mempunyai korelasi bermakna dengan azoospermia pada laki-laki. Selain itu satu laporan kasus menunjukkan bahwa *Candida* menyebabkan kerusakan chromatin packaging sperma dan apoptosis sehingga mengakibatkan kegagalan fertilisasi in vitro. Berbagai jenis mikotoksin dapat dihasilkan berbagai jenis jamur dan dilepaskan pada substratnya, apabila substrat tersebut kemudian termakan oleh manusia atau hewan maka pada jumlah tertentu akan menimbulkan kelainan organ antara lain pada hepar, ginjal dan organ reproduksi. Beberapa mikotoksin bersifat kumulatif dan tidak dapat dieliminasi dari tubuh.

Biofungisida ini memang sangat bermanfaat dibidang pertanian tetapi kita belum mengetahui apakah biofungisida ini aman untuk kesehatan manusia khususnya para petani yang menggunakan

biofungisida tersebut. Apalagi petani yang melakukan penyemprotan tanaman tanpa menggunakan sarung tangan sehingga mereka bisa saja terkontaminasi bahan aktif biofungisida berupa *Trichoderma sp* yang menghasilkan antibiotika berupa gliotoxin dan viridin, pada saat makan bila mereka lupa mencuci tangan atau cuci tangan tidak bersih. Manusia kemungkinan dapat terkontaminasi melalui hewan yang memakan rumput yang terkena semprotan biofungisida kemudian hewan tersebut dimakan oleh manusia. Akibat kontaminasi tersebut kemungkinan dapat mempengaruhi organ tubuh manusia seperti hati, sehingga fungsi hati akan terganggu dan metabolisme tubuh juga akan termasuk organ reproduksi seperti testis.

Dari uraian di atas, mengingat biofungisida dapat menghasilkan racun berupa gliotoxin dan viridin, sedangkan laporan pengaruh biofungisida terhadap histologi testis dan proses spermatogenesis mencit (*Mus musculus*) belum dilaporkan, guna melengkapi informasi ini, penulis tertarik melakukan penelitian dengan judul toksisitas biofungisida yang mengandung *Trichoderma sp* terhadap testis dan proses spermatogenesis pada mencit (*Mus musculus*).

TINJAUAN TEORITIS

Mencit (*Mus musculus*)

Mencit sering dipergunakan sebagai hewan uji dalam penelitian fisiologi reproduksi dan embriologi pada manusia karena mempunyai sistem reproduksi yang tidak jauh berbeda, siklus reproduksi yang relatif singkat, sehingga hasil ujinya dengan cepat dapat segera diketahui. Selain itu hewan ini mudah diperoleh, mudah dipelihara, mudah dikembangbiakkan, dan mudah dikelola (Rugh, 1968; Hafez, 1987). Selain itu kesamaan sistem reproduksi mencit dengan manusia, seperti adanya vesikula seminalis (Nalbandov, 1990). Menurut Smith & Mangkoewidjojo (1988), publikasi data biologis mencit sudah banyak diketahui dan dapat dijadikan sebagai acuan penelitian.

Spermatogenesis

Merupakan serangkaian proses perubahan dari primordium sel-sel benih jantan yang mengadakan seri pembelahan mitosis dan meiosis diikuti oleh proses diferensiasi, transformasi struktur dan metamorfosis yang kompleks sampai terbentuknya spermatozoa (sel gamet jantan) yang masak, sehingga mampu untuk membuahi ovum (sel gamet betina) (Carlson, 1984).

Spermatogenesis adalah proses perkembangan sel spermatogonium menjadi spermatozoa. Secara umum proses ini dibagi 3 fase, yaitu multifikasi

mitotik, spermasitogenesis dan spermiogenesis. Aktivitas mitosis sel germinal primordial dimulai pada usia pubertas dan menghasilkan spermatogonium (Amelar *et al.*, 1977). Tahap spermasitogenesis juga disebut dengan tahap perbanyakan (proliferasi), karena spermatogonium menjadi sejumlah spermatogonia secara mitosis pada saat setelah lahir. Pada mencit terdapat tiga macam spermatogonia, yaitu spermatogonia A, spermatogonia *Intermediate* dan spermatogonia B. Spermatogonia A mengadakan proliferasi menjadi spermatogonia *intermediate* dan sebagian lagi tetap merupakan spermatogonia A, yang bertindak sebagai *stem cell*. Spermatogonia *Intermediate* bermitosis menjadi spermatogonia B, dan spermatogonia B bermitosis menjadi spermatosit primer. Spermatosit primer kemudian memasuki masa profase yang panjang (Bronson *et al.*, 1988). Spermatosit primer kemudian segera mengalami meiosis menjadi spermatosit sekunder, setelah itu spermatosit sekunder mengalami pembelahan meiosis kedua membentuk spermatid, dengan jumlah kromosom setengah dari jumlah kromosom induk (Setchell & Brooks, 1988). Spermatid kemudian akan mengalami spermiogenesis, yaitu proses transformasi (perubahan bentuk) menjadi sperma yang matang (Bronson, *et al.*, 1988). Proses

spermiogenesis meliputi 3 fase yaitu fase golgi, fase akrosomal dan fase maturasi menghasilkan spermatozoa matang yang siap dilepaskan ke lumen tubulus (Bardin *et al.*, 1988).

Waktu yang dibutuhkan mencit untuk proses spermatogenesis yaitu 35,5 hari (Rugh, 1968) atau spermatogenesis akan selesai setelah menempuh empat kali daur epitel seminiferus. Lama satu daur epitel seminiferus pada mencit adalah $207 \pm 6,2$ jam (Lestari, 1994), dapat diartikan bahwa setiap selang waktu $207 \pm 6,2$ jam, spermatogonia A akan selalu memasuki spermatogenesis dan pada waktu selang ini sperma dilepas ke dalam lumen tubulus (Johnson & Everitt, 1988). Spermatogenesis pada tikus 48 hari sedangkan pada manusia membutuhkan waktu selama 74 hari (Johnson & Everitt, 1988). Waktu yang diperlihatkan dalam proses spermatogenesis berbeda-beda. Pada manusia, satu siklus spermatogenesis memerlukan waktu 64 hari, dan satu siklus epitelium spermatogenikum membutuhkan waktu 16 hari (Steinberger, 1975).

Proses spermatogenesis mencit terdiri dari 16 tingkat, pada tikus terdiri dari 19 tingkat dan meliputi 3 fase yaitu fase golgi, fase akrosomal dan fase maturasi. Pada fase golgi terbentuk granulum *akromaticum* dari akumulasi granulum dan *vesicular acrosomatica* menutupi nukleus yang memadat dan

membentuk akrosoma. Sementara itu sentriol memanjang membentuk flagelum dan mitokondria berakumulasi di sekitar flagelum proksimal. Fase terakhir adalah fase maturasi, sisa sitoplasma difagositosis oleh sel sertoli dan menghasilkan spermatozoon matang yang siap dilepaskan ke lumen tubulus (Junquera, *et al.*, 1995).

Di dalam tubulus seminiferus sel-sel spermatogenik dengan berbagai tahap perkembangan tidak terdistribusi acak tetapi tertata dengan pola asosiasi dengan sel tertentu. Proses yang terjadi antara penampakan asosiasi sel tertentu dengan asosiasi sel yang sama berikutnya disebut satu siklus epithelium. Dalam satu siklus spermatogenesis terjadi 4 siklus epithelium spermatogenikum. Steinberger (1975) mengemukakan bahwa pada manusia siklus epithelium spermatogenikum terdiri dari 6 tahap, setiap tahap memiliki komposisi sel pada perkembangan tertentu yang disebut asosiasi sel. Perubahan jumlah anggota sel yang berasosiasi pada tahap tertentu dapat dijadikan indikator adanya gangguan spermatogenesis (De Kretser & Kerr, 1988). Pada prinsipnya proses spermatogenesis dikendalikan oleh sistem saraf melalui poros hipotalamus hipofisis testis yang merupakan sistem neuroendokrin. Selama sistem ini berjalan seimbang, maka proses spermatogenesis akan berjalan normal. Adanya gangguan keseimbangan dari poros ini dipengaruhi

oleh hormon atau antihormon akan mengganggu proses spermatogenesis. Hipotalamus menghasilkan Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH) yang merangsang hipofisis untuk mensekresikan Folikel Stimulating Hormone (FSH) dan Luteinizing Hormone (LH). Vander (2001) mengatakan di testis LH akan berikatan dengan reseptor di sel leydig dan berdampak sel leydig memproduksi testosteron. FSH akan berikatan dengan reseptornya di sel sertoli.

Untuk menjaga keseimbangan hormon-hormon pada poros hipotalamus-hipofisis-testis, terdapat beberapa mekanisme umpan balik. Testosteron akan mengatur sekresi LH, peningkatan testosteron akan menurunkan sekresi LH dan FSH dan sebaliknya penurunan testosteron akan meningkatkan sekresi LH dan FSH. Kontrol umpan balik negatif LH oleh testosteron ini dapat langsung melalui hipofisis anterior atau melalui penghambatan sekresi GnRH oleh hipotalamus. Sekresi FSH bisa dihambat oleh inhibin yang dihasilkan oleh sel sertoli (Vander, 2001).

Follicle Stimulating Hormone (FSH) berpengaruh dalam proliferasi spermatogonium (Mackawa & Abe, 1995), dalam mitosis spermatogonium membentuk spermatosit primer serta dalam spermiogenesis (Stephan *et al.*, 1997).

Proses spermatogenesis erat kaitannya dengan fungsi sel sertoli. Dalam hal ini fungsi sel sertoli adalah sebagai pemelihara sel-sel spermatogenik, melakukan fagositosis sisa sitoplasma spermatid dan melepaskan spermatozoa ke lumen tubulus. Sel ini juga berperan dalam mempertahankan testis yang berfungsi untuk menjaga keseimbangan ion-ion, molekul kecil dan kadar protein antara darah dan cairan tubuler. Hal ini penting sebagai proteksi sel-sel spermatogenik terhadap bahan mutagenik (Bardin *et al.*, 1988).

METODE PENELITIAN

Penelitian dilaksanakan di Rumah Hewan Fakultas Kedokteran sebagai tempat pemeliharaan dan perlakuan terhadap hewan coba. Laboratorium Bagian Biologi Kedokteran, Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya, Palembang dan laboratorium Patologi Anatomi RSMH Palembang. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juli 2006 sampai Agustus 2006.

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit jantan albino berumur 12 minggu, sebanyak 25 ekor. Mencit yang digunakan diperoleh dari Universitas Indonesia (UI) Jakarta Mencit diambil dari suatu populasi yang sudah dibuat homogen, yaitu umur 12 minggu. Berat badan mencit 30 – 42 gram.

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen dengan menggunakan hewan uji mencit (*Mus musculus*). Rancangan penelitian digunakan untuk pengelompokan dan pemberian perlakuan terhadap hewan uji adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL). Kelompok perlakuan dalam eksperimen ini adalah kelompok mencit yang diberi senyawa biofungisida berbahan aktif *Trichoderma sp* secara *oral*, sedangkan kelompok kontrol diberi akuabides steril.

Alat dan bahan yang digunakan untuk penelitian ini antara lain botol vial penampung testis, gelas ukur, gelas objek dan kaca penutup, kandang berupa bak plastik dengan tutup dari kawat kasa, peralatan bedah, spuit 1 ml diberi sonde, timbangan analitik, sarung tangan, mikroskop merk Olympus tipe CX21FS2, timbangan analitik. Akuabides, Biofungisida (*Trichoderma sp*), NaCl 0,9%, canada balsam, kertas saring, satu set bahan kimia untuk pembuatan irisan mikroanatomi testis dengan metode parafin dengan pewarna hematoksilin-eosin.

Prosedur penelitian mencit diberi makanan dan minuman secara *ad libitum*, dikondisikan pada lingkungan, dan perlakuan yang sama. Sebelum digunakan untuk penelitian mencit diaklimatisasi terlebih dahulu selama satu minggu di rumah hewan, Fakultas Kedokteran

Universitas Sriwijaya, Palembang, kemudian dikelompokkan menjadi 5 kelompok perlakuan. Setiap perlakuan terdiri atas 5 ekor mencit. Perlakuan dilakukan per oral dengan menggunakan spuit 1 ml diberi sonde selama 14 hari kemudian diamati hasilnya. Perlakuan dan kontrol yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

1. P0 : kelompok kontrol, mencit diberi akuabides sebagai kontrol normal 16 cc/kg BB
2. P1 : kelompok perlakuan, mencit diberi biofungisida (*Trichoderma sp*) 16 cc/kg BB
3. P2 : kelompok perlakuan, mencit diberi biofungisida (*Trichoderma sp*) 24 cc/kg BB
4. P3 : kelompok perlakuan, mencit diberi biofungisida (*Trichoderma sp*) 36 cc/kg BB
5. P4 : kelompok perlakuan, mencit diberi biofungisida (*Trichoderma sp*) 54 cc/kg BB

Dengan perhitungan yang sudah dikonversikan kepada rerata berat badan mencit yaitu 30 gram maka pada kelompok P1 diberi biofungisida (*Trichoderma sp*) sebanyak 16 cc/kg BB, P2 diberi biofungisida (*Trichoderma sp*) sebanyak 24 cc/kg BB, P3 diberi biofungisida (*Trichoderma sp*) sebanyak 36 cc/kg BB,

P4 diberi biofungisida (*Trichoderma sp*) sebanyak 54 cc/kg BB menurut Klaasen (2001).

Pengambilan testis kemudian dilakukan penghitungan berat testis, dilakukan pembuatan sediaan histopatologi testis, diamati sediaan histopatologi testis serta pembuatan mikrofoto.

Analisis data yang berupa diameter tubulus seminiferus, tebal epitel tubulus seminiferus, berat testis, indeks spermatogenesis, diameter sel leydig, jumlah sel leydig serta jumlah sel sertoli dengan Analisis Varians (ANOVA) dengan tingkat kemaknaan $p < 0,05$. Apabila terjadi perbedaan yang bermakna dilanjutkan uji lanjut Bonferroni dengan menggunakan program SPSS versi 11,5. Data disajikan dalam bentuk tabel.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pengamatan toksisitas biofungisida yang mengandung *Trichoderma sp* selama 14 hari terhadap testis dan proses spermatogenesis pada mencit (*Mus musculus*) antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan (variasi dosis biofungisida (*Trichoderma sp*) dosis 16; 24; 36; 54 cc/kg BB) dapat dilihat pada tabel dan gambar sebagai berikut :

Tabel 1. Rata-Rata Tebal Epitel Germinal Tubulus Seminiferus Mencit Albino (*Mus musculus*) Setelah 14 Hari Pemberian Biofungisida

Dosis (cc/kg BB)	Ulangan (n)	Rata-rata Tebal Epitel Tubulus Seminiferus (μm) ($\bar{x} \pm SD$)
Kontrol (0)	5	57,0 \pm 3,6572 ^a
16	5	31,5 \pm 3,01619 ^b
24	5	28,3 \pm 3,0125 ^b
36	5	27,2 \pm 3,4749 ^{bc}
54	5	21,3 \pm 4,3960 ^c

Keterangan : Angka-angka yang diikuti oleh huruf yang berbeda menunjukkan perbedaan yang bermakna pada uji Bonferroni $p < 0,05$.

Toksistas Biofungisida

Pengamatan yang dilakukan setelah pemberian biofungisida selama 14 hari

menunjukkan adanya rata-rata penurunan diameter tubulus seminiferus yang dapat dilihat pada Tabel 2 di bawah ini.

Tabel 2. Rata-Rata Diameter Tubulus Seminiferus Mencit Albino (*Mus musculus*) Setelah 14 Hari Pemberian Biofungisida

Dosis (cc/kg BB)	Ulangan (n)	Rata-rata Diameter Tubulus Seminiferus (μm) ($\bar{x} \pm SD$)
Kontrol (0)	5	141,4 \pm 9,0719 ^a
16	5	101,4 \pm 5,3666 ^b
24	5	98,8 \pm 4,3244 ^b
36	5	94,8 \pm 7,3959 ^b
54	5	91,4 \pm 11,7388 ^b

Keterangan : Angka-angka yang diikuti oleh huruf yang berbeda menunjukkan perbedaan yang bermakna pada uji Bonferroni $p < 0,05$.

Tabel 3. Rata-Rata Indeks Spermatogenesis Dan Jumlah Sel Sertoli Mencit Albino (*Mus musculus*) Setelah 14 Hari Pemberian Biofungisida

Dosis (cc/kg BB)	Ulangan (n)	Indeks Spermatogenesis % ($\bar{x} \pm SD$)	Jumlah Sertoli ($\bar{x} \pm SD$)
Kontrol (0)	5	83,944 \pm 1,5224 ^a	14,4 \pm 6,9857 ^a
16	5	81,758 \pm 3,4175 ^a	11,0 \pm 1,5811 ^a
24	5	79,612 \pm 3,4036 ^a	10,2 \pm 0,8367 ^a
36	5	70,790 \pm 2,8429 ^b	8,80 \pm 0,8367 ^a
54	5	66,032 \pm 6,8509 ^b	7,40 \pm 0,5477 ^b

Keterangan : Angka-angka yang diikuti oleh huruf yang berbeda menunjukkan perbedaan yang bermakna pada uji Bonferroni $p < 0,05$.

Tabel 4. Rata-Rata Berat Testis Mencit Albino (*Mus musculus*) Setelah 14 Hari Pemberian Biofungisida

Dosis (cc/kg BB)	Ulangan (n)	Berat Testis (g) ($\bar{x} \pm SD$)
Kontrol (0)	5	0,1349 ± 0,0257 ^a
16	5	0,1015 ± 0,0147 ^b
24	5	0,0982 ± 0,0072 ^b
36	5	0,0946 ± 0,0042 ^b
54	5	0,0867 ± 0,0032 ^b

Keterangan : Angka-angka yang diikuti oleh huruf yang berbeda menunjukkan perbedaan yang bermakna pada uji Bonferroni $p < 0,05$.

Tabel 5. Rata-Rata Diameter inti sel leydig Mencit Albino (*Mus musculus*) Setelah 14 Hari Pemberian Biofungisida

Dosis (cc/kg BB)	Ulangan (n)	Rata-rata Diameter Inti Sel Leydig (μm) ($\bar{x} \pm SD$)
Kontrol (0)	5	8,04 ± 0,3577 ^a
16	5	6,76 ± 0,3912 ^b
24	5	6,16 ± 0,4336 ^b
36	5	6,16 ± 0,7733 ^b
54	5	5,36 ± 0,6426 ^{bc}

Keterangan : Angka-angka yang diikuti oleh huruf yang berbeda menunjukkan perbedaan yang bermakna pada uji Bonferroni $p < 0,05$.

Tabel 6. Rata-Rata Jumlah Sel leydig Mencit Albino (*Mus musculus*) Setelah 14 hari pemberian Biofungisida

Dosis (cc/kg BB)	Ulangan (n)	Jumlah Sel Leydig ($\bar{x} \pm SD$)
Kontrol (0)	5	8,058 ± 1,5861 ^a
16	5	6,960 ± 0,8007 ^{ab}
24	5	5,620 ± 0,9085 ^b
36	5	4,674 ± 0,7787 ^{bc}
54	5	4,414 ± 0,2134 ^{bc}

Keterangan : Angka-angka yang diikuti oleh huruf yang berbeda menunjukkan perbedaan yang bermakna pada uji Bonferroni $p < 0,05$.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pembahasan

1. Toksisitas Biofungisida Terhadap Tebal Epitel Germinal Tubulus

Seminiferus Mencit Albino (*Mus musculus*)

Berdasarkan pengamatan histopatologi testis terlihat adanya penurunan tebal epitel

germinal tubulus seminiferus. Dosis 16 cc/Kg sudah menunjukkan perbedaan yang bermakna $p < 0,05$ apabila dibandingkan dengan kontrol. Kemungkinan penurunan tebal epitel germinal tubulus seminiferus disebabkan oleh sel-sel spermatogenik sangat rentan terhadap senyawa yang bersifat toksik (Working & Chellman, 1993), dimana biofungisida yang mengandung *Trichoderma sp* menghasilkan zat toksik berupa gliotoksin dan viridin. Dalam keadaan normal, sel spermatogenik mampu menghasilkan ROS (“Reactive Oxygen Species”). Pemberian biofungisida menyebabkan ROS meningkat. Hal ini mungkin disebabkan terjadinya ikatan yang kuat antara gliotoksin dengan gugus (-SH) pada sistein, yang merupakan prekursor glutation (GSH). Gliotoksin akan berkonjugasi dengan glutation (Orr *et al.*, 2004). Glutation sendiri terdapat pada sel spermatogenik (Fujii, 2003), sehingga pemberian biofungisida dapat mengganggu keseimbangan antioksidan (glutation/GSH) dalam sel dan dapat menimbulkan produksi ROS yang berlebihan (Faix, 2003). Produksi ROS yang berlebihan dapat memacu terjadinya stress oksidatif dan peroksidasi lipid pada sel-sel spermatogenik, yang kemudian dapat menyebabkan kerusakan bahkan kematian pada sel spermatogenik, yang pada akhirnya akan menyebabkan berkurangnya

tebal epitel germinal. Menurut Brinkworth & Handelsman (2000) penurunan jumlah sel-sel spermatogenik akan menyebabkan berkurangnya tebal epitel germinal tubulus seminiferus.

2. Toksisitas Biofungisida Terhadap Diameter Tubulus Seminiferus Mencit Albino (*Mus musculus*)

Berdasarkan pengamatan histopatologi testis terlihat adanya penurunan ukuran diameter tubulus seminiferus. Dosis 16 cc/Kg BB sudah menunjukkan perbedaan yang bermakna $p < 0,05$ apabila dibandingkan dengan kontrol. Hal ini menunjukkan dosis biofungisida 16 cc/Kg BB sudah memberikan pengaruh terhadap tubulus seminiferus sebagai tempat proses spermatogenesis.

Berdasarkan hasil penelitian semakin tinggi dosis biofungisida yang diberikan semakin kecil ukuran diameter tubulus seminiferus. Penurunan diameter tubulus seminiferus menunjukkan bahwa pemberian biofungisida menyebabkan tubulus seminiferus menjadi atrofi, yang terjadi akibat berkurangnya sel-sel spermatogenik. Hal ini diperkuat oleh Jalius (1994) menyatakan bahwa penurunan ukuran diameter tubulus seminiferus sejalan dengan berkurangnya jumlah sel-sel spermatogenik. Robin *et al.* (1984) juga menyatakan berkurangnya

jumlah sel-sel spermatogenik akan berlanjut menjadi atrofi tubulus seminiferus yang ditandai dengan mengecilnya diameter tubulus seminiferus.

3. Toksisitas Biofungisida Terhadap Indeks Spermatogenesis Mencit Albino (*Mus musculus*)

Berdasarkan penelitian ini rata-rata indeks spermatogenesis terjadi penurunan yang bermakna ($p < 0,05$) antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan. Penurunan indeks spermatogenesis terjadi perbedaan yang bermakna pada dosis 36 cc/Kg BB bila dibandingkan dengan control (Tabel 3).

Kita ketahui bahwa proses spermatogenesis terdiri dari beberapa tahap diawali dengan pembelahan spermatogonia sehingga jika sejak awal jumlah spermatogonia berkurang maka jumlah sel perkembangan berikutnya juga berkurang. Perubahan jumlah sel-sel spermatogenik pada tubulus seminiferus bisa digunakan sebagai indikator adanya gangguan pada proses spermatogenesis (De Kretser & Keir 1988). Menurut Du Pan & Campana (1993) penurunan jumlah sel-sel spermatogenik ini juga berkaitan dengan penurunan FSH dan testosteron. Penurunan spermatogonia pada penelitian ini diduga karena penghambatan sekresi FSH mengingat hormon ini diperlukan dalam mitosis dan proliferasi spermatogonia.

Pengaruh FSH pada spermatogonia ini bersifat langsung karena spermatogonia mempunyai reseptor terhadap FSH.

Penurunan jumlah sel-sel spermatogenik ini tidak terlepas dari optimal tidaknya fungsi dari sel sertoli, dimana fungsi sel sertoli antara lain untuk memelihara sel-sel spermatogenik termasuk memberi nutrisi pada sel-sel spermatogenik. Fungsi sel sertoli ini dikendalikan oleh FSH dan testosteron (Du Pan & Campana, 1993). Apabila jumlah sel sertoli berkurang maka kerja dari fungsi sel sertoli akan berkurang juga dan juga akan mengakibatkan jumlah sel spermatogenik akan berkurang sehingga akan terjadi penurunan indeks spermatogenesis. Penurunan indeks spermatogenesis disebabkan karena hambatan mitosis yang terjadi selama spermatogenesis. Biofungisida yang masuk ke dalam tubuh mempengaruhi siklus sel spermatogonia yang berlangsung dalam tubulus seminiferus. Gangguan tersebut dapat berupa hambatan pada tahap interfase (Fase G1, S, dan G2) yang merupakan tahap terjadinya sintesis protein, replikasi DNA, dan persiapan energi untuk pembelahan sel. Albert (1993) melaporkan bahwa sel mamalia yang sedang berada pada fase S, bila sintesis DNA terhambat maka sel tidak

akan memasuki sel mitosis sampai hambatan hilang.

Berdasarkan hasil pengamatan jumlah spermatid semakin sedikit sejalan dengan bertambahnya dosis biofungisida. Menurut Amelar (1997) & Mc Lachan *et al.*, (1994) bahwa ada beberapa kemungkinan mekanisme terjadinya penurunan jumlah spermatid (1) adanya gangguan dalam proses meiosis, (2) adanya gangguan dalam proses spermiogenesis awal, (3) karena lepasnya spermatid ke lumen tubulus dan atau (4) karena terjadi apoptosis spermatid. Keempat mekanisme di atas berhubungan dengan penurunan testoteron. Proses meiosis dari spermatosit primer menjadi spermatosit sekunder dan membentuk spermatid diatur oleh testoteron melalui aksinya pada sel sertoli pengikatan spermatid pada sel sertoli melibatkan hormon testoteron, sedangkan penurunan hormon testoteron akan menurunkan adesi antara spermatid dan sel sertoli. Hal ini sesuai dengan Working & Chellman (1993) yang menyatakan bahwa spermatid merupakan tahap perkembangan akhir dari sel spermatogenik sangat rentan terhadap senyawa yang bersifat toksik.

4. Toksisitas Biofungisida Terhadap Berat Testis Mencit Albino (*Mus musculus*)

Berdasarkan hasil dari penelitian ternyata rata-rata berat testis mengalami penurunan. Pemberian dosis 16 cc/Kg BB sudah menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna tetapi antara dosis 16 cc/Kg BB dengan 24 cc/Kg BB, 36 cc/Kg BB dan 54 cc/Kg BB menunjukkan perbedaan tak bermakna (Tabel 4).

Penurunan berat testis mengindikasikan bahwa suatu senyawa bersifat toksik terhadap testis. Menurunnya berat testis menunjukkan bahwa biofungisida menyebabkan kematian sel-sel spermatogenik, selanjutnya mengakibatkan kerusakan pada epitel germinal dan pada akhirnya menyebabkan degenerasi testis. Kita mengetahui bahwa berat testis ditentukan antara lain oleh perkembangan epitel seminiferus, tubulus seminiferus yang menempati sebagian besar volume testis. Akibat adanya senyawa toksik seperti gliotoxin dan viridin dapat menyebabkan kerusakan epitel germinal tubulus seminiferus dan pada akhirnya dapat menyebabkan degenerasi testis. Penelitian Faix (2003) mengatakan bahwa pemberian senyawa toksik yaitu merkuri dapat mengakibatkan produksi ROS menjadi berlebih, produksi ROS yang berlebih dapat menyebabkan degenerasi testis. Acharya *et al.*, (2003), menyatakan bahwa ROS dapat menyebabkan sel-sel

spermatogenik menjadi rusak bahkan mati, kemudian dapat menurunkan jumlah sperma secara signifikan dan pada akhirnya mempengaruhi penurunan berat testis. Hal tersebut didukung Working & Chellmen (1993) senyawa yang bersifat toksik dapat mempengaruhi testis. Vander *et al.* (2001) juga mengatakan bahwa penurunan berat testis ada kaitannya dengan menurunnya tebal epitel germinal tubulus seminiferus dengan diameter tubulus seminiferus yang menyusun 90% dari volume testis.

5. Toksisitas Biofungisida Terhadap Sel Leydig Mencit Albino (*Mus musculus*)

Berdasarkan penelitian terhadap diameter sel leydig ternyata biofungisida sudah menunjukkan perbedaan yang bermakna pada dosis 16 cc/ Kg BB jika dibandingkan dengan kontrol, sedangkan jumlah sel leydig baru menunjukkan perbedaan yang bermakna pada dosis 24 cc/Kg BB jika dibandingkan dengan kontrol. Berdasarkan gambar histopatologi juga dapat dilihat jumlah sel leydig pada perlakuan kontrol terlihat banyak, sedangkan pada kelompok perlakuan 54 cc/Kg BB semakin sedikit (Tabel 5).

Pada penelitian ini pemberian dosis biofungisida yang bervariasi menunjukkan adanya penurunan rata-rata diameter inti. Hal tersebut kemungkinan karena biofungisida bersifat toksik yang dapat

menghambat inti sel untuk mereplikasi DNA sehingga DNA maupun RNA yang dihasilkan berkurang dan akan mengganggu kerja sel leydig. Hal tersebut didukung oleh pernyataan Rhamalingan & Vimaladevi (2002) bahwa pada fase S (sintesis) dalam siklus sel, DNA mengalami replikasi dan hal ini dinyatakan dengan peningkatan volume inti dan peningkatan diameter inti, dengan demikian diameter inti dapat dijadikan parameter untuk mengamati aktif tidaknya inti sel.

Penurunan jumlah sel leydig pada kelompok perlakuan karena sel leydig mengalami degenerasi, sel leydig yang mengalami degenerasi ditunjukkan dengan adanya inti yang mengecil. Penelitian Faix (2003) mengatakan bahwa pemberian senyawa toksik yaitu merkuri dapat mengakibatkan produksi ROS menjadi berlebih, produksi ROS yang berlebih dapat menyebabkan degenerasi sel. Akibat adanya pemberian biofungisida yang mengandung *Trichoderma sp* dan menghasilkan zat toksik gliotoxin dan viridin dapat menyebabkan degenerasi sel leydig sehingga jumlah sel leydig berkurang.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Kesimpulan dari penelitian ini adalah pemberian biofungisida dosis 16 cc/Kg BB secara oral bersifat toksik terhadap berat testis, diameter tubulus seminiferus, tebal epitel germinal tubulus seminiferus, diameter sel leydig. Dosis 24 cc/Kg BB secara oral bersifat toksik terhadap jumlah sel leydig. Dosis 36 cc/Kg BB secara oral bersifat toksik terhadap indeks spermatogenesis. Dosis 54 cc/Kg BB secara oral bersifat toksik terhadap jumlah sel sertoli.

Saran

Perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui apakah pemberian biofungisida dengan dosis yang lebih rendah dan dalam jangka waktu yang lebih lama dapat mempengaruhi testis dan proses spermatogenesis.

DAFTAR PUSTAKA

- Acharya, U.R., M. Mishra. 2003. Lead Acetat Induced Cytotoxicity in Male Germinal Cells of Swiss Mice. *Industrial Health* 41: 291-294.
(http://www.nih.go.jp/jp/indu_hel?2003/pdf/ih_41_3_21.pdf) diakses 02 Mei 2006.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Watson, J.D. 1993. *Molecular Biology of Cell*. 3rd ed. Garland Pbl., Inc., New York.
- Amelar, R .D., Dubin, L., and Walsh, P.C. 1977. *Male Infertility*. Saunders, Philadelphia.
- Arsyad, K.M. 1980. *Prociding Seminar Spermatogenesis*. Pengurus Besar Perkumpulan Andrologi (PANDI). Surabaya.
- Bardin, C.W, Cheng, C.Y, Musto, N.E and Gonsalves. 1988. *The Sertoli Cell*. In Knobil, E and Neil, J(Editor). *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, Ltd. New York
- Bramono, K. 2005. Peranan Jamur Pada Infertilitas. *Buku Kumpulan Makalah/Abstrak Kongres PANDI IX dan Kongres PERSANDI I*. P 168-169. Jakarta. April 19-22. 2005.
- Brinkwoth, M.H. and D.J. Handelsman. 2000. *Environment Influence on Male Reproductive Health*. In Neischlog, E and H.M. Behne (Editor). *Andrology* (2nd Edition). Springer, Berlin.
- Bronson, F.H., C.P Dagg and G.D Snell. 1988. *Reproduction*. In E.L. Green (Editor) *Biology of the Laboratory Mouse*. Mcgraw-Hill Book Company, New York, USA. P 933-974.
- Carlson, B.M. 1984. *Pattern's Foundation of Embriology*. 4th Edition. TMH Edition Tata. McGraw-Hill Publishing Company. Ltd. New Delhi.
- De Kretser, D.M. 1988. *Evaluation of Male Gonadal Function*. In P.J. Rowe and E.M. Vikhlyaeva (eds). *Diagnosis and Treatment of Infertility*. Hans Huber Publisher. Toronto. p: 93-97.
- Du Pan, M.R. and Campana. 1993. *Physiopathology of*

- Spermatogenic Arrest. Fertil Steril. 60(6): 937-951.
- Faix, S. 2003. Effect of Per Os Administration of Mercuric Chloride on Peroxidation Processes in Japanese Quail. Acta Vet. Brno, 72:23-26. (http://www.vfu.cz/acta-vet/vol72/pdf/72_023.pdf).
- Fujii. 2003. Cooperative Function of Antioxidant and Redox System Against Oxidative Stress in Male Reproductive Tissue. Asian Journal of Andrology, Sep;5;231-242. (<http://www.asiaandro.com/1008-628x/5/231.htm>) diakses 02 Mei 2006.
- Jalius, 1994. Pengaruh Antispermatojenik Ekstrak Etanil Daging Buah Pare (*Momordica charantia* L) Pada Tikus. Maj. Kedokt. Indon. 44(1):9-13.
- Johnson, M.H. and B.J. Everit. 1988. Essential Reproduction (3th edition) Butler and Tanner Ltd.
- Junquera, L.C., Carneiro, J., and Kelley, R.O. 1995. Basic Histology (8th. Edition) Prentice-Hall International, London.
- Lu, F.C. 1995. Toksikologi Dasar Azas Organ Sasaran dan Penilaian Resiko. Diterjemahkan oleh Nugroho. Edisi kedua. Universitas Indonesia. Jakarta.
- Mackawa, K., & Abe, S.O. 1995. Proliferation of New Spermatogonia by Mammalian FSH via Sertoli Cell In vivo. Journal Experiment. Zoology, 272 (5) : 516-520.
- Mangkoewidjojo & S Smith, J.B. 1988. Pemeliharaan, Pembiakan dan Penggunaan Hewan Percobaan di Daerah Tropis.
- Nalbandov, A.V. 1990. Fisiologi Reproduksi Mamalia dan Burung. Terjemahan Sunaryo Keman. UI Press. Jakarta.
- Orr, J.G, V. Leel, G.A. Cameron, C.J. Marek, E.L. Haughton, L.J. Elrick, J.E. Trim, G.M. Hawksworth, A.P. Halestrap, M.C. Wright. 2004. Mechanism Of Action of Antifibrinolytic Compound Gliotoxin in Rat Liver Cells. Hepatology 40: 232-42. (<http://www.caspases.org/showabstract.php?pmid=93044400>) diakses 30 September 2006.
- Rhamalingan, V & V. Vimaladelfi. 2002. Effect of Mercuric Chloride on Membrane-Bound Enzymes in Rat Testis. Asian Journal Andrology. December; 4: 309-311.
- Robins, S.L., Ramsis & Vinay, K. 1984. Pathologic Basis of Disease 3rd.ed. W.B. Saunders Co. Ontario.
- Rugh, R. 1968. The Mouse: Its Reproduction and Development. 1st ed. Burgess Publishing. Co, Mineapolis.
- Setchell, B.P & D.E, Brooks. 1988. Anatomy, Vasculature, Innervation, and Fluids of The Male Reproductive Tract. In E. Knobil and J.D. Neill (Editors). The Physiology of Reproduction, Vol 1. Raven Press, Ltd, New York, USA. P.753 – 836.
- Stephan J.P., Syed, V., and Jegon, B. 1997. Regulation of Sertoli Cell Interleukin-

- I and Interleukin-6 Production
Invitro. *Moll.Cell. Endocrinol.* 134
(2): 109-118.
- Steinberger.E., and Steinberger, A . 1975.
Spermatogenik Function of the
Testis. In Greep.R.O. Astwood,
E.B., Hamilton, D.W., and
Geiger,S.R.(eds) Handbook of
Physiology, section Endocrinology
vol.V.Waverly Press,Inc., Baltimore.
- Suryono. 2006. Pestisida Biologis.
(<http://www.tanindo.com/abdi8/hal4201.htm>.) diakses 02 Mei 2006.
- Suwahyono, Untung, Wahyudi, Priyo.
2001. Biofungisida *Trichoderma*
harzianum, Pestida Ramah
Lingkungan. Seminar Teknologi
Untuk Negeri. Jakarta.
- Vander , A, Sherman , J, Luciana, D.
2001. Male Reproductive
Physiology, Human Phisiology (8th),
Mc Graw Hill Inc. New York, USA.
- Working, P.K and.Chellman, G.J. 1993.
The Testis, Spermatogenesis. And
The Excurrent Duct, In Zinaman,
MJ dan Seiali,AR(Editor).
Reproductive Toxicology and
infertility. p.39.