

# TOKSISITAS 2-METHOXYETHANOL PADA SPERMATOGENESIS MENCIT BALB-C

Putu Oky Ari Tania  
Bagian Biomedik  
Fakultas Kedokteran Universitas Wijaya Kusuma Surabaya

## *Abstract*

*The research was designed to find out the toxicity of 2-methoxyethanol (2-ME) to the number of spermatogenic cells. Ten mice divided into 2 groups, control group was administered by 0.5 % CMC (negative control) and treatment group were administered by 2-ME dose 100 mg/kg body weight. Days thirteenth until sixty thirth, the mice were administered by aquabides orally, andat the end of the treatment, the mice were sacrificed. The number of spermatogenic cells were observated histologically with Hematoxylin-Eosin staining. The observation shows that 2-ME decreases the number of spermatogenic cells, especially spermatocyte I. Exposure of 2-ME destructs anatomy of tubulus seminiferusin testicular, which is affects degradation of ephitellium and atopy of testicular.*

**Keyword** : *Spermatogenic cells, spermatogonium, spermatocyte I, round spermatid, 2-Methoxyethanol*

## PENDAHULUAN

Akumulasi sejumlah bahan toksik di lingkungan, terjadi seiring meningkatnya industri dan pabrik. Bahan toksik yang terakumulasi tersebut dapat mengganggu kesehatan manusia dengan berbagai hambatan metabolisme tubuh. Dua *methoxyethanol* (2-ME) adalah salah satu contoh senyawa *glycol ether* yang juga dikenal sebagai *ethylene glycol monomethyl ether* (EGME). Senyawa ini secara luas digunakan sebagai pelarut bahan organik berbahan dasar air pada industri dan peralatan rumah tangga (Starek *et al.*, 2010).

Senyawa 2-ME tidak ditemukan secara alamiah di lingkungan karena keberadaannya di alam merupakan hasil aktivitas industri dan pabrik. Senyawa ini dapat masuk ke dalam tubuh melalui beberapa cara yaitu melalui kulit, inhalansi atau terhirup, tercampur pada bahan makanan. Di dalam tubuh 2-ME mengalami metabolisme menjadi *methoxyacetic acid* (MAA) dengan bantuan katalisator alkohol dehidrogenase (ADH) dan aldehyd dehidrogenase (ALDH). Metabolit 2-ME yang berupa MAA inilah yang bersifat toksik (Irnidayanti, 2010).

Pemaparan MAA pada hewan jantan dapat menyebabkan gangguan pada sistem reproduksi khususnya pada testis. Gangguan terutama pada proses spermatogenesis, degenerasi epitel germinal, infertilitas, morfologi spermatozoa yang abnormal, juga dapat menyebabkan apoptosis pada spermatosit (Yoon *et al.*, 2001, Tirado *et al.*, 2003).

Spermatogenesis merupakan proses perubahan dari spermatogonia menjadi spermatozoa matur yang terspesialisasi di dalam testis. Spermatogenesis adalah proses yang terjadi dalam rangka produksi gamet jantan (Wistuba *et al.*, 2007). Pada testis, MAA dapat menghambat sintesis DNA terutama spermatosit pakiten. Pada testis tikus prepubertal, kematian sel yang paling mencolok pada sel spermatosit pakiten. Induksi MAA juga mengakibatkan apoptosis dengan target utama pada spermatosit pakiten (Barone *et al.*, 2005). Spermatosit pakiten merupakan sel yang paling aktif mensintesis RNA, dan memerlukan laktat sebagai energinya. Keberadaan MAA dapat mengganggu produksi laktat pada sel Sertoli (Hayati *et al.*, 2005).

Kematian sel germinal dengan jalur apoptosis akibat 2-ME selama spermatogenesis mengakibatkan peningkatan protein kinase, selain itu juga dapat meningkatkan aktivasi *voltage-operated calcium channel* (VOCC) tipe P/ Q pada sel Sertoli (Jindo, *et al.*, 2001). Beberapa peneliti menyatakan bahwa apoptosis dipengaruhi oleh sintesis makromolekular. Apoptosis ini diregulasi oleh beberapa jalur sinyal transduksi intraseluler, diantaranya ion kalsium, protein kinase A (PKA) dan protein kinase C (PK) (Jindo, *et al.*, 2001).

Pemberian MAA menyebabkan terjadinya peningkatan protein kinase. Protein kinase menyebabkan terjadinya diferensiasi, pertumbuhan, metabolisme dan apoptosis sel. Menurut Barone (2005), Jalur apoptosis spermatosit oleh MAA terjadi karena meningkatnya protein kinase yang dipengaruhi oleh konsentrasi  $\text{Ca}^{2+}$  yaitu *myosin light-chain kinase* (MLCK). Peningkatan MLCK ini diimplikasikan dengan peningkatan  $\text{Ca}^{2+}$  dalam sel (*overload*  $\text{Ca}^{2+}$ ) sehingga dapat mengganggu keseimbangan ion  $\text{Ca}^{2+}$  di dalam sel. Gangguan keseimbangan ion  $\text{Ca}^{2+}$  dapat menurunkan metabolisme sel yang pada akhirnya menyebabkan apoptosis. Selain itu peningkatan  $\text{Ca}^{2+}$  intraseluler juga dapat memodulasi aktivitas Calmodulin ( $\text{Ca}^{2+}$  yang dapat mengatur aktivitas kinase). Calmodulin berfungsi untuk memediasi translokasi protein *pro apoptotic* (protein Bad), sehingga dapat mengakibatkan apoptosis sel.

Apoptosis yang diinduksi oleh 2-ME melalui jalur *voltage-operated calcium channel* (VOCC). Pemberian MAA dapat mengaktifasi VOCC tipe P/ Q pada sel Sertoli. Aktivasi

tersebut mengakibatkan terjadinya transfer aktif. Clusterin adalah protein yang diproduksi oleh sel Sertoli dan berasosiasi terhadap kerusakan sel, juga sebagai indikator apoptosis sel germinal. Apabila terjadi aktivasi VOCC pada sistem reproduksi, akan mengakibatkan terjadinya transfer protein Clusterin dari sel Sertoli ke sel germinal. Transfer protein tersebut menyebabkan terjadinya akumulasi protein pada sitoplasma spermatosit yang mengakibatkan terjadinya apoptosis (Barone *et al.*, 2005).

Apoptosis yang terjadi pada spermatosit dapat menurunkan jumlah sel spermatozoa dan pada akhirnya dapat mengakibatkan penurunan kualitas spermatozoa yang mungkin berdampak pada infertilitas. Selanjutnya penelitian ini dilakukan untuk membuktikan toksisitas 2-ME pada spermatogenesis mencit BALB-C, terutama pada histologi testisnya.

## **BAHAN DAN METODE**

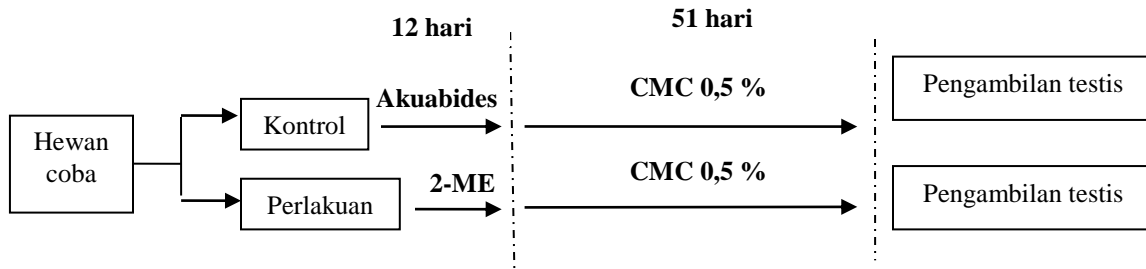
### **BAHAN**

Penelitian ini menggunakan hewan coba yaitu mencit (*Mus musculus*) jantan dewasa yang berumur 6 - 8 minggu, strain BALB/C dan rentang berat badan 25-35 g sebanyak 10 ekor, yang diperoleh dari bagian pemeliharaan hewan percobaan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah senyawa 2-ME, produksi Wako Co., Jepang, akuabides. Bahan untuk pembuatan preparat histologi yaitu bahan fiksasi *neutral buffered formaline*, akuades, etanol bertingkat yaitu 70%, 80%, dan 96%, akuades, xylol, parafin, alkohol asam, pewarna ganda Harris's Hematoxylin-Eosin, albumin, entellan

### **ALAT**

Alat yang digunakan selama penelitian ini adalah timbangan elektrik digital merek OHAUS Adventurer, *rotary vacuum evaporator*, *paraffin bath* merek Sakura, *rotary microtome* merek Microm HM 315, mikroskop cahaya merek Olympus cx 21, dan *hand counter*, *waterbath* merek Julabo TW8, *paraffin oven* merek Sakura.

## METODE



Gambar 1. Skema pembagian kelompok

Dua puluh ekor mencit jantan dengan berat 25-30 gram dibagi menjadi 2 kelompok yaitu kelompok kontrol dan perlakuan. Kelompok kontrol diinjeksi subkutan dengan akuabides selama 12 hari, dilanjutkan dengan pemberian CMC secara *gavage*. Kelompok perlakuan di berikan injeksi 2-ME secara subkutan, yang diberikan dengan dosis setara dengan 100 mg/kg bb/hari selama 12 hari, lalu perlakuan dihentikan. Hari ke 13 dilanjutkan dengan pemberian CMC secara *gavage* selama 51 hari. Pada hari ke 64, pada kelompok kontrol dan perlakuan, semua mencit dikorbankan dan diambil testisnya untuk dibuat sediaan histologinya, yaitu dengan metode parafin dan pewarnaan *Haematoxylin-Eosin*.

Metode penghitungan dan pengambilan data diperoleh dengan cara menghitung jumlah sel spermatogenik meliputi spermatogonium, spermatosit I dan spermatid bundar dalam satu tubulus seminiferus. Pengumpulan data dilakukan dengan mengamati sediaan testis di bawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 400 x. Dalam satu sediaan, berisi sepasang irisan testis, dengan setiap sediaan diamati sebanyak lima lapang pandang secara acak. Setiap lapang pandang diamati satu tubulus seminiferus bentuk bundar dengan kriteria jenis sel spermatogenik mengacu pada tahap 7 dari siklus epitel (Franca *et al.*, 1998).

## HASIL

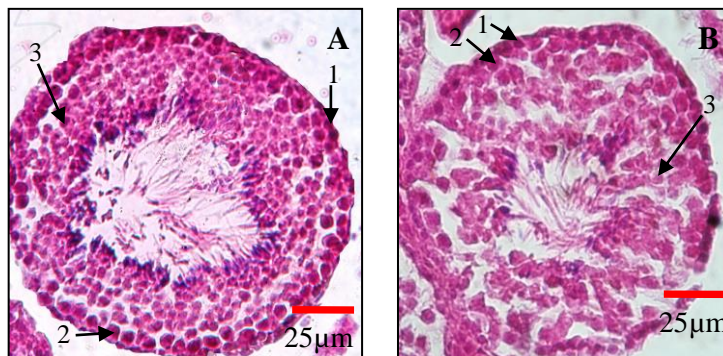
Preparat testis diamati dan dihitung jumlah sel spermatogeniknya, meliputi jumlah sel spermatogonium, spermatosit I, dan spermatid bundar. Hasil penghitungan jumlah sel spermatogenik dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Rerata jumlah sel spermatogenik pada kelompok kontrol dan kelompok Perlakuan

| Kelompok perlakuan | Rerata jumlah sel $\pm$ SD    |                               |                                 |
|--------------------|-------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|
|                    | Spermatogonium                | Spermatosit I                 | Spermatid bundar                |
| Kontrol            | 41,71 $\pm$ 3,14 <sup>a</sup> | 34,51 $\pm$ 4,15 <sup>b</sup> | 81,50 $\pm$ 11,34 <sup>ab</sup> |
| Perlakuan          | 40,66 $\pm$ 2,31 <sup>a</sup> | 29,50 $\pm$ 1,58 <sup>a</sup> | 80,02 $\pm$ 7,44 <sup>a</sup>   |

*superscript* berbeda menunjukkan beda signifikan

Jumlah spermatogonium pada kontrol lebih tinggi dibanding perlakuan, namun tidak ada beda yang signifikan. Jumlah spermatid bundar tidak terdapat perbedaan signifikan antara kelompok kontrol dan perlakuan. Jumlah spermatosit I antara kontrol dan perlakuan menunjukkan beda yang signifikan, yaitu terjadi penurunan jumlah spermatosit I yang cukup tajam pada kelompok perlakuan yang diberikan 2-ME.



Gambar 2. Penampang melintang tubulus seminiferus. A: kelompok kontrol; B: kelompok perlakuan. 1: spermatogonium; 2: spermatosit I; 3: spermatid bundar, 400x, *Hematoxylin-Eosin*

Pengaruh 2-ME pada jumlah sel spermatogenik dapat dilihat pada kelompok perlakuan. Gambar 2. menunjukkan bahwa pada kontrol, sel spermatogenik tersusun rapi dengan kepadatan sel yang tinggi. Spermatogonium tersusun atas 1 lapis, spermatosit I tersusun 1-2 lapis dan spermatid tersusun atas 2-3 lapis, sebaliknya pada kelompok perlakuan, letak sel spermatogenik tampak tidak beraturan dengan kepadatan sel yang rendah. Pengaruh 2-ME tampak paling berpengaruh pada spermatosit I, dibuktikan melalui jumlah spermatosit I yang

menurun jika dibanding dengan kelompok kontrol. Spermatisit I pada kelompok kontrol ini hanya tersusun atas 1 lapisan.

## **DISKUSI**

Metabolit 2-ME yaitu MAA dapat membahayakan sel spermatogenik, terutama spermatisit pakiten (Hayati *et al.*, 2005), sama seperti yang dilaporkan oleh Barone *et al.*, (2005) bahwa MAA menginduksi apoptosis pada sel spermatogenik terutama spermatisit I. Spermatogenesis merupakan proses perubahan dari spermatogonia menjadi spermatozoa matur yang terspesialisasi di dalam testis (Wistuba *et al.*, 2007). Proses ini dikendalikan secara langsung oleh hormon testosteron, yang secara tidak langsung dikendalikan oleh LH dan FSH.

Pengaruh 2-ME terhadap spermatogenesis dapat dilihat pada kelompok kontrol dan perlakuan. Jumlah sel spermatogenik pada perlakuan selalu lebih rendah jika dibandingkan dengan kontrol. Hal ini menunjukkan bahwa 2-ME mampu menghambat spermatogenesis yang ditunjukkan dengan penurunan jumlah sel spermatogenik.

Pengaruh *2-methoxyethanol* pada jumlah sel spermatogenik yang nampak terutama pada spermatisit I. Pengaruh yang terjadi ditandai dengan penurunan jumlah spermatisit I pada perlakuan. Terjadi penurunan jumlah spermatisit yang signifikan pada kelompok perlakuan dibanding dengan kontrol yang hanya diberi pelarut akuabides, sedangkan jumlah spermatogonium dan spermatid bundar tidak menunjukkan penurunan yang berbeda nyata.

Spermatisit merupakan sel pertama yang dipengaruhi oleh pemaparan 2-ME dan penurunan jumlah spermatisit karena kematian sel melibatkan apoptosis (Jindo *et al.*, 2001). Spermatisit I adalah sel yang paling peka terhadap 2-ME (Hayati *et al.*, 2005). Dua belas jam setelah pemaparan 2-ME hampir 50 % spermatisit I mengalami apoptosis pada tahap-tahap spesifik, hal ini menunjukkan bahwa spermatisit adalah target utama untuk 2-ME (Tirado *et al.*, 2003).

Pengaruh 2-ME terhadap penampang melintang tubulus seminiferus (Gambar 2.B), terjadi penurunan kepadatan spermatisit I. Pemaparan 2-ME pada hewan jantan menyebabkan atrofi pada testis, degenerasi pada epitel germinal, menyebabkan infertilitas, dan morfologi spermatozoa yang abnormal (Yoon *et al.*, 2001).

## KESIMPULAN

Pemberian 2-ME pada mencit BALB-C berpengaruh terhadap spermatogenesis, yaitu terjadi penurunan jumlah sel spermatogenik, terutama pada sel spermatosit I. Penurunan jumlah sel spermatosit I diduga melibatkan apoptosis sel. *Dua methoxyethanol* juga mempengaruhi anatomi dari tubulus seminiferus testis, yang ditandai dengan degradasi epitel dan menyebabkan atrofi pada testis.

## DAFTAR PUSTAKA

- Barone, F., S. Aguanno, and D. Agostino. Modulation of MAA-induced apoptosis in male germ cells : Role of sertoli cells P/Q-type calcium channels, *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2005. 3: 13
- Franca, L. R., T. Ogawa, M. R. Avarbock, R. L. Brinster, and L. D. Russell. Germ Cell Genotype Controls Cell Cycle During Spermatogenesis in The Rat, *Biology of Reproduction*. 1998. 59: 1371 – 1377.
- Hayati, A., D. Any, and I. B Rai Pidada. Spermatozoa motility and morphological recovery process in mice after the induction of 2-methoxyethanol, *Folia Medica Indonesia*. 2005. 41 (2) : 90-95.
- Irnidayanti, Y. Expression of Vimetin Protein and Neurofilamen on Forelimb Buds of Black-6 mice on Gestation Day 12 Induced by 2-Methoxyethanol by RT-PCR, *Bioscience*. 2010. 2(3) : 116-120
- Jindo, T., R.N. Wine, Ling-Hong Li, and R.E. Chapin. Protein Kinase Is Central to Rat Germ Cell Apoptosis Induced by Meth oxyacetiv Acid, *Toxicologic Pathology*. 2001. 29 : 607 – 616.
- Starek, A., K. Miranowicz- Dzierżawska, B. Starek-Świechowicz<sup>1</sup>. Interactive effect of combined exposure to ethylene glycol ethers and ethanol on hematological parameters in rats, *Health*. 2010. 2(9) : 1054-1064.
- Tirado, O.M., E.D. Martinez, O.C. Rodriguez, M. Danielsen, D.M. Selva, J. Reventos, F. Munell and C.A. Suarez-Quian. Methoxyacetic acid disregulation of androgen receptor and androgen-binding protein expression in adult rat testis, *Biology of Reproduction*. 2003. 68 : 1437-1446.
- Wistuba, J., J. B. Stukenborg, C. M. Luetjens. Mammalian Spermatogenesis, *Functional Development and Embyology*. 2007. 1(2) : 99-117.

Yoon, C. Y., C. M. Hong, J. Y. Song, Y. Y. Cho, K. S. Choi, B. M. Lee, and C. K. Kim.  
Effect of Ethylene Glycol Monoethyl Ether on the Spermatogenesis in Pubertal and  
Adult Rats, *Veteranary Science*. 2001. 2 (1) : 47-51.

*Reviewer*  
**Dr. Dorta Simamora, M.Si**