



## Pengaruh asam metoksiasetat terhadap organ reproduksi mencit (*Mus musculus*) Swiss Webster jantan

Maman Rumanta\*, Tien W. Surjono\*\*, dan Sri Sudarwati\*\*

\*Jurusan FMIPA-Biologi, FKIP Universitas Terbuka, Jakarta

\*\* Departemen Biologi, FMIPA, Institut Teknologi Bandung, Jl. Ganesa 10 Bandung 40132

### Sari

Asam metoksiasetat (MAA) merupakan salah satu metabolit dari dimetoksietil ftalat (DMEP) yaitu suatu senyawa yang banyak digunakan dalam pembuatan plastik sebagai pelentur (*plasticizer*). DMEP dapat luruh dari plastik dan bila masuk ke dalam tubuh manusia, zat ini diubah menjadi MAA yang dapat menyebabkan efek teratogenik dan toksik terhadap organ tubuh, terutama organ reproduksi jantan. Untuk meneliti pengaruh MAA terhadap organ reproduksi jantan, digunakan mencit Swiss Webster umur 7 minggu, yang diberi dosis 100, 150, 225, dan 300 mg/kg berat badan, secara *gavage* setiap hari selama 4 minggu berturut-turut, dengan satu hari istirahat pada tiap akhir minggu. Kelompok mencit kontrol hanya diberi akuabides sebagai pelarut MAA. Mencit dibunuh sehari setelah pemberian MAA terakhir. Pengamatan dilakukan terhadap berat testis, berat epididimis, dan berat vesikula seminalis; jumlah, motilitas, dan morfologi spermatozoa yang diperoleh dari epididimis kauda; struktur testis yang mencakup diameter, tebal epitel, dan penampilan tubulus seminiferus; jumlah sel spermatogenik, jumlah sel Sertoli, serta jumlah sel Leydig. Dibandingkan dengan kontrol, hasil pengamatan menunjukkan penurunan berat testis dan epididimis, tetapi tidak ada penurunan berat vesikula seminalis. Jumlah dan motilitas spermatozoa menjadi lebih rendah, sedangkan jumlah spermatozoa abnormal meningkat. Diameter dan tebal epitel tubulus seminiferus menurun, demikian pula persentase tubulus seminiferus normal (fase VII), sedangkan persentase tubulus seminiferus abnormal meningkat. Pendedahan terhadap MAA menyebabkan berdegenerasinya sel-sel spermatogenik, terutama spermatosit pakhiten dan spermatid, yang ditunjukkan oleh jumlahnya yang berkurang. Spermatogonium A dan spermatosit praleptoten paling tahan terhadap MAA. Jumlah sel Sertoli dan sel Leydig tidak menurun oleh perlakuan MAA, meskipun tampak adanya gejala toksik pada sel Sertoli yang ditandai oleh vakuolisasi dalam sitoplasma. Dapat disimpulkan bahwa testis merupakan organ reproduksi yang paling sensitif terhadap pengaruh MAA yang mengakibatkan terganggunya spermatogenesis pada mencit Swiss Webster.

*Kata kunci* : MAA; organ reproduksi; mencit jantan; spermatogenesis

### Abstract

#### Effects of methoxyacetic acid on the reproductive organs of male Swiss Webster mice (*Mus musculus*)

Methoxyacetic acid (MAA) is one of the metabolites of dimethoxyethyl phthalate (DMEP), which is mainly used as plasticizer in the manufacture of plastics. DMEP could leach from plastics and by entering the body, it will be metabolized into MAA which is teratogenic and toxic to several organs, particularly male reproductive organs. To investigate the effects of MAA on the male reproductive organs, seven-week-old Swiss Webster mice were treated with MAA at the doses of 100, 150, 225, and 300 mg/kg body weight daily by gavage, within four consecutive weeks with one-day interruption in each weekend. Observation was performed on the weight of testis, epididymis and seminal vesicle; the number, motility, and morphology of the spermatozoa obtained from the caudal epididymis; the histological structure of testis, including diameter, epithelial thickness and the performance of seminiferous tubules; the number of spermatogenic cells, as well as the number of Sertoli and Leydig cells. Compared to control the result showed, that testis and epididymis, but not the seminal vesicle decreased in weight. The number and motility of spermatozoa decreased, whereas the abnormal ones increased. The diameter, the epithelial thickness, as well as the percentage of normal (stage VII) seminiferous tubules were reduced, while the percentage of abnormal tubules increased. The administration of MAA led to the degeneration of spermatogenic cells, particularly the pachytene spermatocyte and spermatids, shown by the reduction in their number. The spermatogonia A and the preleptotene spermatocytes were the most resistant spermatogenic cells to MAA. The number of Sertoli and Leydig cells were not affected by MAA, despite toxic phenomenon of Sertoli cells characterized by vacuolization in the cytoplasm was shown. It is concluded that testis is the most susceptible to MAA insult, which subsequently interferes the spermatogenesis of male Swiss Webster mice.

*Key words*: MAA; reproductive organs; male mice; spermatogenesis

### 1 Pendahuluan

Asam metoksiasetat (MAA) tidak digunakan dalam kehidupan sehari-hari, dan umumnya tidak terdapat di alam, melainkan merupakan suatu metabolit dari

dimetoksietil ftalat (DMEP) yakni salah satu senyawa dari kelompok ester asam ftalat (PAEs). Kelompok ester ini banyak digunakan sebagai pelentur (*plasticizer*) dalam pembuatan plastik (1-4).

Plastik sangat banyak digunakan untuk kepentingan manusia, misalnya sebagai peralatan rumah tangga, bahan pengemas, pipa air, barang mainan anak-anak, dan berbagai peralatan kedokteran atau kesehatan. Selain sangat bermanfaat bagi kepentingan manusia, plastik juga dapat menimbulkan dampak negatif karena selain mencemari lingkungan dan lambat terdegradasi (1), plastik dapat pula membahayakan kesehatan manusia (5-9). Hal ini terjadi karena ikatan PAEs dengan matriks polimer plastik tidak stabil (4), sehingga dapat luruh dari materi plastik oleh pelarut organik, kemudian melalui berbagai cara dapat masuk ke dalam tubuh hewan dan manusia, lalu menyebar ke dalam berbagai organ tubuh (3,4,10-12). Adanya PAEs di dalam berbagai jaringan dan organ tubuh telah dideteksi pada pasien penerima transfusi darah (10), penerima infus *quinine* (11), dan pada pasien setelah menjalani hemodialisis (12), disebabkan oleh luruhnya PAEs dari kantung plastik penyimpan darah atau obat. Selain itu, PAEs dapat masuk ke dalam tubuh secara inhalasi, dari asap pembakaran plastik bekas (13). PAEs ditemukan juga di dalam mainan anak-anak (14) dan di dalam makanan formula bayi (15).

Di antara berbagai PAEs, senyawa yang paling toksik dan bersifat teratogenik adalah DMEP (1,2). Di dalam tubuh, DMEP akan dimetabolisme menjadi MAA, melalui metabolit antara 2-metoksietanol (2-ME) dan metoksiasetaldehid (MALD), yang masing-masing dikatalisis oleh alkohol dehidrogenase dan aldehid dehidrogenase (16,17). MAA, 2-ME, MALD, dan DMEP secara *in vivo* bersifat teratogenik, sedangkan secara *in vitro*, hanya MAA yang bersifat teratogenik (18). Oleh karena itu, MAA merupakan *proximate teratogen*, yang menjadi penentu munculnya kelainan, karena teratogenisitas DMEP, 2-ME, dan MALD itu baru muncul setelah diubah menjadi MAA (2,9,19,20). Metabolit DMEP lainnya yaitu monometoksietil ftalat (MMEP) tidak bersifat teratogenik.

Sasaran teratogenisitas DMEP atau metabolit banyak macamnya, tergantung pada tahap perkembangan saat pemberian, tetapi organ yang paling sensitif adalah anggota badan, yaitu jari (2, 21-23). Selain bersifat teratogenik, DMEP dan turunannya, seperti juga beberapa PAEs lainnya, merupakan toksikan reproduksi, terutama pada hewan jantan, dengan testis sebagai sasaran utamanya. Toksisitas reproduksi PAEs dan turunannya pada hewan jantan, yang diteliti dengan berbagai cara pemberian dan lama pendedahan, serta pada berbagai dosis, telah dilaporkan pada berbagai spesies dan galur hewan, umpamanya mencit, tikus, marmot, dan kelinci. Kelainan yang muncul antara lain ialah menurunnya berat testis dan berat kelenjar aksesori, menurunnya produksi cairan tubulus seminiferus, atrofi tubulus seminiferus, degenerasi sel-sel spermatogenik terutama spermatosit pakhiten, dan berkurangnya jumlah spermatozoa, serta terganggunya sel Sertoli (4,8,24-29). Studi epidemiologi menunjukkan bahwa terhadap manusia, PAEs dapat meningkatkan kejadian

oligospermia sampai azoospermia pada para pengecat kapal yang terdedah 2-ME, yang banyak digunakan sebagai bahan pelarut dalam pembuatan cat (26).

Atas dasar laporan-laporan mengenai efek negatif MAA terhadap organ reproduksi jantan, maka dilakukan penelitian ini untuk melihat efek MAA terhadap organ reproduksi dan spermatozoa mencit Swiss Webster jantan.

## 2 Bahan dan cara kerja

### 2.1 Bahan

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit Swiss Webster jantan umur 7 minggu. Pemeliharaan dilakukan di Rumah Hewan Departemen Biologi-ITB, yang diberi penerangan listrik selama 12 jam (jam 06.00-18.00). Selama pemeliharaan, rata-rata suhu minimum ruang adalah 23,6°C dan maksimum 26°C, serta rata-rata kelembaban relatif 80,6%. Pakan butiran standar (CP 551) produksi PT Charoen Pokphand Indonesia dan air minum berupa air ledeng diberikan secara *ad libitum*.

Bahan yang diuji ialah asam metoksiasetat atau MAA (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), dengan rumus kimia  $\text{CH}_3\text{OCH}_2\text{COOH}$  dan kemurnian 95,0%. Senyawa ini mempunyai berat molekul 90,08 dengan berat jenis 1,172-1,180.

### 2.2 Cara kerja

Mencit jantan umur 7 minggu diberi perlakuan MAA sebanyak 0,1 ml/10g berat badan (bb) dengan cara *gavage*, setiap hari selama empat minggu berturut-turut, dengan satu hari istirahat pada setiap akhir minggu. Kelompok kontrol hanya diberi akuabides dengan volume dan cara pemberian yang sama. Dosis MAA yang diberikan adalah 100, 150, 225, dan 300 mg/kg bb. Sehari setelah pemberian MAA terakhir, semua mencit dibunuh dan dibedah, lalu dilakukan: (a) penimbangan berat testis, epididimis, dan vesikula seminalis, (b) penghitungan konsentrasi spermatozoa dari epididimis kauda (dalam suspensi semen di dalam larutan PBSA), menurut panduan WHO 1992 (30), dan penghitungan persentase spermatozoa yang motil (menggunakan hemasitometer tipe *Improved Neubauer*), dengan kriteria motilitas menurut WHO (30), serta pengamatan terhadap jenis dan persentase spermatozoa abnormal, yang diamati dari sediaan awetan dan sediaan segar (30), (c) pengamatan terhadap struktur histologi testis, mencakup diameter dan tebal epitel tubulus seminiferus, yang diukur dari tubulus yang tersayat bulat dengan menggunakan mikrometer okuler, dan penghitungan persentase tubulus normal (fase VII) serta tubulus abnormal, (d) penghitungan jumlah sel-sel spermatogenik, jumlah sel Sertoli dan sel Leydig, dengan menggunakan kisi-kisi (*grid*) khusus.

**2.3 Analisis data**

Data parametrik diuji dengan menggunakan uji Anava dilanjutkan dengan uji beda nyata terkecil (BNT). Untuk data nonparametrik dilakukan pengujian dengan uji Kruskal-Wallis. Jika terdapat perbedaan yang nyata, dilanjutkan dengan *Wilcoxon's rank sum test*. Derajat signifikansi ditentukan pada  $p \leq 0,05$  (nyata) dan  $p \leq 0,01$  (sangat nyata).

**3 Hasil pengamatan**

**3.1 Pengaruh MAA terhadap berat testis, epididimis, dan vesikula seminalis**

Dari Tabel 1 dapat dibaca bahwa pada semua dosis MAA yang diberikan, berat testis dan berat epididimis berkurang secara nyata atau sangat nyata dari kontrol, sejalan dengan besarnya dosis yang diberikan. Testis merupakan organ reproduksi yang paling terpengaruh oleh MAA, karena penurunan berat yang nyata sudah terjadi pada dosis terendah (100 mg/kg bb), dan menjadi sangat nyata pada dosis 150, 225, dan 300 mg/kg bb. Berkurangnya berat epididimis secara nyata, baru terjadi pada dosis 150 mg/kg bb dan menjadi sangat nyata hanya pada dosis tertinggi (300 mg/kg bb). Vesikula seminalis tidak terpengaruh oleh MAA sebab beratnya hanya cenderung menurun pada semua dosis MAA yang diberikan.

**3.2 Pengaruh MAA terhadap spermatozoa**

Pada tabel 2 ditunjukkan bahwa jumlah (konsentrasi) dan persentase motilitas spermatozoa yang diambil dari epididimis kauda, menurun dari kontrol secara nyata pada dosis MAA terendah (100 mg/kg bb) dan menjadi sangat nyata pada ketiga dosis yang lebih tinggi, dengan pola penurunan yang sejalan dengan besarnya dosis MAA yang diberikan. Pola serupa tampak dalam hal menurunnya persentase spermatozoa yang motil dan meningkatnya persentase spermatozoa yang abnormal. Abnormalitas morfologi spermatozoa dapat terjadi pada bagian kepala, bagian tengah, atau pada ekor. Kelainan yang paling banyak ditemukan adalah kelainan pada bagian ekor.

**3.3 Pengaruh MAA terhadap struktur testis, jumlah sel spermatogenik, jumlah sel Sertoli serta sel Leydig**

Pada tabel 3 ditunjukkan terjadinya penurunan diameter dan penipisan epitel tubulus seminiferus, serta berkurangnya persentase tubulus seminiferus normal (fase VII) yang sangat nyata mulai dosis 150 mg/kg bb. Persentase tubulus seminiferus abnormal, baik yang tidak bervakuola dengan diameter tereduksi dan epitel yang tipis serta susunan sel yang tidak teratur maupun yang disertai vakuolisasi (Gambar 1), meningkat secara nyata mulai dosis MAA 150 mg/kg bb dan sangat nyata pada kedua dosis yang lebih tinggi, kecuali untuk tubulus

**Tabel 1** Berat testis, epididimis, dan vesikula seminalis mencit jantan yang diberi perlakuan MAA selama 4 minggu.

Dosis MAA (mg/kg bb)	Jumlah hewan (n)	Berat organ reproduksi (gram) ( $\bar{X} \pm SD$ )		
		Testis	Epididimis	Vesikula seminalis
0 (kontrol)	5	0,11 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,064 ± 0,008
100	5	0,10 ± 0,01*	0,04 ± 0,01	0,056 ± 0,010
150	5	0,08 ± 0,01**	0,03 ± 0,01*	0,044 ± 0,009
225	5	0,05 ± 0,01**	0,03 ± 0,01*	0,045 ± 0,014
300	5	0,04 ± 0,01**	0,02 ± 0,01**	0,045 ± 0,019

Berbeda dari kontrol: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$  (Uji Anava dilanjutkan dengan uji BNT)

**Tabel 2** Jumlah, motilitas, dan morfologi spermatozoa dari epididimis kauda mencit yang diberi perlakuan MAA selama 4 minggu

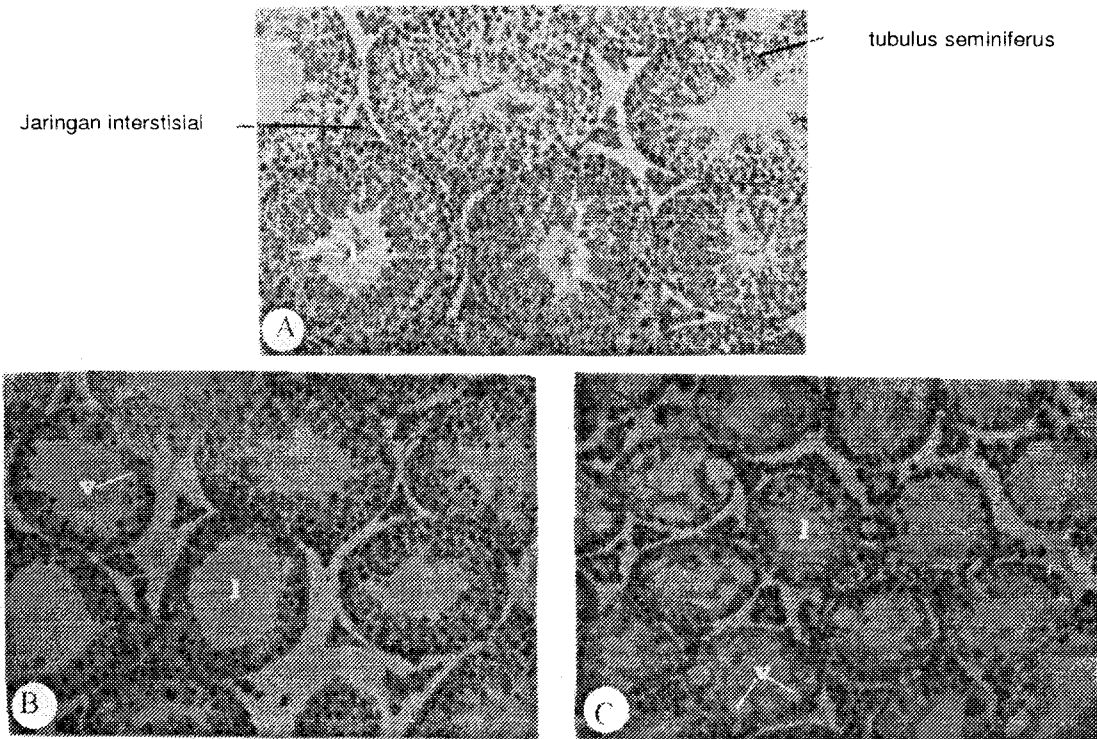
Dosis MAA (mg/kg bb)	Jumlah epididimis kauda (n)	Spermatozoa epididimis kauda		
		Jumlah (10 <sup>6</sup> /ml Suspensi♣) ( $\bar{X} \pm SD$ )	Motilitas (%)	Abnormal (%)
0 (kontrol)	5	1,33 ± 0,14	73,34	13,44
100	5	1,18 ± 0,08*	69,10 #	19,90 #
150	5	0,80 ± 0,06**	59,86 ##	37,60 ##
225	5	0,31 ± 0,06**	45,30 ##	78,08 ##
300	5	0,13 ± 0,04**	24,18 ##	83,44 ##

Berbeda dari kontrol: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$  (Uji Anava dilanjutkan dengan uji BNT)  
 #  $p \leq 0,05$ ; ##  $p \leq 0,05$  (Uji Kruskal-Wallis dilanjutkan dengan *Wilcoxon's rank sum test*)  
 ♣ Suspensi: semen dari satu epididimis kauda dalam 10 ml larutan PBSSA

**Tabel 3** Diameter dan tebal epitel tubulus seminiferus; persentase tubulus fase VII dan tubulus abnormal dari testis mencit yang diberi perlakuan MAA<sup>a</sup> selama empat minggu

Dosis MAA (mg/Kg bb)	Jumlah testis (n)	Diameter tubulus seminiferus (µm) ( $\bar{X} \pm SD$ )	Tebal epitel tubulus seminiferus (µm) ( $\bar{X} \pm SD$ )	Persentase tubulus seminiferus <sup>♣</sup>		
				Normal fase VII	Abnormal	
					Tidak bervakuola	Bervakuola
0 (kontrol)	5	206,68 ± 15,26	61,24 ± 6,04	31,68	0,00	0,00
100	5	203,94 ± 18,95	55,72 ± 4,22	28,08	0,33	0,42
150	5	173,38 ± 16,98**	40,83 ± 12,93**	17,40 ##	10,13#	20,39 #
225	5	157,82 ± 22,22**	25,25 ± 11,35**	12,00 ##	30,40 ##	42,04 ##
300	5	115,72 ± 6,38**	8,29 ± 1,20**	0,00 ##	0,00	100,00 ##

Berbeda dari kontrol: \* p ≤ 0,05; \*\* p ≤ 0,01 (Uji Anava dilanjutkan dengan uji BNT)  
 # p ≤ 0,05; ## p ≤ 0,05 (Uji Kruskal-Wallis dilanjutkan dengan Wilcoxon's rank sum test)  
<sup>♣</sup> di luar persentase yang tercantum ini adalah persentase tubulus normal bukan fase VII.



**Gambar 1** Sayatan histologis tubulus seminiferus mencit yang diberi perlakuan MAA selama 4 minggu (perbesaran 200 X), memperlihatkan tubulus seminiferus abnormal dengan diameter yang tereduksi dan penipisan tebal epitel pada dosis 150 mg/kg bb (B) dan yang disertai vakuolisasi pada dosis 300 mg/kg bb (C), dibandingkan dengan kontrol (A), l: lumen tubulus seminiferus v: vakuola.

abnormal tanpa vakuola, karena abnormalitas ini sudah tidak ditemukan (0%) pada dosis 300 mg/kg bb. Pada dosis tertinggi ini, penampilan tubulus seminiferus abnormal sudah lebih parah, sehingga semuanya (100%) merupakan tubulus bervakuola (Gambar 1C).

Dari tabel 4 dapat diketahui bahwa spermatis pakhiten normal dan spermatid, paling sensitif terhadap MAA, ditunjukkan oleh jumlahnya yang menurun secara sangat nyata dari kontrol mulai dosis 150 mg/kg bb. Pada dosis 300 mg/kg bb, spermatid tidak ditemukan lagi (0%). Purata jumlah spermatis pakhiten yang berdegenerasi meningkat, tetapi pada dosis 300 mg/kg bb menjadi turun

kembali (0,15) hampir sama dengan kontrol (0,11). Penurunan ini, sebenarnya merupakan gambaran dari berkurangnya jumlah spermatis pakhiten secara keseluruhan. Di antara sel-sel spermatogenik, spermatis praleptoten dan spermatogonium A paling tahan terhadap pengaruh MAA, kecuali pada perlakuan dosis tertinggi, yang menurunkan jumlahnya secara sangat nyata.

Jumlah sel Sertoli dan sel Leydig tidak berkurang secara nyata, bahkan pada dosis 300 mg/kg bb jumlahnya secara nyata meningkat, mencapai hampir dua kali lipat dari kontrol.

**Tabel 4** Jumlah sel spermatogenik, sel Sertoli, dan sel Leydig per kisi-kisi ( $64 \mu\text{m}^2$ ) pada testis mencit yang diberi perlakuan MAA selama 4 minggu

Dosis MAA (mg/kg bb)	Jumlah testis (n)	Jumlah spermatogonium A ( $\bar{X} \pm \text{SD}$ ) A	Jumlah spermatogonium ( $\bar{X} \pm \text{SD}$ ) A			Jumlah spermatid ( $\bar{X} \pm \text{SD}$ ) A	Jumlah sel Sertoli ( $\bar{X} \pm \text{SD}$ ) A	Jumlah sel Leydig ( $\bar{X} \pm \text{SD}$ ) B
			Praleptoten	Pakiten (N)	Pakiten (Dg)			
0 (kontrol)	5	0,63 ± 0,09	4,00 ± 0,41	6,78 ± 0,73	0,11 ± 0,07	14,74 ± 0,82	2,47 ± 0,29	9,54 ± 0,33
100	5	0,58 ± 0,07	3,95 ± 0,57	6,24 ± 0,64	0,16 ± 0,11	13,24 ± 1,01	2,37 ± 0,40	9,36 ± 0,75
150	5	0,56 ± 0,02	3,07 ± 0,56	4,12 ± 1,55**	0,54 ± 0,46*	7,73 ± 3,89**	2,40 ± 0,40**	9,14 ± 0,79
225	5	0,58 ± 0,08	2,95 ± 1,17	2,43 ± 1,07**	0,75 ± 0,30**	3,58 ± 3,35**	2,85 ± 0,80**	9,52 ± 1,81
300	5	0,38 ± 0,20**	1,29 ± 1,41**	0,32 ± 0,37**	0,15 ± 0,17	0,00 ± 0,00**	4,30 ± 1,52**	17,38 ± 1,24**

A= Pengamatan menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 1000X. Pakiten (N: normal; Dg : degenerasi)

B= Pengamatan menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400X.

Berbeda dari kontrol: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$  (Uji Anava dilanjutkan dengan uji BNT)

### 3.4 Pembahasan

Menurunnya berat testis akibat perlakuan MAA, disebabkan terganggunya proses spermatogenesis, yang ditandai oleh berkurangnya jumlah spermatosit, spermatid, dan spermatozoa. Beberapa peneliti sebelum ini (8,26-29) telah menyampaikan hasil yang sama dengan hasil yang diperoleh dalam penelitian ini.

Berbagai pendapat telah dikemukakan mengenai hubungan antara kehadiran MAA dengan degenerasi spermatosit. Menurut beberapa peneliti (16,19,28,31), MAA menghambat sintesis DNA dan RNA. Karena spermatosit pakhiten termasuk sel yang paling aktif mensintesis RNA (19), maka sel ini paling sensitif terhadap MAA sehingga paling banyak mengalami degenerasi. Selain itu, menurut Ghanayem & Chapin (24) MAA dapat meningkatkan permeabilitas membran sel yang mengakibatkan influks ion  $\text{Ca}^{2+}$  menjadi berlebih ( $\text{Ca}^{2+}$  overload). Melimpahnya ion  $\text{Ca}^{2+}$  di dalam sel akan menghambat fosforilasi oksidatif, sehingga perolehan ATP berkurang karena energi dipakai untuk memompa ion  $\text{Ca}^{2+}$  yang berlebih. Di samping itu terjadi pengaktifan enzim protease dan fosfolipase yang dapat mendegradasi protein-protein sitoskelet yang diperlukan dalam membangun struktur sel (24,28). Perlakuan MAA pada tikus dapat menyebabkan fragmentasi DNA dengan ciri khas apoptosis pada spermatosit pakhiten (8,19,28). Syed & Hecht (28) meneliti dasar molekuler dari degenerasi spermatosit pakhiten yang diakibatkan oleh pemberian MAA dosis 250 mg/kg bb pada tikus jantan, dengan mengamati adanya perubahan ekspresi gen di dalam sel-sel testis. Hasilnya menunjukkan adanya penurunan protein *polo-like kinase* (Plk1), yang menyebabkan kerusakan mikrotubul pembentuk benang kumparan saat meiosis. Di samping itu terjadi peningkatan protein *thiol specific antioxidant* untuk mengatasi berbagai bentuk oksidasi yang tidak normal akibat adanya oksigen reaktif dan sulfur reaktif, yang kejadiannya antara lain dapat diinduksi oleh MAA. Peningkatan antioksidan ini tetap tidak cukup untuk mengatasi proses-proses yang merusak itu, sehingga sel-sel testis terutama spermatosit pakhiten, mengalami

degenerasi. Menurut Wang *et al.* (29), pemberian 2-ME 200 mg/kg bb pada tikus dewasa, atau pendedahan tubulus seminiferus terhadap 5 mM MAA *in vitro*, mengakibatkan apoptosis pada spermatosit pakhiten, karena adanya peningkatan ekspresi tirosin kinase pp60 (c-src) di dalam spermatosit pakhiten. Pemberian senyawa inhibitor untuk Src, misalnya geldanamisin dan herbimisin A dapat mengurangi degenerasi spermatosit pakhiten.

Berkurangnya berat epididimis kauda disebabkan oleh berkurangnya jumlah spermatozoa di dalam organ itu. Selain itu, hal ini dapat pula disebabkan oleh berkurangnya cairan tubulus seminiferus hasil ekskresi sel Sertoli karena terganggunya fungsi sel Sertoli oleh adanya MAA. Dalam penelitian ini sel Sertoli memperlihatkan vakuolisasi yang nyata, meskipun jumlahnya tidak berkurang oleh perlakuan MAA, bahkan meningkat secara nyata pada dosis 300 mg/kg bb. Dengan meningkatnya jumlah sel Sertoli yang dihitung, tidak berarti bahwa sel Sertoli bertambah secara keseluruhan, melainkan karena diameter tubulus seminiferus mengecil secara nyata, maka jumlah sel yang tampak per kisi-kisi menjadi banyak. Selain itu, sel Sertoli menjadi terakumulasi karena tidak adanya sel-sel spermatogenik. Terjadinya vakuolisasi di dalam sel Sertoli dilaporkan pula oleh Li *et al.* (32).

Perkembangan dan pertumbuhan kelenjar aksesori berada di bawah pengaruh hormon testosteron. Tidak menurunnya jumlah sel Leydig, menunjukkan bahwa testosteron yang dihasilkan tidak berkurang, sehingga masih cukup untuk mempertahankan berat kelenjar vesikula seminalis.

Berkurangnya jumlah spermatid dan spermatozoa merupakan kelanjutan dari degenerasinya spermatosit pakhiten. Menurunnya motilitas spermatozoa, dapat terjadi karena mitokondria, yang merupakan sasaran pertama MAA, mengalami kerusakan dengan adanya  $\text{Ca}^{2+}$  overload, padahal mitokondria merupakan penghasil energi untuk pergerakan ekor spermatozoa. Selain itu penurunan motilitas dapat pula disebabkan oleh banyaknya spermatozoa abnormal.

Lebih tahannya spermatogonium A dan spermatosit praleptoten terhadap pengaruh MAA dikemukakan pula oleh Syed & Hecht (28). Hal ini disebabkan oleh letak kedua macam sel itu di dalam kompartemen basal, di luar kompartemen adluminal, sehingga terlindung oleh adanya *barrier* yang dibentuk oleh sel Sertoli. Oleh karena itu, spermatogonium A dan spermatosit praleptoten tidak terpengaruh oleh gangguan yang terjadi di dalam kompartemen adluminal (33). Perlindungan ini akan hilang, bila kerusakan sel Sertoli sudah terlalu parah, seperti yang terjadi pada dosis MAA 300 mg/kg bb. Menurut beberapa peneliti (16,26-28), Sel Sertoli merupakan target utama metabolit toksik dari ester asam ftalat.

Penampilan tubulus seminiferus yang abnormal disertai oleh menipisnya tebal epitel germinal dan mengecilnya diameter tubulus seminiferus, bahkan hingga bervakuola. Semua kejadian itu disebabkan oleh berdegenerasinya sel-sel spermatogenik. Menurunnya aktivitas sel Sertoli, antara lain ditandai oleh vakuolisasi di dalam sitoplasma.

Sebagai verifikasi terhadap hasil yang diperoleh dalam penelitian ini, telah dilakukan uji kawin antara mencit jantan yang diberi perlakuan MAA dengan mencit betina tanpa perlakuan. Hasilnya menunjukkan bahwa fertilitas mencit jantan menurun, dan penurunan ini belum pulih kembali setelah dilakukan uji kawin pemulihan 40 hari pascaperlakuan MAA (Rumanta *et al.*, belum dipublikasi).

Walaupun terbukti bahwa MAA dengan dosis yang digunakan dalam penelitian ini berdampak negatif terhadap organ reproduksi mencit jantan, namun hal ini baru merupakan peringatan (*warning*) bagi manusia agar mewaspadaai penggunaan plastik karena bahan pelenturnya yang berupa DMEP dapat luruh ke dalam peralut organik. Bila DMEP itu masuk ke dalam tubuh, akan diubah menjadi MAA yang bersifat toksik, dan dikhawatirkan akan merusak organ reproduksi. Oleh karena itu, disarankan agar dalam pembuatan plastik digunakan bahan pelentur lain yang lebih aman.

#### 4 Kesimpulan

Pemberian MAA dosis 100, 150, 225, dan 300 mg/kg bb secara *gavage* selama 4 minggu berturut-turut, pada mencit Swiss Webster jantan umur 7 minggu, berdampak negatif terhadap organ reproduksi, terutama terhadap testis. Akibatnya spermatogenesis menjadi terganggu disertai dengan berdegenerasinya spermatosit pakhiten dan spermatid, serta meningkatnya persentase tubulus seminiferus yang abnormal.

#### 5 Daftar pustaka

- Parkhie, M.R., Webb, M., & Norcross, M.A. Dimethoxyethyl phthalate: embryopathy, teratogenicity, fetal metabolism, and the role of zinc in the rat. *Environ. Health Perspect.*, **45**, 89-97, 1982.
- Ritter, E.J.S., Scott, W.J., Randall, J.L., & Ritter, J.M. Teratogenicity of dimethoxyethanol and methoxyacetic acid in the rat. *Teratology*, **32**, 25-31, 1985.
- Parinar, D., Srivastava, S.P., Singh, G.B., & Seth, P.K. Testicular toxicity of Di (2- ethylhexyl) phthalate in developing rats. *Vet. Human. Toxicol.*, **37**, 310-313, 1995.
- Ema, M., Harazono, A., Miyawaki, E., & Ogawa, Y. Developmental effects of di-n-butyl phthalate after a single administration in rats. *J. Appl. Toxicol.*, **17**, 223-229, 1997.
- Miller, R.R., Carreon, R.E., Young, J.T. & McKenna, M.J. Toxicity of methoxyacetic acid in rats. *Fundam. Appl. Toxicol.*, **2**, 158-160, 1982.
- Schardein, J.L. *Chemically induced birth defects*. Marcel Dekker, Inc. New York, Basel, 1985.
- Laresse, F., Fiorito, A. & De Zotti, R. The possible haematological effects of glycol monomethyl ether in a frame factory. *Br. J. Ind. Med.*, **49**, 131-133, 1992.
- Ku, W.W., Wine, R.N., Chae, B.Y., Ghanayem, B.I., & Chapin, R.E. Spermatocyte toxicity of 2-methoxyethanol in rats and guinea pigs: Evidence for the induction of apoptosis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **134**, 100-110, 1995.
- Gargas, M.L., Tyler, T.R., Sweeney, L.M., Corley, R.A., Weitz, K.K., Mast, T.J., Paustenbach, D.J., & Hays, S.M. A toxicokinetic of inhaled ethylene glycol monomethyl ether (2-ME) and validation of a physiologically based pharmacokinetic model for the pregnant rat and human. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **165**, 53-62, 2000.
- Jaeger, R.J. & Rubin, R.J. Migration of a phthalate ester plasticizer from polyvinyl chloride blood bags into stored human blood and its localization in human tissue. *N. Engl. J. Med.*, **287**, 1114-1118, 1972.
- Faouzi, M.A., Khalfi, F., Dine, T., Lucyckx, M., Brunet, C., Gressier, B., Gouldaliez, F., Cazin, M., Kablan, J., Belabed, A., & Cazin, J.C. Stability, compatibility and plasticizer extraction of quinine injection added to infusion solutions and stored in polyvinyl chloride (PVC) containers. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **21**, 923-930, 1999.
- Mettang, T., Alschner, D.M., Pauli-Magnus, C., Dunst, R., Khulman, U., & Rettenmeier, A.W.. Phthalic acid is the main metabolite of the plasticizer di (2-ethylhexyl) phthalate in peritoneal dialysis patients. *Adv. Perit. Dial.*, **15**, 229-233, 2000.
- Mayer, F.L., Staling, D.L. & Johnson, J.L. Phthalate esters as environmental contaminants. *Nature*, **238**, 411-413, 1972.

14. Wilkinson, C.F. & Lamb, J.C. The potential health effects of phthalate esters in children's toys: a review and risk assessment. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **30**, 140-155, 1999.
15. Petersen, J.H. & Breindahl, T. Plasticizers in total diet samples. baby food and infant formulae. *Food. Addit. Contam.*, **17**, 133-141, 2000.
16. Stedman, D.B. & Welsch, F. Inhibition of DNA synthesis in mouse whole embryo culture by 2-methoxyacetic acid and attenuation of the effects by simple physiological compound. *Toxicol. Lett.* **45**, 111-117, 1989.
17. Moslen, M.T., Kaphalia, L., Balasubramanian, H., Yen, Y.M., & Au, W. Species differences in testicular and hepatic biotransformation of 2-methoxyethanol. *Toxicology*, **96**, 217-224, 1995.
18. Darnanto, W., Kabir, N., Inouye, M., Takaghisi, Y., & Yamamura, H. Effects of 2-ME and MAA on preimplantation mouse embryos *in vitro*. *Environ. Med.*, **38**, 33-36, 1994.
19. Mebus, C.A., Welsch, F., & Working, P.K. The possible role of one-carbon moieties in 2-methoxyethanol and 2-methoxyacetic acid-induced developmental toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **98**, 99-109, 1989.
20. Hays, S.M., Elswick, B.A., Blumenthal, G.M., Welsch, F., Conolly, R.B., & Gargas, M.L. Development of a physiologically based pharmacokinetic model of 2-methoxyethanol and 2-methoxyacetic acid disposition in pregnant rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **163**, 67-74, 2000.
21. Rasyad, Ch., Yamashita, K., Datu, A.R., & Yasuda, M. Pattern of limb malformations in mice induced by methoxyacetic acid. *Hiroshima J. Med. Sci.*, **40**, 93-99, 1991.
22. Scott, W.J., Ritter, E.J., & Wilson, J.G. Delayed appearance of ectodermal cell death as a mechanism of polydactyly induction. *J. Embrol. Exp. Morph.*, **42**, 93-104, 1977.
23. Sudarwati, S., Surjono, T.W., & Yusuf, A.T. Efek *methoxyacetic acid* (MAA) terhadap perkembangan anggota menceit (*Mus musculus*) galur AJJ. *J. Mat. Sains*, Supl. D. **1**, 11-19, 1993.
24. Ghanayem, B.I. & Chapin, R.E. Calcium channel blockers protect against ethylene glycol monomethyl ether (2-methoxyethanol)-induced testicular toxicity. *Exp. Mol. Pathol.*, **52**, 279-290, 1990.
25. Gray, T.J.B. & Gangolli, S.D. Aspects of the testicular toxicity of phthalate esters. *Environ. Health Perspect.*, **65**, 229-235, 1986.
26. Li, L.H., Wine, R.N., & Chapin, R.E. Methoxyacetic acid (MAA)-induced spermatocyte apoptosis in human and rat testes: An *in vitro* comparison. *J. Androl.*, **17**, 538-549, 1996.
27. Berndtson & Foote, R.H. Disruption of spermatogenesis in rabbits consuming ethylene glycol monomethyl ether. *Reprod. Toxicol.*, **11**, 29-36, 1997.
28. Syed, V. & Hecht, N.B. Rat pachytene spermatocytes down-regulate a polo-like kinase and up-regulate thiol specific antioxidant protein, whereas Sertoli cells down-regulate a phosphodiesterase and up-regulate an oxidative stress protein after exposure to methoxyethanol and methoxyacetic acid. *Endocrinology*, **139**, 3503-3511, 1998.
29. Wang, W., Wine, R.N. & Chapin, R.E. Rat testicular Src: normal distribution and involvement in ethylene glycol monomethyl ether-induced apoptosis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **163**, 125-134, 2000.
30. WHO. *Penuntun Lab. WHO untuk pemeriksaan semen manusia dan interaksi semen getah serviks*. Bagian Biologi Medik, Fak. Kedokteran UNSRI, Palembang, 1992.
31. Ku, W.W., & Chapin, R.E. Spermatocyte toxicity of 2-methoxyethanol *in vivo* and *in vitro*, requirement for an intact seminiferous tubule structure for germ cell degeneration. *Toxicol. in vitro*, **8**, 1191-1202, 1994.
32. Li, L.H., Wine, R.N. Miller, D.S., Recce, J.M., Smith, M., & Chapin, R.E. Protection against methoxyacetic acid -induced spermatocyte apoptosis with calcium channel blocker in cultured rat seminiferous tubule: possible mechanism. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **144**, 105-119, 1997.
33. Zenick, H. & Glegg, E.D. Assessment of male reproductive toxicity: a risk assessment approach. *In: Principle and method of toxicology*, 2<sup>nd</sup> edition. Ed. Hayes, A.W. Raven Press., Ltd. New York. 275-306, 1989.