

DISERTASI

**MEKANISME KERJA XANTHONE SEBAGAI PROTEKTOR
PADA SPERMATOZOA DAN TESTIS MENCIT (*Balb/C*)
YANG DIINDUKSI DENGAN *2-METHOXYETHANOL***



ERNAWATI

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN JENJANG DOKTOR
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2020**

DISERTASI

**MEKANISME KERJA *XANTHONE* SEBAGAI PROTEKTOR
PADA SPERMATOZOA DAN TESTIS MENCIT (*Balb/C*)
YANG DIINDUKSI DENGAN *2-METHOXYETHANOL***

ERNAWATI

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN JENJANG DOKTOR
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2020**

**MEKANISME KERJA XANTHONE SEBAGAI PROTEKTOR
PADA SPERMATOZOA DAN TESTIS MENCIT (Balb/C)
YANG DIINDUKSI DENGAN 2-METHOXYETHANOL**

DISERTASI

**Untuk memperoleh Gelar Doktor
dalam Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor
pada Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga**

**Hari : Rabu
Tanggal : 29 April 2020
Pukul : 10.00 WIB**

Oleh:

**ERNAWATI
011617017333**

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN JENJANG DOKTOR
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2020**

LEMBAR PENGESAHAN

**MEKANISME KERJA XANTHONE SEBAGAI PROTEKTOR
PADA SPERMATOZOA DAN TESTIS MENCIT (Balb/C)
YANG DIINDUKSI DENGAN 2-METHOXYETHANOL**

TELAH DISETUJUI

PADA TANGGAL, 04 MEI 2020

**Oleh
Promotor**



**Prof. Sri Agus Sudjarwo.,Ph.D
NIP. 195609041984031004**

Kopromotor



**Dr. Reny I'tishom, M.Si.
NIP. 197110232002121001**

**Disertasi ini telah diuji dan dinilai
Oleh panitia penguji Ujian Akhir Tahap I (Tertutup)
Pada Tanggal 29 April 2020**

Panitia Penguji

Ketua : 1. Prof. Dr. H. Achmad Basori, Drs., Apt., MS.

Anggota : 2. Prof. Sri Agus Sudjarwo.,Ph.D
3. Dr. Reny I'tishom, dr., MS.
4. Prof. Win Darmanto, PhD.
5. Prof. Dr. I Ketut Suidiana, Drs., M.Si.
6. Dr. H. Budi Utomo, dr., M.Kes.
7. Dr. Dewi Hidayati, S.Si., M.Si.

Ditetapkan dengan Surat Keputusan
Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga
Tentang Panitia Penguji Disertasi
Nomor : 147/UN3.1.1/HK.04/2020
Tanggal 29 April 2020

UCAPAN TERIMA KASIH

Alhamdulillahirobbil'alamiin, saya panjatkan kehadiran Allah SWT, karena hanya dengan izin, petunjuk dan hidayah-Nya penulisan Disertasi ini dapat diselesaikan dengan baik.

Penulisan Disertasi ini merupakan tahap utama dari perkuliahan jenjang Program Doktor, Program Studi Ilmu Kedokteran, Universitas Airlangga Surabaya. Banyak tahapan yang telah dilalui dengan melibatkan banyak pihak, baik secara individual maupun institusional. Oleh karena itu, dalam kesempatan ini saya sampaikan ucapan terima kasih secara khusus yang tak terhingga dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada Prof. Sri Agus Sudjarwo, drh.,PhD. (selaku Promotor), Dr. Reny I'tishom, M.Si. (selaku Ko-promotor), yang dengan penuh kearifan, kesabaran, perhatian yang tulus ikhlas telah memberikan bimbingan, nasihat, arahan, koreksi maupun pandangan baru yang sangat berharga terkait dengan materi disertasi dan materi-materi lain yang berhubungan, merupakan bekal yang sangat berharga dan suri tauladan bagi saya.

Selain dari itu, saya ucapkan terima kasih pula yang tak terhingga kepada pihak-pihak sebagai berikut :

1. Prof. Dr. Moh. Nasih, SE., MT., Ak., CMA., selaku Rektor Universitas Airlangga Surabaya, atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan kepada saya untuk mengikuti dan menyelesaikan Program Doktor (S3) di Universitas Airlangga Surabaya.
2. Prof. Dr. Soetojo, dr., Sp.U (K), selaku Dekan Fakultas Kedokteran, Universitas Airlangga Surabaya, atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan kepada saya untuk mengikuti dan menyelesaikan Program Doktor (S3) di Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya.
3. Prof. Dr. H. Joewono Soeroso, dr., M.Sc., Sp.PD-KR., FINASIM selaku Ketua Program Studi S3 Ilmu Kedokteran, Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga yang senantiasa mengingatkan dan memotivasi saya untuk mencapai progres yang baik.
4. Prof. Win Darmanto, PhD. dengan kesabaran dan keseriusan beliau telah banyak memberikan saran, masukan dan arahan yang terkait dengan materi

secara keseluruhan Disertasi ini.

5. Prof. Dr. I. Ketut Sudyana, drs., M.Si. dengan penuh kesabaran, ketelatenan dan menyediakan waktu luang beliau, telah banyak memberikan sumbang saran, masukan dan arahan yang terkait dengan ranah imunohistokimia, mulai penyusunan materi Kualifikasi sampai penyusunan Disertasi ini.
6. Prof. Dr. Achmad Basori, drs. Apt., M.S. yang telah dengan tulus ikhlas dan kesabarannya meluangkan banyak waktu untuk berdiskusi dan memberikan input terkait dengan materi, farmakokinetik dan farmakodinamik, serta kimia farmasi sebagai materi pendukung untuk menyusun Disertasi ini.
7. Dr. H. Budi Utomo, dr., M.Kes. yang telah dengan tulus ikhlas dan kesabarannya meluangkan banyak waktunya untuk berdiskusi dan memberikan input terkait dengan materi biostatistik mulai dari penyusunan materi Kualifikasi sampai dengan penyusunan Disertasi ini.
8. Dr. Dewi Hidayati, S.Si., M.Si. dengan kesabaran, ketelatenan dan keseriusan beliau, masih menyempatkan waktunya untuk tetap memberikan masukan secara konstruktif terkait dengan materi secara keseluruhan pada Disertasi ini.
9. Orang tua, suami dan putra putri tercinta, yang telah memberikan dorongan dan semangat sebelum dan selama menempuh Program Doktor, Program Studi Ilmu Kedokteran, Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya.
10. Teman-temanku Program Doktor Program Studi Ilmu Kedokteran Fakultas Kedokteran, Universitas Airlangga Surabaya angkatan 2016 yang senantiasa memberikan support.
11. Semua pihak yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu yang telah memberikan sumbangsih pemikiran.

Gresik, 30 April 2020

Ernawati

RINGKASAN:**MEKANISME KERJA XANTHONE SEBAGAI PROTEKTOR PADA SPERMATOZOA DAN TESTIS MENCIT (Balb/C) YANG DIINDUKSI DENGAN 2-METHOXYETHANOL****Ernawati**

Infertilitas merupakan masalah di seluruh dunia dan dialami oleh 10-15% pasangan suami istri (Fritz dan Speroff, 2011). Anggapan yang berkembang di masyarakat bahwa infertil disebabkan oleh wanita, padahal pada pria juga dapat terjadi infertilitas sebesar 20-40%, pada wanita 30-55% , faktor gabungan 35% dan penyebab yang tidak dapat diketahui penyebabnya 5-15% (Mascarenhas *et al.*, 2012; Inhorn dan Patrizio, 2015). Terjadinya gangguan infertilitas pada pria ini dapat disebabkan oleh infeksi, trauma, merokok, alkohol, radiasi, diabetes melitus, penggunaan obat, keracunan logam berat (As, Pb, Cd, Hg) dan keracunan *Ethylene Glycol Monomethyl Ether (2-Methoxyethanol)*.

2-Methoxyethanol (2-ME) adalah senyawa *glycol ether* yang terdapat dalam berbagai produk industri yang meliputi cat, tinta, tiner, pernis, cat kuku, cairan hidrolis, bahan plastik, bahan bakar pesawat dan industri makanan (Johanson, 2000; Bagchi dan Waxman, 2008). *2-ME* masuk kedalam tubuh hewan dan manusia melalui inhalasi, peroral dan topical, yang selanjutnya akan di oksidasi oleh *Alcohol dehydrogenase* menjadi *methoxyaldehyde (MALD)*; dan *MALD* secara cepat di oksidasi oleh *aldehyde dehydrogenase* menjadi *methoxyacetic acid (MAA)* yang merupakan metabolit stabil dan sangat toksik (Dayan dan Hales, 2014). Beberapa peneliti melaporkan bahwa *2-ME* dan metabolitnya yaitu *MAA* dapat menyebabkan gangguan pada testis dan spermatozoa sehingga dapat terjadi infertilitas (Adedara dan Farombi, 2014; Hayati *et al.*, 2017; Kumar dan Sing, 2018).

Stres oksidatif mempunyai peran yang sangat penting pada mekanisme kerja *2-ME* dan *MAA* dalam menyebabkan penurunan kualitas dan kuantitas sel spermatozoa pada epididimis, dan kerusakan testis (Kumar dan Sing, 2018). Stres Oksidatif dapat terjadi karena adanya peningkatan *Reactive Oxygen Species (ROS)* yang meliputi *superoxide (O_2^-)*, *hydroxyl radical (*OH)*, *hydrogen peroxides (H_2O_2)* dan penurunan antioksidan endogen yang meliputi *Superoxide Dismutase (SOD)*, *Catalase* dan *Glutathion Peroxidase (GPx)*. Enzim *catalase* dan *glutathion peroksidase* bekerja dengan cara mengubah H_2O_2 menjadi H_2O dan O_2 sedangkan enzim *superoksida dismutase (SOD)* bekerja dengan cara mengkatalisis reaksi dismutasi dari radikal anion superoksida menjadi H_2O_2 (Asadi, 2017)

Ketidak seimbangan antara *ROS* dan antioksidan ini akan meyebabkan oksidasi pada lemak, protein dan *DNA* sel spermatozoa, sel Leydig dan sel Sertoli pada testis sehingga akan terjadi kerusakan oksidatif pada lemak membrane sel, molekul protein dan *DNA* yang dapat menghasilkan *Malondialdehyde (MDA)* (Kumar dan Sing, 2018).

Kerusakan sel akibat paparan *2-ME* dan *MAA* pada spermatozoa dan testis dapat dihambat dengan pemberian antioksidan (Adedara dan Farombi, 2014; Kumar and Sing, 2018). Antioksidan bekerja dengan cara mendonorkan satu

elektronnya kepada senyawa yang bersifat oksidan sehingga aktivitas senyawa oksidan tersebut dapat diredam (Winarsi, 2011). Antioksidan eksogen seperti vitamin C dan E telah dilaporkan dapat digunakan untuk melindungi kerusakan sel spermatozoa dan testis akibat meningkatnya produksi ROS (radikal bebas) pada paparan 2-ME (Uzun *et al.*, 2009, Adewoyin *et al.*, 2017).

Indonesia sebagai negara tropis yang dikenal dengan julukan *The Second Mega Biodiversity*, memiliki berbagai jenis tanaman yang diketahui mempunyai khasiat antioksidan. Beberapa peneliti melaporkan bahwa antioksidan yang berasal dari tanaman seperti *Tribulus terrestris*, *Withania somnifera*, *Garcinia kola* dan *Garcinia mangostana* dapat digunakan sebagai protektor pada kerusakan sel spermatozoa dan testis akibat paparan 2-ME (Zheleva-dimitrova *et al.*, 2012; Adedara dan Farombi, 2014; Hayati dkk., 2017; Kumar dan Sing, 2018). Beberapa penelitian telah membuktikan aktivitas farmakologi dari senyawa yang terkandung dalam *Garcinia mangostana*, mempunyai khasiat sebagai antioksidan (Zarena dan Sankar, 2009; Hadriyono, 2011; Suttirak dan Manurakchinakorn, 2014). *Garcinia mangostana* mengandung senyawa aktif *Xanthones*, *Benzophenones*, *Hydroxycitric Acid*, dan *Anthocyanins* (Chin and Kinghorn, 2008; Obolskiy *et al.*, 2009; Jindarat, 2014).

Xanthone merupakan substansi kimia alami yang tergolong senyawa *polyphenolic* yang mempunyai efek antioksidan karena *xanthone* memiliki gugus hidroksida (OH⁻) yang efektif mengikat radikal bebas di dalam tubuh. Kemampuan antioksidan *xanthone* bahkan melebihi vitamin A, C dan E yang selama ini dikenal sebagai antioksidan paling efektif dalam melawan radikal bebas yang ada dalam tubuh (Nugroho, 2009). Oleh karena *xanthone* mempunyai efek antioksidan yang sangat kuat maka perlu dilakukan penelitian untuk menjelaskan mekanisme kerja *xanthone* sebagai protektor pada kerusakan sel spermatozoa dan testis mencit yang diinduksi dengan 2-ME.

Pada penelitian ini menggunakan 35 mencit (*musculus balb/c*) yang dibagi menjadi 5 kelompok: kontrol negatif (mencit diberi CMC 0.5 % dan air distilasi setiap hari selama 38 hari); kontrol positif (mencit diberi CMC 0.5 % selama 38 hari dan pada hari ke 4 diberi 2-ME 200 mg/kg BB secara oral sekali sehari selama 35 hari); dan kelompok perlakuan (Mencit diberi *xanthone* 60 mg, 120 mg, dan 240 mg / kg BB secara oral sekali sehari selama 38 hari, dan pada hari ke 4, diberi 2-ME 200 mg/kg BB satu jam setelah pemberian *xanthone*). Pada hari ke 38 hari, mencit dikorbankan dengan menggunakan kloroform untuk diambil epididimis dan testisnya. Pada epididimis dilakukan pemeriksaan spermatozoa terhadap konsentrasi, morfologi, motilitas dan viabilitas spermatozoa, sedangkan pada testis dilakukan pemeriksaan imunohistokimia terhadap ekspresi *malondialdehyde (MDA)*, *Superoxide Dismutase (SOD)* dan *Glutathione Peroxidase (GPx)* pada sel spermatogenik, sel *Leydig* dan sel *Sertoli*. Pada testis juga dilakukan pemeriksaan histopatologi terhadap jumlah sel spermatogenik, jumlah sel *Leydig*, jumlah sel *Sertoli*, tebal epitel dan diameter tubulus seminiferus.

Pada pemeriksaan secara imunohistokimia menunjukkan bahwa pemberian 2-ME secara bermakna dapat menurunkan ekspresi *SOD*, *GPx*, dan meningkatkan ekspresi *MDA* pada sel spermatogenik, sel *Leydig* dan sel *Sertoli* bila dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif. Pada pemeriksaan secara histopatologis menunjukkan bahwa pemberian 2-ME secara bermakna menurunkan jumlah sel spermatogenik, jumlah sel *Leydig*, jumlah sel *Sertoli*, tebal epitel dan diameter

tubulus seminiferus. Pemberian *2-ME* juga menurunkan konsentrasi, morfologi, motilitas, viabilitas sel spermatozoa, jika dibandingkan dengan kontrol negatif. Namun, pada pemeriksaan imunohistokimia, pemberian *xanthone* secara bermakna dapat menghambat penurunan ekspresi *SOD*, *GPx*, dan menghambat peningkatan ekspresi *MDA* pada sel spermatogenik, sel *Leydig* dan sel *Sertoli* pada testis mencit yang diinduksi dengan *2-ME*. Pada pemeriksaan histopatologi pemberian *xanthone* secara bermakna dapat menghambat penurunan jumlah sel spermatogenik, jumlah sel *Leydig*, jumlah sel *Sertoli*, tebal epitel dan diameter tubulus seminiferus pada testis mencit yang diinduksi dengan *2-ME*. Pemberian *xanthone* juga dapat menghambat penurunan konsentrasi, morfologi, motilitas, viabilitas sel spermatozoa pada epididimis mencit yang diinduksi dengan *2-ME* dibandingkan dengan kelompok kontrol positif.

Pada penelitian ini dapat disimpulkan bahwa mekanisme kerja *xanthone* dalam memproteksi kerusakan spermatozoa dan testis mencit yang diinduksi *2-ME* yaitu melalui hambatannya terhadap peningkatan ekspresi *MDA*, dan hambatannya terhadap penurunan ekspresi *SOD* dan *GPx*.

SUMMARY:**MECHANISM OF ACTION OF XANTHONE AS PROTECTOR
ON 2-METHOXYETHANOL-INDUCED SPERMATOOZOA AND
TESTIS IN MICE (Balb/C)****ERNAWATI**

Infertility is a worldwide problem and is experienced by 10-15% of married couples (Fritz and Speroff, 2011). Assumptions that develop in society are caused by women, whereas in men infertility can also occur by 20-40%, in women 30-55%, 35% combined factors and unknown causes 5-15% (Mascarenhas *et al.*, 2012; Inhorn and Patrizio, 2015). The occurrence of infertility disorders in men can be caused by infection, trauma, smoking, alcohol, radiation, diabetes mellitus, drug use, heavy metal poisoning (As, Pb, Cd, Hg) and *Ethylene Glycol Monomethyl Ether (2-Methoxyethanol)* poisoning.

2-Methoxyethanol (2-ME) is a glycol ether compound found in various industrial products including paints, inks, varnishes, nail polishes, hydraulic fluids, plastic materials, aircraft fuels and the food industry (Johanson, 2000; Bagchi and Waxman, 2008).

2-ME enters the body of animals and humans through inhalation, peroral and topical, which then be oxidized by *alcohol dehydrogenase to methoxyaldehyde (MALD)*; and *MALD* is rapidly oxidized by *aldehyde dehydrogenase to methoxyacetic acid (MAA)* which is a stable and very toxic metabolite (Dayan and Hales, 2014). Some researchers report that *2-ME* and its metabolites, *MAA*, can cause disturbances in the testis and spermatozoa so can occur infertility.

Oxidative stress has a very important role in the mechanism of action of *2-ME* and *MAA* in causing the decrease in quality and quantity of spermatozoa cells in the epididymis, and testicular damage (Kumar and Singh, 2018). Oxidative stress can occur due to an increase in *Reactive Oxygen Species (ROS)* which includes *superoxide (O_2^-)*, *hydroxyl radical (*OH)*, hydrogen peroxides (H_2O_2) and decreased endogenous antioxidants including *Superoxide Dismutase (SOD)*, *Catalase* and *Glutathione Peroxidase (GPx)*. The enzyme catalase and glutathione peroxidase work by converting H_2O_2 to H_2O and O_2 while the *enzyme superoxide dismutase (SOD)* works by catalyzing the dismutation reaction of the *superoxide anion radical* to H_2O_2 (Asadi *et al.*, 2017)

The imbalance between *ROS* and antioxidants will cause oxidation of lipid, protein, and *DNA* of spermatozoa cells, *Leydig* cells and *Sertoli* cells in the testis so occur oxidative damage in the cell membrane lipids, protein molecules, and *DNA* that can produce *Malondialdehyde (MDA)* (Kumar and Sing, 2018).

Cell damage due to *2-ME* and *MAA* exposure to spermatozoa and testis can be inhibited by administering antioxidants (Adedara and Farombi, 2014; Kumar and Sing, 2018). Antioxidants work by donating one electron to an oxidant compound so that the activity of the oxidant compound can be muted (Asadi *et al.*, 2017). Exogenous antioxidants such as vitamins C and E have been reported to be used to protect spermatozoa and testicular cell damage due to increased production of *ROS* (free radicals) during *2-ME* exposure (Uzun *et al.*, 2009, Adewoyin *et al.*, 2017).

Indonesia as a tropical country known as the second mega biodiversity has various types of plants that are known to have antioxidant properties. Some researchers report that antioxidants derived from plants such as *Tribulus terrestris*, *Withania somnifera*, *Garcinia kola*, and *Garcinia mangostana* can be used as protectors for spermatozoa and testicular cell damage due to 2-ME exposure (Zheleva-dimitrova *et al.*, 2012; Adedara and Farombi, 2014; Hayati *et al.*, 2017; Kumar and Sing, 2018). Several studies have proven the pharmacological activity of the compounds contained in *Garcinia mangostana*, including as an antioxidant (Zarena and Sankar. 2009; Hadriyono, 2011; Suttirak and Manurakchinakorn, 2014). *Garcinia mangostana* contains active compounds *Xanthones*, *Benzophenones*, *Hydroxycitric Acid*, and *Anthocyanins* (Chin and Kinghorn, 2008; Obolskiy *et al.*, 2009; Jindarat, 2014).

Xanthones are a natural chemical substance that is classified as polyphenolic compounds which have an antioxidant effect because *xanthones* have a *hydroxyl* group (*OH*) that effectively binds to free radicals in the body. The antioxidant ability of *xanthones* even exceeds vitamins A, C and E which are known as the most effective antioxidants in against free radicals in the body (Nugroho, 2009). The *xanthones* have a very strong antioxidant effect, therefore is needed research to prove that *xanthone* can be used to prevent damage to spermatozoa and testis cells due to exposure to 2-ME.

Thirty-five male mice divided into 5 groups: negative control (mice were given daily with CMC 0.5 % and water purified by distillation for 38 days); positive control (mice were given daily with CMC 0.5 % for 38 days, and on the 4th day, were given 2-ME 200 mg/kg BW orally once in a day for 35 days); and the treatment group (mice were given the *xanthone* 60 mg, 120 mg, and 240 mg/kg BW orally once in a day for 38 days, and on the 4th day, were given 2-ME 200 mg/kg BW one hour after the *xanthone* administration). After 38 days, all of the rats were sacrificed after anesthetization by chloroform inhalation, then their epididymis and testis were excised. The testis tissues were collected to evaluate the immunohistochemical of the expression of *malondialdehyde (MDA)*, *Superoxide Dismutase (SOD)* and *Glutathione Peroxidase (GPx)* in the spermatogenic cell, *Leydig* cell, and *Sertoli* cell. Testis tissue was also taken to histological evaluations of the spermatogenic cell, *Leydig* cell, *Sertoli* cell number, the thickness of epithelium and diameter of tubules seminiferous. The concentration, morphology, motility, and viability of spermatozoa in the epididymis were also evaluated.

The immunohistochemical evaluation showed that 2-ME administration significantly decreased the expression of *SOD*, *GPx*, and increased the expression of *MDA* in the spermatogenic cell, *Leydig* cell and *Sertoli* cell. The histopathological evaluations showed that 2-ME also significantly decreased spermatogenic cell, *Leydig* cell, *Sertoli* cell number, the thickness of epithelial and diameter of tubules seminiferous. The concentration, morphology, motility, viability of spermatozoa cell were also decreased by 2-ME if were compared with the negative control. However, on immunohistochemical examination, *xanthone* administration can significantly inhibit decreased *SOD*, *GPx* expression, and inhibit increased *MDA* expression in spermatogenic cells, *Leydig* cells and *Sertoli* cells in the testes of mice induced with 2-ME. The histopathological evaluation, *xanthone* administration significantly inhibited the decreased spermatogenic cell, *Leydig* cell, *Sertoli* cell number, the thickness of epithelial and diameter of tubules seminiferous

on testis induced by *2-ME*. *Xanthone* also inhibits decreased concentration, morphology, motility, the viability of spermatozoa of epididymis cell which induced by *2-ME*, were compared with the positive control.

In this study, it can be concluded that the mechanism of action of *xanthon*es in protecting on *2-ME*-induced mice testicular damage is through its inhibition of increased *MDA* expression, and its inhibition of decreased *SOD* and *GPx* expression.