

**Pengaruh Pemberian Vitamin E Terhadap Penurunan Jumlah Sel Leydig
yang Mengalami Proses Nekrosis pada Mencit Dipapar
2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-P-Dioxin (TCDD)**

**Effect of Vitamin E on Decreased of The Leydig Cell Necrosis Number in Mice Treated
with 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-P-Dioxin (TCDD)**

¹Lailia Dwi Kusuma Wardhani, ²Widjiati, ³Roesno Darsono

¹ PPDH Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga

² Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga

Kampus C Unair : Jl. Mulyorejo Surabaya 60115

Telp. 031-5992785, Fax. 031-5993015

Email : lailia_wardhani@yahoo.com

Abstract

The aims of this research was to investigate effect of vitamin E on decreased of the Leydig cell necrosis number in mice treated with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). Male mice of BALB/c strain were administered TCDD and Vitamin E in experimental groups. Four experimental groups of a combination of TCDD and vitamin E were designed as follows: 0 ng/kg/d and 0 mg/kg/d (control negative group, P0), 100 ng/kg/d and 0 mg/kg/d (control positive group, P1), 100 ng/kg/d and 11 mg/kg/d (Group P2), 100 ng/kg/d and 20 mg/kg/d (Group P3) respectively. Vitamin E and TCDD were given by oral gavage for 5 weeks. The result indicated that TCDD increased Leydig cell necrosis number and vitamin E at 11 and 20 mg/kg/d decreased Leydig cell necrosis number. The conclusion indicated that vitamin E at 11 and 20 mg/kg/d decreased the Leydig cell necrosis number in mice treated with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD).

Keywords: vitamin E, Leydig cell, necrosis, mice, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)

Pendahuluan

Sejumlah perhatian telah difokuskan pada kelompok senyawa organik persisten (*Persistent Organic Pollutants*-POPs) yang dapat menyebabkan pencemaran lingkungan dan masalah kesehatan baik manusia maupun hewan (Dobrzyński *et al.*, 2009).

Salah satu senyawa persisten adalah dioksin yang dikeluarkan sebagai hasil samping industri, pembakaran ataupun sumber lainnya (Warlina dkk, 2008).

Paparan jangka panjang TCDD dapat menginduksi stres oksidatif, mengganggu pertahanan sistem antioksidan dalam testis

dan epididimis tikus (Latchoumycandane *et al.*, 2003), menurunkan testosteron serum dan hormon reproduksi yaitu GnRH, FSH, LH, dapat menekan jumlah spermatozoa, merusak struktur testis (Yin *et al.*, 2012), mengurangi volume dan jumlah sel Leydig (Lai *et al.*, 2005) serta dampaknya dapat menyebabkan nekrosis hingga kematian sel pada perkembangan kanker (Yoshida and Ogawa, 1999).

Vitamin E memiliki peranan pada fungsi reproduksi sebagai antioksidan (Yousef *et al.*, 2010). Vitamin E memiliki efek perlindungan yang berperan dalam kerusakan oksidatif dari testis (Chandra *et al.*, 2010), mengurangi perbanyakan ROS dan melindungi sel sperma dari hilangnya motilitas (Yousef, 2010). Hasil penelitian Yin *et al.* (2012) menyatakan bahwa vitamin E merupakan antagonis toksisitas reproduksi yang disebabkan oleh TCDD.

Berdasarkan dari beberapa penelitian di atas, maka penulis ingin mengetahui pengaruh pemberian vitamin E untuk mencegah toksisitas reproduksi yang disebabkan oleh TCDD terutama pada penurunan jumlah sel Leydig yang mengalami proses nekrosis.

Materi dan Metode Penelitian

Bahan dan Alat Penelitian

Pada penelitian ini menggunakan 20 ekor mencit jantan berumur 10 minggu strain BALB/c *Mus musculus*, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD, Analytical standart, Sigma 48599), vitamin E (α -tocopherol, Analytical standart, Sigma T3251), minyak jagung (*Mazola corn oil Switzerland*) sebagai pelarut TCDD dan vitamin E, pakan pellet komersil (pakan komplit ayam pedaging starter Br-1), air minum kemasan komersil (*club*), larutan

buffer phosphate formalin 10% untuk fiksasi, bahan yang digunakan untuk pewarnaan HE meliputi : larutan alkohol berbagai konsentrasi 70%, 80%, 90%, 95% dan alkohol absolut, larutan xylol, parafin cair, larutan mayer hematoksin dan eosin.

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: kandang hewan coba, tempat makan dan minum, timbangan digital, sonde lambung, Peralatan bedah yang digunakan untuk insisi dan pembuatan sediaan histopatologi. Alat untuk melakukan pemeriksaan sediaan histopatologi dan dokumentasi adalah mikroskop (Olympus ® CX-41) dan kamera.

Dosis TCDD dan Vitamin E

Dosis TCDD yang digunakan berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Yin *et al.* (2012) pada mencit yaitu 100 ng/kg/hari. Penentuan dosis vitamin E juga didasarkan pada penelitian Yin *et al.* (2012) dengan menggunakan dosis 20 mg/kg/hari sebagai dosis tertinggi dan kombinasi dosis 11 mg/kg/hari sebagai dosis terendah.

Perlakuan

Menyeleksi 20 ekor mencit jantan dan mengelompokkan secara random ke dalam empat kelompok, setiap kelompok terdiri dari lima ekor mencit. Melarutkan TCDD dalam *corn oil* dan diberikan secara per oral maksimal pukul 10.00 perharinya dan empat jam setelahnya diberikan vitamin E yang telah dilarutkan dalam *corn oil* serta diberikan secara per oral. Perlakuan di atas diberikan selama 35 hari.

Berikut ini tahap perlakuan pada masing – masing perlakuan :

Kelompok I : kelompok kontrol negatif (P0), pemberian pelarut *corn oil* 0,1 ml per oral selama 35 hari.

Kelompok II : kelompok kontrol positif (P1), pemberian dosis 100ng/kg/hari TCDD per oral selama 35 hari.

Kelompok III : kelompok perlakuan (P2), pemberian dosis 100ng/kg/hari TCDD per oral dan 4 jam kemudian diberi vitamin E dosis 11 mg/kg/hari per oral selama 35 hari

Kelompok IV : kelompok perlakuan (P3), pemberian dosis 100ng/kg/hari TCDD per oral dan 4 jam kemudian diberi vitamin E dosis 20 mg/kg/hari per oral selama 35 hari

Pengambilan Sampel dan Pemeriksaan Preparat

Mencit dianestesi menggunakan kloroform dalam kotak kaca, kemudian dilakukan pengambilan organ testis. Organ testis dimasukkan ke dalam tabung plastik yang terlebih dahulu diisi dengan formalin 10% sebagai fiksator. Organ testis diproses untuk pembuatan preparat histopatologi di laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga dengan melewati tahap fiksasi, dehidrasi dan clearing, infiltrasi, pembuatan blok paraffin, pengirisan dan mikrotom, pewarnaan, dan penutupan dengan *cover glass*. Pengamatan dilakukan pada tiap perlakuan dan diperoleh data rata-rata jumlah sel Leydig yang mengalami proses nekrosis dalam 10 lapang pandang tiap ulangan perlakuan pada jaringan interstitial tubulus seminiferus testis yang berbentuk segitiga. Penghitungan dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 1000x.

Data hasil pengamatan dilakukan analisis dengan Analisis Varian (ANOVA) uji *Fisher* (uji F) satu arah dengan taraf kepercayaan 95%. Jika terjadi perbedaan signifikan ($p < 0,05$) dilanjutkan dengan uji perbandingan rerata setiap kelompok perlakuan dengan uji Jarak Berganda *Duncan*. Data diproses dengan menggunakan program SPSS 20.0 *for Windows*.

Hasil dan Pembahasan

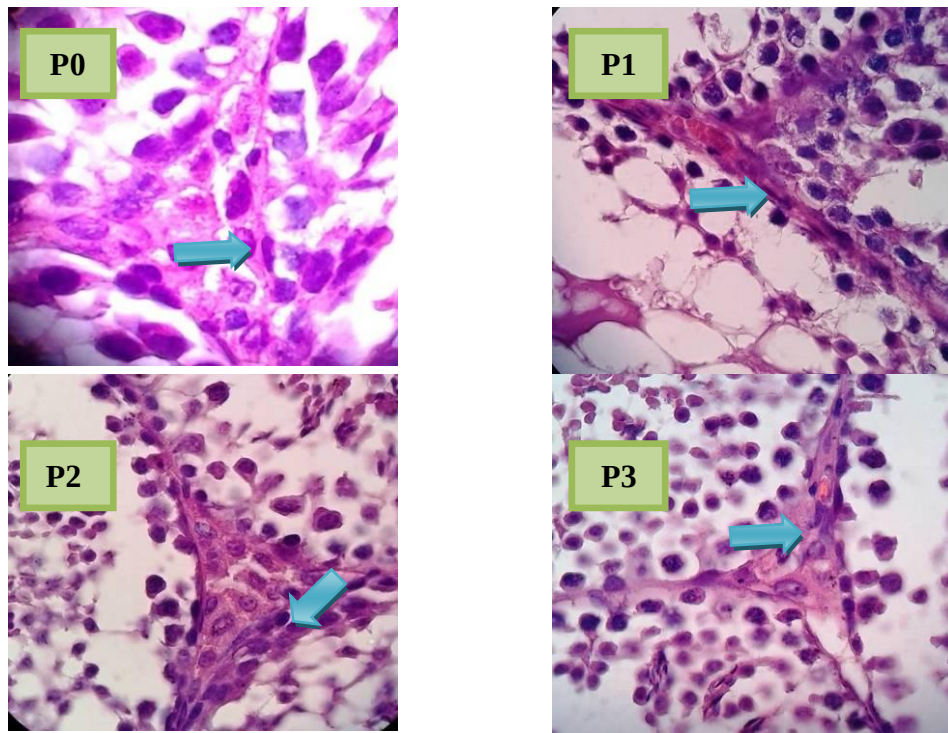
Pengamatan dilakukan secara mikroskopis. Hasil pengamatan rerata jumlah sel Leydig yang mengalami proses nekrosis pada setiap perlakuan disajikan seperti pada tabel berikut.

Tabel 1. Rerata jumlah sel Leydig yang mengalami proses nekrosis pada setiap perlakuan

Perlakuan	Jumlah sel Leydig yang mengalami proses nekrosis (rerata $\pm$ SD)
P0	2,50 ^a $\pm$ 0,16
P1	3,28 ^c $\pm$ 0,16
P2	2,92 ^b $\pm$ 0,22
P3	2,58 ^a $\pm$ 0,38

Keterangan : superskrip (^{abc}) yang berbeda dalam kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($p < 0,05$)

Berdasarkan hasil analisis statistik pada tabel 4.1 menunjukkan bahwa P0 (kelompok kontrol negatif) berbeda nyata dengan P1 (kontrol positif) dan P2, sementara tidak berbeda nyata dengan P3. Jumlah sel Leydig yang mengalami proses nekrosis paling banyak pada P1, sementara paling rendah pada P3 dan tidak berbeda nyata dengan P0 (kelompok kontrol negatif).



Gambar 2. Gambaran perubahan histopatologi testis mencit (Perbesaran 1000 kali, pewarnaan H.E.)

Gambar bertanda panah (➡) menunjukan sel Leydig yang mengalami proses nekrosis.

Gangguan degenerasi sel yang berlangsung cukup lama dan pengaruh zat toksik yang cukup besar pada sel akan melampaui ambang batas kompensasi gangguan tersebut sehingga menyebabkan nekrosis. Nekrosis ditandai dengan adanya perubahan morfologi pada inti sel yaitu piknosis, karioreksis dan kariolisis (Robbins and Kumar, 2004)

2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin akan mengikat AhR di dalam sitoplasma. Kompleks ikatan dioksin-AhR akan tertranslokasi ke inti, selanjutnya akan berheterodimer dengan faktor lain yaitu *Arylhydrocarbon Receptor Nuclear Translocator* (ARNT). Kompleks ikatan AhR-ARNT kemudian akan mengikat sekuen DNA spesifik pada urutan *Xenobiotic Responsive Elements* (XRE) dan mengubah ekspresi gen yang paling sensitive yaitu sitokrom P450 1A1 (CYP1A1) (Doi *et al.*, 2003). Menurut Yoshida and Ogawa (1999), paparan TCDD dapat meningkatkan produksi ROS

melalui biotransformasi xenobiotic yang diinduksi oleh enzim sitokrom P450 1A1 (CYP1A1). Menurut Vanlangenakker *et al.* (2008), sasaran utama kejadian ROS pada sel nekrosis salah satunya pada peroksidasi lipid. Target utama yang rentan terhadap aktivitas ROS adalah PUFA (*Poly Unsaturated Fatty Acid*) yang berada dalam membran sel. Selain itu, ROS dapat diperkuat dengan interaksi hidrogen peroksida dengan superoksida sehingga dapat meningkatkan peroksidasi lipid. Hasil dari peroksidasi lipid memiliki dampak negatif pada fosforilasi oksidatif di dalam mitokondria, peroksidasi lipid diperantarai oleh stabilisasi membran plasma dan membran intraseluler, menghasilkan pengrusakan enzim protease dan pengeluaran Ca^{2+} ke sitosol, yang selanjutnya dapat menyebabkan nekrosis.

Vitamin E memiliki efek antagonis penurunan aktivitas stres oksidasi dan penurunan Vitamin E memiliki manfaat

sebagai antioksidan (Iswara, 2009). Vitamin E berada pada bagian lemak dalam sel, melindungi fosfolipid *unsaturated* dalam membran dari degradasi oksidatif terhadap oksigen reaktif spesies tinggi dan radikal bebas yang lain (Sareharto, 2010). Menurut Yin *et al.* (2012) mekanisme efek antagonis yang ditimbulkan oleh vitamin E terhadap induksi toksisitas TCDD dapat disebabkan oleh salah satu dari mekanisme berikut. (1) Vitamin E menekan target aryl hydrocarbon receptor (AhR) yang memediasi ekspresi gen yang terinduksi oleh TCDD. (2) Vitamin E menghambat *oxidative stress* yang disebabkan oleh TCDD. dari *hydrogen dioxide* yang ditimbulkan oleh TCDD.

Vitamin E dapat melawan oksidan yang disebabkan oleh TCDD dengan cara di atas, dengan memberikan efek antioksidan sebelum adanya ROS akibat perubahan ekspresi enzim CY450 akibat induksi TCDD, sehingga vitamin E dapat mencegah dan mengurangi terjadinya proses nekrosis pada sel. Pengaruh pemberian vitamin E terhadap jumlah sel Leydig yang mengalami proses nekrosis pada dosis 11 dan 20 mg/kg/hari dapat menurunkan jumlah sel Leydig yang mengalami proses nekrosis yang ditimbulkan TCDD. Dapat dikatakan bahwa vitamin E dapat mengurangi jumlah sel Leydig yang mengalami proses nekrosis akibat paparan dari TCDD dan vitamin E berfungsi sebagai antagonis *competitive* dengan TCDD. Hal ini sesuai dengan pendapat Yin *et al.* (2012), vitamin E bertindak sebagai antioksidan akibat dari *stress oksidative* TCDD.

Kesimpulan

Berdasarkan hasil analisis penelitian, maka dapat disimpulkan bahwa pemberian vitamin E dosis 11 dan 20 mg/kg/hari dapat memberikan pengaruh terhadap penurunan jumlah sel Leydig yang mengalami proses

nekrosis pada mencit dipapar 2,3,7,8-*tetrachlorodibenzo-p-dioxin* (TCDD).

Daftar Pustaka

- Chandra, A.K., A. Chatterjee, R. ghosh, and M. Sarkar. 2010. Vitamin E-supplementation Protect Chromium (VI)-Induced Spermatogenic And Steroidogenic Disorders in Testicular Tissue of Rats. Food and Chemical Toxicology 48 : 972-979
- Dobrzyński, M., I. Calkosiński, I. Przywitowska, J. Kobierska-Brzoza, A. Czajczyńska-Waszkiewicz, E. Sołtan, and O. Parulska. 2009. Effects of Dioxins in Environmental Pollution on Development of Tooth Disorders. Polish J. of Environ. Stud. 18 (3) : 319-323
- Doi, H., T. Baba, C. Tohyama, and K. Nohara. 2003. Functional activation of arylhydrocarbon receptor (AhR) in primary T cells by 2,3,7,8-*tetrachlorodibenzo-p-dioxin*. Chemosphere 52 : 655-662
- Iswara, A. 2009. Pengaruh Pemberian Antioksidan Vitamin C dan E Terhadap Kualitas Sel spermatozoa Tikus Putih Terpajan Alletherin. Skripsi. Semarang: Universitas Negeri Semarang
- Lai, K.P., M.H. Wong and C.K.C Wong. 2005. Inhibition of CYP450scc expression in dioxin-exposed rat Leydig cells. J.of Endocrinol 185: 519-527
- Latchoumycandane, C., K.C. Chitra, and P.P. Mathur. 2003. 2,3,7,8-*tetrachlorodibenzo-p-dioxin* (TCDD) induces oxidative stress in the epididymis and epididymal sperm of adult rats. Arch Toxicol 77: 280-284
- Robbins, V.C., and C. Kumar. 2004. Buku Ajar Patologi. Jakarta: EGC
- Sareharto, T.P. 2010. Kadar Vitamin E Rendah Sebagai Faktor Resiko Peningkatan Bilirubin Serum pada

- Neonatus. Tesis Program Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro. Semarang
- Vanlangenakker, N., V.T. Berghe, D.V. Krishko, N. Fetjens and P. Vandernabeele. 2008. Molecular Mechanisms and Pathophysiology of Necrotic Cell Death: Current Molecular Medicine. 207-220
- Warlina, L., E. Noor, A. Fauzi, R.C. Tarumingkeng, dan S.H. Sutjahjo. 2008. Kebijakan manajemen lingkungan untuk emisi dioksin/furan yang bersumber dari industri logam. J. Organisme dan Manajem. 4(2) : 63-72
- Yin, H.P., J.P. Xu, X.Q. Zhou, and Y. Wang. 2012. Effect of Vitamin E on Reproductive Hormones and Testis Structure in Chronic Dioxin-Treated Mice. J. Toxicol and Industrial Health. 28(2) : 152-160
- Yoshida, R. and Y. Ogawa. 1999. Review Article Oxidative Stress Induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin: An Application of Oxidative Stress Markers to Cancer Risk Assessment of Dioxins. National Institute of Industrial Health. 21-1
- Yousef, M.I., G.A. Abdallah, and K.I. Kamel. 2003. Effect of Ascorbic Acid and Vitamin E Supplementation on Semen Quality and Biochemical Parameters of Male Rabbits. Anim Reprod Sci. 76: 99-111