

## Pengaruh Pemberian Vitamin E ( $\alpha$ -Tocopherol) terhadap Jumlah Hitung Sel Leydig pada Mencit yang dipapar 2,3,7,8 – tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)

**Effect of vitamin E ( $\alpha$ -tocopherol) on the Number of Leydig Cell in Mice Treated with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)**

**<sup>1</sup>Nuril Lisa Ramania, <sup>2</sup>Ajik Azmijah, <sup>3</sup>Wurlina**

<sup>1</sup>PPDH Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga

<sup>2</sup> Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga

Kampus C Unair, Jl. Mulyorejo Surabaya 60115

Telp. 031-5992785, Fax. 031-5993015

Email: ramania799@gmail.com

### Abstract

The goal of this research was to verify the effect of vitamin E ( $\alpha$ -tocopherol) on the number of Leydig cell in mice treated with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). Five experimental groups of a combination of TCDD and vitamin E were designed as follows: 0 ng/kg/d and 0 mg/kg/d (P0), 100 ng/kg/d and 0 mg/kg/d (P1), 100 ng/kg/d and 11 mg/kg/d (P2), 100 ng/kg/d and 20 mg/kg/d (P3), and 100 ng/kg/d and 37 mg/kg/d (P4) respectively. Vitamin E and TCDD were given by oral gavage for 9 days. The results demonstrated that 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) could have any effect on male germ cells especially Leydig cell. TCDD decreased the number of Leydig cell in interstitial seminiferous tubule. Vitamin E ( $\alpha$ -tocopherol), which is knownly well to have potential as an antioxidant, to protect the damage to the body caused by exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). Best dose of vitamin E is 37 mg/kg/d increased the number of Leydig cell as well as negative control.

**Keywords:** Vitamin E, Leydig number cell, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)

---

### Pendahuluan

Salah satu pencemaran lingkungan adalah dioksin. *Derivation of toxic equivalency factors* (TEF) menegaskan bahwa 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin(TCDD) merupakan dioksin paling toksik. TCDD berasal dari senyawa kimia yang bersifat resisten (tahan) terhadap degradasi secara fisik dan metabolismik. Sumber TCDD tidak hanya berasal dari industri atau insenerator,

tetapi dapat terjadi melalui pembakaran bahan yang mengandung klor, seperti limbah bahan organik dan produk kertas (Wakiefield, 2008, Warlina *et al.*, 2008). Bahan TCDD telah dibuktikan memiliki efek toksik pada sistem reproduksi, yaitu mempengaruhi proses steroidogenesis, yaitu di dalam sel Leydig dan berpengaruh terhadap penurunan hormon testosteron (Wilkeretal., 1995).

Vitamin E berperan pada fisiologi reproduksi jantan. Menurut Walker (2009), vitamin E merupakan agen pemicu fertilitas yang dapat menormalkan epitel tubuli seminiferi. Yin *et al.*, (2012) membuktikan bahwa vitamin E berpengaruh terhadap fungsi endokrin reproduksi, memperbaiki struktur testis, serta jumlah spermatozoa mencit yang terpapar dengan TCDD. Mekanisme vitamin E sebagai antioksidan terhadap paparan TCDD yaitu dengan memutus ikatan rantai TCDD dengan reseptor AhR (*Aryl hydrocarbon receptor*) yang terdapat pada sitoplasma sel.

Penelitian tentang pengaruh vitamin E terhadap reproduksi jantan telah banyak dilakukan, namun penelitian tentang pengaruh vitamin E terhadap reproduksi jantan khususnya jumlah sel Leydig mencit yang terpapar TCDD belum banyak. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk membuktikan pengaruh pemberian vitamin E pada berbagai dosis terhadap jumlah sel Leydig tubulus seminiferus yang berperan pada proses spermatogenesis.

## Materi dan Metode Penelitian

### Penentuan Dosis TCDD

Sebagai induktor toksik organ reproduksi digunakan 2,3,7,8–*tetrachlorodibenzo-p-dioxin* (2,3,7,8-TCDD Sigma 48599). Penelitian ini menggunakan dosis tunggal TCDD, yaitu 100 ng/kgBB/hari. Dosis TCDD ditentukan berdasarkan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Fujimaki *et al.*, (2002) dan Yin *et al.*, (2012).

### Penentuan Dosis Vitamin E

Sebagai pengobatan akibat pemberian TCDD, diberi pengobatan Vitamin E ( $\alpha$ -tocopherol Sigma Aldrich Singapore).

Menurut hasil penelitian Yin *et al.*, (2012), dosis vitamin E yang efektif adalah 20 mg/kg/BB/hari memberikan dampak yang signifikan terhadap penghambatan toksitas TCDD pada spermatogenesi dan kadar testosterone. Dosis tertinggi ditentukan berdasarkan konversi dosis manusia. Manusia mengkonsumsi bahan makanan yang mengandung vitamin sebesar 25 IU setiap harinya. Untuk mendapatkan efek yang maksimal dari vitamin E, manusia memerlukan tambahan asupan vitamin E sebesar 100-400 IU/hari. Penelitian tersebut menunjukkan bahwa dosis tersebut merupakan dosis optimal untuk mengurangi resiko penyakit kronis (*Institute of Medicine US.*, 2000) dan dikonversi pada mencit menjadi 37 mg/kgBB/hari. Dosis vitamin E yang digunakan dalam penelitian ini adalah 11 mg/kgBB/hari, 20 mg/kgBB/hari dan 37 mg/kgBB/hari

Sebagai pelarut vitamin E dan TCDD digunakan minyak jagung (*Mazol®-Coda Switzerland AG*).

### Perlakuan pada hewan coba

Penelitian ini menggunakan mencit jantan sebanyak 30 ekor berumur 11 minggu yang memiliki berat badan  $\pm$  20 gram kemudian secara acak dibagi dalam 5 kelompok perlakuan, masing-masing kelompok terdiri dari 6 ekor. Kelompok tersebut adalah sebagai berikut :

- P0 : kelompok kontrol negatif, hanya diberi corn oil 0.1 ml.
- P1 : kelompok kontrol positif, diberi TCDD dosis 100 ng/kgBB/hari.
- P2 : pemberian TCDD dosis 100 ng/kgBB/hari. Setelah empat jam, diikuti dengan pemberian vitamin E dosis 11 mg/kgBB/hari.

P3 : pemberian TCDD dosis 100 ng/kgBB/hari. Setelah empat jam, diikuti dengan pemberian vitamin E dosis 20 mg/kgBB/hari.

P4 : pemberian TCDD dosis 100 ng/kgBB/hari. Setelah empat jam, diikuti dengan pemberian vitamin E dosis 37 mg/kgBB/hari.

Pemberian TCDD dan vitamin E diberikan secara oral selama 9 hari, selanjutnya mencit dieutanasi menggunakan eter, selanjutnya testis diambil, dimasukkan dalam larutan formalin 10%. Testes dibuat preparat histopatologi dengan pewarnaan *hematoxillin-eosin* (HE) menyebabkan pemeriksaan dibawah mikroskop, sel Leydig terlihat mempunyai inti berwarna hitam kebiru-biruan dan sitoplasma berwarna merah. Penghitungan sel Leydig yaitu dengan cara memilih lima lapangan pandang berbeda secara acak dilihat dengan perbesaran 400 kali kemudian sel Leydig dari lima lapangan pandang tersebut dijumlahkan.

#### Analisis Data

Rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL). Uji ANOVA dilakukan karena data yang diperoleh merupakan data rasio. Bila terdapat perbedaan yang nyata diantara kelompok penelitian ( $p<0,05$ ), dilanjutkan dengan uji *Duncan* untuk melihat perbedaan antar kelompok kontrol dan kelompok perlakuan.

#### Hasil dan Pembahasan

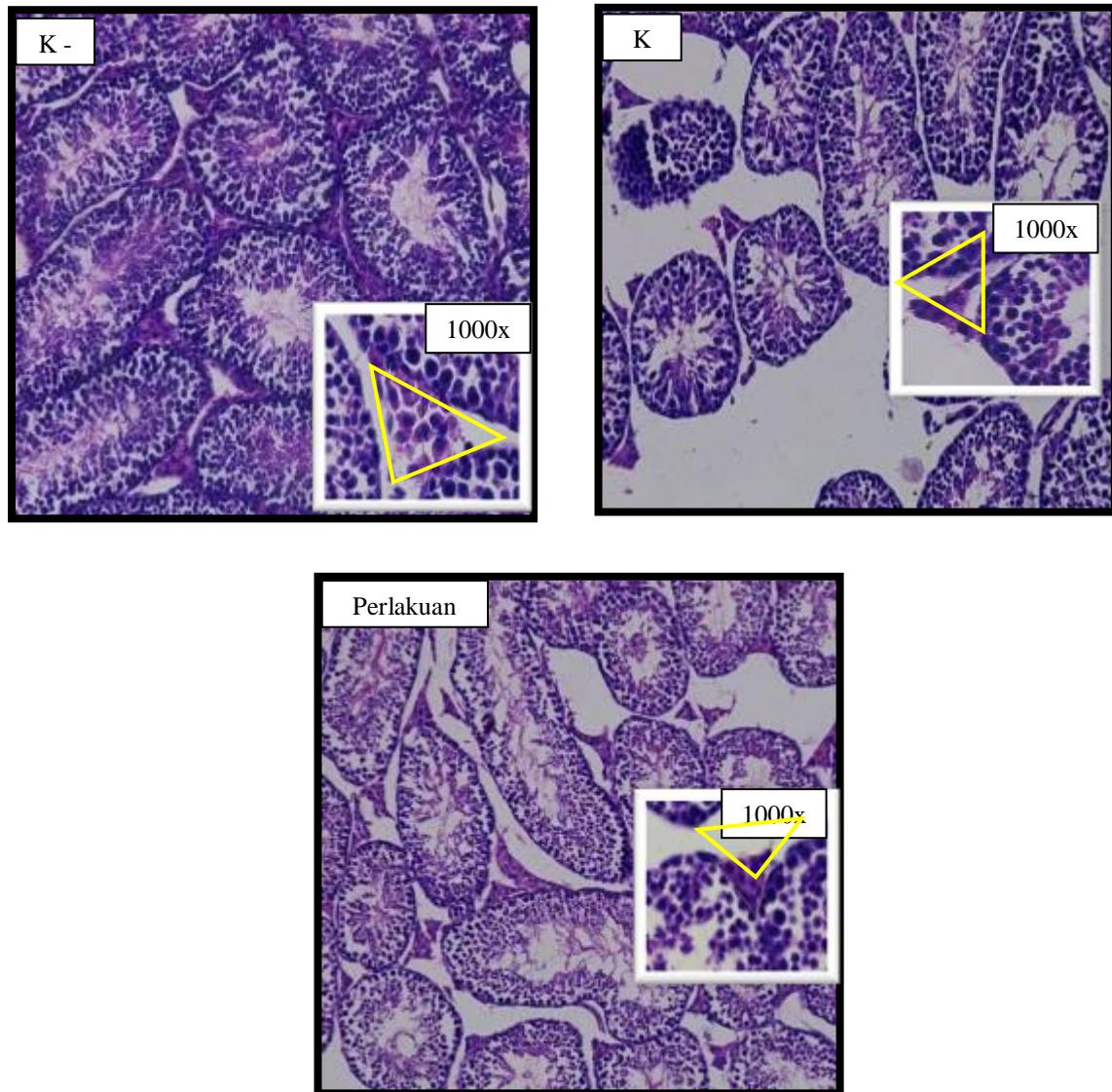
Setelah dilakukan analisis terhadap pengaruh pemberian vitamin E terhadap jumlah sel Leydig yang terpapar dengan TCDD, hasilnya dapat dilihat pada tabel 1 dan gambar 1.

Tabel 1. Rerata dan simpang baku jumlah sel Leydig mencit setelah pemberian TCDD dan Vitamin E.

Perlakuan	N	Jumlah sel Leydig ± SD
P0	6	17,7 <sup>b</sup> ± 2,85
P1	6	11,8 <sup>a</sup> ± 2,71
P2	6	13,3 <sup>a</sup> ± 2,11
P3	6	14,7 <sup>ab</sup> ± 3,10
P4	6	16,8 <sup>b</sup> ± 3,22
Total	30	

Keterangan: Superskrip dengan notasi yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ( $p<0,05$ )

Setelah dilakukan analisis data maka hasil penelitian diperoleh jumlah sel Leydig kelompok kontrol negatif (P0) tidak mempunyai perbedaan yang nyata ( $p>0,05$ ) dengan perlakuan kombinasi TCDD dan Vitamin E dosis 20 mg/kgBB/hari (P3) dan perlakuan kombinasi TCDD dan vitamin E dosis 37 mg/kgBB/hari (P4). Namun, memiliki perbedaan yang nyata ( $p<0,05$ ) dengan perlakuan positif (P1) dan perlakuan kombinasi TCDD dan vitamin E dosis 11 mg/kgBB/hari (P2). Hal ini menunjukkan bahwa pada perlakuan P3 dengan pemberian vitamin E dosis 20 mg/kgBB/hari secara terus menerus sudah mulai memberikan respon terhadap paparan TCDD sehingga jumlah sel Leydig pada perlakuan kombinasi TCDD dan vitamin E dosis 20 mg/kgBB/hari (P3) tersebut tidak berbeda dengan jumlah sel Leydig pada perlakuan kombinasi TCDD dan vitamin E dosis 37 mg/kgBB/hari (P4). Pada perlakuan kombinasi TCDD dan vitamin E dosis 37 mg/kgBB/hari (P4) tidak terdapat perbedaan jumlah sel Leydig dengan kontrol negatif (P0).



Gambar 1. Sel Leydig setelah pemberian vitamin E (K-: corn oil, K+: TCDD, Perlakuan: TCDD dan vitamin E)

Pada saat terjadinya paparan TCDD di dalam tubuh akan terbentuk kompleks senyawa TCDD-AhR-Arnt yang akan berinteraksi dengan DRE (*Dioxin Responsive Enhancer Elements*). Ikatan tersebut akan meningkatkan ekspresi sitokrom P450 terutama CYP1A1 (Doi *et al.*, 2003). ROS yang terbentuk akibat terekspresinya CYP450 mengakibatkan gangguan pada proses steroidogenesis dimana steroidogenesis merupakan salah satu sumber ROS secara fisiologis dalam sel Leydig. Di dalam sel Leydig terdapat

mediator reseptor yang disebut AR (*Androgen Receptor*), AR berperan untuk memediasi pematangan jalur steroidogenesis (Chang *et al.*, 2004). Namun, dengan terekspresinya CYP450 terjadilah ikatan CYP450 dengan AR yang berakibat pada penurunan tindakan AR pada sel Leydig dan peningkatan ROS dalam sel sehingga terjadilah kematian pada sel Leydig (Wati., 2013). Kematian pada sel Leydig ini berakibat pada penurunan jumlah sel Leydig sehingga mengakibatkan penurunan produksi hormon testosteron.

Penurunan produksi hormon testosteron dapat mengakibatkan proses spermatogenesis menurun pula.

Pada kelompok perlakuan P2, P3,P4 mengalami pemulihan jumlah sel Leydig Hal ini menunjukkan terdapat pengaruh positif dari vitamin E terhadap paparan TCDD. Berdasarkan hasil tersebut di atas dapat dinyatakan bahwa hal ini sependapat dengan penelitian Yin *et al.*, (2012) yang menyatakan bahwa TCDD menyebabkan kerusakan struktur testis, kerusakan tubulus seminiferus, degenerasi, *swelling*, penurunan jumlah spermatozoa sampai nekrosis sel spermatogonium, sel spermatosit primer, dan sel spermatosit sekunder. Salah satu kerusakan struktur testis yang ditimbulkan adalah terjadinya penurunan jumlah sel Leydig di interstitial tubulus seminiferus.

Pemberian Vitamin E dapat memproteksi kerusakan struktur testis karena fungsi vitamin E ( $\alpha$ -tocopherol) sebagai antioksidan yang dapat menghentikan reaksi berantai radikal bebas. Kemampuan vitamin E ini juga menyebabkan proses spermatogenesis di dalam tubulus seminiferus berjalan secara normal tanpa pengaruh negatif dari TCDD (Yin *et al.*, 2012). Vitamin E mampu mengendalikan peroksidasi lemak dengan menyumbangkan hidrogen ke dalam reaksi yang mampu mengubah radikal peroksil (hasil peroksidasi lipid) menjadi radikal *tocopherol* yang kurang reaktif, sehingga tidak mampu merusak rantai asam lemak dan selanjutnya melindungi sel dari kerusakan (Hariyatmi, 2004). Vitamin ini berada di dalam lapisan fosfolipid membran sel sehingga vitamin E lebih mudah untuk masuk ke dalam sel (Iswara, 2009).

### Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa pemberian vitamin E ( $\alpha$ -tocopherol) dapat menghambat penurunan jumlah sel Leydig tubulus seminiferi testis mencit dari kerusakan

akibat paparan 2,3,7,8 *tetrachlorodibenzo-p-dioxin* (TCDD).

### Daftar Pustaka

- Chang, C., Y.T. Chen and S.D. Yeh. 2004. Infertility with defective spermatogenesis and hypotestosteronemia in male mice lacking the androgen receptor in sertoli cell. Vol 101
- Doi, H., T. Baba, C. Tohyama and K. Nohara. 2003. Functional Activation of Arylhydrocarbon receptor (Ahr) in primary T-cell by 2,3,7,8 tetrachlorodibenzo-p-dioxin.
- Fujimaki, H.K. Nohara and T. Kobayashi. 2002. Effect of a single oral dose of 2,3,7,8 tetrachlorodibenzo-p-dioxin on immune function in male NC/Nga mice. Toxicology Science. 66(1) : 117-124
- Hariyatmi. 2004. Kemampuan Vitamin E Sebagai Antioksidan Terhadap Radikal Bebas Pada Usia Lanjut. MIPA. 14 (1) : 54
- Iswara, A. 2009. Pengaruh Pemberian Antioksidan Vitamin C Dan E Terhadap Kualitas Spermatozoa Tikus Putih Terpajan Alletherin. Skripsi. Semarang: Universitas Negeri Semarang.
- Kisker, O.,S. Onizuka, C.M. Becker, M. Fannom, E. Flynn, R. D'Amato, B. Zetter, J. Folkman, R. Ray, N. Sawmy and S.P. Shepherd. 2003. Vitamin D Binding protein – macrophage activating factor (DBP-maf) inhibits angiogenesis and tumor growth in mice. 5(1) : 32-40
- Latchoumycandane, C. and P.P. Mathur. 2002. Effects of vitamin E on reactive oxygen species-mediated 2,3,7,8,tetrachlorodibenzo-p-dioxin toxicity in rat testis. Applied toxicology. 22(5) : 113-118.

- Linder MC. 1996. Biokimia Nutrisi dan Metabolisme (Terjemahan: Aminuddin Parakkasi). Jakarta: Universitas Indonesia.
- Wakiefield, 2008. Public policy and retirement saving incentives in the United Kingdom”, 2008, in DeMenils, G., P. Pestieau and R. Fenge (eds.), Strategies for Pension Reform, MIT Press, 2008, (with Woojin Chung, Richard Disney and Carl Emmerson)
- Walker, W. H. 2009. Molecular mechanisme of testosterone action in spermatogenesis. Steroids 74 (2009): 602-607
- Warlina, L., E. Noor, A fauzi, R.C. Tarumingkeng, S.H. Sutjahjo. 2008 Kebijakan manajemen lingkungan untuk emisi dioksin/ furan yang bersumber dari industri logam. Jurnal organisasi dan manajemen. 4 (2) :63-72.
- Wati, W.K. 2013. Potensi Vitamin E Terhadap Jumlah Sel Spermatogenik, Diameter Tubulus Seminiferus Dan Kadar Testosteron Pada Mencit Yang Terpapar 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-P-Dioxin (TCDD). Tesis. Universitas Airlangga. Surabaya. 115-120.
- Yin HP, Xu JP, Zhou XQ, et al., 2008. Antagonistic effects of vitamin E on transcription activity of CYP450 and antioxidant enzymes genes in the liver of mice treated acutely with TCDD. Acta Zoologica Sinica 54 (6) : 1038-1043
- Yin, H.P., J.P. Xu, X.Q. Zhou, and Y. Wang. 2012. Effects of vitamin E on reproductive hormones and testis structure in chronic dioxin-treated mice. Toxicology and industrial health 28 (2): 152