

EFEK 2-METHOXYETHANOL TERHADAP STRUKTUR HISTOLOGI TESTIS MENCIT (*Mus musculus*)

Alfiah Hayati, Binti Yunaida, I.B. Rai Pidada, Win Darmanto, Dwi Winarni
Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Airlangga, Surabaya

ABSTRACT

This research has done to investigate the effect of 2-Methoxyethanol on the testicular histology of the male mice and also the influence the length of time after administration 2-ME stopped in the recovery of the spermatogenic cells and the diameter also the thicknes of seminiferous tubule. Thirty BALB/C male mice 8–9 week old, weighed 28–30 grams body weight. Those mice separated to 6 groups with 5 male mice each group. Those mice were treated with 2-ME 200 mg/kg body weight daily by intra peritoneal injection, within 3 weeks (K_1). To investigate the influence the length of time after administration 2-ME stopped, the male mice after treated by 2-ME in 3 weeks also given by the length of time after 2-ME administration stopped 1, 2, 3 and 4 weeks (P_1 , P_2 , P_3 and P_4). The control animal given by intraperitoneal administration of saline. Histological observation was performed on the number of spermatogonium, primary spermatocyte, oval spermatid and the diameter also epithelial thickness of seminiferous tubules. The data were analyzed by One-Sample T-test to investigate the differences between K_0 and K_1 . One Way ANOVA to investigate the influence the length of time after 2-ME administration stopped in the P_1 , P_2 , P_3 and P_4 and then continuing by LSD (Least Significant Difference) to show the differences groups of treatment.

The result showed that administration 2-ME could destroy the seminiferous tubules in the testes. Its presented by the decreasing of the number spermatogonium, primary spermatocyte, oval spermatid and diameter also epithelial thickness of seminiferous tubule. The length of time after administration 2-ME stopped could recover seminiferous tubules condition. Its presented by the increasing of the number spermatogonium, primary spermatocyte, oval spermatid, and diameter also epithelial tickness of seminiferous tubules. The conclusion of this research were, 2-ME could destroy the testicular histology of the male mice and the length of time after administration 2-ME stopped have linear correlation with seminiferous tubules recovery.

Key words: 2-Methoxyethanol, testicular histology, spermatogenic cells

PENGANTAR

2-Methoxyethanol (2-ME) merupakan salah satu hasil metabolit dari *dimethoxyethylphatalate* (DMEP). DMEP ini merupakan salah satu kelompok dari *phthalic acid ester* (PAEs) yang banyak digunakan sebagai *plasticizer* dalam pembuatan plastik. Dalam kehidupan sehari-hari plastik sangat banyak digunakan untuk kepentingan manusia, misalnya untuk peralatan rumah tangga, bahan pengemas, pipa air, barang mainan anak-anak, dan berbagai peralatan kedokteran atau kesehatan. Selain bermanfaat bagi kepentingan manusia, plastik juga dapat menimbulkan dampak negatif. Dampak negatif tersebut selain mencemari lingkungan air, udara, tanah dan lambat terdegradasinya, juga dapat membahayakan kesehatan manusia. Hal ini dapat terjadi karena ikatan PAEs dengan matriks polimer plastik tidak stabil sehingga dapat luruh oleh pelarut organik, dan dapat masuk ke dalam tubuh hewan dan manusia lalu menyebar ke dalam berbagai organ tubuh. Senyawa ini masuk ke dalam tubuh melalui makanan atau minuman yang dikonsumsi dan telah terkontaminasi atau terserap oleh kulit saat terjadi kontak langsung. Di antara berbagai PAEs, senyawa yang paling toksik adalah DMEP. Selain bersifat teratogenik DMEP dan turunannya, juga merupakan

toksikan pada organ reproduksi terutama pada hewan jantan, dengan testis sebagai sasaran utamanya (Butterworth *et al.*, 1995; Berndtson dan Foote, 1997). Di dalam tubuh, DMEP akan dimetabolisme menjadi 2-ME (Moslen *et al.*, 1995; Rumanta *et al.*, 2001).

2-ME juga banyak digunakan sebagai bahan pelarut organik dalam pembuatan produk-produk industri seperti pelarut cat, pelarut selulosa asetat, resin, ferneris, cat kuku, dan pewarna kayu. Beberapa senyawa dari senyawa ini digunakan sebagai fiksatif parfum dan pembuatan fotografic film (Sax dan Lewiss, 1989). Di dalam tubuh, 2-ME dioksidasi oleh *alkohol dehidrogenase* menjadi *2-methoxyacetaldehyde* (MALD) yang kemudian dimetabolisme lebih lanjut menjadi *2-methoxyacetic acid* (MAA) yang bersifat toksik oleh *aldehyde dehidrogenase* (Moslen *et al.*, 1995; Kim dan Smialowicz, 1997).

Penelitian secara *in vitro* menunjukkan bahwa MAA dapat menghambat produksi asam laktat pada kultur sel sertoli sehingga dapat mengganggu pertumbuhan spermatosit, karena laktat merupakan komponen penting sebagai sumber energi spermatosit yang sedang tumbuh (Gray *et al.*, 1985). Selain itu MAA juga dapat menghambat sintesis DNA dan RNA. Karena spermatosit pakhiten

termasuk sel yang paling aktif mensintesis RNA, maka sel ini paling sensitif terhadap MAA sehingga banyak mengalami degenerasi. MAA juga dapat menaikkan permeabilitas membran sel yang mengakibatkan influks ion Ca^{2+} menjadi berlebih. Melimpahnya ion Ca^{2+} dapat menghambat fosforilasi oksidatif, sehingga perolehan ATP berkurang. Di samping itu terjadi pengaktifan enzim *protease* dan *fosfolipase* yang dapat mendegradasi protein-protein sitoskeleton yang diperlukan dalam membangun struktur sel (Rumanta *et al.*, 2001), ion Ca^{2+} merupakan mediator terjadinya apoptosis (Li *et al.*, 1997; Krebs, 1998). Dengan berkurangnya konsentrasi MAA dalam tubuh maka berangsur-angsur sel yang mati akibat apoptosis akan diabsorpsi oleh sel Sertoli dalam tubulus seminiferus dan segera diganti dengan sel yang baru. Pada tubulus seminiferus testis, spermatogenesis terus berlangsung, dalam proses ini sel-sel spermatogonia aktif berproliferasi menghasilkan spermatisit-spermatisit baru yang siap membelah dan berkembang menjadi spermatozoa-spermatozoa yang baru.

BAHAN DAN CARA KERJA

Hewan percobaan adalah mencit jantan strain BALB/C, 30 ekor, umur 8–9 minggu, berat badan 28–30 gram. Hewan coba dikelompokkan menjadi 6 kelompok perlakuan. Masing-masing kelompok terdiri atas 5 ekor. Perlakuan dengan pemberian 2-ME dosis 200 mg/kg berat badan, setiap hari, secara intraperitoneal. Kelompok kontrol-0 (K_0) diinjeksi 0,6 ml larutan saline selama 3 minggu, kelompok kontrol-1 (K_1) diinjeksi 0,6 ml 2-ME dosis 200 mg/kg BB selama 3 minggu, dan kelompok perlakuan P_1 , P_2 , P_3 dan P_4 diberi 2-ME dosis 200 mg/kg BB selama 3 minggu setelah itu pemberian 2-ME dihentikan berturut-turut pada minggu ke-4, 5, 6, dan 7 atau pemberian 2-ME dihentikan selama 1, 2, 3, dan 4 minggu, kemudian mencit dibedah.

Setelah perlakuan terhadap hewan coba berakhir mencit dimatikan dengan cara dislokasi leher kemudian dibedah dan diambil testisnya. Testis mencit yang sudah dibersihkan dimasukkan ke dalam larutan fiksatif bouin kemudian dibuat sediaan histologi dengan pewarnaan hematoxilin eosin. Pengamatan histologi dengan mikroskop cahaya pada perbesaran $400\times$ bertujuan untuk mengamati diameter tubulus seminiferus, tebal epitel tubulus seminiferus, jumlah spermatogonium, spermatisit primer, dan spermatisit oval. Tubulus seminiferus yang diamati adalah tahap spermatogenesis VII karena pada tahap ini terdapat sel-sel spermatogenik yang diperlukan (spermatogonia, spermatisit, dan spermatisit oval) (Tienhoven, 1983).

Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis dengan Uji T untuk mengetahui perbedaan antara kelompok kontrol K_0 dengan K_1 . Analisis Variansi Satu Arah untuk membedakan adanya perbedaan nilai rata-rata antarkelompok perlakuan. Untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda digunakan uji Beda Nyata Terkecil (BNT).

HASIL

Hasil pengamatan dengan mikroskop menunjukkan adanya perbedaan kondisi penampang melintang tubulus seminiferus pada kelompok K_0 dan kelompok perlakuan lainnya, kelompok K_1 , P_1 , P_2 , P_3 , dan P_4 . Hasil pengukuran diameter dan tebal epitel tubulus seminiferus serta penghitungan jumlah sel spermatogonium, spermatisit primer dan spermatisit oval dapat dilihat pada Tabel 1.

Pengamatan terhadap tubulus seminiferus pada kelompok dengan 2-ME selama 3 minggu menunjukkan bahwa banyak tubulus seminiferus yang abnormal, diameter tereduksi dan epitel tipis dan susunan sel-sel spermatogenik tidak teratur, serta tidak dijumpai adanya spermatisit primer dan spermatisit oval. Seiring dengan penambahan lama waktu

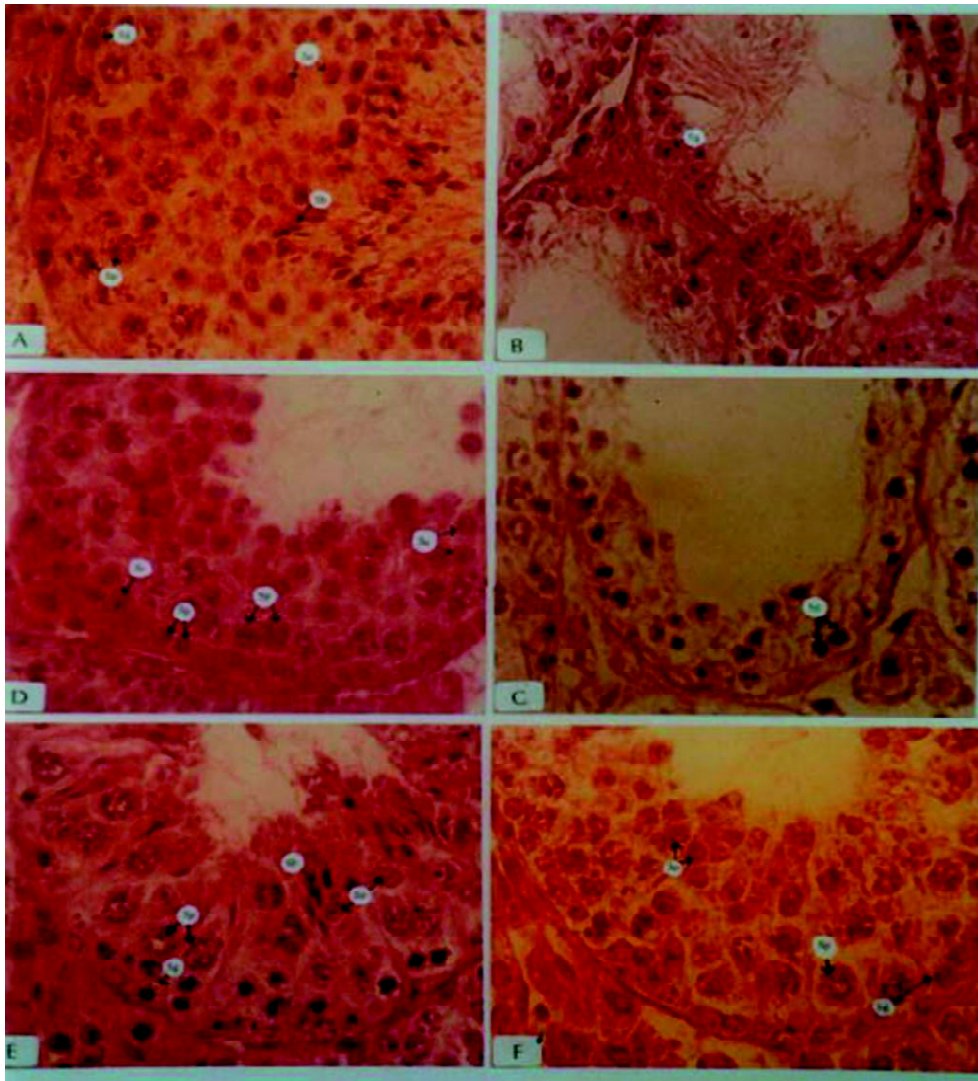
Tabel 1. Diameter dan tebal epitel tubulus seminiferus, jumlah spermatogonium, spermatisit primer dan spermatisit oval pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan

Perlakuan	Diameter tubulus seminiferus (μm)	Tebal epitel tubulus seminiferus (μm)	Jumlah spermatogonium	Jumlah spermatisit primer	Jumlah spermatisit oval
K_0	208 \pm 5,09	100,8 \pm 1,09	69,4 \pm 2,30	35,6 \pm 0,55	65,8 \pm 0,84
K_1	78,4 \pm 3,84	20,8 \pm 1,09	18,4 \pm 1,14	0	0
P_1	130 \pm 2,82	41,6 \pm 2,19	24,8 \pm 1,30	22,6 \pm 0,5	33,6 \pm 0,36
P_2	144,8 \pm 2,28	44 \pm 2,44	29,8 \pm 1,09	24,2 \pm 0,84	39,8 \pm 3,42
P_3	186,4 \pm 5,54	59,6 \pm 4,56	42,4 \pm 0,55	26,6 \pm 1,82	42 \pm 0,82
P_4	199,6 \pm 3,57	73,2 \pm 2,28	47,6 \pm 1,67	34 \pm 2,83	54,6 \pm 0,55

Keterangan: K_0 (Saline), K_1 (2-ME, 3 mgg), P_1 (2-ME, 3 mgg + 1 mgg tanpa 2-ME), P_2 (2-ME, 3 mgg + 2 mgg tanpa 2-ME), P_3 (2-ME, 3 mgg + 3 mgg tanpa 2-ME), P_4 (2-ME, 3 mgg + 4 mgg tanpa 2-ME)

penghentian pemberian 2-ME, selama 1, 2, 3, dan 4 minggu, penampang histologi tubulus seminiferus semakin membaik dan pada kelompok perlakuan P₄, kondisi tubulus seminiferusnya hampir mendekati kondisi tubulus seminiferus pada kelompok kontrol. Kondisi tubulus seminiferus yang semakin membaik tersebut ditandai dengan adanya peningkatan ukuran diameter dan tebal epitel tubulus seminiferus serta jumlah sel spermatogonium, spermatosit primer dan spermatid oval pada kelompok-kelompok dengan penambahan lama waktu setelah penghentian pemberian 2-ME (Gambar 1).

Hasil Penelitian menunjukkan bahwa pemberian 2-ME dapat menyebabkan penurunan ukuran diameter tubulus seminiferus dan tebal epitel tubulus seminiferus. Diameter tubulus seminiferus pada kelompok yang hanya diberi 2-ME saja selama tiga minggu tanpa penambahan waktu penghentian pemberian 2-ME memiliki ukuran yang jauh lebih kecil jika dibandingkan dengan kelompok kontrol (K₀). Perbandingan ukuran diameter tubulus seminiferus antara K₀ dan K₁ menunjukkan adanya penurunan sebesar 62,3%. Begitu pula dengan tebal epitel tubulus seminiferus juga mengalami penurunan sebesar 87,3% (Tabel 1). Hasil uji T

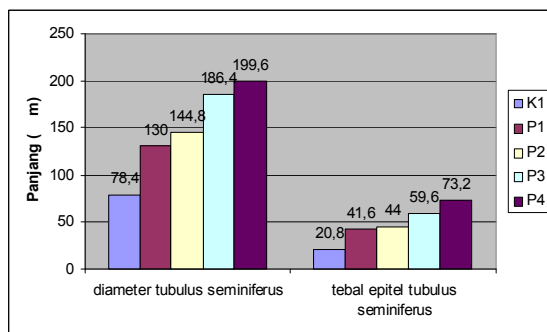


Gambar 1. Penampang histologis tubulus seminiferus mencit (*Mus musculus*) pada kelompok kontrol dan perlakuan, A = K₀, Kelompok kontrol kondisi tubulus seminiferus tampak normal ; B = K₁, tubulus seminiferusnya mengalami reduksi, diameter dan tebal epitelnya kecil dan jumlah sel spermatogeniknya sedikit, dalam gambar hanya tampak spermatogonium; C = P₁, kondisi tubulus seminiferus semakin membaik, dengan ditandai meningkatnya jumlah sel spermatogenik dan ukuran serta tebal epitel tubulus seminiferus, begitu pula untuk kelompok perlakuan dengan penambahan waktu penghentian 2-ME 2, 3, dan 4 minggu; D = P₂; E = P₃; F = P₄ ; Sg = Spermatogonium; Sp = Spermatosit primer; So = Spermatid oval; Sb = Spermatid berekor

terhadap data ukuran diameter dan tebal epitel tubulus seminiferus pada kelompok K_0 dan K_1 menunjukkan ada perbedaan nilai rata-rata yang signifikan antarkelompok perlakuan dengan nilai $\alpha < 0,05$.

Pemberian 2-ME juga menyebabkan penurunan jumlah sel spermatogonium, spermatosit primer, dan spermatid oval di dalam tubulus seminiferus pada kelompok perlakuan yang diberi 2-ME saja (K_1) jika dibandingkan dengan kelompok kontrol (K_0). Bahkan pada kelompok K_1 tidak dijumpai adanya spermatosit primer dan spermatid oval. Pada kelompok K_1 jumlah spermatogonium mengalami penurunan sebesar 73,5%. Kelompok K_1 ini tubulus seminiferusnya mengalami kerusakan yang parah akibat pemberian 2-ME. Hasil uji T terhadap data jumlah spermatogonium, spermatosit primer, dan spermatid oval pada kelompok K_0 dan K_1 menunjukkan ada perbedaan nilai rata-rata yang signifikan antarkelompok perlakuan dengan nilai $\alpha < 0,05$.

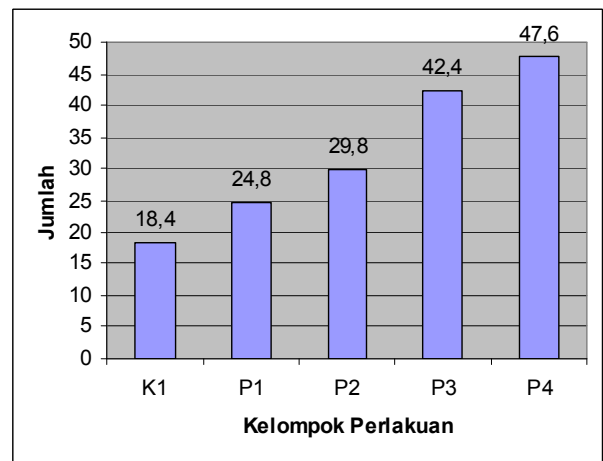
Penambahan lama waktu setelah penghentian pemberian 2-ME mampu meningkatkan ukuran diameter dan tebal epitel tubulus seminiferus jika dibandingkan dengan kelompok yang hanya diberi 2ME (K_1). Selain itu semakin lama waktu penghentian 2-ME ukuran diameter dan tebal epitel tubulus seminiferus semakin meningkat. Ukuran diameter dan Tebal epitel tubulus seminiferus pada kelompok dengan lama waktu penghentian 2-ME pada kelompok P_4 paling besar jika dibandingkan dengan kelompok P_1 , P_2 , dan P_3 . Perbandingan ukuran diameter dan Tebal epitel tubulus seminiferus antara kelompok K_1 dengan P_4 menunjukkan adanya peningkatan. Untuk diameter tubulus seminiferus meningkat sebesar 60,7% dan tebal epitel tubulus seminiferus meningkat 71,6%.



Gambar 2. Diagram efek lama waktu setelah penghentian pemberian 2-me terhadap ukuran diameter dan tebal epitel tubulus seminiferus

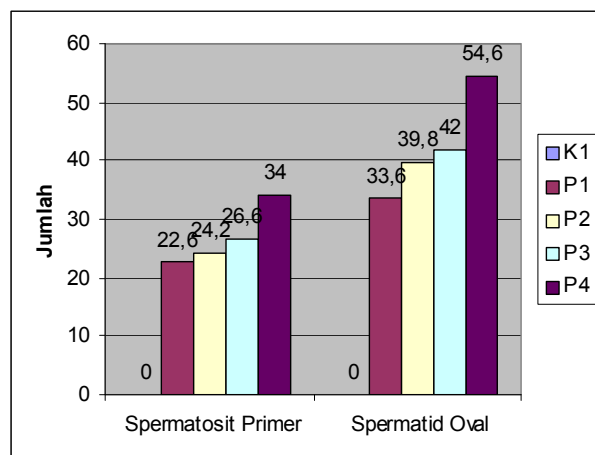
Hasil analisis variansi satu arah terhadap data ukuran diameter dan tebal epitel tubulus seminiferus pada kelompok K_1 , P_1 , P_2 , P_3 , dan P_4 menunjukkan ada perbedaan nilai rata-rata yang signifikan antarkelompok perlakuan dengan nilai $\alpha < 0,05$. Berdasarkan hasil uji BNT diketahui adanya perbedaan yang signifikan antarkelompok perlakuan kecuali untuk tebal epitel pada kelompok P_1 dan P_2 tidak menunjukkan adanya signifikansi (tidak berbeda nyata).

Jumlah spermatogonium pada kelompok yang hanya diberi 2-ME (K_1) paling sedikit jika dibandingkan dengan kelompok yang diberi penambahan waktu penghentian 2-ME (P_1 , P_2 , P_3 , dan P_4). Jumlah spermatogonium ini meningkat seiring dengan bertambahnya lama waktu penghentian 2-ME. Pada kelompok dengan penambahan waktu penghentian 2-ME selama 4 minggu (P_4) memiliki jumlah spermatogonium yang paling banyak jika dibandingkan dengan kelompok yang waktu penghentiannya selama 1, 2, dan 3 minggu (kelompok P_1 , P_2 dan P_3) (Gambar 3). Perbandingan antara kelompok K_1 dengan P_4 menunjukkan adanya peningkatan jumlah spermatogonium sebesar 61,3%.



Gambar 3. Diagram efek lama waktu penghentian pemberian 2-me terhadap jumlah spermatogonium

Spermatosit primer dan spermatid oval pada kelompok K_1 tidak dijumpai. Pada kelompok dengan lama waktu penghentian pemberian 2-ME dijumpai spermatosit primer dan spermatid oval yang jumlahnya semakin meningkat seiring dengan bertambahnya lama waktu penghentian 2-ME (Gambar 4).



Gambar 4. Diagram efek lama waktu penghentian pemberian 2-me terhadap jumlah spermatosit primer dan spermid oval

Hasil analisis variansi satu arah dari jumlah sel spermatogonium, spermatosit primer dan spermatid oval pada kelompok K₁, P₁, P₂, P₃, dan P₄ menunjukkan ada perbedaan nilai rata-rata yang signifikan antarkelompok perlakuan dengan nilai $\alpha < 0,05$. Berdasarkan uji BNT dari jumlah spermatogonium dan spermatid oval diketahui adanya perbedaan yang signifikan antarkelompok perlakuan, sedangkan uji BNT pada jumlah spermatosit primer menunjukkan perbedaan yang signifikan antarkelompok perlakuan kecuali pada kelompok P₁ dengan P₂ tidak menunjukkan adanya signifikansi (tidak berbeda nyata).

PEMBAHASAN

Pada penelitian ini menurunnya ukuran diameter dan tebal epitel tubulus seminiferus karena pemberian 2-ME menyebabkan terganggunya proses spermatogenesis yang ditandai dengan berkurangnya jumlah sel spermatogenik pada kelompok perlakuan jika dibandingkan dengan kelompok kontrol, karena MAA sebagai hasil metabolit 2-ME menyebabkan degenerasi pada sel spermatogenik yang rentan terhadap polutan terutama spermatosit pakhtien dan spermatid (Rumanta *et al.*, 2001). Pada kelompok K₁ jumlah sel spermatogenik paling sedikit jika dibandingkan dengan kelompok perlakuan lain P₁, P₂, P₃, dan P₄, bahkan pada kelompok ini tidak dijumpai adanya spermatosit primer dan spermatid oval di dalam tubulus seminiferus.

Spermatosit primer tidak dijumpai pada kelompok K₁, hal ini menunjukkan bahwa spermatosit primer merupakan sel spermatogenik yang banyak mengalami degenerasi akibat dari pemberian 2-ME. Senyawa ini di dalam tubuh dimetabolisme dalam sel hepatosit oleh alkohol

dehidrogenase menjadi 2-methoxyacetaldehyde dan kemudian dimetabolisme lagi oleh aldehyd dehidrogenase menjadi MAA yang bersifat toksik. MAA dapat menyebabkan nekrosis pada sel spermatogenik, karena nekrosis itu sendiri adalah bentuk klasik dari kematian sel, yang dikendalikan oleh lisis sel maupun kehilangan aktivitas sifat kimia sel yang terjadi bila sel mengalami kerusakan karena faktor fisik atau kekurangan oksigen (Darmanto, 1994; Ku *et al.*, 1994). MAA ini dapat menghambat pembentukan DNA dan RNA pada spermatosit primer khususnya pada tahap spermatosit pakhtien, sel ini paling sensitif terhadap MAA karena sel tersebut termasuk sel yang paling aktif mensintesis RNA (Gray *et al.*, 1985; Rumanta *et al.*, 2001). Senyawa ini menyebabkan fragmentasi DNA dengan ciri khas apoptosis pada spermatid pakhtien. MAA juga dapat meningkatkan permeabilitas membran sel yang mengakibatkan influks ion Ca²⁺ menjadi berlebih (*Ca²⁺ Overload*). Melimpahnya ion Ca²⁺ di dalam sel akan menghambat fosforilasi oksidatif, sehingga perolehan ATP (energi) berkurang karena energi dipakai untuk memompa ion Ca²⁺ yang berlebih. Di samping itu melimpahnya ion Ca²⁺ juga mengaktifkan enzim protease dan fosfolipase yang dapat mendegradasi protein-protein sitoskeleton yang diperlukan dalam membangun struktur sel, karena ion Ca²⁺ juga merupakan mediator terjadinya apoptosis (Li *et al.*, 1997; Krebs *et al.*, 1998; Rumanta *et al.*, 2001). Spermatid oval tidak dijumpai pada kelompok K₁, karena spermatid oval juga merupakan sel spermatogenik yang rentan terhadap pengaruh MAA. Selain itu pada kelompok ini tidak ada spermatosit primer yang akan berkembang menjadi spermatid oval (Rumanta *et al.*, 2001).

Ukuran diameter dan tebal epitel tubulus seminiferus serta jumlah sel spermatogenik semakin meningkat seiring dengan penambahan lama waktu setelah penghentian pemberian 2-ME. Hal ini disebabkan karena di dalam tubulus seminiferus walau banyak sel-sel spermatogenik yang rusak oleh MAA, tetapi pada dasarnya kemampuan regenerasi epitel tidak seluruhnya rusak (Valentine *et al.*, 1999; Ku *et al.*, 1995), karena di dalam tubulus seminiferus terdapat sel spermatogenik yang mempunyai ketahanan lebih terhadap pengaruh MAA yaitu spermatogonium A dan spermatosit praleptoten (Rumanta *et al.*, 2001). Spermatogonium A dan spermatosit praleptoten ini lebih tahan terhadap pengaruh MAA karena kedua macam sel ini terletak dalam kompartemen basal, di luar kompartemen adluminal, sehingga terlindung oleh adanya barrier yang dibentuk oleh sel Sertoli. Hal ini juga terlihat pada kelompok K₁, pada kelompok ini walaupun tubulus seminiferus mengalami kerusakan yang cukup parah tetapi masih

ditemukan beberapa sel spermatogonium. Selain itu di dalam tubulus seminiferus sel spermatogenik yang mati karena pemberian 2-ME baik berupa apoptosis maupun nekrosis akan segera dihilangkan dan segera digantikan dengan sel spermatogenik baru. Sel spermatogenik yang rusak atau abnormal tersebut diabsorpsi oleh sel Sertoli. Oleh karena itu setelah pengaruh 2-ME hilang dari dalam tubuh akibat pemberian lama waktu penghentian 2-ME spermatogenesis dapat berlangsung kembali. Dalam proses spermatogenesis, spermatogonium aktif berproliferasi secara terus-menerus sehingga dihasilkan spermatosit baru yang pada akhirnya akan tumbuh menjadi spermatid dan spermatozoa baru. Dengan demikian kondisi tubulus seminiferus dapat pulih kembali.

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa *2-Methoxyethanol* yang diberikan pada mencit jantan dapat menyebabkan kerusakan tubulus seminiferus, yaitu adanya penurunan jumlah spermatogonium, spermatosit primer, spermatid oval dan ukuran diameter serta tebal epitel tubulus seminiferus. Serta lama waktu penghentian setelah pemberian 2-ME selama 3 minggu mampu memberi kesempatan testis untuk melakukan pemulihan. Keadaan ini mampu meningkatkan diameter dan ketebalan epitel tubulus seminiferus serta jumlah sel spermatogenik. Semakin lama waktu penghentian pemberian 2-ME (4 minggu atau pada minggu ke-7 setelah pemberian 2-ME selama 3 minggu) semakin memperbaiki ukuran diameter tubulus seminiferus, tebal epitel tubulus seminiferus, jumlah sel spermatogonium dan meningkatkan pembentukan spermatosit primer serta spermatid oval.

KEPUSTAKAAN

- Berndtson WE, and Foote RH, 1997. Disruption of spermatogenesis in rabbits consuming ethylene glycol monomethyl ether. *Reproductive Toxicology* 11: 29–36.
- Brown NA, Holt D, Webb M, 1984. The teratogenicity of methoxyacetic acid in the rat. *Toxic Lett*: 22: 93–100.
- Butterworth M, Creasy D, Timbrell JA, 1995. The detection of subchronic testicular damage using urinary creatine: studies with 2-methoxyethanol. *Teratology* 69: 209–11.
- Darmanto W, Sudarwati S, Lien AS, 1994. Effects of methoxyacetic acid on prenatal development of mice. *Environ Med*; 38: 25–8.
- Gray TJB, Moss EJ, Creasy DM, and Gangolli SD, 1985. Studies on The Toxicity of some Glycol Ethers and Alcoxyacetic acids in Primary Testicular Cell Cultures. *J. Toxicology and Applied Pharmacology* 79: 490–501.
- Kim BS dan Smialowicz RJ, 1997. The Role of Metabolism in 2-ME-induced Suppression of in vitro Polyclonal Antibody Responses by Rat and Mouse Lymphocytes. *J. Toxicology and Applied Pharmacology* 123: 227–39.
- Kreb J, 1998. The Role of Calcium in Apoptosis. *Biometal* 11: 375–82.
- Ku WW and Chapin RE, 1994. Spermatocyte toxicity of 2-methoxyethanol *in vivo* and *in vitro*: requirement for an intact seminiferous tubule structure for germ cell degeneration. *Toxicol.*, 8: 1191–202.
- Ku WW, Wine RN, Chae BY, Ghanayem BI, and Chapin RE, 1995. Spermatocyte toxicity of 2-methoxyethanol (ME) in rats and guinea pigs: evidence for the induction of apoptosis. *Toxicol. Appl. Pharmacol* 134: 100–10.
- Li LH, Wine RM, Chapin RE, 1997. Methoxyacetic acid (MAA)-induced spermatocyte apoptosis in human and rat testes: An *in vivo* comparison. *J. Androl* 17: 538–49.
- Moslen MT, Kaphalia L, Balasubramanian H, Yin YM, and Au WW, 1995. Species differences in testicular and hepatic biotransformation of 2-methoxyethanol. *Toxicology* 96: 217–24.
- Rumanta M, Tien WS, S. Sudarwati, 2001. Pengaruh Asam Metoksiacetat terhadap Organ Reproduksi Mencit. *J. Kedokteran dan Farmasi* 33: 61–7.
- Sax NI dan Lewiss RJ, 1989. Dangerous Properties of industrial Materials, 7th edition. Van Nostrand Reinhold, Melbourne, US.
- Tienhoven VA, 1983. Physiology of Vertebrates, Cornell University Press, London.
- Valentine R, AJ. O’neill KP, Lee GL, and Kennedy, 1999. Subchronic inhalasi toxicity of diglyme, *Food and Chemical Toxicology* 37: 75–86.

Reviewer: **Prof. Dr. Sutiman B. Sumitro**