

PENGARUH PEMBERIAN RANITIDINE TERHADAP SPERMATOGENESIS TIKUS *Wistar* DENGAN INTOKSIKASI METANOL AKUT DILIHAT SECARA HISTOPATOLOGIS

James Otniel¹, Muhamad Thohar Arifin², Ika Pawitra Miranti³

¹Mahasiswa Program Studi S-1 Ilmu Kedokteran Umum, Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro

²Staf Pengajar Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro

³ Staf Pengajar Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro
JL. Prof. H. Soedarto, SH., Tembalang-Semarang 50275, Telp. 02476928010

ABSTRAK

Latar belakang: Metanol memiliki efek toksik melalui metabolitnya yaitu asam format yang mengakibatkan gangguan spermatogenesis. Ranitidine mempunyai enzim yang dapat menghambat terbentuknya metabolit asam format sehingga diharapkan akan mengurangi efek toksisitas dari metanol terhadap fungsi spermatogenesis.

Tujuan: Untuk mengetahui seberapa besar pengaruh pemberian ranitidine pada tikus *Wistar* jantan yang terintoksikasi metanol akut terhadap gambaran histopatologi spermatogenesis.

Metode: Penelitian ini memakai desain *true experimental post test only control group*. Tikus *Wistar* jantan usia 2-3 bulan (n=15) secara random dibagi menjadi 3 kelompok yaitu kelompok kontrol negatif (n=5), kelompok kontrol positif (n=5), dan kelompok perlakuan (n=5). Selama 14 hari, dilakukan pemberian metanol per *oral* untuk kelompok kontrol positif dan perlakuan, diikuti injeksi ranitidine per *intraperitoneal* 1 jam setelah pemberian metanol untuk kelompok perlakuan. Kemudian dilakukan terminasi tikus dan testisnya diambil untuk dibuat preparat dengan pengecatan HE. Selanjutnya, pemeriksaan spermatogenesis dilakukan dengan menggunakan skor Johnsen.

Hasil: Kelompok kontrol positif secara signifikan (p<0.05) menunjukkan spermatogenesis yang lebih buruk dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif. Pemberian ranitidine pada tikus yang terintoksikasi metanol akut secara signifikan (p<0.05) menunjukkan spermatogenesis yang lebih baik dibandingkan dengan kelompok kontrol positif. Tidak terdapat perbedaan spermatogenesis antara kelompok yang diberikan ranitidine dengan kelompok kontrol negatif.

Kesimpulan: pemberian ranitidine pada tikus yang terintoksikasi metanol akut dapat mengurangi gangguan spermatogenesis secara histopatologis

Kata kunci: ranitidine, metanol, spermatogenesis

ABSTRACT

THE EFFECT OF RANITIDINE TO THE SPERMATOGENESIS OF *WISTAR* RATS WITH ACUTE METHANOL INTOXICATION SEEN FROM THE HISTOPATHOLOGY

Background: Methanol has a toxic effect that destructs spermatogenesis directly or indirectly with the presence of formic acid. Ranitidine has an enzyme which inhibits the formation of formic acid metabolite, so that it will decrease the toxicity from methanol towards spermatogenesis function.

Aim: To examine how great is the effect of ranitidine in *Wistar* rats with acute methanol intoxication to spermatogenesis histopathological picture.

Methods: Using true experimental design with post test only control group, male Wistar rats at age 2-3 months (n=15) were randomly divided into 3 groups, (Negative control (n=5), positive control (n=5), and treatment group (n=5)). For 14 days, methanol intoxication was given orally to the positive control and treatment group, followed by injecting ranitidine intraperitoneally 1 hour after methanol was given to the treatment group. After termination, the testis was taken to be processed histologically with HE stain. Spermatogenesis examination was done using the Johnsen score.

Results: The group of rats with acute methanol intoxication significantly ($p < 0.05$) showed worse spermatogenesis than the negative control group. The giving of ranitidine to the group of rats with acute methanol intoxication significantly ($p < 0.05$) showed better spermatogenesis than the one without ranitidine (positive control group). There was no difference in spermatogenesis between the treatment group and the negative control group.

Conclusion: Ranitidine decreases the disruption of spermatogenesis in acute methanol intoxication.

PENDAHULUAN

Metanol merupakan senyawa yang sangat mudah diabsorpsi oleh tubuh manusia baik secara *ingesti*, inhalasi, maupun kontak langsung dengan kulit sehingga mudah menyebabkan toksisitas akibat dari hasil metabolismenya dalam tubuh yaitu asam format. Sering kali metanol disalahgunakan dengan dikonsumsi secara berlebihan yang menimbulkan banyak korban akibat efek toksisitas metanol ini sehingga banyak ditemukan kasus keracunan metanol diakibatkan minuman keras oplosan yang beredar di pasaran.¹

Intoksikasi methanol ini berpengaruh dalam mekanisme kerja dari hipotalamo-pituitari-gonadal *axis* (HPG *axis*) yang hasil akhirnya yaitu terganggunya produksi maupun sekresi dari hormon testosteron, *luteinizing hormone* (LH) dan *follicle-stimulating hormone* (FSH).² Berdasarkan mekanisme gangguan tersebut, dapat berakibat pada abnormalitas perkembangan morfologi dan maturasi spermatozoa, berkurangnya produksi dari sperma, atrofi gonad, dan bahkan infertilitas.^{2,3} Penelitian sebelumnya menemukan bahwa 42% pria yang mengalami infertilitas adalah peminum alkohol (Chia, et.al).³

Sejatinya, pencegahan angka infertilitas akibat keracunan metanol dapat dilakukan melalui tindakan, seperti memberikan terapi untuk mencegah efek toksik dari metanol. Pada kasus keracunan metanol, biasanya digunakan etanol sebagai terapinya. Namun karena harganya yang mahal, maka dilakukan penelitian untuk terapi kuratif alternatif pada toksisitas metanol yang telah dibuktikan melalui penelitian oleh *El-Bakary et al* bahwa ranitidin dapat menjadi terapi alternatif pada toksisitas metanol.⁴ Ranitidine bekerja dengan menghambat enzim alkohol dehidrogenase dimana enzim ini dibutuhkan metanol untuk metabolisme nya

menjadi bentuk yang toksik. Dengan adanya ranitidin ini maka pembentukan dari metabolit toksik hasil metabolisme metanol akan berkurang atau tidak terbentuk.⁵

Berdasarkan latar belakang tersebut diatas, maka akan dilakukan penelitian untuk menilai pengaruh pemberian ranitidine terhadap spermatogenesis tikus *Wistar* yang diberi paparan metanol dengan parameter abnormalitas yang terjadi pada gambaran histopatologi. Belum ada penelitian tentang efek ranitidin terhadap HPG *axis* akibat intoksikasi metanol dengan mengamati spermatogenesis secara mikroskopik.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan rancangan penelitian *post test only control group*, menggunakan 15 ekor tikus *Wistar* jantan yang memenuhi kriteria inklusi (berat badan 150-250 gram dan usia 2-3 bulan). Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ranitidine dan variabel tergantungnya adalah gambaran histopatologis spermatogenesis.

Tikus coba dikelompokkan menjadi 3 kelompok perlakuan dengan *allocation random sampling* menjadi kelompok kontrol negatif (tidak diberikan ranitidine dan metanol), kelompok kontrol positif (diberikan metanol 3 gr/kg berat badan per *oral*), dan kelompok perlakuan (diberikan metanol 3 gr/kg berat badan per *oral*, diikuti injeksi ranitidine 30 mg/kg berat badan per *intraperitoneal* 1 jam setelah pemberian metanol) yang masing-masing kelompok diberikan perlakuan selama 14 hari. Kemudian dilakukan terminasi tikus dengan dislokasi servikal dan testisnya diambil untuk dibuat preparat dengan pengecatan HE. Selanjutnya, pemeriksaan spermatogenesis dilakukan dengan menggunakan skor Johnsen dengan melihat 5 lapang pandang masing-masing preparat.⁶ Analisis data menggunakan uji hipotesis *Kruskal-Wallis* untuk menguji secara keseluruhan lalu menggunakan uji *Mann-Whitney* untuk menguji antar kelompok perlakuan.

HASIL

Tubulus seminiferous pada kelompok kontrol negatif paling banyak ditemukan dengan skor Johnsen 10 (epitel tubulus normal, spermatogenesis lengkap, lumen tubulus terbuka, dan sel spermatozoa lebih atau sama dengan 10), yaitu 10 tubulus (40%). Tubulus seminiferous pada kelompok kontrol positif sebagian besar ditemukan dengan skor yang lebih buruk yaitu skor Johnsen 8 (epitel tubulus rusak dan sel spermatozoa kurang dari 10), sebanyak 16

tubulus (64.0%). Kelompok perlakuan didapatkan dua skor Johnsen dalam jumlah tubulus yang sama yakni skor Johnsen 8 dan skor Johnsen 10, sebanyak 10 tubulus masing-masing dengan persentase 40%. Analisa deskriptif dapat dilihat pada tabel 1 berikut:

Tabel 1. Analisa deskriptif

Kelompok	Skor Johnsen				
	n (%)				
	5	7	8	9	10
Kontrol negatif	0 (0.0%)	1 (4.0%)	5 (20.0%)	9 (36.0%)	10 (40.0%)
Kontrol positif	3 (12.0%)	4 (16.0%)	16 (64.0%)	2 (8.0%)	0 (0.0%)
Perlakuan	0 (0.0%)	0 (0.0%)	10 (40.0%)	5 (20.0%)	10 (40.0%)

Hasil analisa uji hipotesis dengan uji *Kruskal-Wallis* dapat dilihat pada tabel 2 berikut:

Tabel 2. Uji *Kruskal-Wallis*

Kelompok	p
Kontrol negatif	0.000
Kontrol positif	
Perlakuan	

Data ini menunjukkan adanya perbedaan gambaran histopatologi spermatogenesis yang bermakna ($p < 0.05$) pada ketiga kelompok tikus. Hasil tersebut menunjukkan paling tidak terdapat perbedaan antar dua kelompok, maka uji dilanjutkan dengan uji hipotesis analisis antar kelompok dengan uji *Mann-Whitney* untuk mengetahui perbedaan gambaran histopatologi spermatogenesis tiap dua kelompok tikus. Hasil analisa uji *Mann-Whitney* dapat dilihat pada tabel 3 berikut:

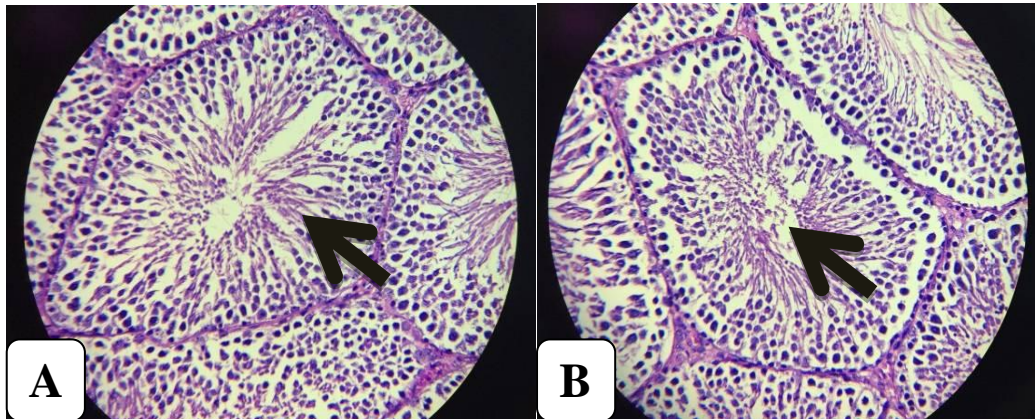
Tabel 3. Uji *Mann-Whitney*

Kelompok	Kontrol Positif	Perlakuan
Kontrol negatif	$p = 0.000^*$	$p = 0.607$
Kontrol positif		$p = 0.000^*$

*Bermakna bila $p < 0.05$

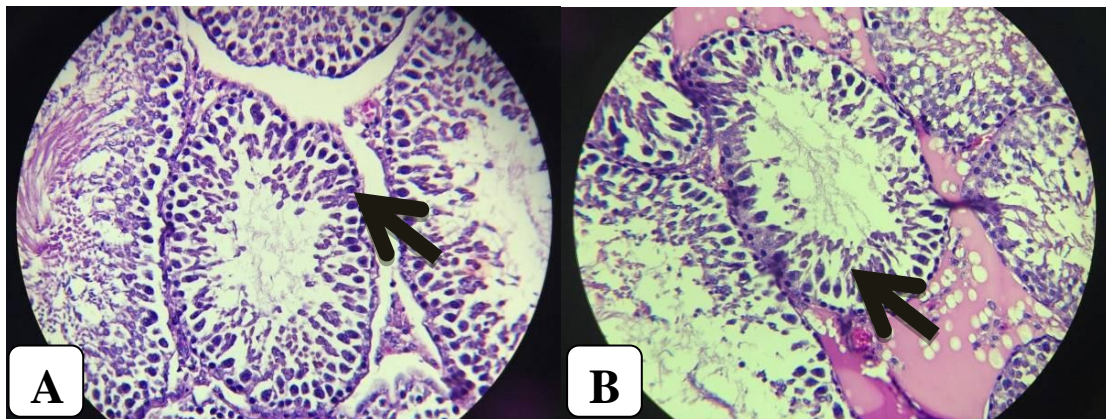
Data tabel diatas menunjukan adanya perbedaan bermakna ($p < 0.05$) terhadap gambaran histopatologi spermatogenesis pada kelompok 1 dan 2, kelompok 2 dan 3. Namun, untuk kelompok 1 dan 3 tidak didapatkan adanya perbedaan yang bermakna ($p > 0.05$).

Gambaran histopatologi spermatogenesis pada kelompok kontrol negatif (dapat dilihat pada gambar 1) secara keseluruhan memperlihatkan gambaran spermatogenesis yang baik, yaitu gambaran epitel tubulus yang normal, spermatogenesis yang lengkap, lumen tubulus seminiferous terbuka, dan didapatkan sel spermatozoa dengan jumlah lebih atau sama dengan 10.



Gambar 1. Gambaran histopatologi spermatogenesis kelompok kontrol negatif: (A) Perbesaran 400x; panah hitam: sel spermatid (B) Perbesaraan 400x; panah hitam: sel spermatozoa

Hal ini menunjukkan bahwa sebagian besar gambaran histopatologi spermatogenesis pada kelompok kontrol negatif ini dalam keadaan normal yaitu ditandai dengan terdapatnya membrana basement yang intak, progresi yang normal epitel germinal mulai dari spermatogonia, spermatosit, spermatid, dan spermatozoa yang lengkap.⁷ Gambaran hasil spermatogenesis yang baik ini disebabkan sampel tikus yang digunakan dalam kondisi sehat tanpa faktor-faktor yang dapat mengganggu proses spermatogenesis seperti usia, infeksi, dan nutrisi.⁸⁻¹²

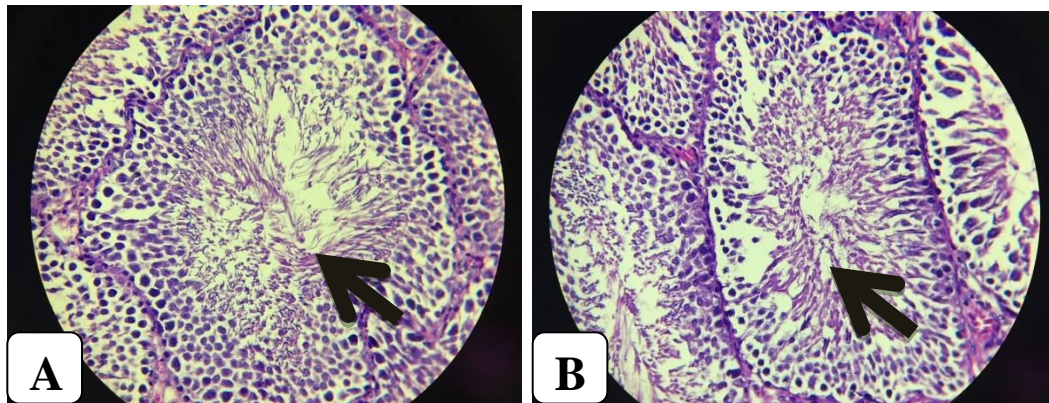


Gambar 2. Gambaran histopatologi spermatogenesis kelompok kontrol positif: (A) Perbesaran 400x; panah hitam: sel spermatogonium (B) Perbesaraan 400x; panah hitam: sel spermatisit

Gambar 2 diatas memperlihatkan histopatologi spermatogenesis yang mengalami kerusakan dan lebih buruk jika dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif dilihat dari hasil skoring Johnsen. Sebagian besar tubulus seminiferous (64%) mendapat skor 8, 16% tubulus seminiferous mendapat skor 7. Hasil tersebut menunjukkan keadaan hipospermatogenesis yaitu keadaan dimana terdapatnya seluruh stadium sel germinal, namun terjadi penurunan dari jumlah sel.⁷ Terdapat 12% tubulus seminiferous yang mendapat skor 5, yaitu tidak adanya spermatid maupun spermatozoa yang mengindikasikan bahwa adanya gangguan dalam proses spermatogenesis. Keadaan ini disebut sebagai germ cell maturation arrest yaitu tidak adanya salah satu atau lebih stadium sel germinal dalam proses spermatogenesis, dalam hal ini tidak adanya spermatid maupun spermatozoa.⁷ Hanya 8% tubulus seminiferous saja yang mendapat skor 9.

Uji hipotesis komparatif dengan Mann-Whitney antara kelompok kontrol negatif dengan kelompok kontrol positif menunjukkan hasil yang bermakna. Hal ini berarti adanya perbedaan yang bermakna antara kedua kelompok tersebut, dalam hal ini kelompok kontrol positif mempunyai gambaran histopatologi spermatogenesis yang lebih buruk dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif berdasarkan hasil skoring Johnsen. Hasil ini juga mendukung penelitian sebelumnya oleh Oremosu et al yaitu efek intoksikasi alkohol baik secara akut maupun kronik dapat menurunkan kadar testosteron, meningkatkan stress oksidatif, dan juga menurunkan parameter semen.¹³ Mekanisme metanol dalam mengganggu proses spermatogenesis ini yaitu melalui hasil metabolitnya asam format dengan mekanisme langsung yaitu menurunkan fungsi tubulus seminiferous, maupun tidak langsung yaitu

pengaruhnya kepada hipotalamo-pituitari-gonadal *axis* yang berdampak pada menurunnya kadar hormon testosteron dan LH, dimana kedua hormon ini sangat dibutuhkan dalam proses spermatogenesis.^{2,3,14-16} Intoksikasi metanol akut juga menyebabkan peningkatan dari stres oksidatif yang menyebabkan kerusakan testis dan menghambat proses spermatogenesis.³



Gambar 3. Gambaran histopatologi spermatogenesis kelompok Perlakuan: (A) Perbesaran 400x; panah hitam: sel spermatid (B) Perbesaraan 400x; panah hitam: sel spermatozoa

Gambar 3 diatas memperlihatkan kelompok perlakuan (kelompok dengan intervensi pemberian metanol dan ranitidine) sebagian besar tubulus seminiferousnya (40%) mendapat skor 10 dan skor 8, 20% tubulus seminiferous sisanya mendapat skor 9. Data ini menunjukkan secara keseluruhan proses spermatogenesis berjalan normal yaitu spermatogenesis sempurna ditandai dengan membrana basement yang intak, progresi yang normal mulai dari spermatogonium, spermatosit, spermatid, dan spermatozoa (skor Johnsen 10). Namun sebagian lainnya mendapatkan skor Johnsen 8 yang menunjukkan keadaan hipospermatogenesis yaitu semua stadium sel germinal dalam spermatogenesis lengkap, namun dalam jumlah yang berkurang.⁷ Uji hipotesis komparatif *Mann-Whitney* antara kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol positif menunjukkan hasil bermakna ($p=0.000$). Hal ini berarti adanya perbedaan yang bermakna antara kedua kelompok tersebut, dalam hal ini kelompok perlakuan mempunyai gambaran histopatologi spermatogenesis yang lebih baik dibandingkan dengan kelompok kontrol positif berdasarkan hasil skoring Johnsen.

Gambaran histopatologi spermatogenesis pada kelompok perlakuan menunjukkan keadaan yang lebih baik dibandingkan dengan kelompok kontrol positif karena pemberian ranitidine. Ranitidine memiliki sifat sebagai penghambat enzim alkohol dehidrogenase,

sehingga metanol yang masuk ke dalam tubuh, tidak diubah menjadi formaldehid dan asam format.¹⁷ Dengan adanya ranitidine, maka asam format tidak akan terbentuk, efek toksiknya pun dapat dihindarkan. Tidak terganggunya proses spermatogenesis pada intoksikasi metanol yang diintervensi dengan ranitidine membuktikan penelitian sebelumnya mengenai ranitidine sebagai alkohol dehidrogenase inhibitor.¹⁷

Uji hipotesis komparatif *Mann-Whitney* menunjukkan perbedaan yang tidak bermakna ($p > 0.05$) pada kelompok kontrol negatif dan kelompok perlakuan. Hal ini sesuai dengan hipotesis peneliti bahwa gambaran histopatologi spermatogenesis pada kelompok perlakuan dan kelompok kontrol negatif adalah sama yaitu tidak adanya gangguan spermatogenesis.

Penelitian ini dapat dipengaruhi oleh berbagai faktor yaitu kemungkinan adanya faktor stres tikus dan keterbatasan penelitian ini antara lain adalah tidak dilakukan pemeriksaan parameter reproduksi jantan lainnya meliputi kadar testosteron, kadar FSH, kadar LH, diameter dan tebal dari tubulus seminiferous, dan analisis sperma secara kualitatif. Selain itu tikus mempunyai kadar folat yang lebih tinggi dari manusia, yang mengakibatkan sensitivitas tikus berkurang terhadap toksisitas metanol, sehingga diperlukan pemberian nitrous oksida secara inhalasi untuk menurunkan kadar folat dalam tikus untuk mendapatkan kondisi yang sama seperti pada manusia.^{5,8,18-21} Pada penelitian ini belum dapat melakukan pemberian nitrous oksida karena keterbatasan yang ada, namun penelitian ini dapat digunakan sebagai salah satu tahap uji praklinik dalam penggunaan ranitidine sebagai obat dalam mengurangi toksisitas metanol. Untuk memaksimalkan penelitian selanjutnya, alangkah lebih baik jika memperhatikan keterbatasan-keterbatasan yang ada pada penelitian ini supaya didapatkan hasil yang optimal.

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Pemberian ranitidine pada tikus yang terintoksikasi metanol akut memberikan gambaran histopatologi spermatogenesis yang lebih baik dibandingkan dengan tikus yang tidak diberikan ranitidine. Tidak terdapat perbedaan gambaran histopatologi spermatogenesis antara kelompok tikus *Wistar* terintoksikasi metanol akut yang diberi ranitidine dengan kelompok yang tidak diberi ranitidine maupun metanol.

Saran

Perlu dilakukannya penelitian lanjutan yaitu dengan melakukan pemberian nitrous oksida inhalasi pada tikus terintoksikasi metanol akut yang diintervensi dengan ranitidine untuk lebih menggambarkan kondisi pada manusia terkait kadar asam folat sebagai lanjutan uji praklinik yang telah dilakukan peneliti.

Selain itu, perlu studi lanjutan untuk memeriksa parameter lain untuk menilai proses spermatogenesis seperti menghitung kadar testosteron, kadar FSH, kadar LH, diameter dan tebal dari tubulus seminiferous, dan analisis sperma secara kualitatif.

DAFTAR PUSTAKA

1. Organization WH. Methanol Poisoning Outbreaks [Internet]. 1978 [cited 2016 Jan 28]. p. 510–1.
2. Emanuele MA, Emanuele N V. Alcohol's Effects on Male Reproduction [Internet]. 1998 [cited 2016 Feb 6].
3. Oremosu a. a., Akang EN. Impact of alcohol on male reproductive hormones, oxidative stress and semen parameters in Sprague–Dawley rats. *Middle East Fertil Soc J* [Internet]. 2015;20(2):114–8.
4. Chia SE, Lim ST, Tay SK. Factors associated with male infertility: a case-control study of 218 infertile and 240 fertile men. *BJOG* [Internet]. 2000;107(1):55–61.
5. Halisa S, Prayitnaningsih S, Way O. Perbandingan Efek Ranitidin , Dexametason dan Kombinasinya terhadap Kadar Asam Format Darah dan Pelepasan Sitokrom C Retina pada Model Tikus Intoksikasi Metanol Akut Comparison of Ranitidine , Dexamethasone and Their Combination Effect on Blood Formic Aci. 26(3):171–5.
6. M Rashed, N Ragab, A Shalaby WR. Patterns Of Testicular Histopathology In Men With Primary Infertility. *Internet J Urol*. 2007;5.
7. Mushtaq H, Alam S, Khan MA. Histopathological Patterns of Testicular Biopsies in Male Infertility Introduction: Male infertility contributes to about 20%. *J Islam Med Dent Coll*. 2013;2(4):81–6.
8. Suckow MA, Weisbroth SH, Franklin CL. *The Laboratory Rat* [Internet]. Academic Press; 2005 [cited 2016 Feb 7]. 928 p.
9. Zemunik T, Peruzovic M, Capkun V, Zekan L, Tomic S, Milkovic K. Reproductive ability of pubertal male and female rats. *Brazilian J Med Biol Res* [Internet]. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*; 2003 Jul [cited 2016 Feb 7];36(7):871–7.
10. Cheah Y, Yang W. Functions of essential nutrition for high quality spermatogenesis [Internet]. 2011 [cited 2016 Feb 8].
11. Fountain S, Holland MK, Hinds LA, Janssens PA, Kerr PJ. Interstitial orchitis with impaired steroidogenesis and spermatogenesis in the testes of rabbits infected with an attenuated strain of myxoma virus. *J Reprod Fertil* [Internet]. 1997 May [cited 2016 Feb 8];110(1):161–9.
12. Naumenko VA, Tiulenev IA, Pushkar' DI, Segal AS, Kovalev VA, Kurilo LF, et al. [Effect of herpes simplex virus on spermatogenesis]. *Urol (Moscow, Russ 1999)* [Internet]. Jan [cited 2016 Feb 8];(6):32–6.

13. Oremsu AA, Akang EN. Impact of alcohol on male reproductive hormones, oxidative stress and semen parameters in Sprague–Dawley rats. *Middle East Fertil Soc J* [Internet]. 2015 Jun [cited 2016 Jan 28];20(2):114–8.
14. Mendelson J, Mello N, Ellingboe J. Effects of acute alcohol intake on pituitary-gonadal hormones in normal human males. *J Pharmacol Exp Ther* [Internet]. 1977 Sep 1 [cited 2016 Jan 28];202(3):676–82.
15. Hafez ES, Lobl T. *Male Fertility and Its Regulation* [Internet]. Springer Science & Business Media; 2012 [cited 2016 Feb 6]. 496 p.
16. Dosumu OO, Osinubi AAA, Duru FIO. Alcohol induced testicular damage: Can abstinence equal recovery? *Middle East Fertil Soc J* [Internet]. 2014 Sep [cited 2016 Feb 7];19(3):221–8.
17. El-Bakary A a, El-Dakrory S a, Attalla SM, Hasanein N a, Malek H a. Ranitidine as an alcohol dehydrogenase inhibitor in acute methanol toxicity in rats. *Hum Exp Toxicol* [Internet]. 2010;29(2):93–101.
18. Barceloux DG, Krenzelok EP, Olson K, Watson W. American Academy of Clinical Toxicology Practice Guidelines on the Treatment of Ethylene Glycol Poisoning. Ad Hoc Committee. *J Toxicol Clin Toxicol*. 1999;37(5):537–60.
19. Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ. *Basic and Clinical Pharmacology*, 11th Edition [Internet]. McGraw Hill Professional; 2009 [cited 2016 Jan 28]. 1232 p.
20. Modi JP. *Modi's Medical Jurisprudence and Toxicology* 23rd Edition, 4th [Internet]. 1969 [cited 2016 Jan 28].
21. Barlowe CK, Appling DR. Nitrous oxide exposure reduces hepatic C1-tetrahydrofolate synthase expression in rats. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. Academic Press; 1988 Nov [cited 2016 Jun 17];157(1):245–9.