

**EFEK PEMBERIAN 2-METOKSIETANOL SELAMA NEURULASI TERHADAP
MENURUNNYA KEMAMPUAN KOGNITIF ANAK MENCIT (*Mus musculus*) SWISS
WEBSTER JANTAN PADA UJI MENGGUNAKAN SHUTTLE BOX**

Yuanita Windusari
Jurusan Biologi FMIPA Universitas Sriwijaya

ABSTRACT

*The study to investigate the effects of prenatal 2-methoxyethanol (2-ME) exposure, a solvent extensively used in various industries, and is derived from the plasticizer called dimethoxyethyl phthalate (DMEP), on the learning behaviour and memory of male Swiss Webster mice (*Mus musculus*) has been conducted. Dams on gestation days 7-10 (group I) or gestation days 14-17 (group II) were injected subcutaneously with 50 and 100 mg/kg body weight (bw) a single dose of 2-ME with a volume of 0.1 ml/10 g bw. Controls were given sterilized bidistilled on gestation days 7-17. The dams were allowed to deliver spontaneously and to rear their offspring, which were adjusted at postnatal day 4, until weaning postnatal day 21. Postweaning behaviour was performed by 9 weeks old males for learning and memory ability by avoidance learning test using shuttle box. Brains were weighed and fixed in Bouin's solution until tough, then the length and width of cerebrum were measured, and the razor blade sectioning on the brain was performed to observe the ventricular dilatation for detecting the presence of internal hydrocephaly. The results showed that prenatal 2-ME exposure caused postweaning behavioural deviations in the offspring. The postweaning F1 generation, 2-ME lowered the learning and memory ability showed by the decrease of the avoidance rate in the avoidance learning test. It can be concluded that prenatal 2-ME exposure administered subcutaneously produces behavioural deviations in the postnatal F1 generation of Swiss Webster mice (*Mus musculus*). The brain weight and cerebral width decreased.*

Keywords: 2-methoxyethanol, shuttle box, behavioural deviation, internal hydrocephaly

LPENDAHULUAN

2-Metoksietanol (2-ME) merupakan senyawa hasil metabolisme dimetoksietil ftalat (DMEP) yakni salah satu ester ftalat (*phthalic acid esters* atau PAEs) yang umum

digunakan sebagai *plasticizer* serta pelarut dalam industri kimia. *Plasticizer* dapat luruh akibat adanya pelarut organik dan suhu tinggi karena ikatan matriks polimer yang tidak stabil.

Penggunaan plastik yang sangat luas dan lambatnya degradasi plastik memungkinkan PAEs berpotensi sebagai pencemar lingkungan di perairan, tanah maupun udara (Wilkinson & Lamb, 1999). 40-60% produk akhir plastik mengandung PAEs (Kaiin, 1998). PAEs juga ditemukan di dalam hati dan jaringan tubuh tikus, hati domba, tubuh ikan, makanan, dan di dalam tubuh pasien penerima transfusi darah (Jaeger dan Rubin, 1972) serta produk formula bayi (Petersen & Breindahl, 2000).

DMEP bersifat sangat toksik (Rasjad *et al.*, 1991) dan dihidrolisis menjadi 2-ME dan MAA dengan dikatalisis oksidasi oleh enzim ADH dan ALDH (Ritter *et al.*, 1985; Johanson, 1999), dengan produk antara MALD. 2-ME dan MAA terbukti bersifat toksik dan teratogenik pada mamalia sehingga berpotensi pula sebagai teratogen bagi manusia (Gargas *et al.*, 2000).

Teratogenisitas DMEP dan 2-ME disebabkan oleh MAA (Hays *et al.*, 2000) dan oksidasi MAA dapat dihambat dengan pemberian 4-metil pirazol (Theorell *et al.*, 1969 dalam Ritter *et al.*, 1985) sehingga teratogenisitas DMEP dan 2-ME berkurang (Kitagawa *et al.*, 2000).

Proses detoksifikasi 2-ME menyebabkan:

1) glukuronidasi membentuk 2-metoksietil β -D-glukuronida. 2) sulfatasi membentuk 2-metoksietilsulfat, 3) demetilasi membentuk etilen glikol yang diubah menjadi asam glikolat, dan akhirnya membentuk glisin. Detoksifikasi adalah cara tubuh untuk mengubah metabolit agar dapat larut dengan sangat baik di dalam air dan dapat diekskresi.

2-ME masuk ke dalam tubuh melalui pernafasan, kontak langsung atau dikonsumsi secara tidak sengaja (US EPA, 1994; Boman *et al.*, 2000) akan diabsorpsi dan menyebar dengan cepat, terutama ke dalam hati, ginjal, sumsum tulang, epididimis dan berbagai jaringan (Johanson, 1999). 2-ME akan diekskresi dalam bentuk urin dan CO₂ (Groeseneken *et al.*, 1989). Meskipun tidak terakumulasi di dalam tubuh, namun pendedahan 2-ME secara kontinu dalam waktu yang lama memungkinkan terjadinya akumulasi. Salah satu organ target 2-ME yakni sistem saraf. Waktu paruh biologis 2-ME di dalam tubuh manusia adalah 77,5 jam dan mencapai 2-20 hari bila berada di lingkungan (US EPA, 1998).

2-ME bersifat toksik yaitu sebagai toksin reproduksi, neurotoksin, hematotoksin,

imunotoksin, dan bersifat karsinogenik pada hewan (CEPA, 2000). Pada manusia, mengakibatkan kelainan hematologis, kelainan sistem saraf, gangguan sistem reproduksi, dan gangguan sistem imun (Gargas *et al.*, 2000; Kitagawa *et al.*, 2000). Gangguan sistem saraf menyebabkan sakit kepala, *fatigue*, *apathy*, gangguan tidur serta menurunnya jumlah sel darah (Johanson, 1999). Selain itu, terhadap sistem reproduksi, 2-ME meningkatkan kejadian oligospermia dan azospermia (Li *et al.*, 1996), dan meningkatkan aborsi spontan serta anak lahir dengan kelainan kongenital berupa *hipospasia*, malformasi wajah dan keterbelakangan mental (Johanson, 1999; CEPA, 2000).

Pemberian 2-ME dosis 250 mg/ kg bb dan 325 mg/kg bb pada saat neurulasi memunculkan eksensefali dan spina bifida pada fetus mencit (Terry *et al.*, 1996; Windusari, 2002), sejalan dengan kematian sel-sel neuroepitel (Ambroso *et al.*, 1998). Perkembangan sistem saraf pusat sangat rentan terhadap pengaruh berbagai senyawa toksik karena perkembangannya yang lebih lama dibandingkan organ tubuh lainnya. Terhambatnya perkembangan sistem saraf

pusat berdampak pada perilaku (Vorhees, 1986). Gangguan biokimiawi otak, terutama konsentrasi neurotransmitter juga berefek terhadap perilaku (Johnson, 1999). Nelson & Brightwell (1984) menyatakan bahwa 2-ME berpotensi sebagai teratogen perilaku.

Pemberian teratogen pada tahap pascaorganogenesis dapat menyebabkan kelainan fungsional yang mungkin baru tampak setelah dewasa (Werboff & Gottlieb, 1963). Salah satu kelainan perilaku yang baru terdeteksi saat dewasa adalah kemampuan belajar dan mengingat. Perilaku merupakan indikator fungsional proses-proses integratif dari sistem saraf pusat dan sistem saraf tepi, dan indikator sensitif adanya efek toksik dan teratogenik suatu xenobiotik, sebelum gejala klinis dan kelainan struktural muncul (Spyker, 1975; Johnson & Kochlar, 1983).

1.1 Permasalahan

Pemberian 2-ME selama neurulasi menyebabkan munculnya eksensefali dan spina bifida sejalan dengan kematian sel-sel neuroepitel. Kurangnya jumlah sel neuroepitel menyebabkan terganggunya perkembangan otak serta berefek terhadap perilaku. Penyimpangan perilaku mungkin

baru terdeteksi pascalahir atau setelah dewasa. 2-ME berpotensi sebagai teratogen perilaku.

Oleh karena masih kurangnya informasi mengenai efek 2-ME terhadap perilaku pascalahir, maka dilakukan penelitian untuk membuktikan bahwa pemberian 2-ME selama neurulasi menyebabkan penyimpangan perilaku yang diperlihatkan dengan menurunnya kemampuan belajar dan mengingat anak mencit (*Mus musculus*) Swiss Webster jantan pada uji dengan menggunakan *shuttle box*.

1.2 Tujuan penelitian

Untuk mengetahui efek pemberian 2-ME selama neurulasi dalam menyebabkan menurunnya kemampuan kognitif anak mencit (*Mus musculus*) Swiss Webster jantan pada uji menggunakan *shuttle box*.

III. BAHAN DAN PROSEDUR KERJA

3.1 Hewan percobaan dan bahan uji

Hewan uji adalah mencit (*Mus musculus*) Swiss Webster yang dikembangbiakan di Rumah Hewan Departemen Biologi-ITB. Ruang pemeliharaan bersuhu 27,52°C dengan

kelembaban relatif 84,69%, dan penerangan listrik selama 12 jam (pukul 06.00-18.00 WIB). Pakan adalah standar untuk anak babi CP 551, produksi PT Charoen Pokphand Indonesia. Pakan dan minum diberikan secara *ad libitum*. Bahan uji yang digunakan adalah 2-ME cair yang diproduksi oleh Wako Pure Chemical Industries Ltd. dengan pelarut akuabides steril.

3.2 Prosedur kerja

Mencit jantan dan betina (1:3) dikawinkan pada sore hari. Adanya sumbat vagina keesokan harinya menyatakan uk nol hari. Induk mencit uk 7-10 hari (kelompok I) atau uk 14-17 hari (kelompok II) diberi perlakuan dengan 2-ME dosis 50 dan 100 mg/kg bb secara subkutan. Kontrol uk 7-17 hari diberi akuabides steril. Selanjutnya, induk dibiarkan melahirkan normal dan 4 ekor anak mencit jantan dipelihara setiap induk hingga sapih. Umur 9 minggu, dilakukan uji kemampuan belajar dan mengingat dengan menggunakan *shuttle box* (kotak kejutan elektrik bolak-balik). Arus listrik berasal dari sumber arus dengan kekuatan 85 V dan 0,5 mA yang dilengkapi dengan alat pengukur tegangan dan sirine

(buzzer 90 dB). Setiap anak diberi waktu 10 detik selama sirine berbunyi untuk berpindah ke ruang yang aman sebelum arus listrik dialirkan. Pemberian arus listrik dan bunyi sirine secara bergantian dilakukan hingga 20 kali ulangan untuk setiap mencit pada setiap hari pengujian tanpa istirahat selama empat hari berturut-turut. Nilai keberhasilan menghindari (*successful avoidance rate*) dari setiap mencit pada setiap hari pengujian dihitung dengan rumus $N/20$. Setelah uji *shuttle box* selesai, dilakukan pengamatan terhadap otak dan diamati adanya hidrosefalus internal.

3.4 Analisis data

Penelitian menggunakan RAL. Data parametrik diuji dengan ANAVA satu arah, dilanjutkan dengan uji *t-Student*. Data nonparametrik dianalisis dengan *Wilcoxon's rank sum test*. Hasil dibandingkan dengan kontrol pada $p < 0,05$ dan $p < 0,01$.

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa 2-ME menyebabkan menurunnya kemampuan kognitif dalam hal belajar dan mengingat semua kelompok perlakuan di setiap hari

pengujian dibandingkan dengan kontrol, yang ditampilkan sebagai nilai keberhasilan menghindari. Kesejajaran antara respons dan dosis ditemukan pada semua kelompok, kecuali pada kelompok I pada hari uji ke-4. Menurut WHO (1984) dan Buelke-Sam *et al.* (1985), tidak adanya kesejajaran antara respons dan dosis merupakan hal yang umum ditemukan pada uji teratologi perilaku karena banyaknya variabel yang mempengaruhi perilaku. Selain itu, jarak antara dosis yang digunakan mungkin terlalu dekat.

Dibandingkan dengan kontrol, keberhasilan menghindari semua kelompok perlakuan hari ke-1 dan ke-2 nyata menurun. Kelompok I dosis 50 mg/kg bb pada uji hari ke-3 sudah tidak berbeda nyata dibandingkan tiga kelompok perlakuan lain yang masih menurun nyata. Pada uji hari ke-4, kelompok perlakuan sudah tidak berbeda nyata, kecuali kelompok II dosis 100 mg/kg bb. Hasil ini memperlihatkan cenderung lebih sensitifnya kelompok II terhadap 2-ME (Tabel I).

Tabel 1 Nilai keberhasilan menghindar mencit jantan umur 9 minggu dalam uji belajar dan mengingat dengan *shuttle box* dari induk yang diberi 2-ME dosis 50 atau 100 mg/kg bb secara subkutan pada umur kebuntingan 7-10 hari (kelompok I) atau umur kebuntingan 14-17 hari (kelompok II)

Parameter	Kelompok		2-Metoksietanol			
	Kontrol		50 mg/kg bb		100 mg/kg bb	
	I-II @		Kelompok I	Kelompok II	Kelompok I	Kelompok II
x ± SD	n _i =12	n _a =58	n _i =11 n _a =51	n _i = 12 n _a =48	n _i =11 n _a =49	n _i =12 n _a =46
Keberhasilan menghindar pada hari pengujian :						
I	33.66 ± 12.43a		23,29 ± 6,24*a	25,45 ± 10,27*a	19,73 ± 3,69*a	20,78 ± 7,16*a
II	48.50 ± 10.59b		38,82 ± 9,23*b	36,55 ± 7,97*a	32.91 ± 2.56*b	31,75 ± 2,56*a
III	65.86 ± 7.36c		54,50 ± 9,71c	49,95 ± 14,65*b	48,25 ± 6,96*c	49,20 ± 16,14*b
IV	75.13 ± 13.28c		64,68 ± 13,60c	70,25 ± 7,81c	68,79 ± 6,87d	60,93 ± 7,25*b

Keterangan : @ Penyuntikan induk kelompok kontrol dilakukan pada u.k. 7-17 hari (I-II)

n_i=jumlah induk n_a=jumlah anak

* berbeda nyata dari kontrol pada p<0,05 (*Wilcoxon's rank sum test*)

Huruf yang sama pada satu kolom untuk satu parameter menyatakan tidak berbeda nyata, p<0,05 (Uji BNT)

Menurunnya kemampuan tampaknya bersifat sementara, sebab selalu terjadi peningkatan kemampuan sejalan dengan bertambahnya hari pengujian, meskipun peningkatannya terjadi lebih lambat dibandingkan dengan kontrol. Pada setiap hari pengamatan, nilai keberhasilan menghindar antarkelompok perlakuan berfluktuasi dan nilai keberhasilan menghindar kelompok II dosis 100 mg/kg bb paling rendah dari nilai tiga kelompok perlakuan lainnya pada hari uji ke-4.

Nelson *et al.* (1984) menyatakan bahwa kelambatan kemampuan kognitif berkaitan

dengan sifat 2-ME sebagai neurotoksin dan bersifat sementara. Untuk memastikan pernyataan ini, maka perlu untuk dilakukan penambahan hari pengujian melampaui hari ke-4.

Perubahan perilaku berkaitan erat dengan perubahan fisik maupun kimia di dalam jaringan otak. Otak merupakan pusat pengaturan dan pengelolaan dan tempat proses mental. Penyimpangan perilaku juga disebabkan menurunnya konsentrasi neurotransmitter di otak, seperti dopamin dan serotonin, serta akibat sedikitnya reseptor N-metil-D-aspartat (NMDA), suatu reseptor

neurotransmitter monoaminergic seperti dopamin yang merangsang aktivitas belajar dan mengingat (Hayasaka & Kameyama, 1983; Coyle *et al.*, 1984; Tamaru, 1994; Powlegde, 1999). Penyimpangan perilaku yang ada mungkin disebabkan menurunnya konsentrasi neurotransmitter otak sehingga fungsi sel-sel saraf juga menurun. Untuk memastikan hal itu, perlu dilakukan pengukuran konsentrasi neurotransmitter di dalam otak.

Efek neurotoksik 2-ME berkaitan dengan demielinasi (US EPA, 1994). Gangguan pada meilnasi menyebabkan terhambatnya pembentukan fosfolipid pada seludang mielin. Hal ini disebabkan oleh masuknya MAA sebagai substrat palsu ke dalam sintesis asam lemak. Hambatan dalam mielinasi memperlambat penyampaian impuls saraf ke neuron lain atau efektor sehingga berakibat pada terhambatnya respons dan terjadi penyimpangan perilaku.

Menurunnya kemampuan belajar dan mengingat juga dapat disebabkan oleh menipisnya epitel hipokampus (Tilson, 1979 dalam WHO, 1984) akibat kematian sel selama neurulasi. Hipokampus adalah modifikasi korteks serebrum dan berperan

penting dalam proses belajar dan mengingat (Guyton 1986; Farr *et al.*, 2000).

Pemberian 2-ME pada akhir neurulasi cenderung meringankan berat otak dan menurunkan ukuran serebrum dan panjang fisura serebrum. Kejadian ini mungkin berkaitan dengan menipisnya sel-sel epitel hipokampus. Meskipun dinding serebrum cenderung menipis, namun tidak menyebabkan membesarnya ventrikel otak yang menandai hidrosefalus internal. Untuk memastikan penyebab berkurangnya berat otak dan bagian-bagiannya, perlu dilakukan penelitian histopatologi untuk mengamati kematian sel-sel neuroepitel.

V. Kesimpulan

Berdasarkan hasil pengamatan yang telah dilakukan disimpulkan bahwa :

2-ME yang diberikan selama neurulasi menyebabkan menurunnya kemampuan kognitif berupa kemampuan belajar dan mengingat anak mencit jantan pada uji menggunakan *shuttle box* dan penurunan terjadi sejalan dengan menurunnya berat otak dan lebar dinding serebrum.

DAFTAR PUSTAKA

- Buelke-Sam, J.U., Kimmel, C.A., Adams, J., Nelson, C.J., Vorhees, C.V., Weight, D.C., Omer, V.S.T., Kord, B.A., Butcher, R.E., Geyer, M.A., Holson, J.F., Kutcher, C.L. & Wayner, M.J. 1985. Collaborative behavioral teratology study. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.*, 7:591-624.
- Canadian Environmental Protection Act (CEPA). 2000. *Priority substances list assesment reports: 2-Methoxyethanol.*
- Coyle, I., Wayner, M.J. & Sunger, G. 1984. Behavioural teratogenesis. A critical evaluation. In: *Neural and behavioural teratology. Advances in the study of birth defects* (4)(Ed. Persaud., T.V.N.)MTP Press Ltd., Lancaster.
- Farr, S.A., Banks, W.A., La Scola, M.E., Flood, J.F. & Morley, J.E.2000. Permanent and temporary inaction of the hippocampus impairs T-maze footshock avoidance acquisition and retention. *Brain Res.*, 872(1-2):343-349.
- Gargas, M., Tyler, T.R., Sweeney, L.M., Corley, R.A., Weitz, K.K., Mast, T.J., Paustenbach, D.J. & Hays, S.M. 2000. A toxicokinetic study of inhaled ethylene glycol monomethyl ether (2-ME) and validation of a physiologically based pharmacokinetic model for the pregnant rat and human. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 165(1)
- Groeseneken, D., Veulemans, H., Masschelein, R. & Van Vlem, E. 1989. Experimental human exposure to ethylene glycol monomethyl ether. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.*, 61(4):243-247.
- Guyton, A.C. 1986. *Textbook of medical physiology.* 7th ed. W.B.Saunders Company Igaku-Shoin/Saunders Jepang.
- Hayasaka, I & Kameyama, Y. 1983. Early pathological changes of neuroepithelium in oxchratoxin A-induced exencephaly in mice. *Environ.Med.*, 27:35-39.
- Hays, S. M., Elswick, B.A., Blumenthal, G. M., Welsch, F., Conolly, R.B. & Gargas, M.L.2000. Developmental of physiologically used pharmacokinetic model of 2-methoxyethanol and 2-methoxyacetic acid disposition in pregnant rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 163 (1): 67-74.
- Jaeger, R.J. & Rubin, R.J. 1972. Migration of phthalate ester plasticizer from polivinyll chloride blood bags into stored human blood and its localization in human tissues. *N.Engl.J.Med.*, 287:1114-1118.
- Johanson, G. 1999. Criteria document for Swedish Occupational Standars. *Ethylene glycol monomethyl ether and ethylene glycol monomethyl ether acetate.* Arbete Och Hals. National Institute for Working Life. Stockhlo, Sweden.

- Johnson, E.M. & Kochhar, D.M. 1983. Teratogenesis and reproductive toxicology. New York.
- Kaiin, E.M. 1998. Transfer embrio untuk mengetahui peran induk dalam memunculkan efek asam metoksiasetat (MAA) pada perkembangan embrio mencit (*Mus musculus*) Swiss Webster. Tesis Pascasarjana Biologi ITB.
- Kitagawa, K., Kawamoto, T., Kunugita, N., Tsukiyama, T., Okamoto, K., Yoshida, A., Nakayama, Keiko & Nakayama, Kei-ichi. 2000. *Aldehyde dehydrogenase (ALDH) 2 associates with oxidation of methoxyacetaldehyde; in vitro analysis with liver subcellular fraction derived from human and Aldh2 gene targeting mouse.* Federation of European Biochemical Societies.
- Li, L-H., Wine, R.N. & Chapin, R.E. 1991. Methoxyacetic acid (MAA) induced spermatocyte apoptosis in human and rat testes; An in vitro comparison. *J. Androl.* 7:538-549.
- Nelson, B.K., Brightwell, W.S., Burg, J.R. & Massari, V.J. 1984. Behavioral and neurochemical alterations in offspring of rat after maternal or paternal inhalation exposure to the industrial solvents 2-methoxyethanol. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 20(2):269-270.
- Petersen, J.H. & Breindahl, T. 2000. Plasticizer in total diet samples, baby food and infant formulae. *Food. Addit. Contam.*, 17(2):133-141.
- Powledge, T.M. 1999. Addiction and the brain: The dopamin pathway is helping researchers find their way through the addiction mice. *BioScience.* 48:513-515.
- Rasjad, C., Yamashita, K., Datu., A.R. & Yasuda, M. 1991. Pattern of limb malformations in mice induced by MAA. *Hiroshima J. Med. Sci.*, 40(3):93-99.
- Ritter, E.J., Scott, W.J., Randall, J.L. & Ritter, J.M. 1985. Teratogenicity of dimethoxyethyl phthalate and its metabolites methoxyethanol and methoxyacetic acid in the rat. *Teratology.* 32:25-31.
- Tamaru, M. 1994. Neurochemical correlates of learning impairment in microencephalic rats induced by methylazoxymethanol acetat. *Cong. Anom.*, 34:13-25.
- Terry, K.T., Stedman, D.B., Bolon, B. & Welsch, F. 1996. Effects of 2-methoxyethanol on mouse neurulation. *Teratology.* 54:219-229.
- U.S. Environmental Protection Agency. 1994. *Chemical summary for 2-methoxyethanol.*
- U.S. Environmental Protection Agency. 1998. *Toxic chemical in your environment-*

a community based program of the total environment centre.

Vorhees, C.V. 1986. Principles of behavior teratology. In: Handbook of behavioral teratology (Eds. Riley, E.P.& Vorhees, C.V.). Plenum Press, New York.

World Health Organization. 1984. *Principles for evaluating health risks to progeny associated with exposure to chemicals during pregnancy.* Environmental Health Criteria 30. WHO. Geneva.

Wilkinson, C.F.& Lamb, J.C. 1999. The potential health effects of phtalate esters in children's toys a review and risk assesment. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 30:140-155.

Windusari, Y. 2002. Pengaruh pendedahan pralahir 2-metoksietanol terhadap kemunculan kelainan perkembangan bumbung neural dan terhadap perilaku pascalahir turunan F1 mencit (*Mus musculus*) Swiss Webster