

PROFIL PROTEIN MEMBRAN SPERMATOZOA TIKUS (*Rattus norvegicus* L.) SETELAH PEMAPARAN 2-METHOXYETHANOL

Alfiah Hayati¹, Soesanto Mangkoewidjojo², Aucky Hinting³, dan Sukarti Moeljopawiro⁴

INTISARI

Hayati, A., S. Mangkoewidjojo, A. Hinting, dan S. Moeljopawiro. 2006. Profil Protein Membran Spermatozoa Tikus (*Rattus norvegicus* L.) Setelah Pemaparan 2-Methoxymethanol. Berkala Ilmiah Biologi 5 (1) : 39 - 44.

Senyawa 2-methoxyethanol (2-ME) bersifat toksik dan oksidan kuat yang dapat menyebabkan kerusakan sel. Kerusakan ini dikarenakan stres oksidasi yang tinggi sehingga ikatan glikoprotein transmembran dapat lepas, akibatnya akan merubah susunan dan struktur molekul penyusun membran sel. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui profil protein membran sel spermatozoa tikus (*Rattus norvegicus*) setelah pemaparan 2-ME dengan variasi lama waktu pemberiannya.

Seratus ekor tikus, strain Wistar, dibagi 5 kelompok, masing-masing terdiri atas 20 ekor. Tikus kelompok pertama (P₁) disuntik 0,2 ml 2-ME dosis 200 mg/kg bb/hari secara subkutan selama 1 hari, P₂ selama 3 hari, P₃ selama 6 hari/minggu dan P₄ selama 12 hari/2 minggu serta kelompok kontrol diberi larutan fisiologis. Spermatozoa di koleksi dengan cara *flusing*. Isolasi spermatozoa menggunakan modifikasi metode Haila dan Daulat (2001) dan Goyal *et al.* (2001). Penentuan profil protein membran menggunakan metode elektroforesis, SDS-PAGE, dan didukung dengan pengukuran luas area pita protein menggunakan densitometer.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa protein membran spermatozoa tersusun atas banyak macam protein. Profil protein diketahui dari tebal dan tipisnya pita protein yang terbentuk pada setiap pita protein. Perubahan profil protein hasil elektroforesis selain diketahui dari ketebalan pita protein juga didukung oleh hasil pengukuran luas area pita proteinnya. Pada semua kelompok, luas area pita protein dengan berat molekul 55 kDa tampak lebih besar (11.634,7 mv.mm), kemudian diikuti oleh protein dengan berat molekul 19 (8.421,5 mv.mm), 43 (8.000,1 mv.mm), 45 (7.510,0 mv.mm), 20 (6.807,1 mv.mm), 24 (6.523,2 mv.mm); 66 (6.480,4 mv.mm), 34 (6.350,8 mv.mm), 22 (5.736,6 mv.mm), dan 84 kDa (3.557,9 mv.mm). Besar area masing-masing pita protein tersebut dipengaruhi oleh lama waktu pemaparan 2-ME. Semakin lama waktu pemaparannya, beberapa protein ketebalan dan luas area pitanya semakin meningkat dan beberapa yang lainnya semakin menurun. Dari penelitian ini disimpulkan bahwa pemaparan 2-ME setelah tiga hari dapat merubah profil protein membran spermatozoa secara bermakna pada protein dengan berat molekul 19 dan 24 kDa; dan profil protein 22 kDa berubah setelah pemaparan 12 hari/2minggu.

Kata kunci : 2-methoxyethanol, radikal bebas, protein membran spermatozoa, SDS-PAGE

ABSTRACT

Hayati, A., S. Mangkoewidjojo, A. Hinting, and S. Moeljopawiro. 2006. Profile of Rat's (*Rattus norvegicus* L.) Spermatozoa Protein Membrane after Induced by 2-methoxyethanol. Berkala Ilmiah Biologi 5 (1) : 39 - 44.

In the body, 2-methoxyethanol (2-ME) compound may be converted to methoxyacetic acid (MAA). The MAA is a strong oxidant and may cause oxidation stress in spermatozoa. Oxidative stress is a disturbance on membrane protein that increases reactive oxygen species (ROS) concentration.

The main purpose of this research was to determine the membrane protein profile of spermatozoa in rats induced by 2-ME. One hundreds male Wistar rats were used in this study. The animals of treated groups were divided into 5 groups of 20. The rats were given subcutaneous injection with 0,2 ml of 200 mg/kg 2-ME /day for 1 day (P₁), 3 days (P₂), 6 days/week (P₃), and 12 days/two weeks (P₄), the control group was injected with physiological saline of the same volume. The membrane protein profile of spermatozoa was observed by electrophoresis using SDS-page technique.

¹ Laboratorium Biologi Reproduksi, Fakultas MIPA UNAIR;
² Bagian Patologi Klinik, Fakultas Kedokteran Hewan UGM;
³ Laboratorium Biologi Medik, Fakultas Kedokteran UNAIR;
⁴ Laboratorium Biokimia, Fakultas Biologi UGM.

The results of the research indicated that 2-ME caused the increasing concentration of the 55 and 84 kDa and the decreasing concentration of the 19, 20, 22, 24, 34, 43, and 45 kDa of spermatozoa membrane protein. The conclusion is the profile of the spermatozoa membrane protein depend on the long time exposes 2-ME on rats. The membrane protein profile 19 and 14 kDa change after three days and 22 kDa after 12 days/two weeks induction of 2-ME.

Keywords : 2-methoxyethanol, reactive oxygen species, spermatozoa membrane protein, SDS-PAGE

PENDAHULUAN

Senyawa 2-methoxyethyl phthalate (DMEP) adalah salah satu ester ftalat yang berbahaya bagi kesehatan. Bahan ini bersifat toksik pada sistem reproduksi khususnya testis. Di dalam tubuh, senyawa DMEP dihidrolisis menjadi 2-methoxyethanol (2-ME). Senyawa ini sering digunakan untuk memenuhi kebutuhan hidup sehari-hari sebagai bahan pelarut cat, vernis, tinta, perekat lem, parfum, kosmetik, sabun cair, dan bahan pembersih. Senyawa ini dapat masuk ke dalam tubuh melalui pernafasan, makanan, atau kontak langsung melalui kulit (Johanson, 2000). Di sel hati, senyawa 2-ME akan dimetabolisis menjadi senyawa methoxyacetaldehyde (MALD) dengan katalisator alkohol dehidrogenase, kemudian dibiotransformasikan lagi oleh aldehyd dehidrogenase menjadi methoxyacetic acid (MAA) (Moslen *et al.*, 1995). Senyawa 2-ME dan hasil metabolismenya methoxyacetic acid (MAA), di dalam tubuh bersifat toksik. Efek yang ditimbulkannya pada sistem reproduksi manusia 60 kali lebih sensitif dari pada hewan percobaan. Syed dan Hecht (1998) menyatakan bahwa 2-ME merupakan oksidan kuat dan menimbulkan stres oksidasi, sehingga dapat menyebabkan terjadinya kerusakan dan kematian sel. Pada penelitian Johanson (2000) diketahui bahwa pekerja yang berhubungan dengan 2-ME, dalam tubuhnya terkontaminasi oleh senyawa MAA sebagai hasil metabolismenya. Di industri kimia, para pekerja yang terkontaminasi senyawa ini, kadar MAA dalam darah tinggi, hemoglobin dan jumlah sel darah merah menurun, serta menimbulkan anemia (Shih *et al.*, 2003). Pada sistem reproduksi tikus jantan, 2-ME menyebabkan kerusakan sel spermatosit primer. Pemberian 200 mg/kg selama 12 hari akan meningkatkan jumlah spermatozoa yang abnormal dan pemberian selama 21 hari menimbulkan kerusakan pada sel spermatogenik, khususnya sel spermatosit dan spermatid (Hayati *et al.*, 2004). Tetapi kerusakan ini bersifat reversibel, hal ini nampak setelah diistirahatkan (tanpa pemaparan 2-ME) selama 4 minggu terjadi

permulihan pada sel-sel spermatogenik dan motilitas serta morfologi normal spermatozoa mencit (Hayati *et al.*, 2003; Hayati *et al.*, 2005).

Kerusakan sel yang disebabkan oleh 2-ME ditimbulkan karena senyawa ini bersifat reaktif sehingga dapat menimbulkan stres oksidasi yang dapat meningkatkan radikal bebas dalam sel. Salah satu radikal bebas adalah reactive oxygen species (ROS), termasuk di dalamnya adalah radikal superoksida, radikal hidroksil, radikal peroksida, dan hidrogen peroksida. Efek sitotoksik dari ROS intraseluler spermatozoa sebagian besar berasal dari leukosit atau sel fagosit (Hoshi & Stefan, 2001). Kerusakan sel yang disebabkan oleh ROS karena terjadinya oksidasi pada DNA, lipid, dan protein dalam sel. Oksidasi tersebut akan menginduksi terbentuknya peroksidasi lipid. Peroksidasi lipid terjadi karena adanya reaksi ROS dengan asam lemak tidak jenuh penyusun membran plasma. Asam lemak tidak jenuh ini selanjutnya akan mengurai menjadi aldehida, diantaranya adalah malondialdehyde (MDA). Senyawa MDA ini dipakai sebagai indikator adanya kerusakan lipid pada membran plasma.

Efek lain dari ROS adalah kemampuannya menyebabkan oksidasi protein. Protein yang teroksidasi menyebabkan terlepasnya ikatan glikoprotein transmembran sehingga mempengaruhi aktivitas dan fungsi membran plasma (Berlett & Earl, 1997). Beberapa peneliti menyatakan bahwa pada membran spermatozoa terdapat protein 29, 32-34, 53 ± 3 , 64, dan 88 kDa yang berpartisipasi pada proses fertilisasi. Protein tersebut diduga merupakan salah satu target dari ROS, apabila teroksidasi akan menimbulkan gangguan pada proses fertilisasi. Kerusakan sel yang ditimbulkan oleh stres oksidasi, diduga selain dipengaruhi oleh dosis dan frekuensi pemberian bahan toksik juga dipengaruhi oleh lama waktu pemaparannya. Sampai saat ini belum ada penelitian yang mengungkap tentang toksisitas 2-ME terhadap profil dan konsentrasi protein membran spermatozoa, yang diduga sebagai salah satu faktor yang

menurunkan kualitas spermatozoa. Pendekatan dengan elektroforesis SDS-PEGE digunakan untuk melihat profil protein membran spermatozoa yang telah diberi 2-ME dengan variasi lama waktu pemaparannya.

BAHAN DAN CARA KERJA

Hewan coba yang digunakan adalah 100 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus* L.) jantan, strain Wistar, umur 12-14 minggu, berat badan 125 – 135 gram, dan dalam kondisi sehat. Tikus dipelihara dalam kandang hewan, dengan suhu 25°C – 26°C, kelembaban udara 50% dan siklus cahaya \pm 12 jam gelap dan \pm 12 jam terang. Air minum dari air PDAM dan pakan berupa pelet Hi-Pro-Vite 524-2 (PT. Charoen Pokphand Indonesia, Surabaya) diberikan secara *ad libitum*. Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah senyawa 2-ME (Wako Co Japan). Tikus dibagi 5 kelompok, masing-masing 20 ekor. Tikus kelompok pertama (P₁) disuntik 0,2 ml 2-ME dosis 200 mg/kgbb/hari secara subkutan selama 1 hari, 3 hari (P₂), 6 hari/minggu (P₃) dan 12 hari/2 minggu (P₄), sedang kelompok kontrol diberi larutan fisiologis. Setelah perlakuan berakhir hewan coba dieutanasi dengan kloroform, kemudian dilakukan nekropsi, spermatozoa diambil dari kauda epididimis dan vas deferens. Koleksi spermatozoa dilakukan dengan cara modifikasi dari Haila dan Daulat (2001) dan Goyal *et al.* (2001), yang pada garis besarnya seperti berikut. Epididimis bagian kauda dan vas deferens dari masing-masing kelompok dipisahkan dari testisnya, kemudian diletakkan ke dalam cawan Petri yang berisi 4 ml larutan fisiologis. Spermatozoa dikoleksi dengan cara *flusing* yaitu dengan menggunakan mikroskop stereo, jarum suntik yang mengandung 1 ml larutan fisiologis dimasukkan ke lubang vas deferens. Selanjutnya jarum ditekan pelan-pelan sehingga larutan fisiologis dapat mendorong spermatozoa yang ada di vas deferens dan epididimis, suspensi sperma siap untuk isolasi protein. Untuk isolasi protein membran spermatozoa, suspensi sperma dikoleksi secara *pulling* untuk setiap kelompok penelitian.

Suspensi tersebut selanjutnya dibagi 3 bagian. Setiap bagian dihomogenkan dengan sentrifus 500 x g selama 5 menit. Pelet diresuspensi dalam keadaan hipo-osmotik dalam 10 mM *potassium phosphate buffer*, pH 7,4 pada 4^o C, kemudian dihomogenkan selama 5 menit. Suspensi tersebut selanjutnya disentrifus pada 1300 x g selama 15

menit pada 4 °C, supernatan dikoleksi (S₁). Pelet diresuspensi lagi dalam 10 mM *potassium phosphate buffer*, selanjutnya medium tersebut disentrifus lagi pada 1300 x g selama 15 menit pada 4 °C, supernatan dikoleksi (S₂). Supernatan S₁ dicampur dengan supernatan S₂ dengan 0,2 M NaCl dan 2 mM MgSO₄. Selanjutnya campuran tersebut disentrifus pada 11.000 x g selama 30 menit pada 4 °C untuk memisahkan mitokondria dari fraksi membran plasma. Supernatan yang mengandung membran plasma disentrifus lagi pada 100.000 x g selama 90 menit pada 4^o C untuk memisahkan membran plasma dari sitosolnya. Pelet yang mengandung membran plasma diekstraksi dengan 1% *octyl-beta-D-thioglucopyranoside* (OSGP) (w:v), 10% *glycerol* (v:v), 20 mM Tris, pH 8,6, mengandung inhibitor protease, dihomogenkan dengan vortex selama 30 menit pada 4 °C. Fraksi larutan protein dikumpulkan dan konsentrasi protein dideterminasi dengan Biorad (Sigma), kemudian disimpan dalam -20 °C dalam 500 ml aliquot (Vernet *et al.*, 2001; Chitra *et al.*, 2001).

Penentuan berat molekul (BM) protein membran dilakukan melalui metode elektroforesis SDS-PAGE. Urutan metode tersebut adalah 80 mg protein membran sperma dilarutkan dalam pelarutnya dan dicampur dengan 2 x buffer sampel (250 mM Tris-HCl, Ph 6,8, 10% SDS, 10% gliserol, dan 0,01% bromfenol biru) kemudian dipanaskan pada 100^o C selama 2 menit sebelum diloding dalam gel (gel poliakrilamid 12%). Elektroforesis pada 90 volt dilakukan selama 2-3 jam. Pita protein dengan berat molekul lebih besar akan terbentuk lebih dekat dengan tempat awal pemisahan. Pewarnaan (*staining*) pita protein dilakukan dengan jalan merendam gel hasil elektroforesis (setelah dilepas dari rangkaian plat) dalam larutan 0,25% *Coomasie brilliant blue* selama 2-3 jam. Setelah diwarnai, dilakukan *destaining* untuk menghilangkan kelebihan warna dengan jalan merendam gel dalam larutan *destaining* (50 ml metanol, 10 ml asam asetat glasial, 40 ml air) hingga gel menjadi jernih dengan pita terpisah jelas satu sama lainnya. Selanjutnya dilakukan *stop staining*, dengan memasukkan gel ke dalam larutan 10% asam asetat glasial. Pita protein yang terbentuk dalam gel setelah elektroforesis ditentukan berat molekulnya (kDa) (Khunsook *et al.*, 2003). Pengukuran ketebalan atau luas area pita protein dilakukan sebanyak tiga kali ulangan, menggunakan densitometer dengan panjang gelombang 560 nm.

Untuk mengetahui perbedaan rata-rata ketebalan antar perlakuan, data yang terkumpul dianalisis dengan analisis varian dengan $P < 0,05$.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Senyawa 2-ME mampu mengubah konsentrasi beberapa protein penyusun membran spermatozoa tikus. Protein membran pada sel spermatozoa selain berfungsi sebagai alat transportasi molekul dari/ke dalam sel juga berfungsi enzimatis dalam proses penggabungan sel spermatozoa dengan sel telur (oosit) serta motilitas spermatozoa. Beberapa diantaranya adalah protein dengan berat molekul 19-21, 32-38 kDa (Leeuwenburgh *et al.*, 1998; Said *et al.*, 2004); protein 50-64 dan 91-127 kDa berperan dalam fosforilasi tiroksin pada proses maturasi sperma di bagian kauda epididimis tikus (Lewis & Aitken, 2001).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa protein membran spermatozoa tersusun atas banyak macam protein. Profil proteinnya diketahui dari tebal dan tipisnya pita protein yang terbentuk pada setiap pita protein. Perubahan profil protein hasil elektroforesis selain diketahui dari ketebalan pita protein juga didukung oleh hasil pengukuran luas area pita protein menggunakan densitometer.

Pada semua kelompok, luas area pita protein dengan berat molekul 55 kDa tampak lebih besar (11.634,7 mv.mm), kemudian diikuti oleh protein dengan berat molekul 19 (8.421,5 mv.mm), 43 (8.000,1 mv.mm), 45 (7.510,0 mv.mm), 20 (6.807,1 mv.mm), 24 (6.523,2 mv.mm); 66 (6.480,4 mv.mm), 34 (6.350,8 mv.mm), 22 (5.736,6 mv.mm), dan 84 kDa (3.557,9 mv.mm) (Tabel 1.). Luas area pita masing-masing pita tersebut berbeda pada setiap kelompok. Setelah data diuji dengan analisis varian, terdapat perbedaan yang bermakna ($P < 0,05$) antara kelompok kontrol dengan : (a) perlakuan 3 hari yaitu hanya pada protein 19 dan 24 kDa, (b) demikian juga dengan perlakuan 6 hari/minggu dan (c) perlakuan 12 hari/2minggu yaitu pada protein 19, 22 dan 24 kDa. Bentuk atau profil protein membran spermatozoa tikus pada kelompok kontrol (K) dan perlakuan (P_1 sampai P_3) dapat diamati pada Gambar 1.

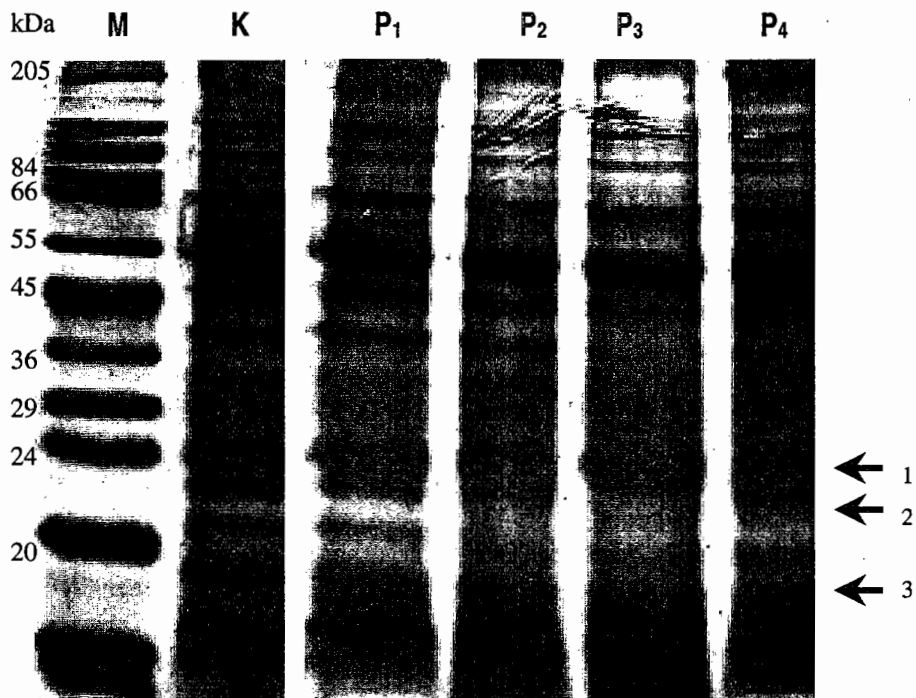
Pada Gambar 1. nampak bahwa membran spermatozoa tikus tersusun atas banyak protein, ketebalan dan luas area pita protein tersebut dipengaruhi oleh lama waktu pemaparan 2-ME. Semakin lama waktu pemaparan 2-ME ketebalan

dan luas area pita proteinnya ada yang meningkat dan ada pula yang menurun. Luas area pita protein yang meningkat dengan bertambah lama waktu pemaparan 2-ME adalah protein dengan berat molekul 55 dan 84 kDa dan yang menurun adalah protein dengan berat molekul 19, 20, 22, 24, 34, 43, dan 45 kDa.

Penelitian ini menemukan bahwa 2-ME mempengaruhi profil protein penyusun membran spermatozoa. Beberapa protein tersebut rusak, yang ditandai dengan adanya penurunan ketebalan dibandingkan kontrol. Penurunan ketebalan pita protein seiring dengan penurunan konsentrasi protein diduga karena terganggu salah satu fungsi protein dalam sel spermatozoa yaitu protein kinase. Protein kinase berperan dalam pengaturan antioksidan dan aktivitasnya, akan mengatur interaksi protein kinase lain dan fosfatase, sehingga terganggunya fungsi protein ini dapat menyebabkan meningkatnya radikal bebas (*reactive oxygen species*, ROS) dan peroksidasi lipid. Kadar ROS yang tinggi menyebabkan terjadinya oksidasi protein transmembran pada membran plasma spermatozoa. Protein yang teroksidasi menyebabkan terbentuknya modifikasi asam amino penyusun protein dan fragmentasi protein. Proses oksidasi ini dapat mempengaruhi konsentrasi, aktivitas, dan fungsi membran plasma (Berlett & Earl, 1997 ; Syed & Hecht, 1998). Tetapi dalam penelitian ini juga nampak bahwa 2-ME dapat menginduksi/mengaktifkan sintesis beberapa protein sehingga konsentrasinya meningkat setelah pemaparan 2-ME. Protein tersebut diperkirakan protein yang menginduksi terjadinya kerusakan dan kematian sel spermatozoa. Hal ini didukung oleh Johanson (2000) dan Hayati *et al.* (2005) yang menyatakan bahwa pemaparan 2-ME dapat menurunkan kualitas spermatozoa melalui penurunan motilitas dan morfologi spermatozoa.

KESIMPULAN

Kesimpulan dari penelitian ini adalah pemaparan 2-ME setelah tiga hari dapat merubah profil protein membran spermatozoa secara bermakna pada protein dengan berat molekul 19 dan 24 kDa; dan profil protein 22 kDa berubah setelah pemaparan 12 hari/2minggu.



Gambar 1. Profil protein transmembran spermatozoa tikus (SDS-PAGE) pada kelompok kontrol (K) dan kelompok perlakuan (P) dengan pemaparan 200 mg/kg 2-ME dengan lama waktu pemaparan yang berbeda. M=Marker; P₁=1 hari; P₂=3 hari; P₃=6 hari/minggu; P₄=12 hari/2minggu; tanda panah = protein yang mengalami perubahan setelah pemaparan 2-ME dengan variasi lama waktu pemaparan 1= 24 kDa, 2= 22 kDa, 3=19 kDa

Tabel 1. Hasil pengukuran rata-rata luas area pita (mv.mm) protein membran plasma spermatozoa tikus pada kelompok kontrol dan perlakuan dengan variasi lama pemaparan

Kelompok	Rata-rata luas area pita protein membran, dengan berat molekul (kDa) :									
	84	66	55	45	43	34	24	22	20	19
K	3557,9	6480,4	11635	7510,0	8000,1	6350,8	6523,2	5736,6	6807,1	8421,5
P - 1	3246,6	5950,5	12620	6243,2	9106,8	4734,2	3929,4	5250,3	5361,0	5438,3
P - 2	3640,6	6276,0	12717	6328,2	7985,4	6123,1	3211,4	5379,3	5648,7	4364,6
P - 3	3717,0	7900,0	14234	4273,1	5861,8	5145,0	3343,1	4419,1	4883,6	3770,3
P - 4	3849,2	6177,1	13973	6848,2	7145,1	4614,6	3095	3765,7	5685,4	2993,2

Keterangan :

K-1 = kontrol

P-1 sampai P-4 = kelompok perlakuan 1 hari; 3 hari; 6 hari/minggu; dan 12 hari/2minggu

UCAPAN TERIMAKASIH

Terima kasih kami ucapkan kepada Pimpinan Proyek DUE-Like Batch III Universitas Airlangga yang mendanai penelitian ini dan Dr. Wayan T. Arthama dan Dr. Widya Asmara atas bimbingan dan saran-sarannya selama proses penelitian berjalan.

PUSTAKA ACUAN

- Berlett, B.S., and R.S. Earl. 1997. Protein Oxidating in Aging, Disease, and Oxidative Stress, *Biochemistry and Molecular Biology*, 33, 20313-20316.
- Chitra, K.C., R. Sudjatha, C. Latchoumycandane, and P.P. Marthur. 2001. Effect of lindane on

- antioxidant enzymes in epididymis and epididymal sperm of adult rats, *Asian Journal Andrology*, 3, 205-208.
- Goyal, HO., TD. Braden, M. Mansour, C.S. William, A. Kamaleldin, and K.K. Srivastava. 2001. Diethylstilbestrol-treated adult rats with altered epididymal sperm numbers and sperm motility parameter but without alteration in sperm production and sperm morphology, *Biology of Reproduction*, 64, 927-934.
- Haila, AA., and R.P.T. Daulat. 2001. Acid Glycohydrolases in Rat Spermatoocyte, Spermatis, and Spermatozoa : Enzyme activities, biosynthesis and immunolocalization, *Biological Procedures Online*, 3, 35-42.
- Hayati, A., W. Darmanto, dan D. Winarni. 2003. Pengaruh Ekstrak Akar Ginseng Jawa terhadap Spermatogenesis Mencit yang Diinduksi 2- methoxyethanol, *Penelitian Medica Eksakta*, 4, 1, 75-855.
- Hayati, A., Y. Binti, I.B.R. Pidada, W. Darmanto, dan D. Winarni. 2004. Efek 2-Methoxyethanol Terhadap Histologi Testis Mencit, *Berkala Penelitian Hayati*, 10, 1.
- Hayati, A., A. Devi, I.B.R. Pidada. 2005. Spermatozoa Motility and Morphological Recovery Process in Mice after The Induction of 2- Methoxyethanol, *Folia Medica Indonesiana*, 41, 2, 90-95.
- Hoshi, T., and H.H. Stefan. 2001. Regulation of Cell Function by Methinine Oxidation and Reduction, *Journal of Physiology*, 531, 1, 1-11.
- Johanson, G. 2000. Toxicity Review of Monomethyl Ether and its Acetate Ester, *Critical review in Toxicology*, 30, 3, 307-345.
- Khunsook S., S.B. Barry, R.M.G. Susan, and A.A. Jack. 2003. Purification and characterization of plasma membrane-associated human sperm a-L-Fucosidase. *Biology of Reproduction*, 68, 709-716.
- Leeuwenburgh, C., H. Polly, S. Aviv, O.H. John, and W.H. Jay. 1998. Markers of Protein Oxidation by Hydroxyl Radical and Reactive Nitrogen Species in Tissues of Aging Rats, *Physiology Regulation Integrity Comparison physiology*, 274, 453-461.
- Lewis, B., and R.J. Aitken. 2001. Impact of Epididymal Maturation on The Tyrosine Phosphorylation Patterns Exhibited by Rat Spermatozoa, *Biology of Reproduction*, 64, 1545-1556.
- Moeslen, M.T, L. Kaphalia, H. Balasubramanian, Y.M. Yin, W.W. Au. 1995. Species differences in testicular and hepatic bio-transformation of 2-methoxyethanol. *Toxicology*; 96, 217-224.
- Said, T.M., U. Paasch, H.J. Glander, and A. Agarwal. 2004. Role of caspases in male infertility. *Human Reproduction*, 10, 1, 39-51.
- Shih S.T, A.T. Hsieh, Y.H. Chen, G.D. Liao, J.S. Chou, and S.H. Liou. 2003. Follow up Study of Haematological Effects in Workers Exposed to 2-methoxyethanol, *Occup Environmental Medicine*, 60, 130-135.
- Syed, V., and N.B. Hecht. 1998. Rat pachytene Spermatoocytes Down-regulate a polo-like Kinase and Up-regulate Thiol Specific Antioxidant Protein, Whereas Sertoli Cells Down-regulate a Phosphodiesterase and Up-regulate an Oxidative Stress Protein After Exposure to Methoxyethanol and Methoxyacetic acid, *Endocrinology*, 139, 3503-3511.
- Vernet, P., F. Norman, W. Ceanne, and A. John. 2001. Analysis of Reactive Oxygen Species Generating Systems in Rat Epididymal Spermatozoa, *Biology of Reproduction*, 65, 1102-1113.