

**PENGARUH EKSTRAK SELEDRI TERHADAP KADAR SOD
DAN EKSPRESI CASPASE-3 TESTIS PADA KERACUNAN
TIMBAL**

Studi *in vivo* Tikus Terpapar Timbal Asetat

TESIS

untuk memenuhi sebagian persyaratan
mencapai derajat Magister (S2)



Disusun Oleh:

Grace FR Panjaitan

MBK. 2016010198

**PROGRAM STUDI MAGISTER BIOMEDIK
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS ISLAM SULTAN AGUNG
SEMARANG
2022**

TESIS

PENGARUH EKSTRAK SELEDRI TERHADAP KADAR SOD DAN EKSPRESICASPASE-3 TESTIS PADA KERACUNAN TIMBAL (Studi *In Vivo* Tikus Terpapar Timbal Asetat)


Disusun oleh:
Grace F.R. Panjaitan
MBK. 2016010198

Akan dipertahankan di depan tim penguji
pada tanggal 7 September 2022
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk diterima

Telah disetujui oleh:

Pembimbing I

Pembimbing II




Dr. dr. Joko Wahyu Wibowo, M.Kes
NIK. 210198046



Dr. dr. Setyo Trisnadi, Sp.F, SH
NIK. 210199049

Mengetahui,
Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik
Fakultas Kedokteran Unisula



Assoc. Prof. Dr. dr. Agung Putra, M.Si.Med
NIK. 210199050

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri dan didalamnya tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi dan lembaga pendidikan lainnya. Pengetahuan yang diperoleh dari hasil penerbitan ataupun yang belum/tidak diterbitkan, sumbernyadijelaskan di dalam tulisan dan daftar pustaka.

Semarang, 6 September 2022



(Grace Ferrina R Panjaitan)



RIWAYAT HIDUP

A. Identitas

Nama : dr. Grace Ferrina Rotuani Panjaitan

Tempat / tanggal lahir : Medan/02.02.1974

Agama : Kristen

Jenis Kelamin : Perempuan

B. Riwayat Pendidikan

1. TK Methodist Madong Lubis :
2. SD Perguruan Kristen Methodist Indonesia : 22 Mei 1986
3. SMP Swasta Kristen Immanuel : 8 Juni 1989
4. SMA Swasta Kristen Immanuel : 12 Juni 1992
5. S1 Fakultas Kedokteran Universitas Methodist Indonesia : 15 Mei 1998
6. Profesi Dokter Universitas Methodist Indonesia : 16 Oktober 2001
7. Magister Ilmu Biomedik FK UNISSULA Semarang : (2019 – sekarang)

C. Riwayat Keluarga

1. Nama Orang Tua
Ayah : Prof. Drg. Monang Panjaitan, M.Sc.
Ibu : Tetty Siregar
2. Nama Anak : 1. Seraphine Agnes Regina Siregar
2. Michelle Olivia Hillary Siregar

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Tuhan Yang Maha Esa, sehingga tesis penulis berjudul, **“PENGARUH EKSTRAK SELEDRI TERHADAP KADAR SOD DAN EKSPRESI CASPASE-3 TESTIS PADA KERACUNAN TIMBAL (Studi *in vivo* Tikus Terpapar Timbal)”** ini dapat terselesaikan.

Tesis ini disusun sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar magister bidang ilmu biomedik kedokteran di Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang. Penulis ingin menyampaikan terima kasih sedalam-dalamnya kepada:

1. Prof. Dr. H. Gunarto., SH., M. Hum selaku rektor Universitas Islam Sultan Agung beserta para wakil rektor yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk menempuh dan menyelesaikan pendidikan Magister Biomedik.
2. Dr. dr. Setyo Trisnadi, S.H., Sp.KF selaku Dekan Fakultas Kedokteran Magister Ilmu Biomedik Universitas Islam Sultan Agung Semarang dan dosen pembimbing I yang bersedia meluangkan waktu dan pikiran untuk membimbing penulis hingga proses penulisan thesis.
3. Assoc. Prof.Dr. dr. Agung Putra, M.Si. Med selaku Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik Universitas Islam Sultan Agung Semarang dan dosen penguji I yang telah memberikan masukan untuk mengarahkan agar penelitian ini menjadi lebih baik.
4. Dr. dr. Joko Wahyu Wibowo, M.Kes selaku dosen pembimbing I yang bersedia meluangkan waktu dan pikiran untuk membimbing penulis hingga selama proses penulisan tesis.
5. Dr. dr. Chodidjah, M. Kes; Dr. Siti Thomas Zulaikhah, M. Kes selaku dosen penguji II dan III yang telah memberikan masukan untuk mengarahkan agar penelitian ini menjadi lebih baik.

6. Seluruh tenaga pendidik di Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang yang telah memberikan banyak dukungan selama proses penyusunan tesis.
7. Papi dan Mami, serta Anak anak ku tercinta
8. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang telah memberikan bantuan dalam penyusunan tesis ini, terimakasih atas dukungannya.

Penulis menyadari bahwa masih banyak kekurangan dalam penyusunan penelitian ini. Oleh karena itu, saran-saran yang membangun dari manapun akan diterima dengan terbuka. Harapan penulis semoga penelitian ini bermanfaat untuk berbagai pihak.

Semarang, 6 September 2022

(Grace FR Panjaitan)



ABSTRAK

“PENGARUH EKSTRAK SELEDRI TERHADAP KADAR SOD DAN EKSPRESI CASPASE-3 PADA TESTIS HEWAN MODEL KERACUNAN TIMBAL”

Latar belakang: Timbal (Pb) termasuk logam berat merupakan salah satu pencemar lingkungan dan bersifat berbahaya apabila masuk ke dalam tubuh secara oral atau inhalasi. Penumpukan Timbal dalam tubuh menimbulkan produksi *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang memicu stress oksidatif dan dapat serta apoptosis sel. Apoptosis sel akibat paparan timbal dapat terjadi pada testis yang ditandai dengan adanya ekspresi Caspase 3 sehingga dapat mengurangi fungsi testis sebagai organ reproduksi.

Metode: Penelitian eksperimental dengan *post test control group*. Kontrol Sakit paparan Timbal 200mg/kgBB, Perlakuan 1 Vitamin E 100 IU dengan Timbal 200 mg/kgBB, Perlakuan 2 paparan Timbal 200 mg/kgBB dan ekstrak seledri 300 mg/kgBB, kelompok sehat tidak diberikan ekstrak seledri. Kelompok perlakuan diberikan injeksi oral ekstrak seledri dosis 300 mg/kgBB selama 14 hari. Sampel testis dianalisis ekspresi Caspase 3 dengan IHC dan Kadar SOD dengan Elisa Kit. Pengolahan analisis data dilakukan dengan menggunakan R studio

Hasil : Analisa ekspresi Caspase 3 dan Kadar SOD di kelompok perlakuan mengalami persentase penurunan ekspresi pada perlakuan ekstrak seledri dosis 300 mg/kgBB. Kadar SOD masing masing kelompok dilakukan uji normalitas dengan menggunakan *Saphiro Wilk* dan uji Homogenitas hasil uji normalitas mendapatkan $p > 0.05$ dengan *Uji Levene.*, homogenitas $p > 0.05$. Didapatkan perbedaan yang tidak signifikan ($p > 0.05$) antara kelompok kontrol sehat dengan kelompok kontrol negatif, kelompok perlakuan 1 serta antar kelompok perlakuan 2 menggunakan uji *One way Anova*.

Kesimpulan : Pemberian ekstrak seledri 300 mg/kgBB diharapkan berpengaruh secara bermakna terhadap penurunan jumlah pada infertilitas di testis.

Kata Kunci : Caspase 3, Kadar SOD, ekstrak seledri, Vitamin E, Timbal Asetat

ABSTRACT

“THE EFFECT OF CELERY EXTRACT ON SOD LEVELS AND TESTICULAR CASPASE-3 EXPRESSION ON LEAD POISONING (IN Vivo study of rats exposed to lead acetate)”

Background : Lead (Pb) which is a heavy metal, is one of the environmental pollutants. And is dangerous if it enters the body orally or by inhalation. The source of Lead (Pb) exposure can come from widely used manufactured products including leaded gasoline, paints, hair dyes, cosmetics and water pipes. Lead (Pb) accumulation in the body causes the production of Reactive Oxygen Species (ROS) of reactive oxygen species which trigger oxidative stress and can result in inflammation, DNA damage that causes mutations and disturbances in cell epigenetics, as well as cell apoptosis. Cell apoptosis due to Lead (Pb) exposure can occur in the testis which is characterized by the expression of *Caspase 3* so that it can reduce the function of the testis as reproductive organs.

Methods : The experimental research with post test control group, sham group, Lead exposure treatment 200 mg/kgBB, Treatment of Vitamin E 100 IU with Lead (Pb) 200 mg/kgBB, treatment Lead (Pb) 200mg/kgBB and celery extract 300 mg/kgBB, meanwhile the sham group was given injection of celery extract at a dose of 300 mg/kgBB everyday in 2 weeks . On day 14, termination was carried out. Testicular samples were analyzed for *Caspase 3* expression with IHC and SOD levels with Elisa Kit. Data analysis processing is done using R studio.

Result : Analysis of *Caspase 3* expression and SOD levels in the blood in the treatment group experienced a decrease in the percentage of expression in the treatment of celery extract at a dose of 300 mg/kgBW. The expression ratio of *Caspase 3* decreased in expression and in the treatment of 300 mg/kgBW celery extract it increased. The ratio of SOD levels in the blood experienced an increasing at 1.25 doses of 300 mg/kgBW celery extract.

Conclusion :

Keywords : CASPASE-3, SOD level, celery extract, Vitamin E, Lead Acetate

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
RIWAYAT HIDUP.....	iii
KATA PENGANTAR	v
ABSTRAK.....	vii
ABSTRACT.....	viii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR TABEL.....	xiv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xv
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.3.1 Tujuan Umum	3
1.3.2 Tujuan Khusus	3
1.4 Originalitas Penelitian	4
1.5 Manfaat penelitian.....	6
1.5.1 Manfaat Teoritis.....	6
1.5.2 Manfaat Praktis	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	7
2.1 Superoxide Dismuthase (SOD)	7
2.1.1 Definisi SOD.....	7
2.1.2 Jenis Antioksidan SOD	8
2.1.3 Mekanisme Antioksidan SOD.....	9
2.2 Caspase-3.....	9
2.2.1 Definisi Caspase-3	9

2.2.2 Mekanisme Seluler Caspase-3 dalam Apoptosis	10
2.3 Seledri.....	12
2.3.1 Morfologi Habitat dan Klasifikasi Seledri	12
2.3.2 Kandungan Senyawa Fitokimia Tanaman Seledri	13
2.3.3 Pengaruh Tanaman Seledri terhadap Radikal Bebas	14
2.3.4 Pengaruh Tanaman Seledri terhadap Caspase 3	15
2.4 Testis	17
2.4.1 Definisi Testis	17
2.4.2 Pengaruh Timbal terhadap Testis.....	19
2.4.3 Prevalensi Keracunan Timbal pada Testis	20
2.4.4 Mekanisme Infertilitas pada Pria yang Diinduksi oleh Timbal	21
2.5 Timbal	24
2.5.1 Definisi dan Karakteristik Timbal.....	24
2.5.2 Prevalensi Keracunan Timbal	24
2.5.3 Sumber Paparan Timbal.....	25
2.5.4 Toksikokinetika Timbal pada Tubuh	26
2.6 Vitamin E	27
BAB III KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS.....	28
3.1 Kerangka Teori.....	28
3.2 Kerangka Konsep	29
3.3. Hipotesis.....	29
BAB IV METODE PENELITIAN	30
4.1 Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian.....	30
4.2 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional	31
4.2.1 Variabel Penelitian.....	31
4.2.1.1 Variabel bebas.....	31
4.2.1.2 Variabel Terikat	31
4.2.2 Definisi Operasional.....	31
4.3 Subjek Penelitian dan Sampel Penelitian	32
4.3.1 Subjek Penelitian.....	32
4.3.2 Sampel Penelitian.....	32
4.3.2.1 Kriteria Inklusi	32

4.3.2.2 Kriteria Eksklusi.....	32
4.3.2.3 Kriteria Drop Out.....	33
4.3.3 Cara Pengambilan Sampel Penelitian	33
4.3.4 Besar Sampel.....	33
4.4 Alat dan Bahan	34
4.4.1 Alat.....	34
4.4.2 Bahan	34
4.5 Cara Penelitian	34
4.5.1 Perolehan Ethical Clearance	34
4.5.2 Cara Pembuatan Ekstrak Seledri.....	35
4.5.3 Penetapan Dosis.....	35
4.5.4 Pembuatan Paparan Timbal dan Pemberian Perlakuan pada Subjek Percobaan.....	35
4.5.5 Pengambilan Sampel Darah.....	36
4.5.6 Perhitungan Kadar SOD.....	36
4.5.7 Pengambilan Sampel Jaringan.....	37
4.5.8 Pembuatan Blok Parafin.....	38
4.5.9 Pengecatan <i>Caspase 3</i>	38
4.6 Tempat dan Waktu Penelitian	40
4.7 Analisa Data	40
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN.....	43
5.1 Hasil Penelitian.....	44
5.1.1 Pembuatan Ekstrak Seledri	44
5.1.2 Efek Pemberian Ekstrak Seledri terhadap Kadar SOD (<i>Superoxide Dismuthase</i>) pada Testis Tikus yang dipapar Timbal Asetat (Pb).....	46
5.1.3 Efek Pemberian Ekstrak Seledri Terhadap Ekspresi CASPASE-3 pada Testis Tikus model Terpapar Timbal Asetat	48
5.2 Pembahasan Hasil Penelitian.....	49
5.3 Kelemahan Penelitian.....	50
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN	54

6.1 Kesimpulan.....	54
6.2 Saran.....	54
DAFTAR PUSTAKA	55
LAMPIRAN.....	71



DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Tanaman Seledri (<i>Apium graveolens</i> Linn.)	12
Gambar 2. Struktur Anatomi Testis	18
Gambar 3. Diagram skematis yang menggambarkan kemungkinan pathways yang terlibat dalam toksisitas testis yang diinduksi Pb	23
Gambar 4. Sumber Paparan Timbal	25
Gambar 5. Kerangka Teori	28
Gambar 6. Kerangka Konsep	28
Gambar 7. Alur Rancangan Penelitian	30
Gambar 8. Alur penelitian	42



DAFTAR TABEL

Tabel 1. Originalitas Penelitian	4
Tabel 2. Definisi Operasional	31



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Ethical Clearence

Lampiran 2 Analisis Statistik

Lampiran 3 Data ekstraksi seledri

Lampiran 4 Foto kegiatan penelitian



BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Timbal (Pb) yang termasuk logam berat merupakan salah satu pencemar lingkungan dan bersifat berbahaya apabila masuk ke dalam tubuh secara oral atau pun inhalasi.^{1,2} Sumber dari paparan Timbal dapat berasal dari produk manufaktur yang banyak digunakan termasuk bensin bertimbal, cat, pewarna rambut, kosmetik, dan pipa air. Paparan Timbal secara terus menerus dapat menyebabkan masalah kesehatan seperti gangguan pernafasan, neurologis, kardiovaskuler, dan peradangan kematian.³ *Institute for Health Metrics and Evaluation* (IHME) melaporkan bahwa paparan timbal menyumbang 900.000 kematian di seluruh dunia dan menyebabkan kecacatan karena efek jangka panjang pada kesehatan.⁴ Prevalensi kasus keracunan timbal didominasi oleh anak-anak dengan angka 800.000.000 di seluruh dunia yang hampir separuh anak berasal dari Asia.⁵ Penelitian terdahulu melaporkan bahwa angka kejadian paparan timbal mencapai 189.725 di 7 negara Asia dan 10,141 di negara Indonesia.⁶

Penumpukan Timbal dalam tubuh menimbulkan produksi *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang memicu stress oksidatif dan dapat berakibat pada peradangan⁷, kerusakan DNA yang menyebabkan mutasi dan gangguan pada keadaan epigenetik sel, serta apoptosis sel. Apoptosis sel akibat paparan timbal dapat terjadi pada testis yang ditandai dengan adanya ekspresi Caspase 3 sehingga dapat mengurangi fungsi testis sebagai organ reproduksi.⁸ Ekspresi Caspase 3 akibat radikal bebas dapat ditekan dengan enzim *Superoxide*

Dismutase (SOD) yang mampu mengkatalisis radikal bebas menjadi hidrogen peroksida dan air.⁹ Seledri (*Apium graveolens L*) merupakan tumbuhan yang umum dikonsumsi dan diketahui mengandung senyawa flavonoid dan fenolik yang bersifat antioksidan.^{10,11} Konsumsi tumbuhan yang mengandung antioksidan dapat meningkatkan kadar SOD sehingga berujung pada penurunan stres oksidatif dan penghambatan apoptosis sel. Namun demikian, peran Seledri dalam mencegah kerusakan testis akibat paparan timbal yang dikaji dari testis serta kadar SOD dan ekspresi Caspase 3 testis belum dikaji.

Penelitian terdahulu menyatakan bahwa penumpukan Timbal dapat menyebabkan gangguan terhadap beberapa proses biokimia dalam tubuh dengan mengikat sulfhidril dan kelompok fungsional nukleofilik yang berperan dalam munculnya stress oksidatif dan produksi ROS berlebih.¹² Peningkatan ROS berlebih menyebabkan kerusakan DNA sel sehingga memicu kaskade sinyal peradangan melalui aktivasi *nuclear factor kappa B* (NF- κ B).¹³ Produksi sitokin proinflamasi seperti *Tumor Necrotic Factor alpha* (TNF- α), dan Interleukin 6 (IL-6) meningkat akibat dari aktivasi NF- κ B dan menginduksi ekspresi *Activator Protein 1* (AP-1) dan berujung pada aktivasi Caspase 8 dan Caspase 3 yang memicu terjadinya apoptosis sel, termasuk sel pada testis.¹⁴

Seledri merupakan tumbuhan *herbaceous* yang termasuk dalam keluarga *Apiaceae* dan umum dikonsumsi sebagai sayuran. Seledri mengandung L-3-n-butylphthalide, sedanolide, asam linoleat, flavonoid, senyawa fenolik dan minyak atsiri sebagai senyawa aktif yang utama yang terdapat hampir di semua bagian termasuk akar, daun dan biji¹⁵. Penelitian sebelumnya telah melaporkan adanya aktivitas antioksidan dan anti radang dari

senyawa fenolik dan flavonoid yang terkandung dalam seledri.¹⁶⁻¹⁸ Namun demikian, pengaruh Seledri dalam menghambat kerusakan testis akibat paparan timbal belum diteliti, oleh karena itu penelitian ini bertujuan mengkaji pengaruh seledri dalam meningkatkan Kadar SOD serta menghambat ekspresi Caspase 3 testis pada tikus yang dipapar timbal.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian dalam latar belakang masalah tersebut diatas, dapat dirumuskan pertanyaan; apakah terdapat pengaruh pemberian ekstrak seledri terhadap kadar SOD dan ekskresi Caspase 3 testis pada tikus wistar yang diinduksi timbal asetat?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Tujuan umum penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak Seledri terhadap Kadar SOD dan Ekspresi Caspase 3 testis pada tikus yang terpapar timbal.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Mengetahui pengaruh ekstrak seledri 300 mg/kgBB terhadap Kadar SOD pada serum tikus wistar yang terpapar Timbal Asetat (Pb)
2. Mengetahui pengaruh ekstrak seledri 300 mg/kgBB terhadap Caspase 3 jaringan testis pada tikus wistar yang terpapar Timbal Asetat (Pb)

1.4 Originalitas Penelitian

Tabel 1. Originalitas Penelitian

No	Peneliti, tahun	Judul	Variabel Bebas	Variabel Tergantung	Hasil
1	El-Magd et al., 2017 ²²	<i>A Potential Mechanism Associated with Lead-Induced Testicular Toxicity in Rats</i>	Paparan timbal asetat dengan dosis 50 mg/L dalam air minum	Jumlah sperma, testosteron serum, Oestrogens E2, kadar SOD, GPx CAT, malondialdehid, ekspresi mRNA dari Cyp19 dan ER α dalam testis.	Pb menginduksi kerusakan oksidatif testis dan mengganggu spermatogenesis melalui penurunan regulasi ekspresi Cyp19 dan ER α , dan menurunkan level E2.
2	Amanpour et al., 2020 ²⁴	<i>Protective Effects of Vitamin E on Cadmium-Induced Apoptosis in Rat Testes</i>	Vitamin E	Ekspresi Mfn1, Mfn2, Bcl-2, Caspase 3, Caspase 7, Caspase 9, BAX	Vitamin E secara signifikan menurunkan ekspresi mRNA gen Bax dan Caspase-9 dan meningkatkan mRNA Mfn1, Mfn2, dan Bcl-2 pada testis tikus yang diinduksi Cd.
3	Al-Attar & Atef M, 2011 ²⁰	<i>Vitamin E attenuates liver injury induced by exposure to lead, mercury, cadmium and copper in albino mice</i>	Vitamin E	ALT, AST, GSG	Terjadi penurunan ALT, AST, dan GSG plasma
4	Hardani et al., 2015 ²¹	<i>Effects Of Aqueous Extract Of Celery (Apium Graveolens L.) Leaves On Spermatogenesis In Healthy Male Rats</i>	Ekstrak seledri	Jumlah sperma epididimis	Terjadi peningkatan jumlah sperma pada pemberian ekstrak seledri

5	Sushanth et al., 2020 ²³	<i>Therapeutic Potential of Apium graveolens on the Reproductive System of Cadmium Treated Male Rats</i>	Ekstrak seledri dengan dosis 200 mg/kg BB dan 400 mg/kg BB	Jumlah sperma, motilitas, viabilitas, peroksidasi lipid, histopatologi jaringan testis, kadar testotesterone serum.	Ekstrak seledri menawarkan perlindungan terhadap toksisitas yang ditimbulkan oleh Cd dengan meningkatkan morfologi, mempertahankan cellular architecture dan melindungi sel germinal dari apoptosis, melindungi sel spermatogenik melawan radikal bebas, mencegah peroksidasi lipid, meningkatkan kadar serum testotesterone.
---	-------------------------------------	--	--	---	---

Berdasarkan Tabel 1 dapat diketahui bahwa paparan timbal pada tikus dapat memicu kerusakan testis.¹⁹ Penelitian terkait peran seledri terhadap perbaikan dan perlindungan organ testis dari kerusakan sudah beberapa kali dilakukan, seperti penelitian yang mengkaji pengaruh pemberian seledri pada kerusakan testis akibat paparan logam berat menemukan bahwa ekstrak seledri mampu menekan kerusakan testis yang ditandai dengan penurunan radikal bebas, peroksidasi lipid, dan kadar serum testotesterone serta peningkatan SOD.^{20,21} Penelitian yang mengkaji pengaruh peran ekstrak seledri terhadap peningkatan sperma menemukan adanya peran ekstrak seledri terhadap jumlah peningkatan sperma pada tikus jantan.²²

Berdasarkan data yang disajikan pada Tabel 1, penelitian yang mengkaji pengaruh ekstrak Seledri terhadap kadar SOD dan ekspresi Caspase 3 testis pada tikus yang terpapar timbal belum dilakukan, sehingga penelitian penelitian dengan “Pengaruh Ekstrak Seledri Terhadap Kadar SOD dan Ekspresi Caspase-3 Testis pada Keracunan Timbal (Studi *In Vivo* Tikus Terpapar Timbal)” yang akan dilakukan masih layak untuk dilakukan karena memiliki keterbaruan.

1.5 Manfaat penelitian

1.5.1 Manfaat Teoritis

Manfaat teoritis penelitian ini adalah tersedianya data yang berkaitan dengan pengaruh pemberian ekstrak Seledri terhadap kadar SOD dan Ekspresi Caspase 3 pada tikus yang terpapar timbal bagi masyarakat.

1.5.2 Manfaat Praktis

Manfaat praktis penelitian ini adalah menjadi data rujukan bagi pengembangan ilmu terapan lanjutan yang diharapkan dapat diolah menjadi produk terapi kerusakan testis akibat paparan timbal.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Superoxide Dismuthase (SOD)

2.1.1 Definisi SOD

Superoxide dismutase merupakan enzim yang mengkatalisis superoksida ($O_2^{\bullet-}$) radikal bebas menjadi molekul oksigen (O_2) dan hidrogen peroksida (H_2O_2). Superoksida merupakan produk sampingan dari metabolisme oksigen dan dalam jumlah berlebihan dapat menyebabkan kerusakan sel. Hidrogen peroksida yang juga dapat merusak sel akan didegradasi oleh enzim lain seperti katalase sehingga lebih aman bagi keberlangsungan hidup sel. Dengan demikian, SOD merupakan pertahanan antioksidan penting di semua sel hidup yang terpapar oksigen radikal.²²

Superoxide Dismutase (SOD) adalah metalloenzymes yang mengandung atom tembaga, seng atau besi yang dibentuk dalam sitosol dan yang mengandung mangan dibentuk di dalam matrik mitokondria, cara kerjanya dengan mengkatalisis dismutasi pada superoxide menjadi hydrogen peroxide dan oksigen, hydrogen peroxide mudah untuk berdifusi melewati membran plasma.²³

Selanjutnya hydrogen peroxide diubah menjadi molekul air oleh enzim katalase dan glutathion peroksidase. SOD merupakan enzim antioksidan yang berefek sangat kuat dan merupakan pertahanan tubuh pertama dalam menghadapi radikal bebas. Keberadaan SOD dapat ditemukan di otak, hati, sel darah merah, ginjal, tiroid, testis, otot jantung,

mukosa lambung, 2 kelenjar pituitari, pankreas dan paru. SOD ditemukan pada seluruh makhluk hidup yang penting bagi perlindungan sistem aerobik untuk mencegah keracunan oksigen (dan derivat radikal bebas dalam oksigen). Kadar SOD juga dipengaruhi oleh usia jika semakin tua maka kadar SOD semakin menurun, selain itu juga dikendalikan oleh faktor genetic. Aktivitas SOD dapat dijadikan acuan pengukuran stress oksidatif dalam tubuh.²⁴

2.1.2 Jenis Antioksidan SOD

Berdasarkan aspek biokimia dan molekuler pada mamalia terdapat 3 jenis superoksida dismutase yaitu SOD1, SOD2 dan SOD 3.²⁵ Senyawa SOD 1 atau CuZnSOD merupakan enzim pertama yang dikarakteristik dan merupakan homodimer yang mengandung tembaga dan seng. Ditemukan pada sitoplasma intraseluler.²⁶ Senyawa ini telah lama dikenal sebagai antioksidan yang berfungsi untuk mengkatalisis superoksida menjadi hidrogen peroksida. Saat ini telah dilaporkan bahwa SOD 1 berperan dalam pensinyalan oksidatif : sebagai respon terhadap peningkatan ROS, dimana SOD 1 akan cepat berpindah ke dalam nukleus untuk menjaga stabilitas genom.²⁷ Senyawa SOD 2 atau MnSOD merupakan tetramer yang disintesis dan mengandung mangan. Enzim ini berada di dalam mitokondria.²⁵ Enzim MnSOD adalah antioksidan endogen yang dapat menangkap dan menguraikan radikal bebas di dalam sel menjadi zat yang kurang reaktif. Stres oksidatif menyebabkan kerusakan oksidatif lipid yang dapat dideteksi dengan peningkatan kadar Malondialdehyde (MDA) dalam sel.²⁸ Senyawa SOD3 atau ECSOD

adalah tetramer yang mengandung tembaga dan seng. Dan disintesis mengandung peptida sinyal untuk mengarahkannya ke ruang ekstraseluler.^{27,29}

2.1.3 Mekanisme Antioksidan SOD

Senyawa ROS merupakan radikal hidroksil ($\text{HO}\bullet$) dan superoksida ($\text{O}_2\bullet^-$), radikal peroksil dan *alkoxyl* ($\text{RO}_2\bullet$ dan $\text{RO}\bullet$), oksigen singlet ($^1\text{O}_2$)³⁰⁻³³, serta hidrogen peroksida (H_2O_2) dan peroksida organik (ROOH). Selain dapat menyebabkan kerusakan secara langsung pada molekul seperti lipid, asam amino dan DNA sel, senyawa ROS dapat mengaktifkan respons seluler baik enzimatik atau pun non-enzimatik.³⁴

Antioksidan merupakan senyawa yang dapat menetralkan ROS sehingga dapat mencegah kerusakan oksidatif pada sel dan jaringan. Beberapa antioksidan enzimatik antara lain *glutathione peroksidase* (GPx), *catalase* (CAT), dan *superoxide dismutase* (SOD).³⁵ Enzim SOD merupakan enzim yang paling banyak berperan dalam menetralkan berbagai macam molekul re-aktif. Penelitian pada model hewan menunjukkan bahwa kurangnya enzim SOD dapat menyebabkan perubahan degeneratif.³⁴

2.2 Caspase-3

2.2.1 Definisi Caspase-3

Caspase-3 terdiri dari dua subunit protein yang berukuran 12- dan 17-kDa. Peran Caspase-3 dalam apoptosis adalah untuk membelah dan mengaktifkan Caspase 3 -6, Caspase-7, dan Caspase-9 untuk memecah sel-sel apoptosis sebelum dikeluarkan. Setelah proses ini, protein Caspase-

3 dibelah dan dipecah sendiri oleh Caspase-8 dan Caspase-10.^{36,37} Pembelahan berurutan dan aktivasi protein ini sangat penting untuk tahap apoptosis.³⁸

Aktivasi Caspase-3 dapat terjadi melalui dua jalur apoptosis, yaitu jalur intrinsik dan ekstrinsik.³⁹ Apoptosis intrinsik diinduksi oleh stres seluler, yang menyebabkan aktivasi kelompok protein *B-cell lymphoma 2* (Bcl-2) yaitu Oligomer *Bcl-2 homologous antagonist killer* (BAK) dan *Bcl-2-associated X* (BAX) kemudian menginduksi pembentukan *pore* di membran luar mitokondria yang menyebabkan pelepasan sitokrom C terjadi.^{40,41} Sitokrom C (Cyt-C) berikatan dengan *apoptotic protease activating factor 1* (APAF-1), menginduksi oligomerisasi APAF1 untuk membentuk apoptosom.^{16,40} Apoptosom merekrut proCaspase-9, yang mengarah ke dimerisasi dan aktivasi Caspase-9. Aktivasi Caspase-9 merangsang kaskade Caspase yang berpuncak pada aktivasi Caspase-3 dan Caspase-7.³⁸

2.2.2 Mekanisme Seluler Caspase-3 dalam Apoptosis

Caspase-3 terdiri dari dua subunit protein yang berukuran 12- dan 17-kDa. Peran Caspase-3 dalam apoptosis adalah untuk membelah dan mengaktifkan *Caspase-6*, *Caspase-7*, dan *Caspase-9* untuk memecah sel-sel apoptosis sebelum dikeluarkan. Setelah proses ini, protein Caspase-3 dibelah dan dipecah sendiri oleh Caspase-8 dan Caspase-10.^{36,37} Pembelahan berurutan dan aktivasi protein ini sangat penting untuk tahap apoptosis.³⁷

Aktivasi Caspase-3 dapat terjadi melalui dua jalur apoptosis, yaitu jalur intrinsik dan ekstrinsik.³⁸ Apoptosis intrinsik diinduksi oleh stres seluler, yang menyebabkan aktivasi kelompok protein *B-cell lymphoma 2* (Bcl-2) yaitu Oligomer *Bcl-2 homologous antagonist killer* (BAK) dan *Bcl-2-associated X* (BAX) kemudian menginduksi pembentukan *pore* di membran luar mitokondria yang menyebabkan pelepasan sitokrom C terjadi.^{39,40} Sitokrom C (Cyt-C) berikatan dengan *apoptotic protease activating factor 1* (APAF-1), menginduksi oligomerisasi (APAF-1) untuk membentuk apoptosom.^{16,40} Apoptosom merekrut proCaspase-9, yang mengarah ke dimerisasi dan aktivasi Caspase-9. Aktivasi Caspase-9 merangsang kaskade Caspase yang berpuncak pada aktivasi Caspase-3 dan Caspase-7.³⁸

Jalur apoptosis ekstrinsik dirangsang melalui pengikatan ligan ke reseptor kematian yang sesuai dan *recruitment Fas-associated death domain* (FADD) ke *death receptor* terjadi. Molekul FADD berasosiasi dengan proCaspase-8/proCaspase-10 melalui domain efektor kematiannya untuk membentuk *multiprotein death-inducing signaling complex* (DISC). Pembentukan DISC memfasilitasi pembelahan dan aktivasi Caspase-8.^{40,42} Jalur ekstrinsik kemudian dapat dilanjutkan melalui jalur pensinyalan tipe I atau jalur pensinyalan tipe II.⁴³ Dalam pensinyalan tipe I, Caspase-8 secara langsung memotong dan mengaktifkan Caspase-3 yang menyebabkan kematian sel.⁴⁴ Pensinyalan tipe II, Caspase-8 memotong Caspase-8-cleaved (BID) dan mengaktifkan BAK dan BAX.⁴⁵ Protein ini kemudian menginduksi pembentukan lubang di mitokondria

dan memicu pelepasan sitokrom C yang mengarah ke aktivasi kaskade Caspase dan berpuncak pada aktivasi Caspase-3.⁴⁶

Timbal dilaporkan menyebabkan stres oksidatif dengan menghasilkan pelepasan *reactive oxygen species* (ROS) seperti radikal superoksida, hidrogen peroksida dan radikal hidroksil dan peroksida lipid⁴⁷. Mekanisme stres oksidatif yang diinduksi timbal melibatkan ketidakseimbangan antara pembentukan dan penghilangan ROS dalam jaringan dan komponen seluler yang menyebabkan kerusakan pada membran, DNA, dan protein.⁴⁸ Timbal asetat meningkatkan peroksidasi lipid dan produksi oksida nitrat dengan pengurangan bersamaan dalam enzim antioksidan sebagai katalase dan superoksida dismutase.⁴⁹ Timbal menginduksi peningkatan signifikan dalam ekspresi Caspase-3 yang menunjukkan bahwa timbal menginduksi terjadinya apoptosis.¹⁰

2.3 Seledri

2.3.1 Morfologi Habitat dan Klasifikasi Seledri

Seledri atau *Apium graveolens* Linn. merupakan tumbuhan yang termasuk ke dalam keluarga *Apiaceae*. Seledri berasal dari daerah Eropa Selatan dengan habitat alaminya berupa tanah berawa di dekat pantai. Seledri memiliki tangkai berserat panjang yang meruncing menjadi daun. Batang, daun atau hipokotilnya dapat dikonsumsi sebagai sayuran, sedangkan bijinya digunakan sebagai bumbu dan obat⁵⁰⁻⁵²



Gambar 1. Tanaman Seledri (*Apium graveolens* Linn.)⁵³

Menurut Malhotra (2006) klasifikasi taksonomi tanaman seledri adalah sebagai berikut :

Kerajaan : *Plantae*
Divisi : *Spermatophyta*
Sub divisi : *Angiospermae*
Kelas : *Magnoliopsida (Dicotyledoneae)*
Sub kelas : *Rosidae*
Ordo : *Apiales*
Famili : *Apiaceae*
Genus : *Apium*
Spesies : *Apium graveolens* Linn.

2.3.2 Kandungan Senyawa Fitokimia Tanaman Seledri

Senyawa aktif yang terkandung dalam seledri antara lain L-3-n-butylphthalide, sedanolide, asam linoleat, flavonoid, senyawa fenolik dan minyak atsiri.^{17,18} Beberapa penelitian terdahulu telah melaporkan adanya

aktivitas farmakologi seledri seperti antimikroba, anti-peradangan, anti-arthritis, antiulcerogenic, antihiperlipidemia, antioksidan dan antihipertensi.^{17-19,23,61,62} Beberapa kandungan seledri seperti apigenin, luteolin, asam caffeic, asam p-coumaric, asam ferulic, tanin, saponin, dan kaempferol yang memiliki karakteristik antioksidan kuat untuk menghilangkan radikal sehingga dapat menjaga fungsi testis dan meningkatkan kesuburan pria^{12,59,62,63}.

2.3.3 Pengaruh Tanaman Seledri terhadap Radikal Bebas

Flavonoid (apiin, apigenin, dan rutin) dan terpen (α -ionone) memberikan kontribusi terbesar terhadap aktivitas pemulungan DPPH, diikuti oleh vitamin (riboflavin, phyloquinone, dan kolin), pigmen (safflomin A), dan karotenoid (3-hidroksi-3'-okso- β , ϵ -karoten).¹³ Apiin, apigenin, dan rutin memiliki kapasitas tertinggi, terutama karena *bond dissociation energy* (BDE) ikatan O-H yang lebih rendah pada cincin-B, yang meningkatkan kemampuan mendonorkan atom-H. Penelitian terdahulu yang membandingkan kapasitas *scavenging* DPPH dan H₂O₂ dari anilin dan fenol, menemukan bahwa fenol lebih efektif dalam mengais DPPH daripada anilin, karena kemampuannya untuk kehilangan atom hidrogen lebih mudah. Menurut struktur kimia flavonoid, kombinasi ikatan rangkap C2 = C3 dan gugus 4-karbonil pada cincin-C dapat secara efisien menggeser elektron cincin-B melalui efek resonansi, yang membantu meningkatkan kapasitas penangkapan radikal^{64,65}

Dilaporkan juga bahwa asam lemak tak jenuh (asam oleat dan asam linolenat) dan vitamin (asam pantotenat dan vitamin E suksinat)

memberikan kontribusi terbesar terhadap aktivitas penangkapan radikal, diikuti oleh flavonoid (3,7-dihidroksi flavon dan apigenin), kumarin (peucedanin), vitamin (kolin dan riboflavin), dan pigmen (safflomin A), sedangkan flavonoid (sianidin dan apiin) memberikan kontribusi terkecil.¹³

2.3.4 Pengaruh Tanaman Seledri terhadap Caspase 3

Menurut penelitian yang telah dilakukan, ekstrak daun seledri dapat menginduksi apoptosis seluler dengan cara yang bergantung pada konsentrasi dan waktu melalui jalur yang dimediasi oleh Caspase dan mitokondria.⁶⁶ Jalur kematian yang diprakarsai oleh mitokondria memainkan peran penting dalam memicu apoptosis sebagai respons terhadap rangsangan tersebut. Pada jalur kematian yang diprakarsai mitokondria, mitokondria yang mengalami transisi permeabilitas melepaskan protein apoptogenik atau faktor pemicu apoptosis dari ruang antar membran mitokondria ke dalam sitosol untuk mengaktifkan Caspase-9, dan mengaktifkan Caspase-9 pada gilirannya membelah dan mengaktifkan algojo Caspase-3. Aktivitas Caspase-3, -8, dan -9 diregulasi, menunjukkan bahwa Caspase berpartisipasi dalam proses apoptosis ini. Bax adalah komponen kunci untuk apoptosis yang diinduksi seluler melalui stres mitokondria.³⁶ Setelah stimulasi apoptosis, Bax membentuk oligomer dan mentranslokasi dari sitosol ke membran mitokondria^{67,68} dan telah terbukti menginduksi pelepasan sitokrom c dan langkah-langkah selanjutnya (termasuk Caspase-9 dan Caspase-3) pada fase eksekusi apoptosis^{69,70}. Ekstrak daun seledri dilaporkan dapat

meningkatkan ekspresi Bax proapoptosis, sementara Bcl-xL anti apoptosis diatur ke bawah setelah peningkatan signifikan aktivitas Caspase-3⁶⁶.

Seledri mengandung senyawa flavonoid seperti apiein, apigenin, dan luteolin yang merupakan senyawa antioksidan kuat. Senyawa antioksidan pada ekstrak seledri mampu melindungi membran sel dari kerusakan secara langsung maupun tidak langsung yang berdampak pada *hypothalamus-pituitary-testis* (HPT) sehingga dapat meningkatkan jumlah sperma dan kesuburan pada pria.^{71,72} Senyawa luteolin dalam ekstrak seledri dapat menghasilkan aktivasi Calpain dan p38. Aktivasi p38 memfosforilasi dan mengaktifkan p53, yang menargetkan gen proapoptosis yang berbeda seperti Bax dan Fas. Translokasi Bax ke dalam sel germinal mitokondria menginduksi permeabilitasnya menghasilkan pelepasan Sitokrom C (Cyt. C). Kumpulan dari Cyt. C dengan *apoptotic protease activating factor-1* (APaf-1) dan proCaspase-9 membentuk apoptosom akan menyebabkan aktivasi proCaspase-9 menjadi *active Caspase 3 -9 (initiator Caspase 3)*, yang selanjutnya mengaktifkan proCaspase-3 menjadi *active Caspase 3 -3*. Caspase-3 kemudian membelah substrat apoptosis yang mengandung motif pengenalan DxxD yang mengarah ke proteolisis beberapa substrat.⁷³⁻⁷⁵ Penelitian sebelumnya mengungkapkan bahwa aktivitas Caspase-9 dan Caspase-3, dan peningkatan tingkat apoptosis telah mengakibatkan degenerasi sel Sertoli dan Leydig, sehingga mengurangi produksi, viabilitas, dan motilitas sperma.⁷⁶

Beberapa penelitian sebelumnya melaporkan bahwa DOX menyebabkan gangguan fungsi testis dan mempengaruhi androgenik pada tikus jantan. Senyawa luteolin dapat memperbaiki kerusakan oksidatif testis dan epididimis yang diinduksi DOX dan memastikan aktivitas steroidogenik normal pada tikus percobaan dengan mekanisme yang berkaitan dengan penekanan peradangan, stres oksidatif, dan apoptosis.⁷⁷⁻⁷⁹ Efek antioksidan, antiinflamasi, dan anti-apoptosis luteolin yaitu melalui represi JNK, p38, ERK1, NF-B, p38 MAPK, Bax, serta peningkatan regulasi Bcl-2, Keap1, Nrf2, HO-1, NQO1, KLF9, mTOR dan Sirt1.⁸⁰⁻⁸⁴

2.4 Testis

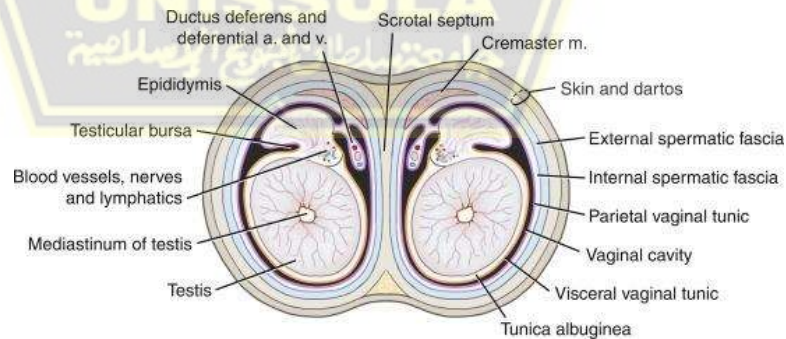
2.4.1 Definisi Testis

Testis adalah organ kompleks yang terdiri dari tubulus seminiferus yang mengandung sel Sertoli dan sel germinal dan interstitium, yang mengandung sel penghasil steroid (Leydig) di bawah regulasi LH.¹¹⁷ Reseptor LH pada permukaan sel sel Leydig menyebabkan protein G-, adenil siklase-, dan aktivasi biosintesis steroid yang dimediasi adenosin monofosfat siklik.

Testis adalah bagian dari sistem reproduksi pria yang merupakan organ terpenting untuk fungsi gametogenesis dan fungsi seksual.⁴⁷ Testis ovoid pada laki-laki sehat memiliki volume 15 sampai 25 mL dengan panjang longitudinal 4,5-5,1 cm.^{48,49} Testis terdiri dari tiga lapisan berbeda yang mengelilingi parenkim, yaitu tunika vaginalis, tunika albuginea, dan tunika vaskulosa. Testis menerima suplai darah dari arteri

testis, arteri kremaster, dan arteri diferensial.^{50,51} Testis dibagi menjadi kompartemen oleh septa, yang merupakan proyeksi dari tunika albuginea. Setiap septum memisahkan tubulus seminiferus, serta jaringan interstisial yang terdiri dari sel Leydig, pembuluh darah, limfatik, sel mast, saraf, dan makrofag.^{47,49}

Testis menghasilkan gamet jantan dan hormon seksual jantan (androgen).⁵² Kesuburan pria tergantung pada keberhasilan spermatogenesis yang menggambarkan semua proses yang terlibat dalam produksi gamet, dan steroidogenesis yang mengacu pada reaksi enzimatik yang mengarah pada produksi hormon steroid pria.^{53,54} Spermatogenesis dan steroidogenesis berlangsung dalam dua kompartemen yang secara morfologis dan fungsional dapat dibedakan satu sama lain, yaitu kompartemen tubular, yang terdiri dari tubulus seminiferus dan kompartemen interstisial antara tubulus seminiferus. Integritas kedua kompartemen diperlukan untuk produksi sel sperma secara kuantitatif dan kualitatif.^{49,55} Secara umum struktur anatomi testis ditampilkan pada Gambar 2.



Gambar 2. Struktur Anatomi Testis

2.4.2 Pengaruh Timbal terhadap Testis

Beberapa penelitian terdahulu melaporkan bahwa paparan Pb yang berkepanjangan dapat menyebabkan kerusakan testis.¹¹⁸ Testis adalah organ reproduksi pria yang penting karena mengatur proses spermatogenesis yang bergantung pada fungsi normal spermatogonia dan sel Leydig.¹¹⁹ Di testis, proses normal spermatogenesis bergantung pada regenerasi spermatogonia yang kuat dan menyebabkan testis sangat sensitif terhadap toksisitas Pb.^{108,120} Penelitian terdahulu melaporkan bahwa spermatogonia dan sel Leydig dirusak oleh Pb dan sintesis testosteron ditekan selama paparan Pb, sehingga mempengaruhi fungsi reproduksi pria.^{121,122} Penelitian terdahulu menemukan bahwa jumlah spermatogonia dan sel Leydig menurun, testosteron serum, jumlah sperma dan motilitas sperma juga berkurang pada tikus yang diberi Pb.¹²³

Keracunan timbal menyebabkan penghambatan fungsi testis dengan kelenjar seksual sekunder seperti prostat, epididimis dan vesikula seminalis, yang mengakibatkan perubahan komposisi biokimia dan mempengaruhi steroidogenesis serta gametogenesis.^{116,124} melaporkan bahwa paparan Pb berpengaruh negatif terhadap fungsi testis dan kualitas semen sehingga menyebabkan kemandulan. Akumulasi timbal dalam testis diketahui memiliki efek antispermatogenik.^{115,125,126}

Paparan timbal kronis dapat menyebabkan gangguan fungsional dan gangguan morfologi testis.^{110,127} Timbal dapat mengurangi parameter mani termasuk kepadatan, jumlah sperma total dan viabilitas dengan peningkatan jumlah spermatozoa patologis, penurunan libido, perubahan

spermatogenesis, kerusakan kromosom, infertilitas dan perubahan serum testosterone.¹²⁸ Testis tikus yang diberi timbal menunjukkan degenerasi yang luar biasa dan tubulus seminiferus yang mengalami atrofi dengan tidak adanya tahapan sel germinal yang berdiferensiasi secara teratur hingga spermatozoa matang.¹²⁹

2.4.3 Prevalensi Keracunan Timbal pada Testis

Paparan timbal yang merupakan salah satu polutan logam beracun, hingga saat ini masih menjadi perhatian global. Namun, dalam beberapa penelitian telah dilaporkan bahwa prevalensi keracunan timbal diremehkan di negara-negara berpenghasilan rendah dan menengah.^{1,130} Berdasarkan *Institute for Health Metrics and Evaluation* (IHME), sekitar 63,2% dari perkembangan idiopatik, cacat intelektual, 10,3% *hypertensive heart diseases*, 5,6% *ischemic heart diseases*, dan 6,2% stroke terkait dengan paparan timbal.¹³¹

Paparan timbal telah dikaitkan dengan beberapa disfungsi reproduksi pada pria, seperti penurunan libido, gangguan spermatogenesis, dan kerusakan kromosom yang dianalisis berdasarkan hubungan antara BLL dan kualitas sperma.^{127,132} *Occupational Safety and Health Administration* (OSHA) mengungkapkan bahwa kadar BLL di atas 40 g/dL dapat mempengaruhi kualitas sperma.^{96,127} Penelitian terdahulu mengungkapkan bahwa peningkatan konsentrasi timbal dalam air mani dapat menyebabkan infertilitas pada pria.¹¹⁶ Infertilitas pria menyumbang

sekitar 50% kasus infertilitas pada 10-15% pasangan dengan penyebab utama kuantitas dan kualitas sperma yang dihasilkan^{103,133}.

Paparan timbal dapat menyebabkan pembentukan *reactive oxygen species* (ROS) dalam sperma yang menyebabkan stres oksidatif dan gangguan fungsi sperma^{127,134}. Data epidemiologis menunjukkan bahwa paparan timbal juga dapat menyebabkan penyakit prostat pada pria dewasa karena timbal dapat menggantikan ion Zn pada protein sehingga memicu penghambatan enzim. Perpindahan Zn oleh timbal dalam cairan mani dapat menentukan efek fungsi prostat, yang menyebabkan infertilitas¹³⁵⁻¹³⁷.

2.4.4 Mekanisme Infertilitas pada Tikus yang Diinduksi oleh Timbal

Timbal (Pb) merupakan faktor risiko utama yang mempengaruhi kesuburan pria.¹³⁸ Ada dua jalur yang memungkinkan terjadinya infertilitas pria, yaitu (i) jalur lokal (langsung) melalui pembentukan *reactive oxygen species* (ROS) berlebih yang mengakibatkan kerusakan oksidatif pada jaringan reproduksi, dan gangguan aktivitas enzim seperti *alkaline phosphatase*, SOD, GPx, CAT dan *sodium potassium ATPase*, dan (ii) jalur sentral (tidak langsung) melalui gangguan hormonal pada sumbu *hypothalamus-pituitary-testis* (HPT), yang meliputi FSH, LH, testosteron, estrogen (termasuk E2) dan reseptornya^{22,139,140}. Penelitian sebelumnya mengungkapkan bahwa gangguan spermatogenesis yang disebabkan oleh Pb dapat dimediasi oleh kelebihan produksi ROS diikuti oleh penghambatan aktivitas enzim antioksidan sebagai akibat dari

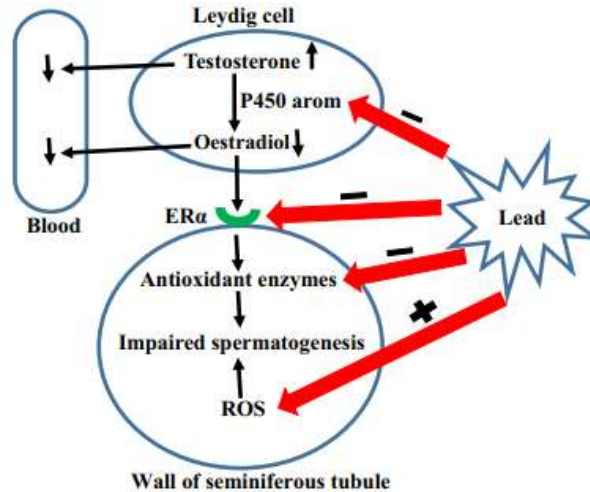
penurunan ekspresi Cyp19 dan *estrogen receptor alpha* (ER α) mRNA, dan tingkat estradiol (E2).²²

Efek toksik Pb dapat dimediasi oleh kelebihan produksi ROS. Paparan Pb menyebabkan akumulasi ROS yang dapat mempengaruhi fungsi reproduksi pria.^{141,142} Selain itu, tingkat ROS yang tinggi dapat menghambat steroidogenesis dalam sel Leydig.^{22,143} Kerusakan oksidatif disebabkan oleh ketidakseimbangan antara produksi ROS dan aktivitas enzim antioksidan, misalnya SOD, GPx dan CAT.¹⁴⁴

Jaringan testis mengandung banyak asam lemak tak jenuh dan tingkat proliferasi sel yang tinggi sehingga menjadikannya sangat rentan terhadap kelebihan produksi ROS yang menginduksi kerusakan oksidatif. Jaringan testis tergantung pada aksi enzim antioksidan, seperti SOD, GPx dan CAT, untuk perlindungan seluler terhadap kerusakan oksidatif.^{142,145,146} Sistem antioksidan yang terganggu pada sel akan mengganggu eliminasi ROS yang bila terakumulasi menyebabkan kerusakan oksidatif pada protein, DNA, dan lipid membran. Membran testis kaya akan asam lemak tak jenuh dan mudah bereaksi dengan radikal bebas sehingga terjadi *lipid peroxide* (LPO) yang menyebabkan kerusakan struktur membran testis dan integritas spermatozoa.^{22,147} Peroksidasi lipid ini juga dapat menghambat aktivitas enzim P450 dengan peningkatan ROS, dan kerusakan testis oksidatif, yang dapat berkontribusi pada infertilitas pria.^{148,149}

Paparan Pb dapat mengganggu spermatogenesis dan menghasilkan kualitas semen yang buruk melibatkan perubahan kadar

luteinizing hormone (LH), *follicle-stimulating hormone* (FSH), estrogen, dan testosterone.^{146,150-152} Estrogen terutama estradiol (E2) memainkan peran penting dalam regulasi spermatogenesis, dan pada *pathways* yang dapat menyebabkan infertilitas pria¹⁵³⁻¹⁵⁶. Produksi estrogen testis dimediasi oleh *downregulation* enzim Aromatase P450 (P450 arom) yang secara ireversibel mengubah androgen menjadi estrogen. Enzim P450 arom dikodekan oleh gen Cyp19 yang diekspresikan di sebagian besar sel testis. Estradiol mengikat *estrogen receptor alpha* (ER α) dan *estrogen receptor beta* (ER β) kemudian memodulasi proliferasi sel testis seperti spermatogonia, spermatosit dan sel Leydig, dan memainkan peran penting dalam kualitas sperma, motilitas spermatozoa dan pematangan sperma.^{22,155,157,158} Timbal dapat menyebabkan infertilitas pria melalui penghambatan ganda P450 arom dan enzim antioksidan, yang dimediasi oleh pengurangan E2 dan reseptornya ER α yang menunjukkan kemampuan kadar Pb yang lebih tinggi untuk menembus sawar darah-testis dan kemudian terakumulasi dalam testis.^{10,138,159-161} Timbal dapat menghambat aktivitas P450 baik dengan menghalangi radikal *ferroxy* yang terlibat dalam aktivitas P450 atau dengan membentuk kompleks dengan residu sistein.^{162,163}



Gambar 3. Diagram skematis yang menggambarkan kemungkinan pathways yang terlibat dalam toksisitas testis yang diinduksi Pb. ²².

2.5 Timbal

2.5.1 Definisi dan Karakteristik Timbal

Timbal (Pb) merupakan logam berat berwarna kelabu kebiruan, dapat menguap pada suhu 550-600°C dan bereaksi dengan O₂ membentuk timbal oksida (PbO) di udara.⁸⁵ Timbal memiliki sifat tahan terhadap korosi sehingga menjadi salah satu jenis logam yang paling sering digunakan pada pembuatan berbagai macam produk.⁸⁶ Timbal tidak dapat terurai secara hayati dan penggunaan yang terjadi secara terus menerus menyebabkan adanya akumulasi di lingkungan.¹

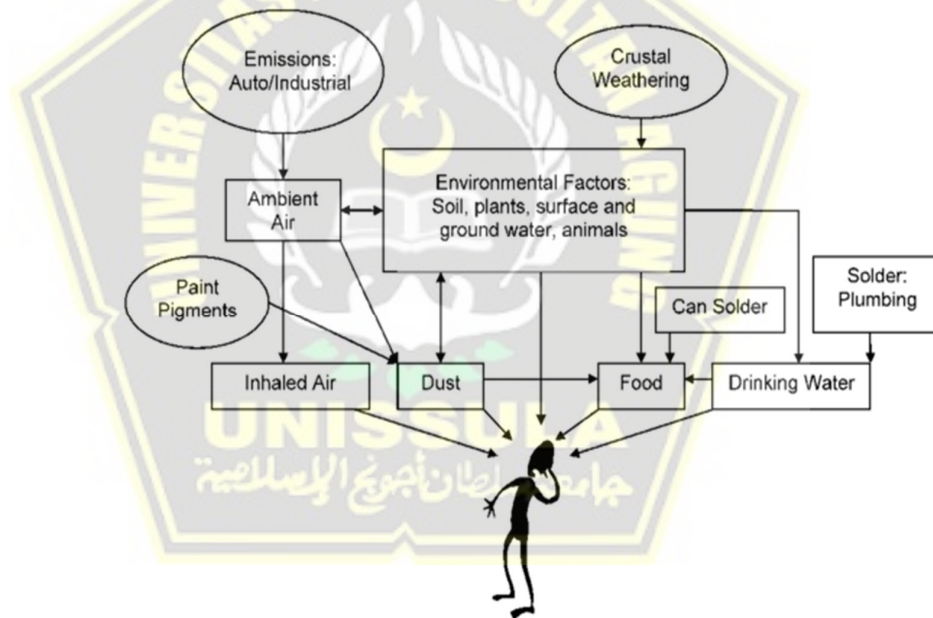
2.5.2 Prevalensi Keracunan Timbal

Timbal merupakan salah satu polutan yang berbahaya karena timbal bersifat *multi-target toxicant* yang dapat memicu masalah kesehatan seperti penyakit gastrointestinal, hematopoietik, kardiovaskular, dan sistem reproduksi.^{1,87,88} *National Poisoning Data*

System (NPDS) dari *American Association of Poison Control Centers* (AAPCC) melaporkan adanya 2286 paparan tunggal terhadap timbal pada tahun 2019 dengan 1080 merupakan anak dibawah 6 tahun.⁸⁹

2.5.3 Sumber Paparan Timbal

Paparan timbal dapat berasal dari berbagai proses kegiatan industri seperti tambang, produksi baterai, peleburan logam, hingga fabrikasi radiator dan kabel. Penggunaan pipa air menggunakan logam dapat menjadi sumber kontaminasi timbal karena adanya kandungan timbal pada pipa yang digunakan.^{90,91} Hal ini menyebabkan paparan timbal tidak dapat Paparan timbal melalui sentuhan, konsumsi atau pun inhalasi dapat menyebabkan keracunan apabila terjadi secara terus menerus.^{92,93}



Gambar 4. Sumber Paparan Timbal⁹⁴

2.5.4 Toksikokinetika Timbal pada Tubuh

Timbal merupakan salah satu senyawa yang dapat melayang di udara sebagai partikel dan tidak mengalami penguraian atau degradasi sehingga paparan timbal juga dapat terjadi secara inhalasi atau dapat mengendap di produk makanan dan masuk ke dalam tubuh setelah dikonsumsi.⁹⁵ Menurut *United States (US) Centers for Disease Control and Prevention* dan *National Institute of Occupational Safety and Health (NIOSH)*, kandungan timbal dalam darah ≥ 5 g/dL dianggap tinggi pada orang dewasa dan kadar timbal dalam darah pada orang dewasa harus diturunkan di bawah 10 g/dL.⁹⁶ Namun, penelitian terdahulu menemukan adanya komplikasi kesehatan akibat paparan timbal dengan kadar yang lebih rendah dan kecil.⁹⁷

Beberapa gejala akibat paparan timbal telah dilaporkan seperti adanya kehilangan ingatan jangka pendek, kurang konsentrasi, temperamental, depresi, nyeri perut, mual, nyeri kepala, penurunan berat badan, hingga hilangnya refleks tendon.^{86,98} Setelah timbal diserap ke dalam tubuh, lebih dari 95% terikat pada eritrosit dan sebagian besar Pb akan terakumulasi dalam hati, serta sisa Pb akan tersebar ke seluruh tubuh termasuk testis yang berkaitan dengan infertilitas.^{2,99-101}

Salah satu faktor utama yang terkait dengan infertilitas pria adalah kuantitas dan kualitas sperma yang dihasilkan.¹⁰³ Kegagalan spermatogenesis merupakan hasil dari beberapa penyebab termasuk

paparan zat yang berbahaya dari lingkungan.¹⁰⁴ Studi epidemiologi dan *in vivo* pada hewan menunjukkan bahwa logam berat timbal dapat membahayakan reproduksi pria.¹⁰⁵ Toksisitas timbal dimanifestasikan dalam fungsi reproduksi pria dengan pengendapan timbal di testis, epididimis, vas deferens, vesikula seminalis dan *seminal ejaculate*.¹⁰⁶ Beberapa penelitian terdahulu telah melaporkan mengenai efek toksisitas timbal pada fungsi testis dan kualitas air mani bahkan pada tingkat rendah dapat menghentikan spermatogenesis.^{10,107-116}

2.6 Vitamin E

Antioksidan Liposoluble kuat yang banyak dikenal adalah Vitamin E (Alfa Tokoferol) dengan dampak tinggi pada potensi kesuburan yang digunakan untuk mengevaluasi dampaknya terhadap kerusakan yang disebabkan oleh Timbal Asetat (Pb) dari perkembangan sistem reproduksi pria.¹⁷³ Antioksidan kuat yang larut dalam lemak adalah Vitamin E, ditemukan dalam konsentrasi yang lebih tinggi dalam sel – sel kekebalan dibandingkan dengan sel sel lain dalam darah, adalah untuk memodulasi fungsi kekebalan dalam salah satu nutrisi yang paling efektif.¹⁷⁴

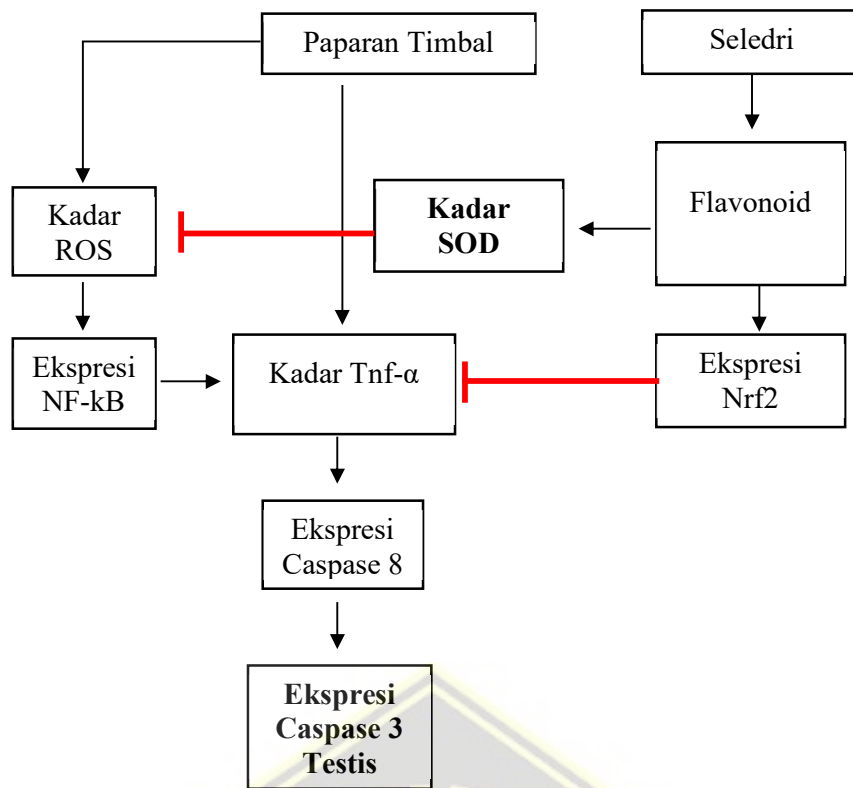
BAB III

KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS

3.1 Kerangka Teori

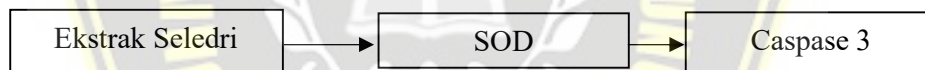
Sehubungan dengan mekanisme keracunan Timbal, paparan Timbal pada jaringan testis menghasilkan pembentukan ROS yang secara langsung menginduksi kerusakan aktivasi NF- κ B yang berperan dalam stimulasi sintesis protein pro-peradangan, termasuk TNF alpha. Produksi TNF alpha secara terus menerus akibat paparan Timbal akan menginduksi aktivasi cascade Caspase 8 hingga Caspase 3 yang dapat berujung pada apoptosis sel pada testis yang berakibat pada kerusakan fungsi testis dan ditandai oleh adanya ROS.

Seledri diketahui mengandung beberapa zat aktif seperti apigenin dan antosianin yang berperan sebagai antioksidan dan anti-peradangan. Penelitian terdahulu menyebutkan bahwa Antosianin dapat menghambat produksi ROS sehingga dapat mencegah aktivasi NF- κ B dan penurunan produksi sitokin pro-peradangan seperti TNF alpha yang berujung pada penekanan ekspresi Caspase 3. Selain itu Antosianin juga diketahui dapat mengaktifkan *nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (Nrf2) yang dapat memblokir jalur TNF alpha. Pemblokiran TNF alpha oleh Nrf2 dapat mencegah terjadinya induksi Caspase 3 sel pada jaringan testis sehingga fungsi testis terjaga yang ditandai dengan penurunan kadar SOD. Ringkasan kerangka teori dijelaskan pada Gambar 3.1.



Gambar 5. Kerangka Teori

3.2 Kerangka Konsep



Gambar 6. Kerangka Konsep

3.3. Hipotesis

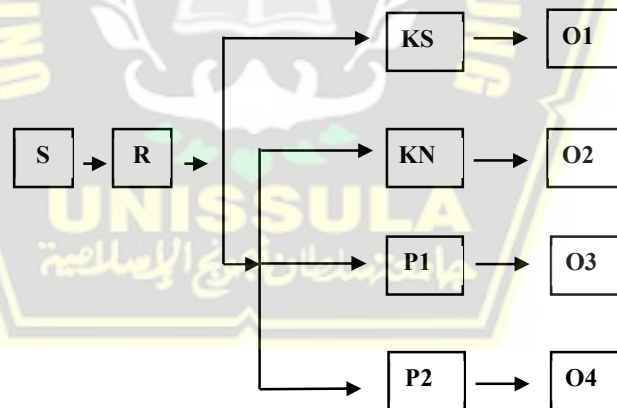
1. Terdapat pengaruh ekstrak seledri 300 mg/kgBB terhadap Kadar SOD jaringan testis pada tikus wistar yang terpapar Timbal Asetat (Pb)
2. Terdapat pengaruh ekstrak seledri 300 mg/kgBB terhadap *Caspase 3* -3 jaringan testis pada tikus wistar yang terpapar Timbal Asetat (Pb)

BAB IV METODE PENELITIAN

4.1 Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental *post test only control group* dengan metode rancang acak lengkap dengan lima kali ulangan tiap perlakuan. Subjek penelitian adalah tikus jantan galur wistar (*Rattus norvegicus*) dengan bobot badan 180-200 gr. Perlakuan pada penelitian ini terdiri dari:

1. Kontrol Sehat (Tikus sehat tanpa paparan Timbal),
2. Kontrol Negatif (Tikus mengalami paparan Timbal tanpa pemberian perlakuan), dan diberikan pakan standar,
3. Perlakuan 1 / P1 (Tikus diberi paparan Timbal 200mg/kgBB/hari dan diberikan vitamin E 100 IU serta pakan standar),
4. Perlakuan 2 / P1 (Tikus diberi paparan Timbal 200mg/kgBB/hari dan ekstrak seledri 300 mg/kgBB/hari serta pakan standar)



Gambar 7. Alur Penelitian

Keterangan

- S : Sampel
R : Randomisasi
KS : Kontrol Sehat
KN : Kontrol Negatif
KP : Kontrol Positif
P : Perlakuan
O : Observasi Parameter

4.2 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

4.2.1 Variabel Penelitian

4.2.1.1 Variabel bebas

Variabel bebas penelitian ini adalah ekstrak Seledri¹⁶⁴

4.2.1.2 Variabel Terikat

Variabel terikat penelitian ini adalah Kadar SOD dan Ekspresi Caspase

4.2.2 Definisi Operasional

Tabel 2. Definisi Operasional

No	Variable	Deskripsi	Unit	Skala
1	Ekstrak Seledri	adalah ekstrak dari Seledri yang berasal dari area Jawa Tengah dan berusia 1-3 bulan yang di ekstrak menggunakan pelarut etanol yang dibuat sediaan oral dengan dosis 300 mg/kg BB	mg	Ordinal
2	SOD	Superoksida dismutase adalah enzim yang mengkatalisis radikal superoksida menjadi oksigen molekuler biasa dan hidrogen peroksida. Analisa SOD menggunakan ELISA	pg/mL	Rasio
3	Caspase 3	adalah protein yang terdiri dari 2 subunit berukuran t 12- dan 17-	%	Rasio

	kDa yang berperan dalam inisiasi proses apoptosis. Caspase 3 dilihat menggunakan metode immunohistokimia dan dianalisis menggunakan software ImageJ		
4. Vitamin E	Merupakan vitamin larut lemak yang tersusun atas α -tocopherol dengan dosis 100 IU	IU	Ordinal

4.3 Subjek Penelitian dan Sampel Penelitian

4.3.1 Subjek Penelitian

Subjek penelitian ini adalah tikus jantan galur Wistar (*Rattus norvegicus*) dengan bobot badan 180-200 gram dan berusia 2-3 bulan yang dinyatakan sehat dan layak dijadikan subjek penelitian oleh dokter hewan yang dipapar timbal secara oral dengan kadar 200 mg/kg BB selama 14 hari .

4.3.2 Sampel Penelitian

4.3.2.1 Kriteria Inklusi

Kriteria inklusi yang diterapkan dalam penelitian ini antara lain tikus putih jantan galur wistar, berumur 2-3 bulan, tikus sehat, bobot badan 180-200 gram.

4.3.2.2 Kriteria Eksklusi

Tikus putih jantan galur Wistar dengan kriteria memiliki kelainan anatomis, sudah pernah digunakan untuk penelitian sebelumnya

4.3.2.3 Kriteria Drop Out

Tikus yang masuk kriteria *drop out* pada penelitian ini adalah tikus mati atau infeksi selama penelitian

4.3.3 Cara Pengambilan Sampel Penelitian

Pengambilan sampel dilakukan secara acak. Tikus putih jantan galur Wistar dibagi menjadi 4 kelompok yaitu Kontrol Sehat (tikus kondisi sehat tanpa dipapar Timbal), Kontrol Negatif (tikus dipapar Timbal dan tidak diberi perlakuan), Perlakuan 1 atau P1 (tikus diinduksi timbal dan diberi vitamin E secara oral), dan Perlakuan 2 atau P2 (tikus dipapar Timbal yang diberi injeksi ekstrak Seledri dosis 300 mg/kgBB secara oral).

4.3.4 Besar Sampel

Pengambilan sampel dilakukan secara acak. Tikus putih jantan galur Wistar dibagi menjadi 4 kelompok yaitu Kontrol Sehat (tikus kondisi sehat tanpa dipapar Timbal), Kontrol Negatif (tikus dipapar Timbal dan tidak diberi perlakuan), Perlakuan 1 atau P1 (tikus diinduksi timbal dan diberi vitamin E secara oral), dan Perlakuan 2 atau P2 (tikus dipapar Timbal yang diberi ekstrak Seledri dosis 300 mg/kgBB secara oral).

Sampel minimal mengikuti ketentuan WHO yaitu sebanyak 5 ekor per jenis perlakuan dikali dengan jumlah kelompok perlakuan pengambilan sampel. Pengambilan sampel dilakukan satu kali pada hari

ke 15 setelah pemberian pertama perlakuan, sehingga jumlah sampel minimal pada penelitian ini adalah 20 ekor tikus wistar. Berikut rumus menghitung besar sampel menurut WHO.

4.4 Alat dan Bahan

4.4.1 Alat

Alat yang digunakan dalam pembuatan hewan model keracunan timbal antara lain kandang pemeliharaan, spuit sonde, spuit 1 mL, botol air minum tikus, dan botol kaca gelap. Alat yang digunakan untuk pengambilan data antara lain vacutainer edta, tabung hematokrit, mikropipet 1000 uL, dan mikropipet tip 1000 uL. Alat yang digunakan untuk analisis data terdiri dari *microplate reader*, mikroskop binokuler, *staining jar*, *coated desk glass*, *cover glass*, dan laptop.

4.4.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri asam asetat, antibodi *Caspase 3*, IHC staining kit, alkohol 30%, 40%, 60%, 50%, 70%, 80%, 90%, 96%, xylen, buffer sitrat, aquades, etanol, akuades, pakan tikus, dan chloroform, SOD ELISA Kit.

4.5 Cara Penelitian

4.5.1 Perolehan Ethical Clearance

Penelitian diawali dengan pengajuan *ethical clearance* penelitian yang diajukan kepada komisi etik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

4.5.2 Cara Pembuatan Ekstrak Seledri

Seledri sebanyak ± 600 gram dipotong hingga halus, dikeringkan pada suhu $50 - 60^{\circ} \text{C}$ dan diblender menjadi bubuk kering. Bubuk kering dimaserasi menggunakan etanol 95%, kemudian disaring menggunakan kertas saring dan filtrat yang dihasilkan ditampung, sedangkan residu yang tertinggal di kertas saring kemudian dimaserasi kembali dengan metode yang sama. Kandungan etanol dievaporasi menggunakan *rotary evaporator* hingga tersisa ekstrak kental. Ekstrak kental yang terbentuk kemudian disimpan dalam lemari pendingin dengan suhu $2-8^{\circ}\text{C}$ hingga pemberian perlakuan diberikan.

4.5.3 Penetapan Dosis

Dosis ekstrak Seledri ditentukan dengan studi literatur sebelum proses penelitian. Penelitian terdahulu menyatakan bahwa pemberian 300 mg/kgBB/hari ekstrak Seledri secara oral melindungi fungsi testis¹⁶⁵. Oleh karena itu penelitian ini menggunakan dosis 300 mg/kgBB/hari . Tikus dalam penelitian ini memiliki bobot badan berkisar antara $180-200 \text{ gr}$, sehingga dosis ekstrak Seledri yang diberikan secara oral adalah 60 mg/tikus/hari .

4.5.4 Pembuatan Paparan Timbal dan Pemberian Perlakuan pada Subjek Percobaan

1. Tikus diadaptasi selama 1 minggu setelah sampai di tempat penelitian
2. Tikus sehat tidak diberi paparan timbal asetat dan tetap diberi pakan standar selama 14 hari

3. Tikus kontrol negatif, tikus diinduksi timbal asetat secara oral dengan dosis 200 mg/kg BB yang dilarutkan dalam aquades 2mL selama 14 hari dan tetap diberikan pakan standar¹⁶⁶.
4. Tikus kontrol positif, tikus diinduksi timbal asetat secara oral dengan dosis 200 mg/kg BB yang dilarutkan aquadestilata sebanyak 2 ml dan bersama diberi vitamin E secara oral dengan dosis 100 IU dan tetap diberi pakan standar selama 14 hari
5. Tikus perlakuan, tikus diinduksi timbal asetat secara oral dengan dosis 200 mg/kg BB yang dilarutkan dalam aquadestilata sebanyak 2 ml dan bersamaan diberi ekstrak seledri dengan dosis 300 mg/kg BB dan tetap diberikan pakan standar selama 14 hari ¹⁶⁵

4.5.5 Pengambilan Sampel Darah

Pengambilan sampel darah diambil dari tikus melalui vena orbital menggunakan tabung hematokrit sebanyak 3 mL tanpa pembiusan darah dilakukan pada hari ke 15 setelah hari pertama pemberian perlakuan. Sampel darah dimasukkan ke dalam *vacutainer* EDTA dan kemudian diputar membentuk angka 8 secara perlahan agar tidak menggumpal. plasma darah dimasukkan ke dalam kotak pendingin bersuhu 2-8°C untuk proses transportasi menuju laboratorium uji. Sampel darah segera dianalisis Kadar SOD tidak melebihi 12 jam setelah waktu pengambilan sampel.

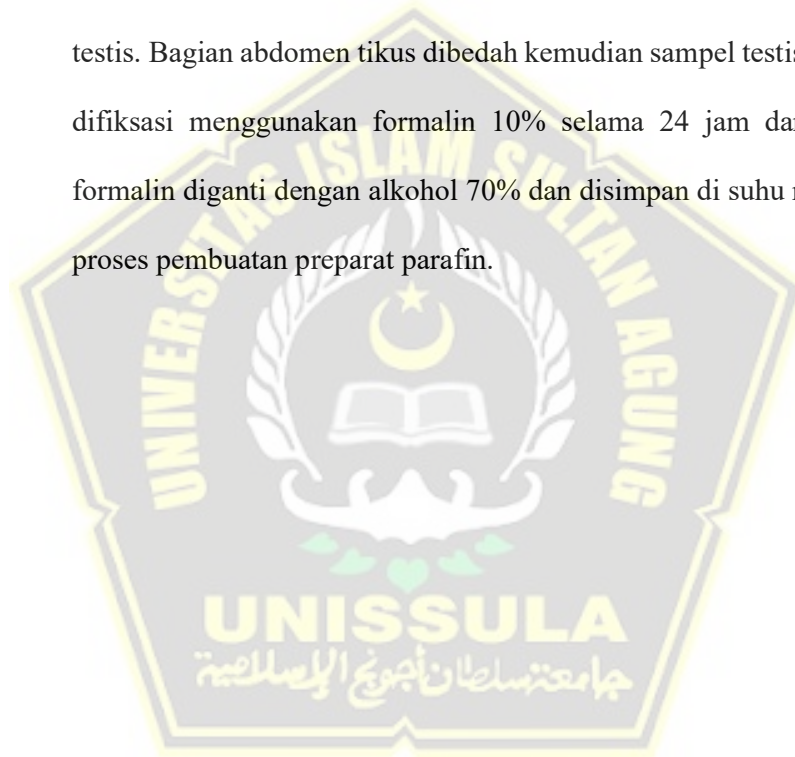
4.5.6 Perhitungan Kadar SOD

Sampel plasma darah dianalisis kadar SOD menggunakan metode *Enzyme Linked Immunoabsorbance Assay* (ELISA). Sebelum proses

analisis, plasma darah dicairkan dalam suhu ruang dan diresuspensi untuk agar serum tercampur secara merata. Analisis ELISA SOD dilakukan dengan metode kit dari Finetest ® (Wuhan, China). Langkah-langkah analisis kadar SOD mengikuti protokol yang sesuai dengan petunjuk yang ada. Pembacaan dilakukan dengan menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 450 nm.

4.5.7 Pengambilan Sampel Jaringan

Tikus setelah 24 jam pasca pemberian perlakuan terakhir dimatikan dengan cara servikal dislokasi untuk proses pengambilan organ testis. Bagian abdomen tikus dibedah kemudian sampel testis diambil dan difiksasi menggunakan formalin 10% selama 24 jam dan setelah itu formalin diganti dengan alkohol 70% dan disimpan di suhu ruang sampai proses pembuatan preparat parafin.



4.5.8 Pembuatan Blok Parafin

Pembuatan blok paraffin dilakukan dengan beberapa tahap antara lain sebagai berikut :

1. Dehidrasi

Potongan jaringan dimasukkan dalam alkohol bertingkat dari 30%, 40%, 60%, 50%, 70%, 80%, 90%, 96% agar cairan keluar dari dalam jaringan. Jaringan kemudian dimasukkan ke dalam larutan alkohol-xylol selama 1 jam dan jaringan kemudian dimasukan dalam larutan xylol murni selama 2 x 2 jam.

2. Parafinisasi dan *Embedding*

Jaringan yang telah melalui proses dehidrasi dimasukan ke dalam parafin cair selama 2 x 2 jam dan tunggu hingga parafin memadat. Jaringan yang telah terparafin dipotong dengan ketebalan 4 mikron menggunakan mikrotom. Hasil potongan jaringan ditempelkan pada *object glass* yang sudah dilapisi polilisin sebagai perekat. Masukan jaringan pada kaca objek deparafinasi dalam inkubator dan dipanaskan dengan suhu 56-58°C hingga parafin mencair.

4.5.9 Pengecatan Caspase 3

Jaringan testis yang telah di tempelkan ke slide *Poly-L-Lysine Coated* (Biogear) kemudian dipanaskan pada *slide warmer* dengan suhu 60°C selama 5 menit, kemudian dilakukan proses deparafinisasi dengan merendam sampel dalam *xylene* (Merck-Millipore, Australia) 1 dan 2 masing masing selama 5 menit. Kemudian dilakukan proses rehidrasi

dengan merendam slide kedalam etanol absolut 1, absolut 2, etanol 90%, etanol 80%, etanol 70%, etanol 70% (Merck-Millipore, Australia) masing masing selama 3 menit, kemudian dicuci pada air mengalir selama 5 menit, selanjutnya direndam akuades selama 5 menit.

Proses selanjutnya yaitu *Antigen retrieval* dengan merendam slide dalam *citrate buffer* 1x pH 6,5 dan masukkan dalam *Decloaking Chamber* (Biogear) selama 30 menit pada suhu 90°C slide dikeluarkan dan didiamkan hingga mencapai suhu ruang (± 30 menit). Selanjutnya slide dicuci dengan PBS 1x selama 5 menit sebanyak 3 kali. Kemudian dilakukan *blocking* peroksidase endogen dengan 3% H₂O₂ selama 5 menit, kemudian slide dicuci dengan PBS 1x selama 5 menit sebanyak 3 kali. Kemudian dilakukan *blocking background* dengan meneteskan larutan *Background Sniper (Starr Trek Universal-HRP Detection Kit)* pada jaringan per slide dan diinkubasi selama 20 menit, selanjutnya slide dikeringkan dengan menggunakan tisu pada permukaan bawahnya dan sekitar jaringan tanpa merusak jaringan dan ditambahkan antibodi primer sebanyak 70-100 μ L antibodi Caspase 3 (LSBio, Seattle, WA, USA), kemudian tutup *humidity chamber* dan disimpan dalam kulkas 4°C *overnight*.

Ambil slide sampel dari kulkas 4°C dan diamkan pada suhu ruang selama ± 30 menit hingga mencapai suhu ruang, kemudian cuci slide menggunakan PBS 1x sebanyak 3 kali selama 5 menit, bersihkan jaringan dan tetesi *secondary antibody Trekkie Universal Link (Starr Trek Universal-HRP Detection Kit)* kemudian inkubasi selama 60 menit pada

suhu ruang, cuci slide menggunakan PBS 1x sebanyak 3 kali selama 5 menit, kemudian tetesi *TrekAvidin*-HRP Label (*Starr Trek Universal-HRP Detection Kit*) inkubasi selama 45 menit pada suhu ruang, cuci slide menggunakan PBS 1x sebanyak 3 kali selama 5 menit, kemudian tetesi DAB 1:400 (1 μ L Betazoid DAB *Chromogen* ditambahkan 400 μ L Betazoid DAB Substrat) inkubasi 3 menit dalam ruangan gelap, cuci slide menggunakan PBS 1x sebanyak 3 kali selama 5 menit, kemudian lakukan *counterstaining* dengan mencelupkan dalam Mayer Hematoksilin (Bio-Optica Milano S.p.A) selama 3 menit, cuci slide menggunakan air mengalir selama selama 5 menit. Selanjutnya lakukan dehidrasi dengan mencelupkan slide sampel pada rak *staining* logam ke dalam etanol 70%, etanol 80%, etanol 96%, etanol absolut 1, absolut 2, masing masing selama 3 menit, selanjutnya proses *clearing* dengan mencelupkan slide pada xylene 1, 2 dan 3 masing masing selama 5 menit, kemudian *mounting* jaringan dengan entellan.

4.6 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium SCCR Semarang. Penelitian rencana akan dilakukan pada Juli-Agustus 2022.

4.7 Analisa Data

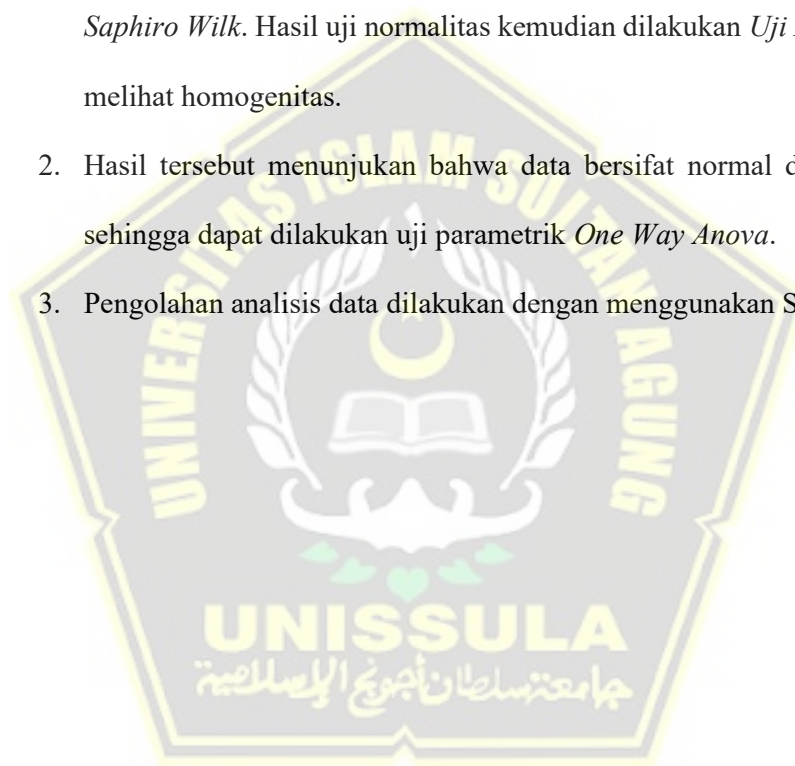
Data dianalisis menggunakan uji deskriptif, normalitas, dan homogenitas :

4.7.1 Kadar SOD

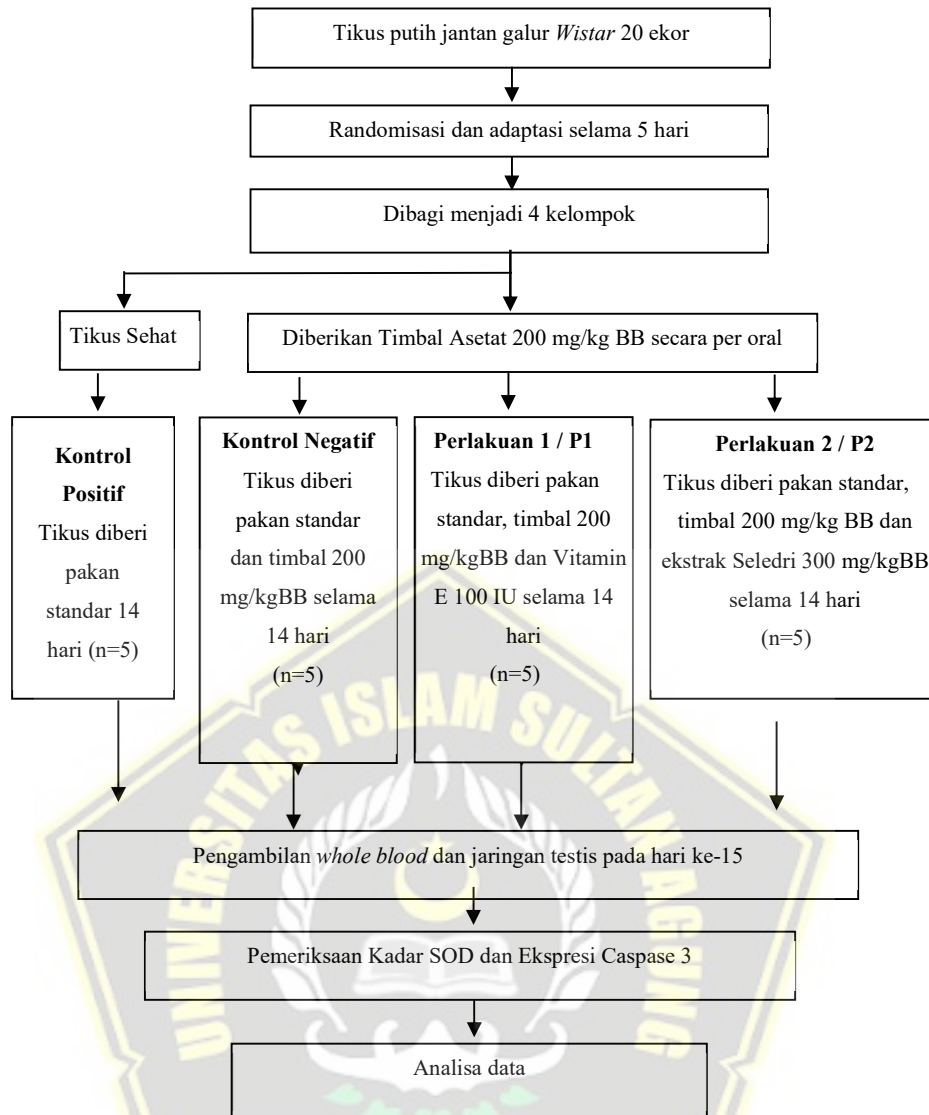
1. Masing masing kelompok dilakukan uji normalitas dengan menggunakan *Saphiro Wilk*. Hasil uji normalitas kemudian dilakukan *Uji Levene* untuk melihat homogenitas.
2. Hasil tersebut menunjukkan bahwa data bersifat normal dan homogen sehingga dapat dilakukan uji parametrik *One Way Anova*.
3. Pengolahan analisis data dilakukan dengan menggunakan SPSS 22.0.

4.7.2 Ekspresi Caspase 3

1. Masing masing kelompok dilakukan uji normalitas dengan menggunakan *Saphiro Wilk*. Hasil uji normalitas kemudian dilakukan *Uji Levene* untuk melihat homogenitas.
2. Hasil tersebut menunjukkan bahwa data bersifat normal dan homogen sehingga dapat dilakukan uji parametrik *One Way Anova*.
3. Pengolahan analisis data dilakukan dengan menggunakan SPSS 22.0.



4.8 Alur Penelitian



Gambar 8. Alur penelitian

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian eksperimental ini kami lakukan selama periode bulan Agustus 2022 hingga September 2022 di laboratorium Stem Cell and Cancer Research (SCCR), Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung, Semarang. Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji pengaruh Ekstrak Seledri terhadap ekspresi Kadar SOD dan Caspase 3 pada tikus yang terpapar Timbal Asetat (Pb). Subjek dari penelitian yang telah dilakukan ini adalah 5 ekor tikus jantan galur Wistar (*Rattus norvegicus*) dengan bobot badan 180-200 gram dan berusia 2-3 bulan yang dinyatakan sehat dan layak dijadikan subjek penelitian oleh dokter hewan yang dipapar timbal secara oral dengan kadar 200 mg/kg BB selama 14 hari.

Penelitian ini terdiri dari 4 kelompok dengan 2 kelompok perlakuan, 1 Kontrol Positif, dan 1 kelompok Kontrol Negatif. Tikus putih jantan galur Wistar dibagi menjadi 4 kelompok yaitu Kontrol Positif (tikus kondisi sehat tanpa diberikan Timbal Asetat (Pb) secara oral), Kontrol Negatif (tikus diberikan Timbal Asetat (Pb) secara oral dan tidak diberi perlakuan), Tikus P1 (tikus diberikan Timbal Asetat (Pb) secara oral dan diberi vitamin E secara oral), dan Tikus P2 (tikus diberikan Timbal Asetat (Pb) secara oral yang diberi Ekstrak Seledri dosis 300 mg/kgBB secara oral selama 14 hari). Seluruh tikus diberikan pakan dengan jumlah yang sama.

5.1 Hasil Penelitian

5.1.1 Determinasi dan Ekstraksi Tanaman Seledri

Tanaman Seledri (*Apium graveolens Linn*) yang digunakan dalam penelitian ini didapatkan dari perkebunan di Kota Surabaya. Determinasi bahan dilakukan di UPT Laboratorium Terpadu Universitas Diponegoro Semarang (Tabel 5.1)

Tabel 5.1 Hasil Determinasi Tanaman Seledri

Kingdom	<i>Plantae</i>
Divisi	<i>Tracheophyta</i>
Classis	<i>Magnoliopsida</i>
Ordo	<i>Apiales</i>
Familia	<i>Apiaceae</i>
Subfamilia	<i>Apioideae Drude</i>
Genus	<i>Apium</i>
Species	<i>Apium Graveolens L</i>
Sinonim	<i>Apium Celleri Gaertn, Corum Graveolens L</i>
Nama Lokal	Seledri, Saledri

Seledri sebanyak ± 600 gram dipotong hingga halus, dikeringkan pada suhu $50 - 60^{\circ} \text{C}$ dan diblender menjadi bubuk kering. Bubuk kering di maserasi menggunakan etanol 95%, kemudian disaring menggunakan kertas saring dan filtrat yang dihasilkan ditampung, sedangkan residu yang tertinggal di kertas saring kemudian dimaserasi kembali dengan metode yang sama. Kandungan etanol di evaporasi menggunakan *rotary evaporator* hingga tersisa ekstrak kental. Ekstrak kental yang terbentuk kemudian disimpan dalam lemari pendingin dengan suhu $2-8^{\circ} \text{C}$ hingga pemberian perlakuan diberikan.

5.1.2 Uji Kualitatif Skrining Fitokimia dan Uji Kadar Flavonoid Total

Uji kualitatif merupakan metode penapisan fitokimia yang dilakukan dengan melihat reaksi pengujian warna dengan menggunakan suatu pereaksi warna. Hal – hal yang berperan penting pada skrining fitokimia antara lain pemulihan pelarut dan metode ekstraksi. Hasil skrining senyawa fitokimia ekstrak seledri (*Apium graveolens Linn*) dapat dinilai kandungan senyawa metabolit sekunder yang dilihat dengan visualisasi warna yang dihasilkan masing – masing senyawa. ^{17,174} Uji skrining fitokimia terdiri dari uji flavonoid, uji alkaloid, uji tanin, uji saponin, uji triterpenoid, uji steroid ^{17,174} seperti pada tabel 5.3

Tabel 5.2 Kandungan Ekstrak Seledri

Zat Aktif	Metode
Alkaloid	wagner
Saponin	Forth
Tanin	FeCl13%
Flavonoid	wilstater
Steroid	Lieberman burchard
Triteroid	Lieberman burchard

Pada uji kualitatif flavonoid dengan pereaksi warna, jika setelah ditambahkan serbuk magnesium dan HCl 2N terbentuk warna merah hingga merah muda maka menunjukkan adanya Flavonoid^{17, 174} Uji flavonoid secara kuantitatif dengan menganalisis kandungan flavonoid total pada ekstrak etil asetat dan etanol seledri ⁶³ Pengukuran kadar flavonoid total dilakukan sebanyak 3 kali, hasil yang diperoleh dapat dilihat pada Tabel 5.3. hasil kadar rata – rata flavonoid total pada sampel ekstrak seledri adalah 14.3036

Tabel 5.3 Hasil Uji kadar Flavonoid total

Nilai	TFfC
Mean ± sd	14.3036 ± 0.6632

5.1.3 Efek Pemberian Ekstrak Seledri terhadap Kadar SOD (*Superoxide Dismuthase*) pada Testis Tikus yang dipapar Timbal Asetat (Pb)

Superoxide dismutase merupakan enzim yang mengkatalisis superoksida ($O_2^{\cdot-}$) radikal bebas menjadi molekul oksigen (O_2) dan hidrogen peroksida (H_2O_2). Superoksida merupakan produk sampingan dari metabolisme oksigen dan dalam jumlah berlebihan dapat menyebabkan kerusakan sel.²⁵ Pada pemberian ekstrak seledri, kadar SOD terdapat peningkatan.

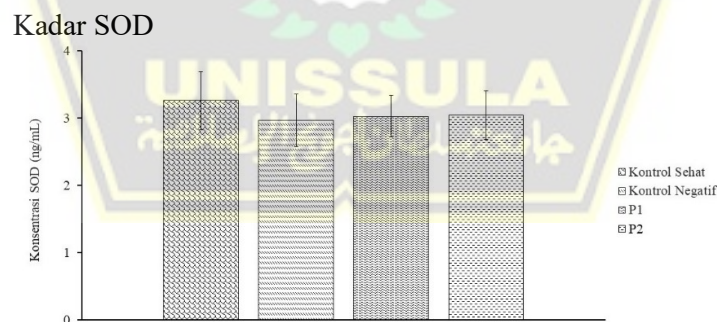
Tabel 5.4 Data hasil rerata penelitian kadar SOD (*Superoxide dismutase*) dan ekspresi *Caspase 3* -3

Variabel	Kelompok				P value
	Kontrol Sehat n=5	Kontrol Negatif n=5	P1 n=5	P2 n=5	
	Mean±SD	Mean±SD	Mean±SD	Mean±SD	
Kadar SOD	3.226 ± 0,4368	2,97 ± 0,3927	3,026 ± 0,3112	3,045 ± 0,3636	
<i>Saphiro</i>		0,909	0,967	0,961	
<i>Wilk</i>					0,920
<i>Levene test</i>					0,643
<i>Anova</i>					

Berdasarkan Tabel 5.4 dapat dilihat bahwa Ekstrak Seledri mampu menaikan Kadar SOD dengan peningkatan yang bermakna dibandingkan Kontrol Negatif dan Perlakuan 1. Data juga menunjukan bahwa Ekstrak Seledri dapat menaikan kadar SOD. Berdasarkan data di atas terlihat bahwa pemberian ekstrak seledri secara berturut – turut dapat

meningkatkan kadar SOD dibandingkan kelompok kontrol. Kedua perlakuan dosis memberikan perbedaan peningkatan dalam meningkatkan kadar SOD dibanding Kontrol Positif dan Kontrol Negatif. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak seledri mampu meningkatkan kadar SOD meskipun belum setara dengan kondisi normal tanpa induksi Timbal.

Kadar SOD masing masing kelompok dilakukan uji normalitas dengan menggunakan *Saphiro Wilk* dan uji Homogenitas hasil uji normalitas mendapatkan $p > 0.05$ dengan *Uji Levene*. dan homogenitas $p > 0.05$. Hasil tersebut menunjukkan bahwa data bersifat homogen sehingga dapat dilakukan uji parametrik *One Way Anova* untuk melihat signifikansi pada semua kelompok. Hasil *One Way Anova* ($p > 0.05$) menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang signifikan pada semua perlakuan disajikan dalam bentuk grafik pada gambar 5.1 dan tabel 5.2 pada penelitian ini. Didapatkan perbedaan yang tidak signifikan ($p > 0.05$) antara kelompok kontrol sehat dengan kelompok kontrol negatif dan kelompok perlakuan 1 serta antar kelompok perlakuan 2.



Gambar 5.1 Grafik kadar SOD pada semua kelompok penelitian (* $p > 0,05$ = tidak signifikan)

5.1.4 Efek Pemberian Ekstrak Seledri Terhadap Ekspresi Caspase 3 pada Testis Tikus model Terpapar Timbal Asetat

Caspase-3 terdiri dari dua subunit protein yang berukuran 12- dan 17-kDa. Peran Caspase-3 dalam apoptosis adalah untuk membelah dan mengaktifkan Caspase 6, Caspase-7, dan Caspase-9 untuk memecah sel-sel apoptosis sebelum dikeluarkan. Setelah proses ini, protein Caspase-3 dibelah dan dipecah sendiri oleh Caspase-8 dan Caspase-10.^{32,33} Pembelahan berurutan dan aktivasi protein ini sangat penting untuk tahap apoptosis.³³

Hasil Analisis ekspresi gen Caspase 3 pada hari ke-14 pasca pemberian Timbal Asetat (Pb) didapatkan data sebagaimana yang ditunjukkan pada Tabel 5.3. Data yang dihasilkan dalam penelitian ini dianalisis menggunakan uji *Saphiro Wills* untuk mengetahui normalitas. Berdasarkan uji tersebut, data Caspase 3 yang dihasilkan dalam penelitian ini menunjukkan data terdistribusi normal nilai ($p > 0,05$). Data ekspresi gen Caspase 3 yang tergolong normal kemudian dianalisis menggunakan uji *Leveane* ($p > 0,05$) kemudian data kemudian dianalisis menggunakan uji *One Way Anova* untuk melihat signifikansi pada semua kelompok. Berdasarkan analisis statistik tersebut didapatkan bahwa ekspresi Caspase 3 pada hari ke 14 setelah pemberian ($p < 0,05$).

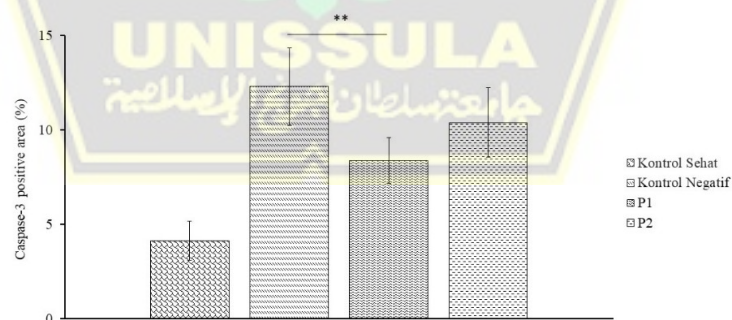
Tabel 5.5 Ekpresi gen *Caspase 3-3* setelah pemberian perlakuan

Variabel	Kelompok				p-value
	Kontrol Sehat	Kontrol Sakit	P1	P2	
	n=5 Mean±SD	n=5 Mean±SD	n=5 Mean±SD	n=5 Mean±SD	
<i>Caspase 3-3</i>	4.131 ± 1.043	12.308 ± 2.304	8.379 ± 1.3475	10.390 ± 2.051	0.400 0.025
<i>Saphiro Wilk</i>					
<i>Leveane Anova</i>		0.931	0.166	0.785	

Berdasarkan analisis *One Way Anova* dilakukan Post Hoc LSD untuk melihat signifikansi antar tiap perlakuan, kemudian didapati data signifikan antara Kontrol Negatif dan P1 ($p < 0.05$) pada ekspresi gen *Caspase-3*. Pada Perlakuan 2 data yang didapat tidak signifikan dibandingkan dengan Kontrol Sakit dan Perlakuan 1 ($p > 0,05$). Hasil uji Post Hoc secara lengkap ditampilkan pada tabel 5.5

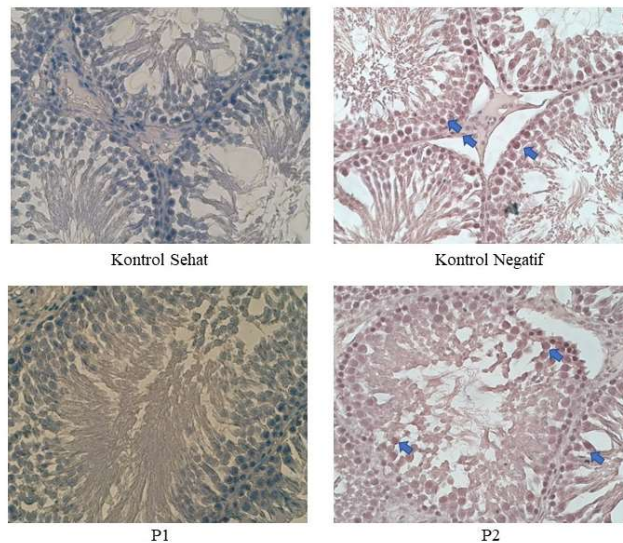
Tabel 5.5 Uji Post Hoc LSD *Caspase 3* pasca pemberian perlakuan

Kelompok	Kelompok Perbandingan	Signifikan
Kontrol Negatif	P1	0.008*
	P2	0.146
P1	Kontrol Negatif	0.008*
	P2	0.128
P2	Kontrol Negatif	0.146
	P1	0.128



Gambar 5.2 Grafik ekspresi Caspase 3 pasca pemberian perlakuan

* Kuantifikasi ekspresi Caspase 3 setiap kelompok perlakuan



Gambar 5.3 ekspresi Caspase 3 setiap kelompok dari jaringan testis tikus model yang di induksi Pb Asetate

5.2 Pembahasan Hasil Penelitian

Paparan Timbal secara terus menerus dapat menyebabkan masalah kesehatan seperti gangguan pernafasan, neurologis, kardiovaskuler, dan peradangan kematian.⁴ *Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME)* melaporkan bahwa paparan timbal menyumbang 900.000 kematian di seluruh dunia dan menyebabkan kecacatan karena efek jangka panjang pada kesehatan. Penumpukan Timbal dalam tubuh menimbulkan produksi *Reactive Oxygen Species (ROS)* yang memicu stress oksidatif dan dapat berakibat pada peradangan⁸, kerusakan DNA yang menyebabkan mutasi dan gangguan pada keadaan epigenetik sel⁹, serta apoptosis sel. Seledri merupakan tumbuhan *herbaceous* yang termasuk dalam keluarga *Apiaceae* dan umum dikonsumsi sebagai sayuran. Seledri mengandung *L-3-n-butylphthalide*, *sedanolide*, asam linoleat, flavonoid, senyawa fenolik dan minyak atsiri sebagai senyawa aktif yang utama yang terdapat hampir di semua bagian termasuk akar, daun dan biji.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak Seledri terhadap Kadar SOD dan Ekspresi Caspase 3 testis pada tikus yang terpapar timbal.

Penelitian ini menggunakan tikus jantan galur wistar yang diberi Pb asetat 200 mg/kgBB per oral selama 14 hari. Kelompok P1 diberi Vitamin E 100 IU per oral selama pemberian Pb asetat. Sisi lain kelompok P2 diberi ekstrak seledri sebanyak 300 mg/kgBB per oral selama pemberian Pb asetat. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian ekstrak seledri per oral memberikan peningkatan kadar SOD ($P > 0.05$) dibanding Kontrol Negatif. Hasil tersebut didukung dengan penelitian terdahulu yang menjelaskan bahwa ekstrak seledri sebagai antioksidan mampu berperan dalam menurunkan kadar ROS melalui peningkatan SOD.¹⁶² Ekstrak seledri mengandung berbagai senyawa flavonoid salah satunya adalah antosianin. Penelitian terdahulu melaporkan bahwa antosianin memainkan peran penting dalam menghambat ROS melalui mekanisme *indirect*. Antosianin dapat berperan dalam peningkatan kadar SOD melalui aktivasi jalur NRF2.¹⁶³ Tidak adanya signifikansi peningkatan SOD diduga disebabkan karena berbagai hal salah satunya adalah dosis yang tidak optimal. Penelitian terdahulu melaporkan pemberian ekstrak seledri mampu berperan dalam penghambatan superoxide anion pada dosis 500 mg/kgBB.¹⁶⁴ Hasil tersebut menunjukkan bahwa perlu dilakukan pengujian ekstrak seledri dengan dosis yang lebih tinggi pada tikus model Pb asetat. Peningkatan enzim SOD didukung dengan hasil analisis Caspase 3.

Hasil analisis menunjukkan terdapat penurunan Caspase 3 jaringan testis setelah diberi ekstrak seledri pada tikus model Pb asetat. Hasil ini didukung penelitian terdahulu yang melaporkan bahwa kandungan antosianin pada ekstrak seledri mampu berperan dalam penghambatan inflamasi dan apoptosis. Penelitian terdahulu melaporkan antosianin mampu berperan dalam penghambatan ROS. Hambatan ROS berdampak pada penurunan aktivasi NFkB yang berujung pada penurunan ekspresi molekul proinflamasi seperti TNF a IFN gamma dan IL6. Penurunan kadar molekul proinflamasi berdampak pada hambatan ekspresi Caspase 3 yang berujung pada penurunan apoptosis sel.¹⁶⁵ Tidak adanya signifikansi penurunan Caspase 3 diduga disebabkan karena berbagai hal salah satunya adalah dosis yang tidak optimal. Hal ini didukung penelitian terdahulu yang menyatakan bahwa pemberian ekstrak seledri 1000 mg/kgBB dapat menghambat ekspresi Caspase 3 jaringan testis pada tikus terpapar Pb asetat.¹⁶⁶ Penurunan ekspresi Caspase 3 secara signifikan dihasilkan setelah perlakuan vitamin E dosis 100 IU pada tikus induksi Pb asetat. Hasil ini didukung dengan penelitian terdahulu yang menyatakan bahwa pemberian vitamin E 100 IU mampu menghambat ekspresi Caspase 9 yang berdampak pada penurunan apoptosis pada jaringan testis terpapar logam berat.¹⁶⁷

5.3 Kelemahan Penelitian

Kelemahan penelitian ini adalah dari jenis genetik tikus dapat tahan terhadap paparan Pb Asetate. Tidak semua ROS yang sama dapat di tahan oleh Flavonoid. Tidak menganalisis kandungan senyawa fitokimia secara spesifik yang berpengaruh terhadap hasil penelitian. Tidak dilakukannya pemisahan antosianin yang dilakukan secara langsung yang sangat berpengaruh pada nilai penurunan. Sebaiknya dilakukan pemeriksaan di HPLC, GCMS dan SNS. Terdapat antosianin yang tidak di analisis untuk dilakukan penelitian.



BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

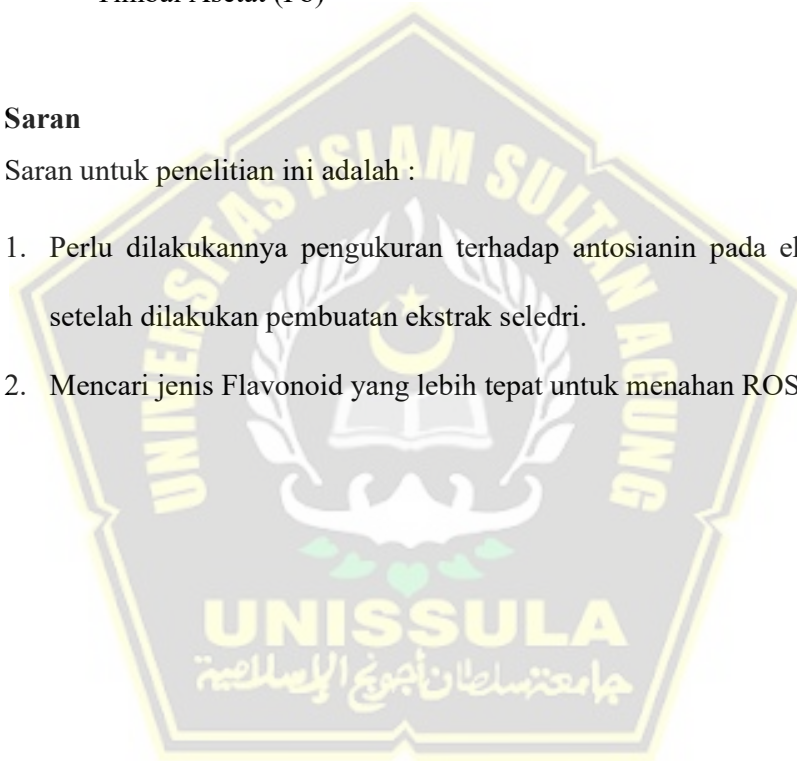
Berdasarkan hasil penelitian maka dapat disimpulkan :

1. Tidak terdapat pengaruh yang signifikan ekstrak seledri 300 mg/kgBB terhadap Kadar SOD pada serum tikus wistar yang terpapar Timbal Asetat (Pb)
2. Tidak terdapat pengaruh yang signifikan ekstrak seledri 300 mg/kgBB terhadap Caspase 3 jaringan testis pada tikus wistar yang terpapar Timbal Asetat (Pb)

6.2 Saran

Saran untuk penelitian ini adalah :

1. Perlu dilakukannya pengukuran terhadap antosianin pada ekstrak Seledri setelah dilakukan pembuatan ekstrak seledri.
2. Mencari jenis Flavonoid yang lebih tepat untuk menahan ROS



DAFTAR PUSTAKA

- 1 Wani AL, Ara A, Usmani JA. Lead toxicity: A review. *Interdiscip. Toxicol.* 2015. doi:10.1515/intox-2015-0009.
- 2 Charkiewicz AE, Backstrand JR. Lead toxicity and pollution in Poland. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2020. doi:10.3390/ijerph17124385.
3. Balali-Mood M, Naseri K, Tahergorabi Z, Khazdair MR, Sadeghi M. Toxic Mechanisms of Five Heavy Metals: Mercury, Lead, Chromium, Cadmium, and Arsenic. *Front. Pharmacol.* 2021. doi:10.3389/fphar.2021.643972.
4. Zhongming Z, Linong L, Xiaona Y, Wangqiang Z, Wei L, others. Revealed: A third of world's children poisoned by lead, UNICEF analysis finds. 2020.
- 7 Caravanos J, Chatham-Stephens K, Ericson B, Landrigan PJ, Fuller R. The burden of disease from pediatric lead exposure at hazardous waste sites in 7 Asian countries. *Environ Res* 2013. doi:10.1016/j.envres.2012.06.006.
- 8 Mittal M, Siddiqui MR, Tran K, Reddy SP, Malik AB. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxidants & redox Signal* 2014; **20**: 1126–1167.
- 9 Guillaumet-Adkins A, Yañez Y, Peris-Diaz MD, Calabria I, Palanca-Ballester C, Sandoval J. Epigenetics and oxidative stress in aging. *Oxid Med Cell Longev* 2017; **2017**.
- 10 Elgawish RAR, Abdelrazek HMA. Effects of lead acetate on testicular function and Caspase-3 expression with respect to the protective effect of cinnamon in albino rats. *Toxicol Reports* 2014. doi:10.1016/j.toxrep.2014.10.010.
- 11 Wang Y, Branicky R, Noë A, Hekimi S. Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. *J Cell Biol* 2018; **217**: 1915–1928.
- 12 Yildiz L, Başkan KS, Tütem E, Apak R. Combined HPLC-CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay of parsley, celery leaves, and nettle. *Talanta* 2008. doi:10.1016/j.talanta.2008.06.028.
- 13 Liu DK, Xu CC, Zhang L, Ma H, Chen XJ, Sui YC *et al.* Evaluation of bioactive components and antioxidant capacity of four celery (*Apium*

- graveolens L.) leaves and petioles. *Int J Food Prop* 2020. doi:10.1080/10942912.2020.1778027.
- 14 Ding Y, Gonick HC, Vaziri ND. Lead promotes hydroxyl radical generation and lipid peroxidation in cultured aortic endothelial cells. *Am J Hypertens* 2000. doi:10.1016/s0895-7061(99)00226-5.
- 15 Chen ACH, Arany PR, Huang YY, Tomkinson EM, Sharma SK, Kharkwal GB *et al.* Low-Level laser therapy activates NF-kB via generation of reactive oxygen species in mouse embryonic fibroblasts. *PLoS One* 2011. doi:10.1371/journal.pone.0022453.
- 16 Brentnall M, Rodriguez-Menocal L, De Guevara RL, Cepero E, Boise LH. Caspase-9, Caspase-3 and Caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis. *BMC Cell Biol* 2013. doi:10.1186/1471-2121-14-32.
- 17 Din ZU, Shad AA, Bakht J, Ullah I, Jan S. In vitro antimicrobial, antioxidant activity and phytochemical screening of *Apium graveolens*. *Pak J Pharm Sci* 2015.
- 18 Sowbhagya HB. Chemistry, Technology, and Nutraceutical Functions of Celery (*Apium graveolens* L.): An Overview. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2014. doi:10.1080/10408398.2011.586740.
- 19 Hardani A, Afzalzadeh MR, Amirzargar A, Mansouri E, Meamar Z. Effects of aqueous extract of celery (*Apium graveolens* L.) leaves on spermatogenesis in healthy male rats. *Avicenna J phytomedicine* 2015; **5**: 113.
- 20 N. K. S, R. V, S. V, Sivanesan S. Therapeutic Potential of *Apium graveolens* on the Reproductive System of Cadmium Treated Male Rats. *J Evol Med Dent Sci* 2020. doi:10.14260/jemds/2020/575.
- 21 Amanpour P, Khodarahmi P, Salehipour M. Protective effects of vitamin E on cadmium-induced apoptosis in rat testes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2020; **393**: 349–358.
- 22 Astari L, Cahyono H, Widjajanto E. Correlation of Interleukin-10, Superoxide Dismutase (SOD), and Malondialdehyde (MDA) Levels with HbA1c in Pediatric Type 1 Diabetes Mellitus. *J Trop Life Sci* 2017; **7**: 286–292.

- 23 Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative Stress and Antioxidant Defense- review article. *Wao*. 2012;(January):9–19.
- 24 Mohanty S. Role of Biochemical Markers for Evaluation of Oxidative Stress in Senile Cataract. 2012;2(2).
- 25 Kim, S. H., Kim, S. H., Lee, J. H., Lee, B. H., Yoon, H. J., Shin, D. H. Jee, Y. K. (2014). SOD 1,2,3 gene (SOD1, SOD2, and SOD3) polymorphisms and antituberculosis drug-induced hepatitis. *Allergy, Asthma and Immunology Research*.
- 26 Zelko, I. N., Mariani, T. J., & Folz, R. J. (2002). Superoxide dismutase multigene family: A comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radical Biology and Medicine*.
- 27 Tsang, C. K. wa., Liu, Y., Thomas, J., Zhang, Y., & Zheng, X. F. S. (2014). Superoxide dismutase 1 acts as a nuclear transcription factor to regulate oxidative stress resistance. *Nature Communications*. <https://doi.org/10.1038/ncomms4446>
- 28 Zainuri, M., & Wanandi, S. I. (2012). AKTIVITAS SPESIFIK MANGANESE SUPEROXIDE DISMUTASE (MnSOD) DAN KATALASE PADA HATI TIKUS YANG DIINDUKSI HIPOKSIDIA SISTEMIK: HUBUNGANNYA DENGAN KERUSAKAN OKSIDATIF. *Media of Health Research and Development*, 22(2 Jun), 87–92.
- 29 Zhang, X., Ng, W. L., Wang, P., Tian, L. L., Werner, E., Wang, H., Wang, Y. (2012). MicroRNA-21 modulates the levels of reactive oxygen species by targeting SOD3 and TNF α . *Cancer Research*. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-0639>
- 30 Augusto O, Miyamoto S, others. Oxygen radicals and related species. *Princ Free Radic Biomed* 2011; 1: 19–42.
- 31 Abdal Dayem A, Hossain MK, Lee S Bin, Kim K, Saha SK, Yang G-M *et al*. The role of reactive oxygen species (ROS) in the biological activities of metallic nanoparticles. *Int J Mol Sci* 2017; 18: 120.
- 32 Wu H, Yin J-J, Wamer WG, Zeng M, Lo YM. Reactive oxygen species-related activities of nano-iron metal and nano-iron oxides. *J Food Drug Anal*

- 2014; **22**: 86–94.
- 33 Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L. Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian J Clin Biochem* 2015; **30**: 11–26.
- 34 Wölfle U, Esser PR, Simon-Haarhaus B, Martin SF, Lademann J, Schempp CM. UVB-induced DNA damage, generation of reactive oxygen species, and inflammation are effectively attenuated by the flavonoid luteolin in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med* 2011; **50**: 1081–1093.
- 35 Arab Sadeghabadi Z, Abbasalipourkabar R, Mohseni R, Ziamajidi N. Investigation of oxidative stress markers and antioxidant enzymes activity in newly diagnosed type 2 diabetes patients and healthy subjects, association with IL-6 level. *J Diabetes Metab Disord* 2019; **18**: 437–443.
- 36 Shalini S, Dorstyn L, Dawar S, Kumar S. Old, new and emerging functions of Caspases. *Cell Death Differ*. 2015. doi:10.1038/cdd.2014.216.
- 37 Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol. Pathol*. 2007. doi:10.1080/01926230701320337.
- 38 Boland K, Flanagan L, Prehn JHM. Paracrine control of tissue regeneration and cell proliferation by Caspase-3. *Cell Death Dis*. 2013. doi:10.1038/cddis.2013.250.
- 39 Eskes R, Desagher S, Antonsson B, Martinou J-C. Bid Induces the Oligomerization and Insertion of Bax into the Outer Mitochondrial Membrane. *Mol Cell Biol* 2000. doi:10.1128/mcb.20.3.929-935.2000.
- 40 Wei MC, Zong WX, Cheng EHY, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ *et al*. Proapoptotic BAX and BAK: A requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science (80-)* 2001. doi:10.1126/science.1059108.
- 41 Hyun HP, Lo YC, Lin SC, Wang L, Jin KY, Wu H. The death domain superfamily in intracellular signaling of apoptosis and inflammation. *Annu. Rev. Immunol*. 2007. doi:10.1146/annurev.immunol.25.022106.141656.
- 42 Reed JC, Doctor KS, Godzik A. The domains of apoptosis: a genomics perspective. *Sci. STKE*. 2004. doi:10.1126/stke.2392004re9.
- 43 Chang DW, Xing Z, Capacio VL, Peter ME, Yang X. Interdimer processing mechanism of proCaspase-8 activation. *EMBO J* 2003.

- doi:10.1093/emboj/cdg414.
- 44 Parrish AB, Freel CD, Kornbluth S. Cellular mechanisms controlling Caspase activation and function. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013. doi:10.1101/cshperspect.a008672.
- 45 Billen LP, Shamas-Din A, Andrews DW. Bid: A Bax-like BH3 protein. *Oncogene*. 2008. doi:10.1038/onc.2009.47.
- 46 El-Nekeety AA, El-Kady AA, Soliman MS, Hassan NS, Abdel-Wahhab MA. Protective effect of *Aquilegia vulgaris* (L.) against lead acetate-induced oxidative stress in rats. *Food Chem Toxicol* 2009; **47**: 2209–2215.
- 47 Patra RC, Rautray AK, Swarup D. Oxidative stress in lead and cadmium toxicity and its amelioration. *Vet. Med. Int.* 2011. doi:10.4061/2011/457327.
- 48 Moniem AEA, Dkhil MA, Al-Quraishy S. Protective role of flaxseed oil against lead acetate induced oxidative stress in testes of adult rats. *African J Biotechnol* 2010.
- 49 Ilacqua A, Francomano D, Aversa A. The Physiology of the Testis. 2018 doi:10.1007/978-3-319-44675-2_17.
- 50 Helaly AA-D, El-Refy A, Mady E, Mosa KA, Craker L. Morphological and molecular analysis of three celery accessions. *J Med Act plants* 2014; **2**: 27–32.
- 51 Halim AF. Analysis of celery fruit oil and investigation of the effect of storage. *Egypt J Pharm Sci* 1990; **31**: 107–113.
- 52 Shalaby MA, El Zorba HY. Protective effect of celery oil, vitamin E and their combination against testicular toxicity in male rats. *Glob Vet* 2010.
- 53 Kooti W, Daraei N. A Review of the Antioxidant Activity of Celery (*Apium graveolens* L). *J. Evidence-Based Complement. Altern. Med.* 2017. doi:10.1177/2156587217717415. Malhotra SK. Celery. In: *Handbook of herbs and spices*. Elsevier, 2006, pp 317–336.
- 54 Kooti W, Mansouri E, Ghasemiboroon M, Harizi M, Amirzargar A. Protective effects of celery (*Apium Graveolens*) on testis and cauda epididymal spermatozoa in rat. *Iran. J. Reprod. Med.* 2014.
- 55 Kooti W, Mansouri E, Ghasemiboroon M, Harizi M, Ashtary-Larky D, Afrisham R. The effects of hydroalcoholic extract of *Apium graveolens* leaf

- on the number of sexual cells and testicular structure in rat. *Jundishapur J Nat Pharm Prod* 2014. doi:10.17795/jjnpp-17532.
- 56 Zidorn C, Jöhrer K, Ganzera M, Schubert B, Sigmund EM, Mader J *et al.* Polyacetylenes from the apiaceae vegetables carrot, celery, fennel, parsley, and parsnip and their cytotoxic activities. *J Agric Food Chem* 2005. doi:10.1021/jf048041s.
- 57 Bendary E, Francis RR, Ali HMG, Sarwat MI, El Hady S. Antioxidant and structure–activity relationships (SARs) of some phenolic and anilines compounds. *Ann Agric Sci* 2013. doi:10.1016/j.aosas.2013.07.002.
- 58 Atrahimovich D, Vaya J, Khatib S. The effects and mechanism of flavonoid-rePON1 interactions. Structure-activity relationship study. *Bioorganic Med Chem* 2013. doi:10.1016/j.bmc.2013.02.055.
- 59 Gao LL, Feng L, Yao ST, Jiao P, Qin SC, Zhang W *et al.* Molecular mechanisms of celery seed extract induced apoptosis via S phase cell cycle arrest in the BGC-823 human stomach cancer cell line. *Asian Pacific J Cancer Prev* 2011.
- 60 Jürgensmeier JM, Xie Z, Deveraux Q, Ellerby L, Bredesen D, Reed JC. Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998. doi:10.1073/pnas.95.9.4997.
- 61 Marzo I, Brenner C, Zamzami N, Jürgensmeier JM, Susin SA, Vieira HLA *et al.* Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science* (80-) 1998. doi:10.1126/science.281.5385.2027.
- 62 Lakhani SA, Masud A, Kuida K, Porter GA, Booth CJ, Mehal WZ *et al.* Caspases 3 and 7: Key mediators of mitochondrial events of apoptosis. *Science* (80-) 2006. doi:10.1126/science.1115035.
- 63 Zhao J, Jin J, Zhang X, Shi M, Dai J, Wu M *et al.* Transfection of Smac sensitizes tumor cells to etoposide-induced apoptosis and eradicates established human hepatoma in vivo. *Cancer Gene Ther* 2006. doi:10.1038/sj.cgt.7700910.
- 64 Fazal SS, Ansari MM, Singla RK, Khan S. Isolation of 3-n-Butyl Phthalide & Sedanenolide from *Apium graveolens* Linn. *Indo Glob J Pharm Sci* 2012.

- 65 Fazal S, Singla R. Review on the Pharmacognostical & Pharmacological Characterization of Apium Graveolens Linn. *Indo Glob J Pharm Sci* 2012.
- 66 D'Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol. Int.* 2019. doi:10.1002/cbin.11137.
- 67 Jung A, Schuppe HC. Influence of genital heat stress on semen quality in humans. *Andrologia.* 2007. doi:10.1111/j.1439-0272.2007.00794.x.
- 68 Shiraishi K, Takihara H, Matsuyama H. Elevated scrotal temperature, but not varicocele grade, reflects testicular oxidative stress-mediated apoptosis. *World J Urol* 2010. doi:10.1007/s00345-009-0462-5.
- 69 Owumi SE, Ijadele AO, Arunsi UO, Odunola OA. Luteolin abates reproductive toxicity mediated by the oxido-inflammatory response in Doxorubicin-treated rats. *Toxicol Res Appl* 2020. doi:10.1177/2397847320972040.
- 70 Li Z, Li H, Liu B, Luo J, Qin X, Gong M *et al.* Inhibition of MiR-25 attenuates doxorubicin-induced apoptosis, reactive oxygen species production and DNA damage by targeting pten. *Int J Med Sci* 2020. doi:10.7150/ijms.41980.
- 71 Nagai K, Oda A, Konishi H. Theanine prevents doxorubicin-induced acute hepatotoxicity by reducing intrinsic apoptotic response. *Food Chem Toxicol* 2015. doi:10.1016/j.fct.2015.02.009.
- 72 Zhang J, Sun Z, Lin N, Lu W, Huang X, Weng J *et al.* Fucoidan from *Fucus vesiculosus* attenuates doxorubicin-induced acute cardiotoxicity by regulating JAK2/STAT3-mediated apoptosis and autophagy. *Biomed Pharmacother* 2020. doi:10.1016/j.biopha.2020.110534.
- 73 Yang D, Tan X, Lv Z, Liu B, Baiyun R, Lu J *et al.* Regulation of Sirt1/Nrf2/TNF- α signaling pathway by luteolin is critical to attenuate acute mercuric chloride exposure induced hepatotoxicity. *Sci Rep* 2016. doi:10.1038/srep37157.
- 74 Tan L, Liang C, Wang Y, Jiang Y, Zeng S, Tan R. Pharmacodynamic effect of luteolin micelles on alleviating cerebral ischemia reperfusion injury. *Pharmaceutics* 2018; **10**: 248.
- 75 Zhang Z, Xu P, Yu H, Shi L. Luteolin protects PC-12 cells from H₂O₂ -

- induced injury by up-regulation of microRNA-21. *Biomed Pharmacother* 2019. doi:10.1016/j.biopha.2019.108698.
- 76 Al-Megrin WA, Alkhuriji AF, Yousef AOS, Metwally DM, Habotta OA, Kassab RB *et al.* Antagonistic efficacy of luteolin against lead acetate exposure-associated with hepatotoxicity is mediated via antioxidant, anti-inflammatory, and anti-apoptotic activities. *Antioxidants* 2020. doi:10.3390/antiox9010010.
- 77 Kitakaze T, Makiyama A, Yamashita Y, Ashida H. Low dose of luteolin activates Nrf2 in the liver of mice at start of the active phase but not that of the inactive phase. *PLoS One* 2020. doi:10.1371/journal.pone.0231403.
- 78 Bratovic A. Synthesis, Characterization, Applications, and Toxicity of Lead Oxide Nanoparticles. In: *Lead Chemistry*. 2020 doi:10.5772/intechopen.91362.
- 79 Karrari P, Mehrpour O, Abdollahi M. A systematic review on status of lead pollution and toxicity in Iran; Guidance for preventive measures. *DARU, J Pharm Sci* 2012. doi:10.1186/1560-8115-20-2.
- 80 Organization WH, others. Report on activities during the fifth international lead poisoning prevention week, 22--28 October 2017. 2018.
- 81 Dobrakowski M, Pawlas N, Kasperczyk A, Kozłowska A, Olewińska E, Machoń-Grecka A *et al.* Oxidative DNA damage and oxidative stress in lead-exposed workers. *Hum Exp Toxicol* 2017. doi:10.1177/0960327116665674.
- 82 Gummin DD, Mowry JB, Beuhler MC, Spyker DA, Brooks DE, Dibert KW *et al.* 2019 Annual Report of the American Association of Poison Control Centers' National Poison Data System (NPDS): 37th Annual Report. *Clin Toxicol (Phila)* 2020. doi:10.1080/15563650.2020.1834219.
- 83 Wilson V, Hou A, Zhang R, Wilson VL, Meng G. HIV-1 RT inhibitor design View project Source of lead pollution, its influence on public health and the countermeasures. *Anim Sci Food Saf* 2015.
- 84 Jaishankar M, Tseten T, Anbalagan N, Mathew BB, Beeregowda KN. Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdiscip. Toxicol.* 2014. doi:10.2478/intox-2014-0009.

- 85 Mehrpour O, Karrari P, Abdollahi M. Chronic lead poisoning in Iran; A silent disease. *DARU, J. Pharm. Sci.* 2012. doi:10.1186/2008-2231-20-8.
- 86 Fathabadi B, Dehghanifiroozabadi M, Aaseth J, Sharifzadeh G, Nakhaee S, Rajabpour-Sanati A *et al.* Comparison of Blood Lead Levels in Patients With Alzheimer's Disease and Healthy People. *Am J Alzheimers Dis Other Demen* 2018. doi:10.1177/1533317518794032.
- 87 Schell LM, Gallo M V., Denham M, Ravenscroft J. Effects of pollution on human growth and development: An introduction. *J. Physiol. Anthropol.* 2006. doi:10.2114/jpa2.25.103.
- 88 Abadin H, Ashizawa A, Stevens YW, Et A. 3 . Health Effects of Lead. In: *Toxicological profile for lead.* 2007.
- 89 Safety O, Administration H, others. Adult Blood Lead Epidemiology and Surveillance (ABLES). 2018.
- 90 Keramati MR, Sadeghian MH, Mood M. Akü sanayiinde çalışan işçilerde demir eksikliği anemisi ile kurşun intoksikasyonu ilişkisi. *UHOD - Uluslararası Hematol Derg* 2010.
- 91 Hayatbakhsh MM, Oghabian Z, Conlon E, Nakhaee S, Amirabadizadeh AR, Zahedi MJ *et al.* Lead poisoning among opium users in Iran: An emerging health hazard. *Subst Abus Treat Prev Policy* 2017. doi:10.1186/s13011-017-0127-0.
- 92 Kshirsagar M, Patil J, Patil A, Ghanwat G, Sontakke A, Ayachit RK. Biochemical effects of lead exposure and toxicity on battery manufacturing workers of Western Maharashtra (India): with respect to liver and kidney function tests. *Proquest* 2017.
- 93 Dumková J, Smutná T, Vrlíková L, Le Coustumer P, Večeřa Z, Dočekal B *et al.* Sub-chronic inhalation of lead oxide nanoparticles revealed their broad distribution and tissue-specific subcellular localization in target organs. *Part Fibre Toxicol* 2017. doi:10.1186/s12989-017-0236-y.
- 94 Sirivarasai J, Kaojarern S, Chanprasertyothin S, Panpunuan P, Petchpoung K, Tatsaneeyapant A *et al.* Environmental lead exposure, catalase gene, and markers of antioxidant and oxidative stress relation to hypertension: An analysis based on the EGAT study. *Biomed Res Int* 2015.

doi:10.1155/2015/856319.

- 94 Selvi Rani D, Vanniarajan A, Gupta NJ, Chakravarty B, Singh L, Thangaraj K. A novel missense mutation C11994T in the mitochondrial ND4 gene as a cause of low sperm motility in the Indian subcontinent. *Fertil Steril* 2006. doi:10.1016/j.fertnstert.2006.04.044.
- 96 Khalif**** HHHWMMHRHBJMZS. Heavy Metal Pollution and Men Infertility in Al-Falluja City. 2016.
- 97 Mendiola J, Moreno JM, Roca M, Vergara-Jurez N, Martínez-García MJ, García-Sánchez A *et al.* Relationships between heavy metal concentrations in three different body fluids and male reproductive parameters: A pilot study. *Environ Heal A Glob Access Sci Source* 2011. doi:10.1186/1476-069X-10-6.
- 98 Chowdhury AR, others. Recent advances in heavy metals induced effect on male reproductive function-A retrospective. *Al Ameen J Med Sci* 2009; **2**: 37–42.
- 99 Sokol RZ, Madding CE, Swerdloff RS. Lead toxicity and the hypothalamic-pituitary-testicular axis. *Biol Reprod* 1985. doi:10.1095/biolreprod33.3.722.
- 100 Huang H, Wang M, Hou L, Lin X, Pan S, Zheng P *et al.* A potential mechanism associated with lead-induced spermatogonia and Leydig cell toxicity and mitigative effect of selenium in chicken. *Ecotoxicol Environ Saf* 2021. doi:10.1016/j.ecoenv.2020.111671.
- 101 Saxena DK, Srivastava RS, Lal B, Chandra S V. The effect of lead exposure on the testis of growing rats. *Exp Pathol* 1987. doi:10.1016/S0232-1513(87)80010-5.
- 102 Martynowicz H, Andrzejak R, Mędraś M. The influence of lead on testis function. *Med. Pr.* 2005.
- 103 Wang L, Xun P, Zhao Y, Wang X, Qian L, Chen F. Effects of lead exposure on sperm concentrations and testes weight in male rats: A meta-regression analysis. *J Toxicol Environ Heal - Part A Curr Issues* 2008. doi:10.1080/15287390701839331.
- 104 Almansour MI. Histological alterations induced by lead in the testes of the quail *Coturnix coturnix*. *Res J Environ Toxicol* 2009.

doi:10.3923/rjet.2009.24.30.

- 105 Garu U, Sharma R, Barber I. EFFECT OF LEAD TOXICITY ON DEVELOPING TESTIS OF MICE. *IJPSR* 2011.
- 106 Gandhi J, Hernandez RJ, Chen A, Smith NL, Sheynkin YR, Joshi G *et al.* Impaired hypothalamic-pituitary-testicular axis activity, spermatogenesis, and sperm function promote infertility in males with lead poisoning. *Zygote* 2017. doi:10.1017/S0967199417000028.
- 107 Leidens D, Bianchini A, Varela Junior AS, Barcarolli IF, Rosa CE, Bonnel J *et al.* Effects of Experimental Lead Exposure on Testis of the Chestnut Capped Blackbird *Chrysomus ruficapillus*. *Bull Environ Contam Toxicol* 2018. doi:10.1007/s00128-017-2227-y.
- 108 James Offor S, Orji Mbagwu H, Ebere Orisakwe O. Improvement of Lead Acetate-Induced Testicular Injury and Sperm Quality Deterioration by Solanum Anomalum Thonn. Ex. Schumach Fruit Extracts in Albino Rats. *J Fam Reprod Heal* 2019. doi:10.18502/jfrh.v13i2.1916.
- 109 Mäkelä JA, Koskeniemi JJ, Virtanen HE, Toppari J. Testis Development. *Endocr. Rev.* 2019. doi:10.1210/er.2018-00140.
- 110 Huang H, An Y, Jiao W, Wang J, Li S, Teng X. CHOP/Caspase-3 signal pathway involves in mitigative effect of selenium on lead-induced apoptosis via endoplasmic reticulum pathway in chicken testes. *Environ Sci Pollut Res* 2018. doi:10.1007/s11356-018-1950-1.
- 111 O'Donnell L, Stanton P, de Kretser DM. Endocrinology of the male reproductive system and spermatogenesis. 2015.
- 112 Walker S, Robison OW, Whisnant CS, Cassady JP. Effect of divergent selection for testosterone production on testicular morphology and daily sperm production in boars. *J Anim Sci* 2004; **82**: 2259–2263.
- 113 Cheng CY, Wong EWP, Lie PPY, Li MWM, Su L, Siu ER *et al.* Environmental toxicants and male reproductive function. *Spermatogenesis* 2011. doi:10.4161/spmg.1.1.13971.
- 114 Thoreux-Manlay A, Le Goascogne C, Segretain D, Jégou B, Pinon-Lataillade G. Lead affects steroidogenesis in rat Leydig cells in vivo and in vitro. *Toxicology* 1995. doi:10.1016/0300-483X(95)03107-Q.

- 115 Hasanein P, Fazeli F, Parviz M, Roghani M. Ferulic acid prevents lead-induced testicular oxidative stress and suppressed spermatogenesis in rats. *Andrologia* 2018. doi:10.1111/and.12798.
- 116 Corpas I, Castillo M, Marquina D, Benito MJ. Lead intoxication in gestational and lactation periods alters the development of male reproductive organs. *Ecotoxicol Environ Saf* 2002. doi:10.1006/eesa.2002.2230.
- 117 Meligy AMA, Waheed MM, El-bahr SM. Effect of heavy metals arsenic, cadmium, and lead on the semen variables of dromedary camels (*Camelus dromedarius*). *Anim Reprod Sci* 2019. doi:10.1016/j.anireprosci.2019.106115.
- 118 Fahim MA, Tariq S, Adeghate E. Vitamin E modifies the ultrastructure of testis and epididymis in mice exposed to lead intoxication. *Ann Anat* 2013. doi:10.1016/j.aanat.2012.11.001.
- 119 La Llave León O, M. Salas Pacheco J. Effects of Lead on Reproductive Health. In: *Lead Chemistry*. 2020 doi:10.5772/intechopen.91992.
- 120 Kumar S. Occupational and environmental exposure to lead and reproductive health impairment: An overview. *Indian J Occup Environ Med* 2018. doi:10.4103/ijoem.IJOEM-126-18.
- 121 Reshma Anjum M, Madhu P, Pratap Reddy K, Sreenivasula Reddy P. The protective effects of zinc in lead-induced testicular and epididymal toxicity in Wistar rats. *Toxicol Ind Health* 2017. doi:10.1177/0748233716637543.
- 122 Ericson B, Landrigan P, Taylor MP, Frostad J, Caravanos J, Keith J *et al*. The Global Burden of Lead Toxicity Attributable to Informal Used Lead-Acid Battery Sites. *Ann Glob Heal* 2016. doi:10.1016/j.aogh.2016.10.015.
- 123 Organization WH, others. Preventing disease through healthy environments: exposure to lead: a major public health concern. 2019.
- 124 Debnath B, Ibrahim M, Fatima P. Study of blood lead and semen lead concentration in male infertility. *Pulse* 2011. doi:10.3329/pulse.v4i1.6956.
- 125 A. J, A. G, H. T, T. D, Z. K, G. D *et al*. European association of urology guidelines on male infertility: The 2012 update. *Eur Urol* 2012.
- 126 Hsu PC, Liu MY, Hsu CC, Chen LY, Guo YL. Lead exposure causes generation of reactive oxygen species and functional impairment in rat

- sperm. *Toxicology* 1997. doi:10.1016/S0300-483X(97)00090-5.
- 127 House MA, Wernicke BP, Farley KA. Paleo-geomorphology of the Sierra Nevada, California, from (U-TH)/he ages in apatite. *Am J Sci* 2001. doi:10.2475/ajs.301.2.77.
- 128 Siddiqui MK, Srivastava S, Mehrotra PK. Environmental exposure to lead as a risk for prostate cancer. *Biomed Environ Sci* 2002.
- 129 Verze P, Cai T, Lorenzetti S. The role of the prostate in male fertility, health and disease. *Nat. Rev. Urol.* 2016. doi:10.1038/nrurol.2016.89.
- 130 Wang H, Ji YL, Wang Q, Zhao XF, Ning H, Liu P *et al.* Maternal lead exposure during lactation persistently impairs testicular development and steroidogenesis in male offspring. *J Appl Toxicol* 2013. doi:10.1002/jat.2795.
- 131 Batra N, Nehru B, Bansal MP. Influence of lead and zinc on rat male reproduction at 'biochemical and histopathological levels'. *J Appl Toxicol* 2001. doi:10.1002/jat.796.
- 132 Vaziri ND, Khan M. Interplay of reactive oxygen species and nitric oxide in the pathogenesis of experimental lead-induced hypertension. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2007. doi:10.1111/j.1440-1681.2007.04644.x.
- 133 Bolin CM, Basha R, Cox D, Zawia NH, Maloney B, Lahiri DK *et al.* Exposure to lead (Pb) and the developmental origin of oxidative DNA damage in the aging brain. *FASEB J* 2006. doi:10.1096/fj.05-5091fje.
- 134 Mabrouk A, Cheikh H Ben. Thymoquinone supplementation reverses lead-induced oxidative stress in adult rat testes. *Gen Physiol Biophys* 2015. doi:10.4149/gpb_2014022.
- 135 Kostic TS, Andric SA, Maric D, Kovacevic RZ. Inhibitory effects of stress-activated nitric oxide on antioxidant enzymes and testicular steroidogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2000. doi:10.1016/S0960-0760(00)00185-0.
- 136 Kehrer JP, Klotz LO. Free radicals and related reactive species as mediators of tissue injury and disease: Implications for Health. *Crit Rev Toxicol* 2015. doi:10.3109/10408444.2015.1074159.
- 137 Hsu PC, Guo YL. Antioxidant nutrients and lead toxicity. *Toxicology* 2002. doi:10.1016/S0300-483X(02)00380-3.

- 138 Salawu EO, Adeeyo OA, Falokun OP, Yusuf UA, Oyerinde A, Adeleke AA. Tomato (*Lycopersicon esculentum*) prevents lead-induced testicular toxicity. *J Hum Reprod Sci* 2009. doi:10.4103/0974-1208.51346.
- 139 Mishra M, Acharya UR. Protective action of vitamins on the spermatogenesis in lead-treated Swiss mice. *J Trace Elem Med Biol* 2004. doi:10.1016/j.jtemb.2004.03.007.
- 140 Hornsby PJ. Regulation of cytochrome P-450-supported 11 β -hydroxylation of deoxycortisol by steroids, oxygen, and antioxidants in adrenocortical cell cultures. *J Biol Chem* 1980. doi:10.1016/s0021-9258(19)85626-0.
- 141 Adewoyin M, Ibrahim M, Roszaman R, Isa M, Alewi N, Rafa A *et al.* Male Infertility: The Effect of Natural Antioxidants and Phytocompounds on Seminal Oxidative Stress. *Diseases* 2017. doi:10.3390/diseases5010009.
- 142 Huseman CA, Varma MM, Angle CR. Neuroendocrine effects of toxic and low blood lead levels in children. *Pediatrics* 1992. doi:10.1542/peds.90.2.186.
- 143 Allouche L, Hamadouche M, Touabti A. Chronic effects of low lead levels on sperm quality, gonadotropins and testosterone in albino rats. *Exp Toxicol Pathol* 2009. doi:10.1016/j.etp.2008.12.003.
- 144 García-Lestón Julia J, Méndez J, Pávaro E, Laffon B. Genotoxic effects of lead: An updated review. *Environ. Int.* 2010. doi:10.1016/j.envint.2010.04.011.
- 145 Carreau S, de Vienne C, Galeraud-Denis I. Aromatase and estrogens in man reproduction: a review and latest advances. *Adv. Med. Sci.* 2008. doi:10.2478/v10039-008-0022-z.
- 146 Bois C, Delalande C, Nurmio M, Parvinen M, Zanatta L, Toppari J *et al.* Age- and cell-related gene expression of aromatase and estrogen receptors in the rat testis. *J Mol Endocrinol* 2010. doi:10.1677/JME-10-0041.
- 147 Carreau S, Hess RA. Oestrogens and spermatogenesis. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 2010. doi:10.1098/rstb.2009.0235.
- 148 Joseph A, Shur BD, Hess RA. Estrogen, efferent ductules, and the epididymis. *Biol. Reprod.* 2011. doi:10.1095/biolreprod.110.087353.
- 149 Pentikäinen V, Erkkilä K, Suomalainen L, Parvinen M, Dunkel L. Estradiol

- acts as a germ cell survival factor in the human testis in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 2000. doi:10.1210/jc.85.5.2057.
- 150 Cacciola G, Chioccarelli T, Fasano S, Pierantoni R, Cobellis G. Estrogens and spermiogenesis: New insights from type 1 cannabinoid receptor knockout mice. *Int J Endocrinol* 2013. doi:10.1155/2013/501350.
- 151 Gorbel F, Boujelbene M, Makni-Ayadi F, Guermazi F, Croute F, Soleilhavoup JP *et al.* [Cytotoxic effects of lead on the endocrine and exocrine sexual function of pubescent male and female rats. Demonstration of apoptotic activity]. *C R Biol* 2002.
- 152 Marchlewicz M, Michalska T, Wiszniewska B. Detection of lead-induced oxidative stress in the rat epididymis by chemiluminescence. *Chemosphere* 2004. doi:10.1016/j.chemosphere.2004.08.102.
- 153 Ramah A, EL-shwarby R, M.A. N, El-shewey E. The effect of lead toxicity on male albino rats reproduction with ameliorate by vitamin E and pumpkin seeds oil. *Benha Vet Med J* 2015. doi:10.21608/bvmj.2015.32538.
- 154 Watanabe Y. Alternatives to the oxoferryl porphyrin cation radical as the proposed reactive intermediate of cytochrome P450: Two-electron oxidized Fe(III) porphyrin derivatives. *J. Biol. Inorg. Chem.* 2001. doi:10.1007/s007750100278.
- 155 Boujbiha MAM, Hamden K, Guermazi F, Bouzlama A, Omezzine A, El Feki A. Impairment of spermatogenesis in rats by mercuric chloride: Involvement of low 17 β -estradiol level in induction of acute oxidative stress. *Biol Trace Elem Res* 2011. doi:10.1007/s12011-010-8774-2.
- 156 Singh NK, Garabadu D, Sharma P, Shrivastava SK, Mishra P. Anti-allergy and anti-tussive activity of *Clitoria ternatea* L. in experimental animals. *J Ethnopharmacol* 2018. doi:10.1016/j.jep.2018.05.026.
- 157 Nainggolan M, Sinaga KR, Sinaga SM, Nugraha SE. Effect of Ethanol Extract of Celery (*Apium graveolens* L) against Urea and Creatinine Level in Male Wistar Rats on Ethylene Glycol Induced Nephrolithiasis. 2020 doi:10.5220/0010087107420746.
- 158 Nadia NO. The role of antioxidant properties of Celery against lead acetate induced hepatotoxicity and oxidative stress in irradiated rats. *Arab J Nucl Sci*

- Appli* 2013; **46**: 339–346.
- 159 Saddein, I, Haghpanah, T, dkk (2019) Efek Pencegahan Vitamin E pada Tesis, Parameter kerusakan dan sperma pada anak mencit Generasi pertama Akibat paparan Mancozeb sebelum dan setelah melahirkan. *Hindawi Jurnal Teknologi*, artikel 4763684
- 160 Wakhidah, Anisatu. Z, (2021) REVIEW : SELEDRI (*Apium graveolens L.*): BOTANI, EKOLOGI, FITOKIMIA, BIOAKTIVITAS, DAN PEMANFAATAN. *Biology Research Centre – LIPI, Jawa Barat*
- 161 Sukketsiri W, Chonpathompikunlert P, Tanasawet S, Choosri N, Wongtawatchai T. Effects of *Apium graveolens* Extract on the Oxidative Stress in the Liver of Adjuvant-Induced Arthritic Rats. *Prev Nutr Food Sci*. 2016 Jun;21(2):79-84. doi: 10.3746/pnf.2016.21.2.79. Epub 2016 Jun 30. PMID: 27390722; PMCID: PMC4935245.
- 162 Ma Q. Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2013;53:401-26. doi: 10.1146/annurev-pharmtox-011112-140320. PMID: 23294312; PMCID: PMC4680839.
- 163 Hifnawy MS, Aboseada MA, Hassan HM, AboulMagd AM, Tohamy AF, Abdel-Kawi SH, Rateb ME, El Naggat EMB, Liu M, Quinn RJ, Alhadrami HA, Abdelmohsen UR. Testicular Caspase-3 and β -Catenin Regulators Predicted via Comparative Metabolomics and Docking Studies. *Metabolites*. 2020 Jan 11;10(1):31. doi: 10.3390/metabo10010031. PMID: 31940785; PMCID: PMC7022381.
- 164 Morgan MJ, Liu ZG. Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling. *Cell Res*. 2011 Jan;21(1):103-15. doi: 10.1038/cr.2010.178. Epub 2010 Dec 28. PMID: 21187859; PMCID: PMC3193400.
- 167 Amanpour P, Khodarahmi P, Salehipour M. Protective effects of vitamin E on cadmium-induced apoptosis in rat testes. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 2020 Mar;393(3):349-358. doi: 10.1007/s00210-019-01736-w. Epub 2019 Oct 17. PMID: 31620823.