

ARTIKEL PENELITIAN

Efek Mangiferin terhadap Toksisitas Doksorubisin pada Testis Tikus**Supraja Dwiyono,^{1*} Wawaimuli Arozal,² Radiana Dhewayani³**¹Program Magister Ilmu Biomedik,²Departemen Farmakologi dan Terapeutik,³Departemen Histologi, FK Universitas Indonesia

*Korespondensi: sprjdwyn@gmail.com

Diterima 6 November 2015; Disetujui 11 Agustus 2016

Abstrak

Penggunaan doksorubisin (DOX) sebagai antikanker dapat menyebabkan efek samping di organ lain seperti testis akibat peningkatan stres oksidatif. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek antioksidan mangiferin yang terkandung dalam *Mangifera indica* untuk mengurangi toksisitas testis. Sebanyak 24 ekor tikus jantan sprague dawley, dibagi menjadi empat kelompok. Kelompok normal mendapatkan injeksi NaCl 0,9%, kelompok kontrol negatif mendapatkan DOX total 15mg/kgBB; kelompok DOX mendapat mangiferin 30mg/kgBB dan mangiferin 60mg/kgBB. Setelah 7 minggu, tikus dimatikan dan testis dikumpulkan untuk analisis parameter stres oksidatif biokimia yaitu kadar malonyaldehyde (MDA), aktivitas superoxide dysmutase (SOD), perubahan histologi dan apoptosis kaspase-9 dan kaspase-12. Pemberian mangiferin dosis 30mg/kgBB dan 60mg/kgBB selama 7 minggu dapat mengurangi kerusakan sel spermatogenik dan sel sertoli tubulus seminiferus testis, menurunkan kadar MDA dan menurunkan ekspresi kaspase-9 pada kelompok yang diberikan DOX dan mangiferin. Perbaikan parameter tersebut mengindikasikan mangiferin mempunyai efek proteksi terhadap kerusakan sel spermatogenik dan sel sertoli tubulus seminiferus testis tikus yang diberikan DOX.

Kata kunci: toksisitas doksorubisin, stres oksidatif, apoptosis, mangiferin, testis.

Mangiferin Effects against Doxorubicin Toxicity in Rat Testis**Abstract**

The use of doxorubicin (DOX) as an anti-cancer agent might cause side effects to other organs such as testicle due to increased oxidative stress. This study was aimed to investigate the antioxidant effect of mangiferin inside *Mangifera indica* for lowering testicle toxicity. A total of 24 sprague dawley male rats was divided into 4 groups. The normal group was injected with 0.9% of NaCl, the negative control group received DOX with dosage of 15 mg/BW while DOX treated group received mangiferin with dosage of 30 mg/BW and 60 mg/BW. After 7 weeks, all rats were killed and testicles from every rats were subsequently collected for oxidative stress parameter analysis which were measuring the rate of malonyaldehyde (MDA), superoxide dysmutase activity, histological changes, and apoptosis of caspase-9 and caspase-12. Administration of mangiferin with dosage of 30 mg/BW and 60 mg/BW for 7 weeks decreased the destruction of spermatogenic cells and sertoli cells of seminiferous tubule, decreased the rate of MDA, and lowered the expression of caspase-9 in the group which received DOX and mangiferin. Improvement in those parameters indicated that mangiferin had a protective effect towards spermatogenic and sertoli cells of seminiferous tubule destruction in rats which were given DOX.

Keywords: doxorubicin toxicity, oxidative stress, apoptosis, mangiferin, testicles.

Pendahuluan

Doksorubisin (DOX) adalah obat antikanker golongan antrasiklin yang dihasilkan dari bakteri *Streptomyces peucetius caesius*. DOX digunakan dalam pengobatan leukemia, limfoma dan tumor solid seperti kanker payudara, ovarium, paru dan tiroid.^{1,2} DOX mempunyai mekanisme kerja yang tidak dapat dipisahkan dengan mekanisme toksisitasnya. Mekanisme antikanker DOX adalah interkalasi dengan DNA, inhibisi kerja topoisomerase II, menghambat religasi untai DNA, dan mengganggu membran fluiditas. Gugus kuinon DOX dapat membentuk radikal semikuinon yang berperan dalam pembentukan radikal bebas oksigen.³ Penurunan efektifitas DOX dalam pengobatan kanker dapat disebabkan pengurangan dosis atau penundaan terapi.⁴

Efek sitotoksik DOX mengenai berbagai organ seperti jantung, otak, hati, ginjal dan testis.^{5,6} Penelitian farmakokinetik DOX di tikus menunjukkan akumulasi DOX di testis.⁷ Penelitian efek toksik DOX di testis tikus memperlihatkan obat tersebut dapat merusak sel sertoli dan sel spermatogenik tikus (spermatisit primer, spermatid dan spermatozoa). Hal tersebut dapat mengubah struktur morfologi tubulus seminiferus pada pemeriksaan histologi testis.⁸⁻¹⁰

Pemberian DOX secara terus-menerus dapat menyebabkan disfungsi testis sehingga dapat terjadi infertilitas primer setelah pengobatan selesai.¹¹ Peningkatan stres oksidatif dan apoptosis sel merupakan dasar timbulnya toksisitas di testis.

Reactive oxygen species (ROS) timbul di jaringan yang diberikan DOX. ROS merusak komponen sel seperti lemak sehingga terjadi peroksidasi lemak yang dapat dinilai dengan pengukuran kadar malondialdehid (MDA).^{8,9,12,13} Selain itu, ROS mempengaruhi kerja enzim antioksidan termasuk *superoxide dismutase* (SOD).¹⁴

DOX dapat menyebabkan apoptosis sel melalui aktivasi jalur intrinsik (jalur mitokondria dan jalur retikulum endoplasma). Aktivasi tersebut akan mengaktifkan kaspase yang berakhir pada kematian sel.¹²

Berbagai bahan alam dapat mengurangi toksisitas DOX seperti ginkgobiloba, propolis, taurin.⁸⁻¹⁰ Mangiferin (MAG) merupakan glukosil-xanthonoid alami yang terdapat di tanaman *Mangifera indica*¹⁵ dengan kandungan MAG tertinggi di daun dan *stem bark*.¹⁶ MAG yang terkandung dalam ekstrak air *stem bark Mangifera indica* mempunyai efek proteksi lebih baik melawan

kerusakan oksidatif yang ditimbulkan *12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate* (TPA) dibandingkan vitamin C, E dan beta-karoten.¹⁷ Dosis MAG 30mg/kgBB dan 60mg/kgBB per oral digunakan dalam penelitian untuk memperlihatkan efek antioksidan di sel hati setelah diinduksi karbon tetraklorida (CCl₄).¹⁸ Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek MAG dalam mencegah toksisitas testis di tikus setelah pemberian DOX

Metode

Sebanyak 24 ekor tikus jantan *sprague dawley* dibagi menjadi empat kelompok, yaitu kelompok normal yang mendapatkan injeksi NaCl 0,9% (intraperitoneal/IP) + CMC 0,5% (oral) + NaCl 0,9%; kelompok DOX: DOX dosis total 15mg/kgBB (IP) + CMC 0,5% (oral) + NaCl 0,9%; kelompok DOX + MAG 30: DOX dosis total 15mg/kgBB (IP) + CMC 0,5% + MAG 30mg/kgBB/hari; kelompok DOX + MAG 60: DOX dosis total 15mg/kgBB (IP) + CMC 0,5% + MAG 60mg/kgBB/hari.

Homogenat testis dibuat dengan menimbang ± 100 mg jaringan lalu dihomogenkan dengan PBS pH 7,4 0,1M menggunakan *tissue homogenizer*. Selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 3500rpm selama 10 menit pada suhu 4°C hingga diperoleh supernatan. Supernatan disimpan pada suhu -80°C dan digunakan untuk mengukur aktivitas SOD dan kadar MDA. Pengukuran aktivitas SOD menggunakan Kit Ransod sedangkan pengukuran aktivitas MDA menggunakan prinsip reaksi TBA 0,67% dan TCA 20% menghasilkan warna lembayung.

Sediaan dibuat dengan memotong testis setebal 4-5mm kemudian difiksasi dengan larutan formalin 10% selama 24 jam, dicuci dengan alkohol 70% dan dehidrasi dengan merendam ke dalam alkohol 70%, 80%, 90%, 95% dan 100% selama 24 jam. Penjernihan dilakukan dengan merendam dalam xylol sebanyak dua kali selama 24 jam dan 2-3 jam. Dilakukan perendaman dalam *benzol-histoplast* (parafin) selama ½-1 jam dan perendaman dalam histoplas cair di oven selama 1-2 jam pada suhu 60°C. Jaringan dipotong menggunakan mikrotom dengan ketebalan 4-5µ dan potongan tersebut dimasukkan ke dalam penangas air (air hangat, suhu $\pm 50^\circ\text{C}$) agar mengembang dengan baik. Jaringan direkatkan di gelas obyek dan dikeringkan pada suhu $\pm 60^\circ\text{C}$ selama 10 menit. Sediaan yang dibuat adalah potongan melintang dan memanjang.

Sediaan potongan melintang diwarnai dengan larutan HE untuk menilai gambaran kerusakan sel kemudian dibaca dengan mikroskop cahaya

(Olympus CX-21) pembesaran 400X (lensa obyektif 40X dan lensa okuler 10X; lapang pandang besar). Dipilih 5 tubulus seminiferus dalam lapang pandang besar (LPB) secara acak tiap sediaan menggunakan kamera mikroskop Advance (Optilab).⁸ Kriteria pemilihan tubulus seminiferus adalah tubulus berbentuk bulat dan memenuhi lapangan pandang minimal 80%.¹⁰

Diameter tubulus seminiferus diukur dengan cara mengukur garis terpanjang dari tubulus seminiferus pada potongan melintang. Dihitung rerata diameter tubulus seminiferus tiap sediaan yang terdiri atas 5 tubulus seminiferus yang dipilih secara acak lalu dihitung rerata diameter tubulus seminiferus testis dari tiap kelompok yang terdiri atas 5 sediaan.⁸

Perhitungan jumlah sel sertoli dan spermatogenik (spermatogonium, spermatosit primer (I), spermatid dan spermatozoa) per tubulus seminiferus tiap sediaan dalam kelompok, disesuaikan dengan penelitian sebelumnya.¹⁰

Kadar aktivitas MDA dan SOD disajikan dalam nilai rerata $\pm$ SD dan nilai rerata $\pm$ SEM. Perbandingan antar kelompok dianalisis dengan uji ANOVA atau uji non-parameterik Kruskal-Wallis. Untuk melihat masing-masing kemaknaan antar kelompok dilakukan uji Mann-Whitney.^{19,20} Penelitian ini telah disetujui oleh komite etik FKUI no. 575/H2.F1/ETIK/2013.

Hasil

Tingkat Aktivitas SOD dan Kadar MDA

Tabel 1 memperlihatkan tingkat aktivitas SOD dan kadar MDA pada masing-masing kelompok. Aktivitas SOD pada kelompok DOX menurun dibandingkan kelompok normal. Aktivitas SOD pada kelompok MAG 60mg/kgBB meningkat dibandingkan kelompok DOX. Tidak ada perbedaan bermakna di antara kelompok tersebut. Kadar MDA pada kelompok DOX meningkat dibandingkan dengan kelompok normal. Kadar MDA pada kelompok MAG 30mg/kgBB/hari menurun dibandingkan kelompok DOX dan kadar MDA juga menurun pada kelompok MAG 60mg/kgBB/hari.

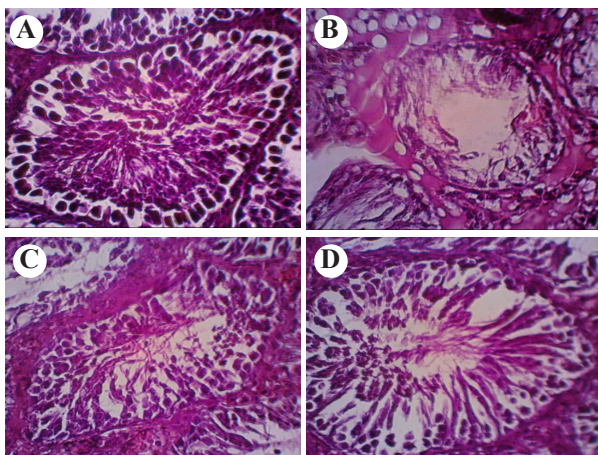
Tabel 1. Tingkat Aktivitas SOD dan Kadar MDA

Kelompok	Aktivitas SOD (Unit SOD/g jaringan)	Kadar MDA (nmom/ml)
Normal	15,117 $\pm$ 2,543	0,909 $\pm$ 0,758
DOX	14,524 $\pm$ 1,528	1,792 $\pm$ 0,263
DOX+MAG 30	13,936 $\pm$ 2,974	1,3961 $\pm$ 0,129
DOX+MAG 60	15,528 $\pm$ 3,78	1,2874 $\pm$ 0,143

Efek Pemberian MAG pasca Toksisitas Testis yang Diinduksi Doksorubisin

Toksisitas DOX menyebabkan proses spermatogenesis tidak lengkap di lapisan sel sertoli, spermatogonium di basal tubulus dan

sel-sel spermatogenik yang berkembang hingga spermatozoa. Pasca pemberian MAG 30mg dan 60mg tampak lapisan sel sertoli, spermatogonium di basal tubulus dan sel spermatogenik berkembang hingga spermatozoa menunjukkan proses spermatogenesis yang lengkap (Gambar 1)

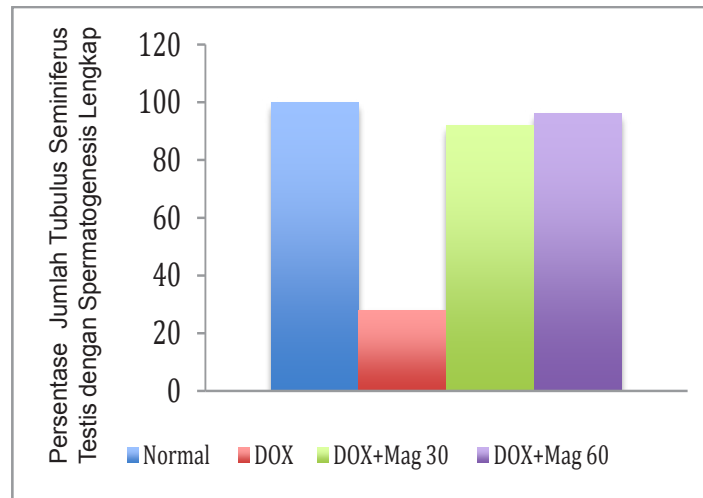


Gambar 1. Tubulus Seminiferus Testis Masing-masing Kelompok.

(A) Tubulus seminiferus testis tikus normal. (B) Tubulus seminiferus testis yang diinduksi DOX menunjukkan histologi testis normal. (C) Tubulus seminiferus testis diinduksi DOX+MAG 30mg. (D) Tubulus seminiferus testis diinduksi DOX+MAG 60mg (Hematoxylin-Eosin/HE, pembesaran 400x)

Gambar 2. menunjukkan semua tubulus seminiferus testis kelompok tikus normal mengalami proses spermatogenesis lengkap (100%). Di testis yang diinduksi toksisitas DOX, hanya 28% tubulus seminiferus testis yang mengalami proses spermatogenesis lengkap. Angka tersebut adalah yang paling rendah dibandingkan kelompok tikus lainnya. Hasil tersebut menandakan terjadi hambatan atau gangguan proses spermatogenesis

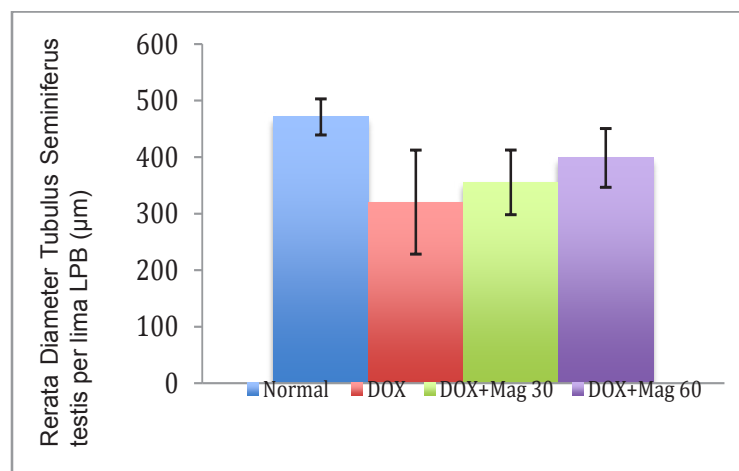
di tubulus seminiferus testis yang diinduksi toksisitas DOX. Penambahan MAG 30mg dan 60mg pasca induksi sitotoksitas DOX menunjukkan 92% dan 96% tubulus seminiferus testis mengalami proses spermatogenesis lengkap. Penambahan MAG 30mg dan MAG 60mg mengatasi hambatan atau gangguan proses spermatogenesis tersebut sehingga jumlah tubulus seminiferus testis dengan spermatogenesis lengkap hampir setara dengan kelompok tikus normal.



Gambar 2. Persentase Jumlah Tubulus Seminiferus Testis dengan Spermatogenesis Lengkap

Perubahan histologi testis akibat induksi toksisitas DOX adalah penyusutan rerata diameter tubulus seminiferus testis. Penyusutan rerata diameter tubulus seminiferus testis lebih rendah

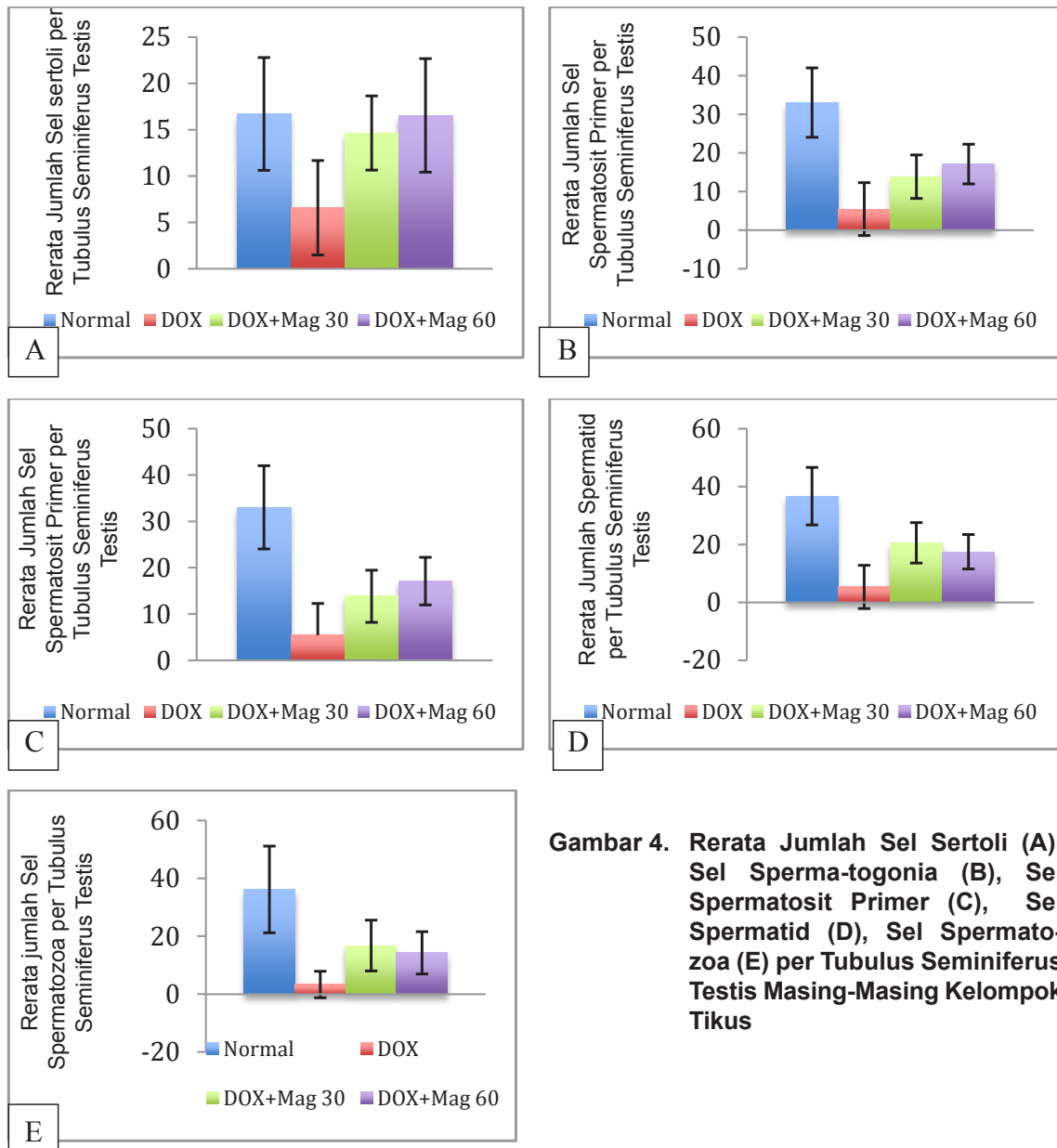
dengan penambahan MAG 30mg dan semakin rendah di kelompok dengan penambahan 60mg pasca DOX (Gambar 3)



Gambar 3. Rerata Diameter Tubulus Seminiferus Testis per LPB per Subyek Masing-masing Kelompok Tikus

Gambar 4 menunjukkan rerata jumlah sel sertoli, sel spermatogonia, sel spermatosit primer, per tubulus seminiferus testis masing-masing

kelompok tikus. Rerata jumlah sel spermatozoa per tubulus seminiferus sangat sedikit pada kelompok tikus dengan induksi toksisitas DOX dibandingkan kelompok tikus lainnya.



Gambar 4. Rerata Jumlah Sel Sertoli (A), Sel Sperma-togonia (B), Sel Spermatosit Primer (C), Sel Spermatid (D), Sel Spermatozoa (E) per Tubulus Seminiferus Testis Masing-Masing Kelompok Tikus

Pembahasan

Pada penelitian ini dilakukan pemeriksaan terhadap kerusakan sel sertoli dan sel spermatogenik tubulus seminiferus testis yang diinduksi DOX dan pengaruh penambahan MAG dalam melindungi sel-sel tersebut. Salah satu mekanisme DOX adalah memproduksi ROS dan meningkatkan stres oksidatif. Mekanisme tersebut berperan dalam efeknya sebagai antikanker dan

dalam menimbulkan toksisitas sel. Induksi DOX mengurangi aktivitas pertahanan antioksidan endogen sehingga stres oksidatif meningkat. Peningkatan stres oksidatif di testis dapat menyebabkan apoptosis dan berakhir dengan kematian sel.³

MAG merupakan senyawa polifenol alami yang memiliki efek antioksidan dan dapat mengurangi toksisitas DOX di beberapa organ.¹⁵ MAG terbukti memproteksi jantung dan hati hewan coba yang

diinduksi DOX.²¹ Efek proteksi di organ lain mendasari penelitian MAG di testis yang diinduksi DOX. Pembuktian peningkatan stres oksidatif di testis dilakukan dengan pemeriksaan parameter stres oksidatif (aktivitas SOD dan kadar MDA) dan pemeriksaan perubahan histologi testis.

Efek Protektif MAG terhadap Peningkatan Stres Oksidatif Testis

Pemberian DOX memperlihatkan aktivitas SOD yang menurun dibandingkan kelompok normal dan pada kelompok penambahan MAG 60mg menunjukkan aktivitas SOD yang meningkat dibandingkan kelompok DOX:

DOX merupakan agen kemoterapi yang digunakan untuk berbagai penyakit keganasan, salah satunya adalah leukemia.² DOX dapat terakumulasi di testis dan dapat menimbulkan toksisitas di organ tersebut. Proses spermatogenesis di testis merupakan proses aktif yang dapat menghasilkan 1000 sperma per detik. Tingginya tingkat pembelahan sel di testis mencerminkan besarnya konsumsi oksigen oleh lapisan epitel germinal.

Testis mempunyai vaskularisasi rendah yang mencerminkan rendahnya tekanan oksigen di organ tersebut. Walaupun demikian, testis rentan terhadap peningkatan stres oksidatif karena banyaknya sistem pembentuk ROS dan jumlah asam lemak tidak jenuh.²² DOX dapat menimbulkan ROS melalui: 1) DOX dimetabolisme menjadi radikal semikuinon, dengan keberadaan oksiden radikal semikuinon yang terbentuk akan menghasilkan radikal superoksida 2) DOX menginduksi *inducible NO Synthase* (iNOS, NOS2). NO yang dihasilkan akan membentuk RNS 3) DOX dimetabolisme menjadi metabolit aglikon, metabolit tersebut melalui reaksi redoks menghasilkan radikal superoksida 4) kompleks DOX-Fe bentuk oksidasi dapat direduksi oleh domain reduktase (NADPH-oxidase, *xanthine-oxidase*, sitokrom P450 sitosol, tiol-sistein dan glutathion) menjadi kompleks DOX-Fe bentuk reduksi. Bentuk tereduksi tersebut dapat menghasilkan radikal superoksida. Keberadaan besi dapat dijelaskan dengan transferrin testikular.²³ Besi akan terlepas dari transferrin oleh DOX dan ROS sehingga memicu pembentukan ROS lebih banyak.²⁴

SOD yang terdapat di testis meliputi SOD sitosol, mitokondria dan ekstraselular. Radikal superoksida yang terbentuk melalui mekanisme di atas dikatalisis oleh SOD menjadi hidrogen peroksida. Hidrogen peroksida akan dikatalisis dengan keberadaan besi menjadi radikal hidroksil

yang merupakan senyawa toksik untuk sel.²⁵ SOD akan menurun aktivitasnya bila testis diinduksi oleh DOX²⁶ namun pada penelitian ini aktivitas SOD pada kelompok DOX menurun tidak bermakna dibandingkan kelompok normal. Perbandingan tidak bermakna tersebut tidak sesuai dengan penelitian lain namun nilai tidak bermakna itu masih mencerminkan aktivitas SOD pada kelompok DOX dan kelompok *co-treatment* MAG 60. Pentingnya peran GPX, GST dan enzim yang diekspresikan di sel germinal matur, LDH-X, menunjukkan keberagaman enzim antioksidan yang bekerja di sel sertoli dan sel germinal testis.²⁷

Pemeriksaan peroksidasi lipid dilakukan dengan mengukur kadar MDA testis yang merupakan produk peroksidasi lipid. MDA digunakan karena MDA yang dihasilkan dapat bereaksi dengan TBA. Penelitian kadar MDA diperiksa dengan mereaksikan homogenat testis dengan TBA dan diukur kadarnya dengan spektrofotometri.

MDA merupakan penanda penting terhadap kerusakan jaringan akibat peningkatan stres oksidatif.²⁸ Pada penelitian ini, kadar MDA pada kelompok DOX meningkat bermakna dibandingkan kelompok normal dan aktivitas SOD pada kelompok DOX menurun dibandingkan kelompok normal. Peningkatan bermakna kadar MDA membuktikan bahwa pemberian DOX dapat meningkatkan stres oksidatif di testis. Hal tersebut sejalan dengan penelitian sebelumnya.⁸

Penelitian mengenai MAG sebagai aktivitas antioksidan *in vivo* telah ditunjukkan oleh penelitian sebelumnya²⁹ dengan menggunakan MAG dosis 30mg/kgBB/hari dan 60mg/kg BB/hari untuk melindungi sel hati dari kerusakan CCl₄.¹⁸ Hal tersebut mendasari penggunaan dosis MAG 30mg/kgBB/hari dan 60mg/kgBB/hari yang digunakan pada penelitian ini. Pemberian MAG dosis 30mg/kgBB/hari dan 60mg/kgBB/hari menurunkan kadar MDA di testis secara bermakna dibandingkan kelompok DOX.

Peningkatan dosis MAG menurunkan kadar MDA testis lebih baik dari kelompok normal, menunjukkan kemungkinan fenomena *dose-dependent* MAG terhadap pengurangan peroksidasi lipid di homogenat testis. Kemampuan MAG menurunkan peroksidasi lipid di testis tersebut dapat disebabkan oleh aktivitas antioksidan testis.

Efek Protektif MAG terhadap Toksisitas DOX

Peningkatan stres oksidatif yang disebabkan oleh DOX dapat dilihat dari kematian satu ekor tikus pada empat kelompok DOX. Kematian tersebut

tidak sesuai dengan penelitian sebelumnya. Selain itu peningkatan stres oksidatif yang disebabkan oleh DOX juga dapat dilihat dari pemeriksaan histologi testis dengan pewarnaan HE. Pada Penelitian ini didapatkan kerusakan tubulus seminiferus yang ditandai dengan penyusutan diameter tubulus seminiferus testis, hilangnya sebagian besar lapisan sel sertoli, spermatogonium, spermatosit primer, spermatid dan spermatozoa. Kerusakan tubulus seminiferus mengganggu proses spermatogenesis.

Penggunaan DOX sebagai kombinasi kemoterapi pada leukemia, limfoma hodgkin dan non-hodgkin mengakibatkan azospermia yang menyebabkan disfungsi testis.²² Seperti yang diharapkan, penelitian efek DOX di testis tikus menunjukkan hasil yang sama dengan penelitian ini.²⁹

MAG mempunyai aktivitas antioksidan dan hal itu telah dibuktikan oleh berbagai penelitian sebelumnya. Kematian satu ekor tikus pada kelompok penambahan MAG 30 mg/kgBB/hari dan MAG 60mg/kgBB/hari dibandingkan kelompok DOX tidak menunjukkan pengurangan toksisitas DOX oleh penambahan MAG tersebut. Kematian tersebut mungkin disebabkan oleh dosis DOX yang diberikan terlalu besar. Dosis total DOX yang diberikan pada penelitian lain sebesar 9mg/kgBB.¹²

Penambahan MAG 30mg/kgBB/hari dan MAG 60mg/kgBB/hari (*co-treatment* MAG 30 mg/kgBB/hari dan 60mg/kgBB/hari) dapat memulihkan ukuran diameter tubulus seminiferus, perbaikan gambaran histologi, dan proses spermatogenesis tubulus seminiferus testis secara bermakna dibandingkan kelompok DOX. Kemampuan MAG memulihkan ukuran diameter tubulus seminiferus, memperbaiki gambaran histologi dan proses spermatogenesis tubulus seminiferus di testis dapat disebabkan oleh aktivitas antioksidan.

Kesimpulan

MAG menurunkan toksisitas DOX melalui mekanisme antioksidan dengan memberikan proteksi terhadap kerusakan sel spermatogenik dan sel sertoli tubulus seminiferus testis tikus yang diberikan DOX.

Daftar Pustaka

1. Arcamone F, Casinelli G, Fantini G. Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin, a new antitumour antibiotic from *S. peuceetius* var. *caesisus*. *Biotechnol Bioeng.* 1969;11:1101-10.
2. Priestman T. *Cancer chemotherapy in clinical practice.* London: Springer-Verlag; 2008.
3. Chabner BA. General principles of cancer chemotherapy. Dalam: B. Laurence, editors. Goodman and Gilman's the Pharmacological basis of therapeutics. 12th ed. China: The Mc Graw-Hill Companies; 2011. p.1669-713.
4. Cancer Care Ontario. Doxorubicin [drug monograph]. Ontario: Cancer Care Ontario; 2014.
5. Shivakumar P, Rani MU, Reddy AG, Anjaneyulu Y. A study on the toxic effects of doxorubicin on the histology of certain organs. *Tox Int.* 2012;19(3):241-44.
6. Deavall DG, Martin EA, Horner JM, Roberts R. Drug-induced oxidative stress and toxicity. *J Tox.* 2012 Aug 5;2012.
7. Nwankwoala R, Georgewill GU, Georgewill U. Pharmacokinetics of Adriamycin after intravenous administration in Rat. *The Int Jou Onc.* 2009;6.
8. Yeh Y-C, Liu T-J, Wang L-C, Lee H-W, Ting C-T, Lee W-L, et al. A standardized extract of *Ginkgo-biloba* suppresses doxorubicin-induced oxidative stress and p53-mediated mitochondrial apoptosis in rat testes. *Brit Jou Pharm.* 2009;156:48-61.
9. Rizk SM, Zaki HF, Mina MAM. Propolis attenuates doxorubicin-induced testicular toxicity in rats. *Food Chem Tox.* 2014;67:176-86.
10. Takahashi H, Tainaka H, Umezawa M, Takeda K, Hiromitsu T, Nishimune Y, et al. Evaluation of testicular toxicology of doxorubicin based on microarray analysis of testicular specific gene expression. *J Tox Sci.* 2011;36(5):559-67.
11. Howell SJ, Shalet, SM. Spermatogenesis after cancer treatment: damage and recovery. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2005;12-7.
12. Das J, Ghosh J, Manna P, Sil PC. Taurine protects rat testes against doxorubicin-induced oxidative stress as well as p53, Fas and caspase 12-mediated apoptosis. *Amino Acids.* 2012;42:1839-55.
13. Uygur R, Aktas C, Tulubas F, Uygur E, Kanter M, Erboga M, et al. Protective effect of fish omega-3 fatty acids on doxorubicin-induced testicular apoptosis and oxidative damage in rats. *Andrologia.* 2014; 46:917-24.
14. Sikka SC. Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. *J Androl.* 2014;25:5-18.

15. Saleh NAM, El-Ansari MAI. Polyphenolics of twenty local varieties of *Mangifera indica*. *Planta Medica*. 1975;28:124-30.
16. Bhusari S, Patil A, Kandangire P, Gite S, Shinde D, Wakte P. Activity guided isolation of antioxidant compound from leaves of *Mangifera indica*. *Inter J Pharm Pharm Sci*. 2012;4(4):112-6.
17. Sanchez GM, Re L, Giuliani A, Nunez-Selles AJ, Davison GP, Leon-Fernandez OS. Protective effects of *Mangifera indica*. Extract, mangiferin and selected antioxidants againsts TPA-induced biomolecules oxidation and peritoneal macrophage activation in mice. *Pharmacol Res*. 2000;42(6):565-73.
18. Bhattacharyya S, Ahmmed SM, Saha BP, Mukherjee PK. Soya phospholipid complex of mangiferin enhances its hepatoprotectivity by improving its bioavailability and pharmacokinetics. *Sci Food Agric*. 2014;94(7):1380-8.
19. Pengujian hipotesis parametrik untuk sampel ganda. Dalam: Jones DS, editor. *Statistik farmasi*; alih bahasa Ramadaniati HU, Rivai HH; editor edisi bahasa Indonesia Aini N. Jakarta: EGC; 2010:312-97.
20. Pengujian hipotesis non-parametrik untuk sampel ganda. Dalam: Jones DS, editor. *Statistik farmasi*; alih bahasa Ramadaniati HU, Rivai HH; editor edisi bahasa Indonesia Aini N. Jakarta: EGC; 2010:400-53.
21. Quan WZ, Gang DJ, Li Yan. Pharmacological effects of mangiferin. *Chi Herb Med*. 2011;3(4):266-71.
22. Repetto M, Semprine J, Boveris A. Lipid peroxidation: chemical mechanism, biological implications and analytical determination. *Intech*. 2012;1:3-24.
23. Bardin CW, Scherins RJ, DeKretser DM, Kerr JF, DW Hamilton, Naftolin F. Sistem reproduksi pria. Dalam: Fawcett DW, editor. *Buku ajar histologi*; Alih bahasa Jan Tambayong. Edisi ke-12. Jakarta: EGC; 2002: 687-714.
24. Simunek T, Sterba M, Popelova O, Adamcova M, Hrdina R, Gersl V. Anthracycline-induced cardiotoxicity: overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron. *Pharmacological Report*. 2009;61:154-71.
25. Torres VM, Simic VD. Doxorubicin-induced oxidative injury of cardiomyocytes - do we have right strategies for prevention? *INTECH Open Access Publisher*; 2012.
26. Aitken RJ, Roman SD. Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. *Ox Med Cell Long*. 2008;1(1):15-24.
27. Kaur P, Bansal MP. Influence of selenium induced oxidative stress on spermatogenesis and lactate dehydrogenase-X in mice testis. *Asian J Androl*. 2004;6:227-23.
28. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Ox Med Cel Long*. 2014; 2014: 3.
29. Al-Azemi M, Omu FE, Kehinde EO, Anim JT, Oriowo MA, Omu AE. Lithium protects against toxic effects of cadmium in the rat testes. *J Assist Reprod Genet*. 2010;27(8):469-76.