

Pengaruh Antioksidan Sarang Semut (*Myrmecodia pendans*) Terhadap Kadar MDA dan Integritas Membran Spermatozoa Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Yang Terpapar Plumbum

Dr. Djuna Lamondo, M.Si¹⁾, Drs. Mustamin Ibrahim, M.Si¹⁾.

¹⁾ Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Science, Gorontalo State University

Abstract

Background: Mekanisme toksisitas plumbum (Pb) pada jaringan testis disebabkan oleh produksi *reactive oxygen species* (ROS) yang berlebihan dan menghambat aktivitas enzim antioksidan. Berdasarkan hal tersebut, maka untuk menghilangkan dampak buruk Pb yakni dengan cara meningkatkan ketahanan antioksidan sel melalui suplementasi antioksidan dari luar tubuh. Senyawa aktif dalam Sarang Semut adalah flavonoid, tanin, polifenol, dan tokoferol yang berfungsi sebagai antioksidan primer dalam tubuh. Adanya antioksidan ini memungkinkan Sarang Semut digunakan untuk mengatasi ROS yang diinduksi Pb.

Methods: Penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratoris, dengan desain *separate sample pretest-posttest control group design*. Rancangan yang digunakan adalah rancangan acak lengkap dengan 5 perlakuan dan 7 ulangan. Pengukuran kadar *malondialdehyde* (MDA) dengan metode ELISA (Sevilla *et al.*, 1997). Spermatozoa diambil dari cauda epididimis untuk pemeriksaan integritas membran dengan metode Hipoosmotik Swelling Test (HOST). Analisis data dilakukan dengan *Analisis of Varians* (ANOVA) dan uji lanjut *Duncan's* untuk mengetahui perlakuan mana yang berbeda satu sama lain. Data yang berdistribusi normal dengan varians tidak homogen diuji dengan *Robust test*, dan dilanjutkan dengan *Games-Howell*. Uji korelasi *Pearson's* dilakukan terhadap data kadar MDA epididimis dengan data kadar MDA serum.

Results: Analisis statistik menunjukkan bahwa integritas membran spermatozoa menunjukkan peningkatan yang bermakna (ANOVA, $p < 0,05$), sedangkan kadar MDA epididimis tikus putih antar kelompok menunjukkan tidak ada perbedaan yang bermakna (ANOVA, $p > 0,05$). Kadar MDA serum menunjukkan penurunan yang bermakna (*Robust test*, $p < 0,05$).

Conclusion: Antioksidan Sarang Semut dapat menurunkan kadar *malondialdehyde* (MDA) serum, kadar MDA epididimis dan dapat meningkatkan integritas membran spermatozoa.

Kata kunci : *Plumbum, malondialdehyde, Integritas membran spermatozoa, Myrmecodia pendans*

1. Introduction.

Plumbum (Pb) merupakan salah satu logam berat yang banyak digunakan di industri dan bahan aditif pada bahan bakar kendaraan bermotor. Namun di satu sisi logam berat ini telah menyebabkan pencemaran dan sangat berbahaya bagi kesehatan, termasuk sistem reproduksi (Wang *et al.*, 2006; Hariono, 2005).

Beberapa peneliti mencatat bahwa mekanisme toksisitas Pb pada jaringan testis disebabkan oleh produksi *reactive oxygen species* (ROS) yang berlebihan (Mariola *et al.*, 2004). Spermatozoa sangat rentan terhadap ROS, karena lipid membran plasma spermatozoa memiliki fosfolipid dengan kadar yang tinggi (Sanocka *et al.*, 2004). Oksidasi lipid membran spermatozoa menghasilkan senyawa *malondialdehyde* (MDA) yang bersifat toksik dan menyebabkan penurunan integritas membran spermatozoa.

Selain peningkatan ROS, plumbum menghambat aktivitas enzim antioksidan (Patrick, 2006). Berdasarkan hal tersebut, maka untuk menghilangkan dampak buruk Pb selain dengan pengelat Pb, yakni dengan cara meningkatkan ketahanan antioksidan sel melalui suplementasi antioksidan dari luar tubuh.

Myrmecodia pendans yang dikenal dengan nama Sarang Semut merupakan salah satu tumbuhan obat tradisional Indonesia yang kaya akan metabolit sekunder seperti flavonoid, tokoferol, tannin, phenol yang berfungsi sebagai antioksidan dalam tubuh. Hasil analisis antioksidan dari ekstrak tumbuhan Sarang Semut menunjukkan bahwa ekstrak tersebut memiliki aktivitas antioksidan (Subroto dan Saputro, 2006; Bustanussalam, 2010; Utomo *et al.*, 2012). Atas dasar komposisi senyawa kimianya tersebut, maka sarang semut mempunyai potensi sebagai antioksidan yang dapat dikembangkan sebagai *agent* yang dapat meredam dampak negatif Pb pada spermatozoa.

2. Material and Method

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratoris, dengan desain *separate sample pretest-posttest control group design*. Tahap I 50 ekor tikus dibagi menjadi 2 kelompok, 11 ekor kontrol dan 39 ekor dipapar plumbum asetat 1.000 ppm/200 g BB/hari selama 8 minggu. Setelah 8 minggu 4 ekor dari masing-masing kelompok (kelompok I dan II) akan dikorbankan untuk pemeriksaan awal kadar MDA dan integritas membran spermatozoa. Tikus yang dipapar dengan Pb dibagi secara acak menjadi 5 kelompok: Kelompok III (Pb), V dan IV (Pb + ekstrak Sarang Semut (27 mg dan 54 mg)), kelompok V dan VI (Pb + fraksi etil asetat Sarang Semut (4 mg dan 8 mg) peroral/hari). Setelah 8 minggu semua hewan akan dikorbankan. Pengukuran kadar *malondialdehyde* (MDA) dengan metode ELISA (Sevilla *et al.*, 1997). Spermatozoa diambil dari cauda epididimis untuk pemeriksaan integritas membran dengan metode Hipoosmotik Swelling Test (HOST).

3. Results

Hasil pengukuran kadar MDA serum, MDA epididimis dan hasil pemeriksaan integritas membran spermatozoa ditampilkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Mean dan Standar Deviasi Kadar MDA Serum, Kadar MDA Epididimis, dan Integritas Membran Spermatozoa Tikus Putih pada Kelompok Perlakuan

Kelompok Perlakuan	Mean \pm SD Kadar MDA Serum Tikus Putih (pmol/mL serum)	Mean \pm SD Kadar MDA Epididimis Tikus Putih (nmol/mg)	Mean \pm SD Integritas Membran Spermatozoa Tikus Putih (%)
I. DS (minggu ke-8)	11,475 ^a \pm 2,08387	37,189 ^a \pm 5,79075	73,500 ^b \pm 3,69685
II. DS+Pb (minggu ke-8)	31,725 ^{bc} \pm 16,68140	53,427 ^a \pm 12,76231	60,250 ^a \pm 7,84750
III. DS (minggu ke-16)	21,900 ^{ab} \pm 6,16993	45,026 ^a \pm 10,40019	72,833 ^b \pm 5,03653
IV. DS+Pb (minggu ke-16)	33,333 ^c \pm 13,61935	58,064 ^a \pm 10,78821	57,333 ^a \pm 8,26236
V. DS+Pb+ESS 27 mg/200 g BB	17,866 ^a \pm 6,09973	45,080 ^a \pm 15,62349	71,333 ^b \pm 4,13118
VI. DS+Pb+ESS 54 mg/200 g BB	17,323 ^a \pm 5,74909	49,107 ^a \pm 18,89066	70,166 ^b \pm 6,30608
VII. DS+Pb+FSS 4 mg/200 g BB	18,350 ^a \pm 5,54355	47,472 ^a \pm 7,26493	70,333 ^b \pm 3,61478
VIII. DS+Pb+FSS 8 mg/200 g BB	15,450 ^a \pm 3,94398	43,794 ^a \pm 9,63996	72,666 ^b \pm 4,96655

Superskrip berbeda pada kolom sama menunjukkan perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$);

SD = Standar Deviasi, DS = Diet Standar, ESS = Ekstrak Sarang Semut, FSS = Fraksi Sarang Semut

Analisis statistik menunjukkan bahwa integritas membran spermatozoa menunjukkan peningkatan yang bermakna (ANOVA, $p < 0,05$), sedangkan kadar MDA epididimis tikus putih antar kelompok menunjukkan tidak ada perbedaan yang bermakna (ANOVA, $p > 0,05$). Kadar MDA serum menunjukkan penurunan yang bermakna (*Robust test*, $p < 0,05$).

Ye *et al.* (1999) mengungkapkan bahwa terdapat korelasi positif antara kadar plumbum darah dengan peningkatan kadar MDA plasma pekerja yang terpapar plumbum. Hasil penelitian tersebut sejalan dengan penelitian kami, yang membuktikan bahwa pemberian plumbum asetat 1.000 ppm secara bermakna dapat meningkatkan kadar MDA serum (Tabel 1). Peningkatan kadar MDA adalah salah satu penanda peningkatan peroksidasi lipid dan menunjukkan stres oksidatif yang disebabkan oleh keracunan plumbum.

Hasil penelitian kami juga sejalan dengan penelitian Khaki dan Khaki (2010) yang membuktikan bahwa pemberian plumbum asetat 1% selama 10 minggu terjadi peningkatan yang bermakna kadar MDA plasma. Salawu *et al.*, (2009) juga telah melaporkan bahwa plumbum asetat menyebabkan peningkatan yang sangat bermakna (nilai $p < 0,01$) kadar MDA plasma dan MDA jaringan testis. Sadek (2012) membuktikan pemberian plumbum asetat secara bermakna ($p < 0,05$) meningkatkan kadar MDA di otak, hati dan ginjal kelinci.

Hasil penelitian ini membuktikan bahwa tumbuhan Sarang Semut mampu menurunkan kadar *malondialdehyde* (MDA) serum baik dalam bentuk ekstrak maupun fraksi. Pendekatan yang dapat mendeskripsikan hal tersebut adalah ekstrak dan fraksi tumbuhan Sarang Semut mengandung komponen bahan aktif yang dapat mencegah peroksidasi lipid. Peroksidasi lipid dapat dicegah oleh adanya antioksidan larut lemak seperti tokoferol, atau antioksidan yang dapat mengelat Fe^{2+} atau Cu^{2+} sebagai katalis reaksi redoks (Sadek, 2012). Menurut Middleton *et al.* (2000) peroksidasi lipid dapat dicegah pada tahap inisiasi oleh pemulung radikal dan pada tahap propagasi dapat dicegah oleh pemulung radikal peroksil.

Tumbuhan Sarang Semut mengandung tokoferol. Tokoferol adalah antioksidan intraseluler yang melindungi asam lemak tak jenuh ganda membran sel dari kerusakan oksidatif. Tokoferol (vitamin E) telah terbukti dapat menghambat kerusakan akibat radikal bebas. Tokoferol merupakan antioksidan yang sangat aktif dalam mencegah peroksidasi lipid dengan menangkap lipid peroksil. Tokoferol akan mentransfer atom hidrogen (dengan elektron tunggalnya). Tokoferol tidak hanya mengeruk radikal oksigen dari membran, tetapi

juga memotong radikal peroksidil dan alkoksil yang dihasilkan selama konversi hidroperoksida lipid yang menyulut reaksi berantai peroksidasi. Dengan demikian mencegah propagasi reaksi berantai lipid peroksidasi (Bansal dan Bilaspuri, 2009).

Tumbuhan Sarang Semut juga mengandung fenol dan flavonoid. Flavonoid dapat mengelat ion besi dan membentuk kompleks *inert* yang tidak dapat memulai peroksidasi lipid (Sadek, 2012). Flavonoid juga sebagai *scavenging* radikal bebas. Flavonoid dapat meredam radikal hidroksil (OH*) sebagai inisiator terjadinya reaksi berantai peroksidasi lipid membran sel yang produk akhirnya adalah MDA, sehingga senyawa flavonoid dapat mencegah awal mula terjadinya reaksi berantai peroksidasi lipid membran sel yang dipicu oleh radikal hidroksil (Middleton *et al.*, 2000).

Keberadaan Zn dalam tumbuhan Sarang Semut diduga juga dapat menurunkan kadar MDA, karena Zn dapat menghambat peroksidasi lipid dengan menggusur logam transisi seperti besi dan tembaga dari situs katalitik. Tikus yang diberi diet kekurangan Zn mengalami penurunan potensi antioksidan testis dan peningkatan peroksidasi lipid dalam jaringan. sebaliknya pemberian Zn akan menetralkan stres oksidatif dalam testis yang disebabkan oleh paparan plumbum (Aitken dan Roman, 2008).

Penelitian ini juga membuktikan bahwa spermatozoa yang terpapar plumbum memiliki persentase integritas membran yang rendah. Persentase integritas membran spermatozoa terendah dihasilkan pada kelompok terpapar plumbum dan tidak diberi Sarang Semut pada pengamatan minggu ke-16 (kelompok IV) 57,3%, yang tidak berbeda secara bermakna ($p > 0,05$) dengan persentase integritas membran spermatozoa tikus putih yang terpapar plumbum pada pengamatan minggu ke-8 (kelompok II) 60,25%. Rendahnya persentase integritas membran spermatozoa pada kelompok yang terpapar plumbum berhubungan dengan keberadaan radikal yang sangat reaktif. Plumbum menginduksi terbentuknya ROS (Xu *et al.*, 2008). *Reactive oxygen species* yang dihasilkan sebagai akibat dari paparan plumbum telah diidentifikasi dalam paru, jaringan endotel, testis, sperma, hati, dan saraf (Patrick, 2006; Sharma dan Garu, 2011). Produksi ROS berlebihan dan tidak mampu dinetralisasi oleh sistem pertahanan antioksidan yang ada pada spermatozoa atau plasma semen akan mengarah pada kerusakan oksidatif lipid membran, protein, dan DNA (Zelen *et al.*, 2010).

Membran plasma spermatozoa berada di bawah ancaman kerusakan oksidatif karena mengandung poli asam lemak tak jenuh (PUFA) dalam jumlah besar dan relatif kurangnya enzim antioksidan dalam sitoplasma mereka. Kerusakan oksidatif lipid membran sel spermatozoa akan mengubah komposisi asam lemak membran sel spermatozoa, mengakibatkan meningkatnya permeabilitas membran dan kerusakan membran spermatozoa sehingga menghasilkan integritas membran spermatozoa yang rendah (Sharma dan Garu, 2011). Kerusakan membran spermatozoa yang disebabkan stres oksidatif bertanggung jawab terhadap gangguan struktur dan fungsi membran dan memiliki kontribusi signifikan terhadap infertilitas laki-laki (Ajay *et al.*, 2011).

Hasil penelitian ini juga membuktikan bahwa tumbuhan Sarang Semut baik dalam bentuk ekstrak maupun fraksi etil asetat meningkatkan persentase integritas membran spermatozoa tikus putih yang terpapar plumbum. Kemampuan tumbuhan Sarang Semut meningkatkan integritas membran spermatozoa melalui penurunan kadar MDA serum dan kadar MDA epididimis. Hal ini menunjukkan bahwa tumbuhan Sarang Semut baik dalam

bentuk ekstrak atau fraksi dapat menghambat reaksi berantai peroksidasi lipid yang diinduksi plumbum. Reaksi berantai peroksidasi lipid hanya dapat dihentikan oleh senyawa yang memiliki kemampuan untuk memecahkan reaksi berantai. Pada tahap ini, diduga tokoferol dalam tumbuhan Sarang Semut memperlambat jalannya reaksi peroksidasi lipid karena kemampuannya untuk menangkap radikal bebas, dengan melepaskan ion hidrogen dengan satu elektron. Tokoferol juga dapat memadamkan radikal peroksil dan alkoksil (ROO*). (Bansal dan Bilaspuri, 2009). Yousef *et al.* (2003) menjelaskan tokoferol merupakan komponen utama sistem antioksidan dari spermatozoa dan merupakan salah satu pelindung membran plasma terhadap serangan ROS dan *lipid peroxidation* (LPO).

Kesimpulan: Antioksidan tumbuhan Sarang Semut meningkatkan integritas membran spermatozoa tikus putih yang terpapar plumbum, dan secara signifikan menurunkan kadar *malondialdehyde* (MDA) tikus putih yang terpapar plumbum. Terdapat korelasi antara kadar MDA serum dengan kadar MDA epididimis, semakin rendah kadar MDA serum semakin rendah kadar MDA epididimi.