

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Sistem Reproduksi Jantan

2.1.1 Testis

Organ reproduksi jantan yang dipengaruhi oleh hormon gonadotropin adalah testis. Testis adalah salah satu organ internal pria. Pada testis terdapat tubulus seminiferous, yaitu tempat dua komponen penting dalam spermatogenesis dan steroidogenesis. Dua komponen tersebut adalah sel Leydig dan sel Sertoli. Sel Leydig atau sel-sel interstitial berada pada lumen tubulus seminiferous di testis. Sel ini berfungsi sebagai tempat produksi hormon testosteron. Hormon testosteron adalah hormon steroid seks pada pria yang bertanggung jawab secara langsung dan tidak langsung dalam diferensiasi seks saat masa embrio untuk membentuk organ genitalia eksternal dan internal pria, berperan dalam perkembangan seks sekunder pria saat pubertas, dan untuk mempertahankan libido dan potensi pada pria dewasa. Setiap harinya sel Leydig memproduksi sekitar 4-6 mg testosteron dan sel Sertoli bertanggung jawab pada produksi inhibin B, *anti Mullerian Hormone* (AMH), dan regulasi spermatogenesis (White dan Porterfield, 2013).

Sel Sertoli dan sel Leydig berhubungan secara langsung dan tidak langsung karena setiap sel tersebut memiliki fungsi yang berbeda namun saling berkaitan. Inisiasi dan pertahanan fungsi kedua sel ini dipengaruhi oleh intaknya aksis hipotalamus-hipofisis anterior. Regulasi yang berlangsung dengan koordinasi yang baik melalui aksis ini menghasilkan proses spermatogenesis dan steroidogenesis berjalan dengan baik. Kelainan pada testis, hipofisis anterior, dan hipotalamus, serta

struktur aksesoris lainnya dapat mengakibatkan produksi gamet atau androgen yang abnormal, infertilitas, atau kombinasi keduanya (White dan Porterfield. 2013).

2.1.2 Sel Leydig

Sel Leydig adalah sel yang berbentuk polyhedral dengan ukuran diameter 15 hingga 20 μ m. Sitoplasma dari sel Leydig merupakan tempat berlangsungnya steroidogenesis. Pada testis, sel Leydig terletak di ruang antara tubulus seminiferus satu dengan tubulus seminiferus yang lainnya. Sel Leydig merupakan sel yang sangat peka terhadap senyawa kimia toksik dan radikal bebas. Sel Leydig berfungsi memproduksi hormon testosteron ditemukan oleh Franz Leydig pada tahun 1850. Sel Leydig ditemukan di bagian intersisial testis, beberapa sel melekat dekat dengan pembuluh kapiler, dan ada yang melekat pada *peritubular myofibrocytes*. Sel-sel seperti makrofag, sel master, fibroblast, saraf, dan sel-sel endothelium juga ditemukan di ruang intersisial. Sel Leydig dikelilingi oleh fibroblast, makrofag, dan jaringan pengikat. Sel Leydig memiliki nukleus tunggal yang berbentuk bulat, dengan dua nucleolus yang terletak eksentrik dan sitoplasma yang eosinofilik, kaya retikulum endoplasma halus dan mitokondria dengan *tubular cristae*, kristal Rinke, *lipid droplets*, dan pigmen *lipofuscin* terdapat pada sitoplasma sel. Fungsi kristal Rinke belum diketahui secara pasti dan hanya terdapat pada pria setelah pubertas (Wulandari, 2018).

Sel-sel Leydig letaknya berkelompok memadat pada daerah segitiga yang terbentuk oleh susunan-susunan tubulus seminiferus. Sel-sel tersebut besar dengan sitoplasma sering bervakuol pada pengamatan mikroskop cahaya. Inti selnya mengandung butir-butir kromatin kasar, anak inti jelas, dan umumnya dijumpai sel yang memiliki dua inti. Sitoplasma sel kaya dengan benda-benda kristaloid

berbentuk batang. Celah di antara tubulus seminiferus dalam testis diisi kumpulan jaringan ikat, saraf, pembuluh darah, dan limfe (Petersen *et al.*, 2015). Tahapan perkembangan sel Leydig pada manusia berawal dari *Leydig stem cells*, *progenitor Leydig cells*, *immature Leydig cells*, dan *adult Leydig cells*. *Fetal Leydig cells* (FLC) merupakan sel Leydig pada masa janin dengan jumlah mencapai 200.000 sel pada masing-masing testis. Testosteron yang dihasilkan FLC dibutuhkan untuk diferensiasi sistem urogenital pria. Intersisium testis pada masa awal postnatal ditemukan *spindle-shaped undifferentiated cells* yang berbentuk “*mesenchymal-like*”. *Mesenchymal-like cells* berproliferasi secara aktif hari 14-28 dan mengekspresikan marker sel Leydig seperti 3β -HSD dan reseptor *Luteinizing Hormone* (LH) (Teerds and Huhtaniemi, 2015).

Immature Leydig cells adalah sel progenitor Leydig yang berubah bentuk dari *spindle-shaped* menjadi bulat, diikuti dengan retikulum endosplasma halus (tempat untuk terjadinya steroidogenesis) yang jumlahnya meningkat, dan terjadi pada usia 28 hari. *Adult Leydig cells* (ALC) adalah populasi sel Leydig yang meningkat dua kali lipat dari hari 28-56 sampai mencapai 25 juta sel pada tiap testis. Produksi testosteron mencapai puncak pada usia 90 hari. ALC bisa melakukan regenerasi bila rusak dan butuh waktu 7 minggu untuk regenerasi sempurna pada percobaan dengan pemberian *ethanedimethane sulfonate* (EDS) (Harlis dan Septiana, 2017). Diferensiasi sel Leydig pada postnatal tikus dimulai sekitar minggu kedua setelah kelahiran, yaitu hari ke-10. Perkembangannya terdiri dari beberapa tahap yaitu proliferasi sel-sel precursor, diferensiasi sel-sel precursor menjadi sel-sel progenitor, diferensiasi sel-sel progenitor menjadi bentukan baru (*newly formed*) sel Leydig, kemudian berkembang menjadi sel Leydig muda dan terakhir menjadi

sel Leydig dewasa. Jumlah sel Leydig sebelum dan pada masa pubertas bertambah oleh dua mekanisme, yakni diferensiasi dari sel-sel mesenkim (*precursor*) dan pembelahan mitosis dari bentukan baru sel Leydig (Elnaga *et al.*, 2018).

2.1.3 Sel Sertoli

Sel Sertoli adalah sel piramid memanjang yang dikelilingi oleh sel-sel spermatogenik. Sel Sertoli berbentuk panjang, berdasar luas, melekat pada membrane basal, berfungsi sebagai perawat sel-sel spermatozoa yang baru saja terbentuk. Jumlah sel Sertoli akan meningkat seiring dengan peningkatan jumlah sel-sel spermatogenik. Hal ini berkaitan dengan fungsi sel Sertoli terhadap sel-sel spermatogenik (Liu *et al.*, 2017). Sel Sertoli memiliki empat fungsi utama, yaitu:

1. Sel Sertoli berperan dalam menunjang, melindungi, dan mengatur nutrisi spermatozoa yang berkembang, mengatur pertukaran bahan makanan, metabolit, dan sawar, serta melindungi sel sperma dari serangan imunologis.
2. Sel Sertoli merombang dan memfagositosis keeping sitoplasma yang berlebihan dan melepaskannya sebagai residu.
3. Sel Sertoli mensekresi suatu cairan untuk perpindahan spermatozoa ke dalam tubulus seminiferus secara terus menerus.
4. Sel Sertoli memproduksi hormon anti-*Mullerian* yang bekerja selama masa embrional untuk memudahkan regresi saluran *Muller* pada fetus jantan.

2.2 *Reactive Oxygen Species (ROS)*

Radikal bebas adalah suatu atom yang memiliki satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan pada orbital paling luar, sehingga bersifat sangat reaktif dan mampu bereaksi dengan protein, lipid, karbohidrat, bahkan hingga tahap *deoxyribo*

nucleic acid (DNA), sehingga reaksi antara radikal bebas dan molekul berakibat pada timbulnya suatu penyakit atau gangguan organ. Radikal bebas merupakan keadaan tidak stabilnya jumlah elektron sel, sehingga mengganggu keseimbangan elektron lainnya dan berlangsung secara berantai. *Reactive oxygen species* (ROS) memiliki sifat perusak dari radikal bebas. Beberapa contoh ROS seperti superoxide anion ($O_2^{\bullet-}$), hydrogen peroksida (H_2O_2), dan hidroksil radikal (HO^{\bullet}), keseluruhannya tersebut mengandung oksigen spesies radikal dan non-radikal yang terbentuk oleh karena reduksi sebagian oksigen. Produksi ROS dalam tingkat seluler secara endogen adalah hasil dari proses fosforilasi oksidatif dalam mitokondria, atau secara eksogen senyawa tersebut dihasilkan dari hasil interaksi antara faktor eksogen dengan komponen xenobiotik (Gabrielsen dan Tanrikut, 2016).

Kondisi elektron pada radikal bebas tidak semuanya berpasangan karena elektronnya sebagian ada yang ganjil. Suatu radikal bebas menjadi zat yang sangat reaktif dan berenergi tinggi yang menimbulkan suatu kondisi radikal. Elektron yang tidak berpasangan menyebabkan instabilitas dan sangat reaktif. Bertambah atau hilangnya satu elektron pada molekul lain dapat menyebabkan radikal bebas baru dan terjadi perubahan secara fisik dan kimiawi (Sedes *et al.*, 2018). Radikal bebas sebagai produk sampingan hasil dari pembentukan energi selama proses metabolisme tubuh. Proses oksidasi lemak, karbohidrat, dan protein menghasilkan energi berupa *adenosine triphosphate* (ATP), serta diperoleh anion superoksida dan hidroksil radikal yang dikenal sebagai radikal bebas. Selain dihasilkan oleh proses metabolisme tubuh, radikal bebas juga terbentuk akibat aktivitas tubuh melawan polusi lingkungan seperti kendaraan bermotor, rokok, dan sinar ultraviolet yang

juga mampu merubah elektron dalam atom menjadi bersifat radikal (Zheng *et al.*, 2016).

Sifat radikal bebas memiliki kecenderungan untuk menstabilkan muatannya dengan cara mengionisasi elektron senyawa lain dan membentuk senyawa radikal bebas baru sehingga terbentuk reaksi berantai pembentukan radikal bebas. Reaksi berantai radikal bebas dapat merusak beberapa komponen penting dalam tubuh, yaitu merusak membran sel, terutama asam lemak tak jenuh/ *polyunsaturated fatty acid* (PUFA) yang dapat merusak bagian dari fosfolipid dan protein di dalam sel, dapat merusak protein, DNA, dan peroksidasi lipid (Sengupta dan Banerjee, 2014). Secara umum keberadaan radikal bebas diperlukan dalam kelangsungan beberapa proses fisiologis tubuh, terutama pada rantai respirasi. Radikal bebas dalam kadar normal dibutuhkan untuk perkembangan sel dan berperan pada sistem imun. Ketidakseimbangan antara oksidan dan antioksidan menimbulkan *oxidative stress*/ stress oksidatif yang dapat mengganggu aktivitas sistem imun. Secara alami, dalam tubuh telah memiliki mekanisme pertahanan terhadap radikal bebas, yaitu antioksidan endogen yang terdiri atas enzim-enzim yang disintesis dalam tubuh seperti *Superoxide dismutase* (SOD), *catalase*, dan *glutathione peroxidase* (Parekattil dan Agarwal, 2012).

Kelompok radikal bebas yang telah diketahui sebagai ROS, yaitu molekul yang memiliki molekul oksigen dan bersifat sangat reaktif. Sejumlah 85-90% oksigen yang dimetabolisme di dalam sel terjadi di mitokondria. Hal ini menyebabkan mitokondria menjadi sumber utama penghasil ROS endogen. Spesies oksigen reaktif/ ROS adalah produk hasil metabolisme oksigen, sebagai spesies

kimiawi dengan elektron tidak berpasangan yang berasal dari molekul oksigen (Sengupta dan Banerjee, 2014).

Molekul oksigen bersifat bi-radikal karena mengandung dua (2) elektron tidak berpasangan di luar membran, juga dikenal sebagai *triplet state*. Pada kedua elektron tersebut memiliki jenis spin yang sama, sehingga oksigen hanya dapat bereaksi dengan satu elektron pada suatu waktu dan tidak reaktif pada molekul kimia yang memiliki dua elektron. Kondisi ketika salah satu elektronnya melepaskan diri dan merubah spin, maka molekul oksigen menjadi berubah bentuk menjadi *singlet oxygen* dan menjadi oksidan yang kuat, mampu bereaksi dengan pasangan elektron lain terutama yang memiliki ikatan ganda. Peningkatan produksi ROS dalam mitokondria saat adanya stres akan memicu modifikasi non-spesifik dari lipid, protein, dan asam nukleat, sehingga terjadi disfungsi bioenergi. Unsur membran mitokondria sangat rentan terhadap kerusakan akibat ROS. Komponen fosfolipid pada membran mitokondria sangat kaya akan asam lemak yang tidak jenuh (*unsaturated fatty acids*). Kondisi ini potensial untuk terdampak oleh ROS, karena adanya ikatan ganda tersebut, sehingga berlanjut pada peroksidasi melalui rantai reaksi oksidatif. Konsentrasi ROS dalam tubuh juga dibutuhkan untuk mengatur sinyal seluler, peningkatan ROS yang tidak teratur dan konsentrasi *reactive nitrogen species* (RNS), dan memicu jalur intrinsik apoptosis sel (Slimen *et al.*, 2014).

Sel-sel germinal di dalam testis mengalami proses kompleks proliferasi serta maturasi, dari spermatogonia diploid melalui meiosis menjadi spermatozoa haploid matur yang sangat bergantung pada metabolisme oksigen (Guerriero *et al.*, 2014). Sel yang teroksidasi di testis menjadi sumber ROS bagi organ testis itu sendiri,

sehingga menyebabkan peningkatan stres oksidatif. Jika stres oksidatif berlebih, maka komunikasi antar sel pada testis seperti sel Sertoli, sel Leydig, dan sel spermatogenik lainnya dapat mengalami kerusakan. Kerusakan oksidatif terjadi pada banyak jenis molekul seperti lipid, protein, asam nukleat, dan gula. Setiap sel, nukleus, dan membran mitokondria, struktural dan protein sitoplasma, karbohidrat kompleks, *ribonucleic acid* (RNA) dan DNA, seluruhnya berpotensi terjadi stres oksidatif. Jaringan seperti testis dengan tingkat metabolisme dan replikasi sel yang tinggi sehingga mudah terjadi stres oksidatif. Stres oksidatif akibat peningkatan ROS dapat mengakibatkan kerusakan sel, jaringan, hingga organ. Hal ini mengakibatkan terganggunya proses pembentukan sperma di tubulus seminiferus karena rusaknya sel-sel yang berperan dalam spermatogenesis, sehingga jumlah sel spermatogenik menurun dan pada akhirnya menimbulkan infertilitas faktor pria (Darbandi *et al.*, 2018).

2.3 Antioksidan

Antioksidan adalah senyawa yang bisa menghilangkan, membersihkan, dan menahan pembentukan efek ROS. Antioksidan sebagai senyawa yang mampu menghambat proses autooksidasi pada semua bahan yang mengandung lipid. Proses antioksidan menghambat pembentukan radikal bebas dengan bertindak sebagai donor H terhadap radikal bebas berubah menjadi bentuk yang lebih stabil (Sihombing *et al.*, 2015). Antioksidan berdasarkan sumbernya diklasifikasikan dalam dua kelompok, yaitu antioksidan endogen dan antioksidan eksogen. Antioksidan endogen merupakan antioksidan secara alami berada dalam sel tubuh, yaitu SOD, *catalase* (CAT), dan *glutathione peroxidase* (GPx). Antioksidan

eksogen adalah antioksidan yang berasal dari luar tubuh, dapat berasal dari makanan sehari-hari yang mengandung vitamin (vitamin C, vitamin E beta-karoten) dan senyawa fitokimia (karotenoid, isoflavon, saponin, flavonoid, polifenol). Antioksidan eksogen juga terdiri dari dua kelompok besar, yaitu kelompok antioksidan alami yang diperoleh dari bahan alami dan antioksidan sintetis yang diperoleh dari bahan hasil sintesis kimia (Xu *et al.*, 2017).

Berikutnya bila dilihat dari mekanisme kerjanya dalam menekan radikal bebas, antioksidan dibedakan menjadi tiga kelompok. Antioksidan primer seperti SOD, CAT, dan GPx. Antioksidan primer disebut juga antioksidan enzimatis. Suatu senyawa dikatakan sebagai antioksidan primer bila dapat mendonorkan atom hydrogen secara cepat kepada senyawa radikal, kemudian senyawa radikal yang terbentuk segera berubah menjadi senyawa yang lebih stabil. Aktivitas antioksidan primer bekerja dengan mengubah radikal bebas yang telah terbentuk menjadi molekul reaktif. Sebutan *chain-breaking-antioxidant* adalah istilah yang diberikan untuk kelompok antioksidan primer (Mustafa, 2015). Antioksidan sekunder atau disebut juga antioksidan nonenzimatis. Antioksidan ini juga disebut sebagai antioksidan sistem preventif. Sistem pertahanan tersebut adalah dihambatnya pembentukan senyawa oksigen reaktif dengan cara penangkapan oksigen dan mengubah hidroperoksida menjadi spesies non radikal. Antioksidan nonenzimatis dapat berupa nonnutrisi dan komponen nutrisi dari sayuran dan buah-buahan, termasuk senyawa metabolit sekunder. Kerja sistem antioksidan ini yaitu dengan memotong reaksi oksidasi berantai dari radikal bebas. Hal ini mengakibatkan radikal bebas tidak akan bereaksi dengan komponen seluler. Mekanisme kerja antioksidan tersier adalah meliputi sistem enzim DNA-*repair* dan

metionin sulfoksida reduktase (Msr). Enzim-enzim tersebut berfungsi dalam perbaikan biomolekuler yang rusak akibat reaktivitas radikal bebas (Krishnamoorthy *et al.*, 2013).

2.4 Timbal

2.4.1 Definisi timbal

Timbal atau juga dikenal sebagai timah hitam / *plumbum* (Pb) merupakan logam berat yang berada di lingkungan. Nomor atom 82, berat atom 207,19 dan berat jenis 11,34, bersifat lunak dan lentur, sangat rapuh dan mengkerut pada pendinginan, sulit larut dalam air dingin, air panas, dan air asam, berwarna biru keabu-abuan, titik leleh 327,5°C dan titik didih 1740°C, menguap pada suhu 550-600°C, dan bergabung dengan oksigen di udara membentuk timbal oksida. Timbal dapat larut dalam asam nitrit, asam asetat, dan asam sulfat pekat (Wulandari, 2018). Timbal (lebih dari 95%) merupakan senyawa anorganik dan umumnya dalam bentuk garam timbal anorganik, dan selebihnya berbentuk timbal organik. Sejumlah besar senyawa Pb anorganik ada dalam bentuk Pb asetat, Pb *emtimonate*, Pb azida, Pb bromit, Pb nitrat, dan bentuk senyawa lainnya (Ettinger *et al.*, 2019).

2.4.2 Sumber timbal

Sumber timbal secara alami dapat ditemukan di alam, yaitu dalam bebatuan sekitar 13 mg/kg, di tanah sekitar 5-25 mg/kg, di air bawah tanah berkisar 1-60 µg/liter, di air telaga dan air sungai sekitar 1-10 µg/liter, dan di udara sekitar 0,0001-0,001 µg/liter. Timbal bersifat korosif sehingga digunakan secara luas dalam berbagai industri seperti industri pengecoran, pemurnian, industri baterai, industri bahan bakar, industri kabel, dan industri kimia. Sumber timbal yang sehari-hari

adalah pada bahan bakar terutama bensin. Hasil pembakaran dari bahan tambahan (*aditive*) timbal pada kendaraan bermotor menghasilkan emisi timbal nonorganik. Logam berat seperti timbal bercampur dengan bahan bakar tersebut akan bercampur dengan oli dan melalui proses di dalam mesin, maka timbal akan keluar dari knalpot bersama dengan gas buang lainnya (Wulandari, 2018).

Timbal masuk ke dalam tubuh manusia dengan beberapa cara yaitu inhalasi, pemaparan kulit, serta makanan dan minuman. Ukuran partikel yang sangat kecil memungkinkan timbal secara tidak sengaja terhirup dan masuk sampai ke paru-paru. Timbal dalam bentuk gas akan masuk ke dalam tubuh dan terikat dalam darah. Sekitar 90% partikel timbal dalam asap atau debu halus di udara dihisap melalui saluran pernafasan. Udara yang mengandung timbal akan memapari manusia, hewan, dan tanaman (Gidlow, 2015). Masuknya timbal melalui pemaparan kulit dari perembesan pada selaput kulit. Penggunaan timbal di bidang industri yang semakin meningkat, utamanya di bidang industri cat rambut, kain katun, insektisida, amunisi, dan kosmetik menyebabkan risiko kontak antara timbal dengan manusia semakin meningkat. Kontaminasi timbal pada sumber air juga dapat masuk ke dalam organisme di perairan tersebut. Air tersebut jika dikonsumsi akan masuk ke dalam tubuh manusia dan jika digunakan untuk menyirani tanaman akan menimbulkan risiko masuknya timbal ke dalam tanaman. Tanaman tersebut jika dikonsumsi akan menyebabkan masuknya timbal ke dalam tubuh (Sachdeva *et al.*, 2018).

Batas timbal menurut *World Health Organization* (WHO) di dalam air sebesar 0,1 mg/L. Jenis makanan yang dikonsumsi manusia juga sangat mungkin mengandung timbal secara alami, sehingga sangat penting dalam memperhatikan

menu makanan yang dikonsumsi setiap hari. Setiap 100 mg timbal yang masuk ke dalam tubuh manusia melalui mulut akan menghasilkan timbal darah sebesar 6-10 µg/100 liter darah. Hewan yang makan tanaman (tercemar timbal) mengakibatkan hewan tersebut semakin terpapar timbal dan jika dikonsumsi oleh manusia dapat menimbulkan akumulasi timbal dalam tubuh (Wani *et al.*, 2015).

Penelitian terbaru di Indonesia kontaminasi timbal bahkan berada sangat dekat, yaitu pada cat yang digunakan untuk rumah maupun bangunan sekolah. Pengukuran menggunakan *portable x-ray Fluorescence* (pXRF) menunjukkan bahwa 2.7% dari debu yang tertempel pada 1574 permukaan cat dalam mg/cm² adalah terkontaminasi timbal. Pengukuran pXRF juga menemukan 11% rumah dan 26% bangunan sekolah taman kanak-kanak dengan cat yang terkontaminasi timbal (Ericson *et al.*, 2019).

2.4.3 Metabolisme timbal

1. Absorpsi

Absorpsi timbal dapat melalui saluran pernafasan, saluran cerna dan melalui kulit. Absorpsi timbal melalui saluran pernafasan dipengaruhi oleh tiga proses, yaitu deposisi, pembersihan mukosiliar, dan pembersihan alveolar. Deposisi terjadi di nasofaring, saluran trakeobronkial, dan alveolus. Deposisi tergantung pada ukuran partikel timbal, volume pernafasan dan daya larut. Partikel yang lebih besar banyak dideposit pada saluran pernafasan bagian atas dibanding partikel yang lebih kecil. Pembersihan mukosiliar membawa partikel dari saluran pernafasan bagian atas ke nasofaring kemudian tertelan. Rata-rata 10-30% timbal yang terhirup diabsorpsi melalui paru-paru. Timbal yang diabsorpsi melalui saluran pernafasan masuk ke aliran darah sebanyak 30-40%. Timbal yang masuk ke aliran darah

bergantung pada ukuran partikel, daya larut, dan variasi faal antar individu (Boskabady *et al.*, 2018).

2. Distribusi

Timbal yang telah diabsorpsi kemudia diangkut oleh darah ke jaringan seperti otak, paru-paru, hati, limpa, dan sumsum tulang, serta selanjutnya mengalami retribusi dan disimpan dalam tulang. Sekitar 95% timbal dalam darah diikat oleh eritrosit dengan waktu paruh 25-40 hari, pada jaringan lunak waktu paruh timbal 40 hari, sedangkan pada tulang memiliki waktu paruh selama 28 tahun (Wulandari, 2018).

3. Ekskresi

Proses ekskresi timbal adalah melalui kemih (75-80%) dan feses (15%). Keseimbangan absorpsi dan ekskresi oleh mekanisme tubuh yaitu jumlah timbal yang diekskresikan dalam kemih, feses, empedu, keringat, rambut, dan kuku sama dengan timbal yang diabsorpsi. Ekskresi timbal melalui saluran cerna dipengaruhi saluran aktif dan pasif kelenjar saliva, pancreas, dan kelenjar lainnya di dinding usus, regenerasi sel epitel, dan ekskresi empedu. Proses ekskresi timbal adalah melalui filtrasi glomerulus ginjal. Timbal disimpan di aorta, hati, ginjal, otak, dan kulit, sehingga sangat berbahaya bagi kesehatan (Nkechi *et al.*, 2015).

2.4.4 Timbal asetat

Timbal asetat merupakan timbal dengan golongan organik yang memiliki bentuk kristal, granul atau serbuk, berwarna putih, abu-abu atau coklat, sedikit berbau asam asetat, dengan titik leleh 327,4°C, titik didih 1740 °C, kelarutan dalam air 1600 ml, kelarutan dalam air panas 0,5 ml, kelarutan dalam alkohol 30 ml, cepat larut dalam gliserol, pH dalam larutan aqua 5% pada 25 °C sama dengan 5,5-6,5,

dan rumus molekul $Pb(C_2H_3O_2)_2 \cdot 3H_2O$, serta kerapatan spesifik 2,55 (Wulandari, 2018). Reaktivitas timbal asetat adalah stabil pada temperatur dan tekanan normal, sangat mudah menyerap karbonmonoksida dari udara. Kondisi yang harus dihindari adalah suhu tinggi atau panas, nyala api, sumber api/ panas, dan bahan-bahan yang tak tercampurkan. Bahan yang tak tercampurkan adalah bromat, fenol, kloral hidrat, sulfida, hidrogen peroksida, resorsinol, asam salisilat, sulfit, infuse sayuran, alkali, tannin, fosfat, sitrat, klorida, karbonat, tartar, dan asam-asam. Bahaya bila terjadi dekomposisi produk adalah uap beracun dari timah atau timah oksida bisa terlepas jika terjadi dekomposisi oleh panas. Proses polimerisasi tidak terjadi pada timbal asetat. Penyimpanan timbal asetat dalam wadah tertutup rapat, di tempat yang sejuk dan kering dengan ventilasi yang baik, serta meletakkan di tempat yang jauh dari bahan-bahan mudah terbakar dan dalam kondisi atmosfer netral (Sikernas, 2012).

2.4.5 Mekanisme toksisitas timbal terhadap sel Leydig dan sel Sertoli

Dampak timbal (Pb) merusak berbagai organ tubuh manusia, terutama sistem saraf, sistem pembentukan darah, ginjal, sistem jantung, dan sistem reproduksi. Timbal juga dapat menyebabkan tekanan darah tinggi dan anemia. Dampak negatif dari bahaya timah hitam adalah bahwa pencemaran timah hitam dalam udara menurut penelitian merupakan penyebab potensial terhadap peningkatan akumulasi kandungan timah hitam dalam darah. Akumulasi timah hitam dalam darah yang relatif tinggi akan menyebabkan sindroma saluran pencernaan, kesadaran, anemia, kerusakan ginjal, hipertensi, *neuromuskular*, dan konsekuensi *pathophysiological* serta kerusakan saraf pusat dan perubahan tingkah laku. Kadar timbal dalam jaringan otak tidak sama dengan kadar timbal dalam jaringan paru ataupun dalam jaringan lain. Timbal yang tertinggal di dalam tubuh, baik dari udara maupun

melalui makanan/minuman akan mengumpul terutama di dalam skeleton (90-95%). Karena menganalisis Pb di dalam tulang cukup sulit, maka kandungan Pb di dalam tubuh ditetapkan dengan menganalisis konsentrasi Pb di dalam darah atau urin. Konsentrasi Pb di dalam darah merupakan indikator yang lebih baik dibandingkan dengan konsentrasi Pb di dalam urin (Ardillah, 2016).

Toksisitas timbal dipengaruhi oleh faktor lingkungan (dosis, paparan, kelangsungan paparan, jalur paparan) dan faktor manusia (usia tua lebih rentan terhadap timbal, jenis kelamin, dan lama paparan). Kontaminasi timbal meningkatkan kadar *aminolevulinic acid dehidratase* (ALAD) dalam darah dan urin, meningkatkan kadar *protoporphine* dalam sel darah merah, memperpendek umur sel darah merah, menurunkan jumlah dan kadar sel darah merah yang masih muda, dan meningkatkan kandungan Fe dalam plasma. Kandungan timbal dalam darah sebanyak 100 mikrogram/l dianggap sebagai tingkat aktif (*level action*) yang berdampak pada gangguan perkembangan dan penyimpangan perilaku. Kandungan timbal 450 mikrogram/l membutuhkan perawatan segera dalam waktu 48 jam. Kandungan timbal lebih dari 700 mikrogram/l mengakibatkan kondisi gawat secara medis. Bila kandungan timbal mencapai di atas 1.200 mikrogram/l bersifat sangat toksik dan dapat menimbulkan kematian pada anak. Kadar timbal 68 mikrogram/l dapat menyebabkan anak semakin agresif, kurang konsentrasi, hingga kanker (Wulandari, 2018).

Paparan timbal menimbulkan toksisitas yang bersifat kronis dan akut. Pengaruh timbal pada testis terjadi melalui dua mekanisme yakni pembentukan ROS (hiperperoksida, oksigen anget, dan hydrogen peroksida) dan penurunan cadangan antioksidan tubuh. Produksi ROS yang berlebih menyebabkan cadangan

antioksidan dalam tubuh mengalami penurunan. Mekanisme timbal menginduksi stres oksidatif yaitu dengan cara langsung mempengaruhi membran sel, adanya interaksi timbal dan hemoglobin, *aminolevulinic acid* (ALA) menginduksi pembentukan ROS, timbal mempengaruhi pertahanan antioksidan sel, dan terjadinya peroksidasi lipid (Nkechi *et al.*, 2015). Kondisi timbal yang secara langsung membran sel, yaitu ketika sel darah merah mengikat 99% timbal dalam darah, maka terjadi destabilitas membran sel, menimbulkan fluiditas membran, dan meningkatkan kecepatan hemolisis. Timbal sebagai agen hemolitik menyebabkan penghancuran eritrosit melalui pembentukan peroksida lipid dalam membran sel. Timbal juga berikatan kuat dengan *phosphatidilkholin* membran sel secara *in vitro*, sehingga menyebabkan menurunnya kadar *phosphatidilkholin* membran sel (Mulyadi dkk., 2015).

Interaksi timbal dengan hemoglobin menjadi sumber pembentukan radikal bebas superoksida pada eritrosit karena adanya logam berat pada oksihemoglobin. Timbal juga memperbesar autooksidasi hemoglobin pada liposom. Induksi pembentukan ROS akibat paparan timbal juga diakibatkan oleh ALA. Penghambatan terhadap *delta aminolevulinic acid dehidratase* (DALAD), enzim utama dalam biosintesis heme, menyebabkan peninggian kadar substrat ALA baik dalam darah ataupun urin individu yang terpapar. Peningkatan kadar ALA menyebabkan pembentukan hidrogen peroksida, radikal superoksida, dan juga interaksi keduanya menghasilkan radikal hidroksil, yaitu suatu radikal bebas yang paling reaktif. Senyawa ALA yang teroksidasi akan menjadi asam 4,5-dioxoalerat, suatu senyawa yang berpotensi genotoksik dan memungkinkan Pb sebagai karsinogenik (Mulyadi dkk., 2015). Senyawa ALA mengalami enolisasi dan

auooksidasi pada pH 7-8. Enol ALA atau ALA yang terenolisasi menjadi donor elektron dari oksihemoglobin ke oksigen. Adanya H_2O_2 dan O_2^- yang terbentuk berinteraksi membentuk radikal HO yang sangat reaktif. Selain oksihemoglobin, methemoglobin, dan logam besi atau kompleks besi juga dapat memicu oksidasi ALA (Clay *et al.*, 2018).

Pengaruh timbal pada pertahanan antioksidan sel yakni karena timbal menyebabkan perubahan pada enzim antioksidan seperti SOD, CAT, GPx, dan *glutathione* (GSH). Timbal pada dosis rendah mampu meningkatkan kadar enzim-enzim antioksidan dalam darah, baik SOD, CAT, dan GPx, namun pemaparan pada dosis lebih tinggi (lebih dari 40 $\mu\text{g/dL}$ darah) dan jangka waktu lama ternyata dapat menekan enzim-enzim tersebut (Wulandari, 2018). Timbal memiliki afinitas tinggi terhadap gugus sulfhidril (SH). Beberapa enzim dihambat oleh timbal khususnya enzim dengan gugus fungsional SH seperti DALAD dan *glucose 6-phosphat dehydrogenase* (G6PD). G6PD adalah enzim yang berperan untuk menyediakan *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate* (NADPH) di luar mitokondria. Molekul pereduksi NADPH ini penting dalam menjaga tersedianya GSH yang dibentuk kembali dari *glutation teroksidasi* (GSSG) oleh enzim *glutation reduktase* (GR) (Wulandari, 2018). GSH memiliki gugus SH yang berpotensi reduktif, sehingga molekul ini menjadi pelindung sel dari stres oksidatif. Peran GSH sebagai molekul antioksidan dapat secara non-enzimatik atau enzimatik sebagai ko-faktor/ko-enzim dalam detoksifikasi ROS. Pb yang berikatan dengan gugus SH dari GSH akan menyebabkan kadar GSH menurun dan mempengaruhi aktivitas antioksidannya. Enzim GR membantu sistem pertahanan antioksidan secara langsung. Enzim ini memiliki disulfida pada tempat katalitiknya yang merupakan

target Pb, sehingga Pb yang terikat pada enzim ini menghambat kerja enzim (Clay *et al.*, 2018).

Enzim yang berperan sebagai antioksidan, GPx, CAT, dan SOD merupakan metalprotein yang mendetoksifikasi secara enzimatik berbagai peroksida seperti H₂O₂ dan O₂⁻. Enzim tersebut bergantung pada berbagai mikromineral untuk struktur molekulnya ataupun fungsi enzimatiknya, sehingga potensial menjadi target dari efek timbal. Timbal diketahui sebagai antagonis selenium (Se), menurunkan pengambilan Se oleh jaringan dan berakibat menurunkan aktifitas GPx yang memerlukan Se sebagai ko-faktornya. Paparan timbal menurunkan absorpsi besi di saluran cerna dan menghambat biosintesis heme, menyebabkan hemoglobin darah tidak terbentuk dan menurunkan aktifitas katalase yang memerlukan heme sebagai gugus prostetiknya. SOD adalah enzim yang memerlukan Cu dan Zn untuk aktifitasnya. Pada hewan terdapat korelasi yang tinggi antara penurunan SOD dengan penurunan kadar Cu darah. Bila kadar Pb darah meninggi, namun kadar Cu darah normal, maka tidak ada efek pada SOD. Pengamatan tersebut mengesankan bahwa adanya penghambatan oleh Pb terhadap aktifitas SOD secara tidak langsung adalah melalui penurunan kadar Cu darah (Boskabady *et al.*, 2018).

Peroksidasi lipid adalah mekanisme dari trauma sel, baik pada tumbuhan maupun hewan, sehingga peroksidasi lipid digunakan sebagai indikator dari stres oksidatif pada sel dan jaringan. Endoperoksida lipid yang berasal dari asam lemak tak jenuh ganda, sifatnya tidak stabil, dan terurai membentuk beberapa senyawa kompleks, termasuk senyawa karbonil reaktif, terutama *malondialdehyde* (MDA). Lipid membran sel mengandung asam lemak tak jenuh yang hidrofob. Tahap awal peroksidasi pada asam-asam lemak tak jenuh ganda yang terdapat pada membran

disebut *first chain initiation*. Tahapan ini menunjukkan serangan molekul-molekul yang reaktif terhadap atom hydrogen, sehingga terlepas dari gugus metilen asam-asam lemak tak jenuh (Mathur *et al.*, 2011). Ikatan rangkap pada asam lemak melemahkan ikatan C-H pada atom carbon yang ada pada ikatan rangkap dan menyebabkan atom H dapat dilepaskan dengan mudah. Asam-asam lemak tanpa ikatan rangkap dengan 1 atau 2 ikatan rangkap akan lebih tahan terhadap serangan oksidatif daripada asam-asam lemak tak jenuh ganda. Pb meningkatkan peroksidasi lipid berkaitan dengan jumlah ikatan rangkap asam-asam lemak membran sel (Wulandari, 2018).

Paparan Pb terutama berpengaruh terhadap testis, kemudian berpengaruh kepada menekan aksis hipotalamus-hipofisa-testis, sehingga mengakibatkan histologi testis, terutama sel Leydig dan sel Sertoli yang berperan pada proses spermatogenesis (Sharma dan Garu, 2011). Toksisitas reproduksi timbal berkaitan dengan kelebihan produksi ROS. ROS menghambat produksi antioksidan sulfhidril, menghambat reaksi enzim, merusak asam nukleat dan menghambat perbaikan DNA, serta menyebabkan peroksidasi lipid dalam membran seluler. Timbal menginduksi stres oksidatif dan memicu pembentukan hidrogen peroksida. Peningkatan kadar ROS dalam jaringan disebut sebagai kontributor utama yang menimbulkan gangguan akibat paparan timbal. Sebuah studi epidemiologi dari sistem reproduksi pria telah menunjukkan korelasi positif antara timbal plasma seminalis dan level ROS spermatozoa (Isradji, 2011). Paparan timbal yang berkepanjangan, peningkatan aktivitas superoksida dismutase menunjukkan bahwa terjadi mekanisme adaptif terhadap peningkatan jumlah produksi ROS yang disebabkan oleh timbal. Hal ini dapat menyebabkan sel oksidatif pada kerusakan

jaringan reproduksi yang terkait erat dengan produksi ROS. Sebagai contoh, studi pada tikus yang terpajan timbal telah menunjukkan bahwa timbal mempengaruhi fungsi sperma, menurunkan kadar testosteron serum dan menghasilkan onset awal kapasitas dengan mengaktifkan jalur generasi ROS. Bukti tambahan di mana tikus secara kronis terpapar timbal juga menunjukkan adanya peningkatan konsentrasi lipid peroksida dalam organ reproduksi. Hasil studi menemukan bahwa ROS yang diinduksi timbal adalah mekanisme molekuler penting untuk gangguan reproduksi jantan, baik dalam tahap hormonal atau selama spermatogenesis (Asadi *et al.*, 2017).

2.4.6 Nilai ambang batas timbal

Nilai ambang batas timbal pada manusia dilihat dari spesimen darah, rambut, dan urin. Nilai ambang batas kadar timbal dalam spesimen darah pada orang dewasa normal adalah 10-25 $\mu\text{g/dL}$. Kadar timbal dalam spesimen rambut 0,007-1,17 mg Pb/100 g jaringan basah. Untuk spesimen urin memiliki batas dalam spesimen urin yaitu 150 $\mu\text{g/dL}$ kreatinin. Indonesia memiliki indeks untuk mengatur Pb, melalui surat keputusan dengan nomor 1406/MENKES/SK/IX/2002 mengenai standar pemeriksaan kadar Pb pada spesimen biomarker manusia (Wulandari, 2018).

Lethal dose (LD_{50}) adalah besar dosis yang menyebabkan kematian (dosis letal) pada lima puluh persen hewan coba. LD_{50} tikus 100-825 mg/kgBB secara oral (timbal arsenat), LD_{50} tikus 109 mg/kgBB secara oral (tetrametil timbal), LD_{50} kelinci 125 mg/kgBB secara oral (timbal arsenat), LD_{50} ayam 450 mg/kgBB secara oral (timbal arsenat). LD_{50} pada manusia adalah 714 mg/kgBB (timbal asetat), LDLo intravenous-pria adalah 71 mg/kgBB (timbal asetat). LDLo subkutan 100 mg/kgBB. LD_{50} interperitoneal tikus 150 mg/kgBB (Mulyadi dkk., 2015).

Proses spermatogenesis yang terganggu akibat paparan timbal dapat mengindikasikan penurunan fungsi baik hormonal maupun sel-sel germinal. Paparan timbal asetat dapat merusak baik secara makroskopis maupun mikroskopis fungsi reproduksi, terutama steroidogenesis dan spermatogenesis. Peran sel Leydig dan sel Sertoli sangat krusial untuk dapat mempertahankan kedua proses tersebut berlangsung baik. Berbagai fakta yang telah disebutkan menjadi dasar pemilihan timbal asetat untuk menginduksi penurunan jumlah sel Leydig dan sel Sertoli mencit jantan.

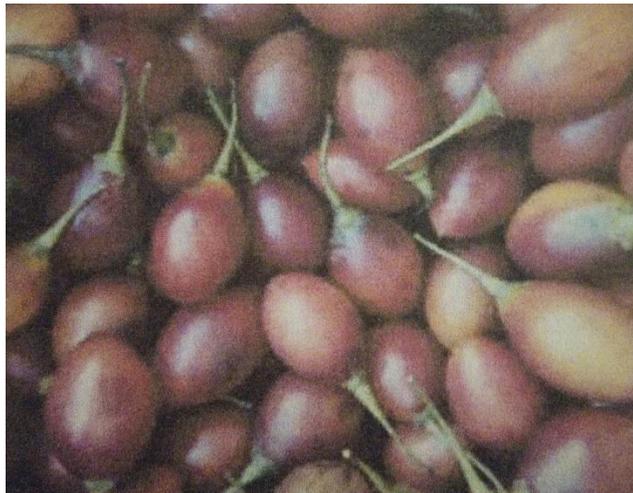
2.5 Terong Belanda (*Solanum betaceum*)

Terong belanda berasal dari pegunungan Andes di Peru, Chili, Equador dan Bolivia. Tanaman ini kemudian masuk ke Indonesia dan berkembang di daerah Bali, Jawa Barat serta Sumatera Utara. Tanaman ini sangat familiar pada penduduk New Zealand sejak zaman dahulu karena rasa buahnya merupakan kombinasi antara tomat dan jambu biji dan menjadi daya tarik masyarakat di New Zealand (Devi, 2018). Terong belanda (*Solanum betaceum*) atau yang dikenal dengan sebutan Tamarillo merupakan tanaman perdu jenis terung-terungan yang tergolong ke dalam famili *Solanaceae*. Awalnya terong belanda dikenal dengan nama *Cyphomandra betaceae* (Cav.) Sendt., namun kemudian direvisi oleh Sendtner dengan nama ilmiah *Solanum betaceum* Cav. (Hassan and Bakar, 2013).

2.5.1 Klasifikasi tanaman *Solanum betaceum*

Secara taksonomi, dalam Khaerunnisa (2018), tanaman terong belanda dapat diklasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Subkingdom	: Tracheobionta
Divisi	: Spermatophyta
Class	: Dicotyledonae
Subclass	: Asteridae
Ordo	: Solanales
Famili	: Solanaceae
Genus	: Sonalum
Spesies	: <i>Solanum betaceum</i>



Gambar 2.1 Buah terong belanda/ *Solanum betaceum* (Khaerunnisa, 2018)

Terong belanda merupakan tanaman semak atau pohon dengan tinggi batang antara 2 sampai 3 meter dengan diameter batang 4 cm. Tanaman terong belanda tumbuh pada ketinggian 1000-1800 m di atas permukaan laut, sehingga tanaman ini dapat dikembangkan di daerah tropis dan subtropis. *Solanum betaceum* tumbuh

baik di daerah yang memiliki drainase baik, kandungan organik dan kelembapan sedang serta tidak tahan terhadap genangan air. Pohonnya berbuah lebat, berumur panjang dan responsive terhadap pupuk kandang dan tempat-tempat kering. Bentuk bunga terong belanda berukuran kecil, mempunyai tandan dengan warna merah jambu sampai biru terong dengan diameter berukuran 1 cm. Tanaman ini memiliki tangkai panjang sehingga satu dengan yang lainnya dapat tumbuh sendirian atau ada yang berkelompok sebanyak 3-12. *Solanum betaceum* mulai berbuah setelah 1,5-2 tahun dan memiliki usia produktif antara 5-6 tahun (Khaerunnisa, 2018).

Buah terong belanda berbentuk oval dengan ukuran panjang antara 5-6 cm serta lebarnya di atas 5 cm. Warna kulit buah ini sangat bervariasi mulai dari ungu gelap, merah darah, oranye dan kuning. Buah terong belanda yang masih muda berwarna hijau agak keabu-abuan. Ketika buah sudah mulai matang maka warnanya akan menjadi merah kecoklatan. Daging buah terong belanda berwarna kekuningan dan dibungkus oleh selaput tipis. Kandungan daging buah ini memiliki lapisan luar yang memiliki kandungan air yang tinggi. Biji terong belanda berbentuk yang agak tumpul, bulat dan kecil namun lebih besar daripada biji tomat, serta berwarna coklat muda hingga kehitaman dengan struktur yang keras (Devi, 2018).

2.5.2 Kandungan *Solanum betaceum*

Solanum betaceum memiliki banyak kandungan gizi, seperti vitamin A, C, dan serat. Buah terong belanda ini bermanfaat untuk mencegah kerusakan sel-sel dan jaringan tubuh yang disebabkan oleh berbagai penyakit seperti kanker, tumor, dan lainnya. Buah ini juga dapat melancarkan penyumbatan pembuluh darah (arteriosklerosis) sehingga dapat mencegah penyakit jantung dan stroke serta menormalkan tekanan darah, dan mempercepat penyembuhan. Provitamin A yang

terdapat pada *Solanum betaceum* baik untuk kesehatan mata dan vitamin C yang dapat mengobati sariawan serta meningkatkan daya tahan tubuh. Kandungan mineral seperti potassium, fosfor, dan magnesium berguna untuk menjaga dan memelihara kesehatan tubuh. Adanya kandungan serat bermanfaat untuk mencegah sembelit atau konstipasi. Komponen lain yang terkandung dalam *Solanum betaceum* adalah vitamin E dan senyawa fenolik (termasuk antosianin dan flavonoid lainnya), serta karotenoid (Nallakurumban *et al.*, 2015).

Kandungan senyawa dalam 100 g *Solanum betaceum* terdapat 82,7-87,8 g air, 1,5 g protein, 0,06-1,28 g lemak, 10,3 g karbohidrat, 1,4-4,29 g serat, 0,66-0,94 g abu, 50 mg β -karoten, 540 μ g vitamin A, 23,3-44,9 g vitamin C, dan 2 mg vitamin E. Saat buah terong belanda/ tamarilo ini dimasak, maka kandungan vitamin C sebagian besar akan hilang. Nutrisi yang terkandung dalam *Solanum betaceum* sangat beragam dan baik bagi tubuh, selain vitamin juga terdapat kandungan zat besi dan potassium. Buah terong belanda juga disebut sebagai buah yang bebas kolesterol dan sodium, serta menjadi sumber vitamin C dan vitamin E yang sempurna (Masbiontoro, dkk., 2016). Komponen metabolit sekunder yang terdapat dalam *Solanum betaceum* adalah flavonoid golongan antosianin: malvidin-3-diglikosida, malvidin-3-glukosil-glukosa, paeonidin-3-diglikosida, paeonidin-3-glukosil-glukosida, pelargonidin-3-diglikosida, delphinidin-3-rutinosida, sianidin-3-rutinosida, dan senyawa flavonoid lainnya, yaitu karotenoid, β -karoten, β -kriptoxantin, dan lutein. Kandungan antioksidan *Solanum betaceum* adalah memiliki total fenolik sejumlah 190,8 mg GAE/100g FW; total karotenoid 1,71 mg/100g FW; vitamin C sejumlah 34,3 mg/100g FW; dan vitamin E sejumlah 1,8 mg/100g FW. Komposisi fenolik *Solanum betaceum* mengandung antosianin

sejumlah 82,4 mg GAE/100g FW; flavonoid 6,4 mg/100g FW; dan asam fenolat 29,6 mg/100g FW (Khaerunnisa, 2018).

Kandungan antosianin dalam buah terong belanda merupakan antioksidan yang kuat dan dapat menangkal berbagai radikal bebas. Antosianin pada buah-buahan tidak hanya mengandung antioksidan tapi juga bermanfaat sebagai anti bakteri, anti radang, anti kanker (untuk pencegahan), memperbaiki fungsi penglihatan, anti-tumor, dan anti penuaan. Buah yang baik untuk diolah adalah saat buah berada pada tingkat kematangan 75-100% matang, tidak rusak, tidak busuk atau pecah. Pemanfaatan buah terong belanda dengan berbagai cara seperti masakan dan makanan manis. Buah yang masih mentah dapat digunakan untuk masakan kari dan sambal, sementara yang sudah matang digunakan untuk sirup, jus, sup, adonan pelengkap, bumbu, dan rujak. Buah yang telah dimatangkan juga dapat digunakan untuk menghasilkan jeli, selai, pencuci mulut, dan sebagai hiasan es krim yang berkualitas baik. Setelah dilakukan skrining terhadap metabolit sekunder buah *Solanum betaceum* diketahui bahwa ekstrak etanol *Solanum betaceum* mengandung senyawa metabolik sekunder, yaitu flavonoid, tannin, dan terpenoid (Khaerunnisa, 2018).

2.5.3 Ekstrak etanol *Solanum betaceum*

Proses ekstraksi bertujuan untuk memisahkan substansi atau komponen kimia dari campurannya menggunakan pelarut yang sesuai. Jenis ekstraksi dapat dibedakan berdasarkan bentuk campuran yang diekstraksi dan proses pelaksanaan ekstraksi. Menurut bentuk campurannya, ekstraksi dikelompokkan atas ekstraksi padat-cair dan ekstraksi cair-cair. Berdasarkan proses pelaksanaannya ekstraksi terbagi atas ekstraksi yang berkesinambungan dan ekstraksi bertahap. Proses

ekstraksi padat-cair memerlukan kontak yang sangat lama antara pelarut dan padatan. Hal ini menyebabkan ekstraksi berkesinambungan lebih dipilih daripada metode ekstraksi bertahap. Maserasi adalah salah satu contoh metode ekstraksi padat-cair yang bertahap dan dilakukan dengan cara membiarkan padatan terendam dalam suatu pelarut bahan (Masbintoro dkk., 2016).

Senyawa flavonoid yang terdapat pada jaringan tumbuhan segar dapat diekstraksi dengan menggunakan pelarut semi polar seperti aseton atau pelarut etanol. Faktor yang mempengaruhi laju ekstraksi adalah tipe ekstraksi, persiapan sampel, waktu ekstraksi, jumlah sampel, suhu, dan jenis pelarut. Umumnya flavonoid ditemukan berikatan dengan gula membentuk glikosida yang menyebabkan senyawa ini mudah larut dalam pelarut polar. Selama proses ekstraksi flavonoid akan terlarut dalam larutan penyari yang sesuai dengan kepolarannya. Kelarutan suatu zat ke dalam suatu pelarut sangat ditentukan oleh kecocokan sifat atau struktur kimia antara zat terlarut dengan pelarut, yaitu *like dissolves like*. Pelarut etanol adalah pelarut polar sehingga pelarut ini sering digunakan untuk mengidentifikasi senyawa flavonoid (Verdiana, dkk., 2018).

Faktor selain jenis pelarut, perbedaan konsentrasi juga mempengaruhi hasil ekstraksi. Perbedaan konsentrasi etanol dapat mengakibatkan perubahan polaritas pelarut sehingga mempengaruhi kelarutan senyawa bioaktif salah satunya ialah flavonoid. Penggunaan konsentrasi etanol yang lebih tinggi hingga 90% mengakibatkan total flavonoid ekstrak yang diperoleh mengalami penurunan. Pelarut etanol 70% merupakan pelarut yang cocok untuk melarutkan senyawa flavonoid dari daun lotus karena menghasilkan flavonoid optimum dibandingkan dengan etanol 65% dan 75%. Nilai aktivitas antioksidan akan meningkat sesuai

dengan meningkatnya kandungan total fenolik dan flavonoid yang terdapat dalam ekstrak, namun setelah konsentrasi pelarut optimum aktivitas antioksidan akan berkurang sesuai dengan penurunan total fenolik dan flavonoid yang terdapat pada ekstrak. Hasil penelitian menunjukkan pada konsentrasi pelarut etanol 70% ditemukan aktivitas antioksidan yang optimum (Suhendra dkk., 2019).

Buah terong belanda (*Solanum betaceum*) dicuci bersih, kemudian dipotong-potong dan dikeringkan menggunakan oven. Buah terong belanda yang telah kering kemudian diblender hingga menjadi serbuk halus. Serbuk ini selanjutnya direndam dengan larutan etanol 70% selama 3 x 24 jam pada suhu ruangan. Filtrat hasil perendaman kemudian dikumpulkan dan selanjutnya dilakukan evaporasi menggunakan *rotary vacuum evaporator* untuk mendapatkan ekstrak murni dari buah terong belanda (Raharjo dkk., 2017).

2.5.4 Kaitan ekstrak *Solanum betaceum* dengan sel Leydig dan sel Sertoli

Flavonoid yang terdapat dalam buah *Solanum betaceum* merupakan antioksidan sekunder yang terbukti bermanfaat dalam mencegah kerusakan sel yang diakibatkan oleh stres oksidatif. Aktivitas antioksidan yang dimiliki oleh senyawa flavonoid dapat dimanfaatkan untuk pencegahan penyakit degenerative (Asih dkk., 2017). Mekanisme kerja dari senyawa flavonoid sebagai antioksidan bisa secara langsung maupun tidak langsung. Mekanisme kerja secara langsung yaitu dengan mendonorkan ion hidrogen sehingga dapat menetralkan efek toksik dari radikal bebas. Mekanisme kerja secara tidak langsung yaitu dengan meningkatkan ekspresi gen antioksidan endogen melalui beberapa mekanisme. Salah satu mekanisme peningkatan ekspresi gen antioksidan adalah melalui aktivasi *nuclear factor erythroid 2 related factor 2* (Nrf2) sehingga terjadi peningkatan ekspresi gen yang

berperan dalam sintesis misalnya gen *superoxide dismutase/ SOD* (do Nascimento *et al.*, 2013).

Adanya gugus hidroksi fenolik yang mampu beresonansi ketika ada radikal bebas menyebabkan flavonoid memiliki efek antioksidan yang kuat. Flavonoid juga dikenal sebagai *biological response modifiers* karena mampu memodifikasi reaksi tubuh terhadap berbagai stress seperti allergen, karsinogen, dan virus. Posisi dan jumlah total gugus hidroksil, konfigurasi, substitusi, dan faktor lainnya dalam struktur kimia flavonoid berkontribusi terhadap kemampuan mengkelat ion logam yang dapat meredam radikal bebas. Konfigurasi gugus hidroksil pada cincin B secara signifikan meredam (*scavenging*) dan mengkelat ion logam dari ROS dan *reactive nitrogen species* (RNS), karena berfungsi sebagai donator hydrogen dan elektron ke gugus hidroksil, peroksil, dan radikal peroksinitrit yang menghasilkan radikal flavonoid atau radikal aroksil (F1-O[•]) yang relatif stabil. Hal ini menyebabkan flavonoid dapat berperan sebagai senyawa peredam (*scavengers*) yang efektif untuk radikal bebas (R-O[•]). Radikal bebas akan terdelokalisasi oleh struktur flavonoid, sehingga mampu mengakhiri rantai propagasi (Khaerunnisa, 2018). Berbagai mekanisme peredam radikal bebas oleh flavonoid menyebabkan efek protektif bagi sel Leydig dan sel Sertoli terhadap radikal bebas (Ordonez *et al.*, 2010). Peran flavonoid dalam menghambat radikal bebas sehingga tidak terjadi stres oksidatif, maka jumlah sel Leydig dan sel Sertoli dapat dipertahankan serta tidak terganggunya proses steroidogenesis maupun spermatogenesis (Atiqah *et al.*, 2014).

Ekstrak *Solanum betaceum* juga memiliki kandungan antosianin yang tinggi, yaitu sebesar 82.4 mg GAE/100g FW (Khaerunnisa, 2018). Antosianin

menghambat stres oksidatif melalui proses penghambatan yang terjadi melalui mekanisme pemutusan rantai propagasi dari radikal bebas, yaitu semua gugus hidroksil (OH) pada cincin B dapat menyumbangkan dan berperan sebagai donor elektron atau hidrogen sehingga terjadi pembersihan atau pencegahan terhadap radikal bebas. Antosianin memiliki sifat hidrofilik yang memudahkannya larut dalam air. Senyawa ini juga merupakan turunan flavonoid yang selain bersifat hidrofilik, antosianin juga dapat larut dalam pelarut organik yang bersifat polar seperti etanol, metanol, aseton, dan kloroform (Priska dkk., 2018). Kandungan antosianin dalam ekstrak terong belanda/ *Solanum betaceum* memberikan efek terhadap pertahanan sel Leydig dan sel Sertoli dari kondisi ketidakseimbangan ROS. Paparan polusi timbal dalam uraian bab sebelumnya menunjukkan bahwa timbal dapat meningkatkan kadar ROS, terutama pada jaringan testikular. Hal ini dapat mengganggu fungsi sel Leydig dalam proses steroidogenesis maupun sel Sertoli dalam proses spermatogenesis. Mekanisme penghambatan radikal bebas oleh senyawa antosianin diyakini mampu mencegah terjadinya stres oksidatif sehingga dapat mempertahankan jumlah sel Leydig dan sel Sertoli (Abdu, 2018).

2.6 Mencit (*Mus musculus*)

2.6.1 Deskripsi mencit (*Mus musculus*)

Mencit adalah hewan yang sering digunakan sebagai hewan laboratorium khususnya untuk penelitian biologis karena memiliki beberapa keunggulan. Keuntungan menggunakan mencit dalam penelitian yakni siklus hidup yang relatif pendek, variasi sifat-sifatnya tinggi, jumlah anak banyak per kelahiran, mudah ditangani, serta sifat produksi dan karakteristik reproduksi mirip hewan lain seperti

kambing, domba, babi dan sapi (Widawati *et al.*, 2017). Mencit bersifat penakut, fotofobik, memiliki kecenderungan untuk bersembunyi dan lebih aktif bila malam hari. Umur mencit berkisar antara 1-3 tahun. Habitat mencit ditemukan mulai daerah beriklim dingin, sedang maupun panas dan dapat hidup bebas atau dalam kandang. Mencit sangat mudah menyesuaikan diri dengan perubahan yang dibuat manusia, bahkan jumlahnya yang hidup liar di hutan barangkali lebih sedikit daripada yang tinggal di perkotaan. Mencit percobaan (laboratorium) dikembangkan dari mencit, melalui proses seleksi. Sekarang mencit juga dikembangkan sebagai hewan peliharaan. Mencit memiliki ciri-ciri antara lain memiliki tulang belakang, jantung terdiri dari empat ruang, badan ditutupi oleh bulu, mempunyai cuping telinga, mempunyai kelenjar peluh, mamalia betina melahirkan dan menyusui, memiliki paru-paru untuk bernapas dan berdarah panas (Phifer-Rixey dan Nachman, 2015).

2.6.2 Klasifikasi mencit (*Mus musculus*)

Klasifikasi mencit (*Mus musculus*) dalam Hamid *et al.* (2016) adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Animalia
Phylum	: Chordata
Classis	: Mamalia
Ordo	: Rodentia
Familia	: Muridae
Genus	: Mus
Species	: <i>Mus musculus</i>



Gambar 2.2 Mencit (*Mus musculus*) (Phifer-Rixey dan Nachman, 2015)

2.6.3 Sistem reproduksi mencit (*Mus musculus*) jantan

Organ reproduksi mencit jantan terdiri atas organ reproduksi primer, kelompok kelenjar kelamin pelengkap, dan organ kopulasi. Organ reproduksi primer mencit jantan disebut gonad atau testis sebagai kelenjar benih yang merupakan organ reproduksi utama pada hewan jantan. Kelenjar kelamin pelengkap terdiri dari kelenjar vesikularis, kelenjar prostat, dan kelenjar cowper, serta saluran-saluran reproduksi yaitu epididimis dan vas deferens. Organ kopulasi mencit jantan adalah penis sebagai alat kelamin luar yang berfungsi untuk menyalurkan sperma pada organ reproduksi betina (Phifer-Rixey and Nachman, 2015).

Organ reproduksi primer pada hewan jantan adalah testis. Testis memiliki fungsi penting yaitu dalam produksi spermatozoa dan produksi hormon androgen. Segmen-segmen testis mengandung banyak tubuli seminiferus yang berkelok-kelok, jaringan longgar dan sel-sel interstitial yang letaknya menyebar. Tubulus seminiferus dibatasi oleh epitel berlapis kompleks bergaris tengah sekitar 150-250 μ m dan panjang 30-70 cm (Widawati *et al.*, 2017). Faktor-faktor yang dapat mempengaruhi perubahan anatomi dan fisiologis testis berupa faktor endogen dan eksogen. Faktor endogen berasal dari gangguan koordinasi hormonal sehingga

terjadi ketidakseimbangan pada hormon reproduksi. Hormon reproduksi yang bersinergi dengan baik mempertahankan keadaan anatomi dan fisiologis testis normal. Faktor eksogen bersumber dari bahan kimia, suhu, radiasi, trauma, dan polusi. Faktor eksogen secara tidak langsung mempengaruhi anatomi dan fisiologis testis. Paparan yang terus menerus dapat mengakibatkan terjadinya abnormalitas pada testis dan jaringan hinggai sel-sel yang ada di dalamnya (Chen *et al.*, 2016). Kerusakan pada testis akan berdampak pada proses pembentukan sel spermatogonium menjadi spermatozoa (spermatogenesis). Spermatogenesis terjadi pada semua tubulus seminiferus selama kehidupan yang terjadi akibat koordinasi yang tepat dari aksis hipotalamus-hipofisis anterior/ *pituitary*-testis (H-P-T). Spermatogenesis pada mencit berlangsung selama 4 siklus dan 1 siklus membutuhkan waktu kurang lebih 207 ± 6 jam atau $8,63 \pm 0,25$ hari. Perkiraan tersebut menunjukkan bahwa keseluruhan proses spermatogenesis membutuhkan waktu sekitar 35 hari pada mencit jantan (Nakarimah *et al.*, 2018).