

PEMBERIAN EKSTRAK RUMPUT KEBAR (*Biophytum petersianum* Klotszch) TERHADAP VIABILITAS SPERMATOZOA MENCIT

(*Mus musculus*) DIABETES MELITUS

Prima Arundani¹, Reny I'tishom², Bambang Purwanto³

Pascasarjana Ilmu Kesehatan Reproduksi, Fakultas Kedokteran
Universitas Airlangga¹

Departemen Biologi Kedokteran, Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga²

Departemen Fisiologi Kedokteran, Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga³

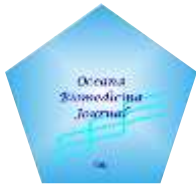
ABSTRAK

Diabetes mellitus yang tidak ditangani dengan baik akan mengakibatkan infertilitas yang disebabkan oleh adanya kerusakan salah satu organ reproduksi yaitu testis. Hiperglikemia atau tingginya kadar gula dalam darah berperan dalam kerusakan sel dengan cara peningkatan *reactive oxygen species* (ROS) sehingga terjadi stres oksidatif jaringan yang mengakibatkan radikal hidroksil. Peningkatan *Reactive Oxygen Species* (ROS) menyebabkan cedera sel melalui mekanisme peroksidasi lipid dan kerusakan oksidatif protein serta DNA. Proses lipid peroksidasi pada akhirnya merusak membran spermatozoa dan mitokondria DNA sehingga menyebabkan penurunan kualitas spermatozoa.

Penelitian ini bertujuan mengetahui efek ekstrak rumput kebar terhadap viabilitas spermatozoa mencit jantan (*Mus musculus*) model diabetes mellitus. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan rancangan *post test only control group design*. Ekstrak rumput kebar menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%. Sebanyak 30 ekor mencit yang dibagi ke dalam 5 kelompok, yaitu kelompok kontrol negatif yaitu mencit diabetes mellitus yang di sonde cmc na, kelompok kontrol positif yaitu mencit diabetes mellitus yang di sonde metformin, kelompok I, II, dan III yang di sonde ekstrak rumput kebar dengan dosis 67,5; 130; dan 270 mg/kg BB. Viabilitas spermatozoa dianalisis dengan mengambil sampel spermatozoa dari kauda epididimis.

Hasil uji Kruskal Wallis menunjukkan hasil yang signifikan $p = 0,005$ ($p < 0,05$) pada viabilitas spermatozoa mencit diabetes mellitus dan perbedaan yang bermakna pada kelompok kontrol negatif mencit dengan diabetes mellitus dengan kelompok perlakuan 3 yang diberi metformin dan ekstrak rumput kebar dosis 270 mg/kg BB. Viabilitas spermatozoa pada kelompok kontrol negatif memiliki persentase terendah sedangkan pada kelompok perlakuan 3 memiliki persentase tertinggi. Simpulan penelitian ini adalah ekstrak rumput kebar (*Biophytum petersianum* Klotszch) meningkatkan viabilitas spermatozoa mencit (*Mus musculus*) model diabetes mellitus.

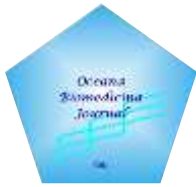
Kata kunci : diabetes mellitus, viabilitas, ekstrak rumput kebar



PENDAHULUAN

Diabetes melitus adalah penyakit metabolik dengan karakteristik hiperglikemia yang terjadi karena kelainan sekresi insulin, kerja insulin, atau keduanya yang berhubungan dengan kerusakan jangka panjang, disfungsi, atau kegagalan organ tubuh. Diabetes melitus (DM) yang tidak ditangani dengan baik akan mengakibatkan penyakit infertilitas yang disebabkan oleh adanya kerusakan salah satu organ reproduksi pria, yaitu testis yang pada akhirnya dapat menurunkan kualitas spermatozoa yang berujung pada masalah kesuburan pada pria. Infertilitas karena diabetes melitus dapat disebabkan oleh kerusakan epididimis, menyebabkan terganggunya migrasi spermatozoa, dan mengganggu dari fungsi reproduksi sehingga dapat ditemukan penurunan jumlah sel spermatogonium, jumlah spermatozoa dalam testis dan epididimis, penurunan diameter tubulus seminiferus, dan penurunan motilitas (Vignera *et al.*, 2012). Hiperglikemia atau tingginya kadar gula dalam darah berperan dalam kerusakan sel dengan cara peningkatan *reactive oxygen species* (ROS) yang dapat mengakibatkan stres oksidatif jaringan yang akan mengakibatkan radikal hidroksil. Peningkatan *Reactive Oxygen Species* (ROS) menyebabkan cedera sel melalui mekanisme peroksidasi lipid dan kerusakan oksidatif protein serta DNA. Proses lipid peroksidase pada akhirnya merusak membran spermatozoa dan mitokondria DNA sehingga menyebabkan penurunan kualitas spermatozoa.

Testis dalam proses reproduksi mempunyai dua fungsi utama yaitu memproduksi hormon dan spermatozoa. Kedua fungsi tersebut secara anatomi



berlangsung terpisah yaitu hormon testosteron dihasilkan oleh sel Leydig, sedangkan spermatozoa dihasilkan oleh sel epitel tubulus seminiferus. Selain itu, kadar FSH yang turun pada darah memberikan efek pada sel Sertoli sehingga hormon ABP (*Androgen Binding Protein*) tidak atau berkurang produksinya yang akibatnya proses spermatogenesis terganggu. Kadar LH yang menurun dalam darah memberikan efek pada sel Leydig berupa menurunnya produksi hormon testosteron. Kondisi defisiensi testosteron dapat menyebabkan penurunan libido, kualitas ereksi rendah, tidak adanya spermatozoa dalam semen (Parhizkar *et al.*, 2013), dan penurunan kualitas spermatozoa (Agbaje *et al.*, 2007).

Pengobatan yang mampu memberikan efek terapi terhadap kondisi hiperglikemia dan komplikasi pada DM adalah agen hipoglikemik, dapat juga digunakan adjuvant antioksidan yang akan bekerja dengan menekan stress oksidatif yang ditimbulkan karena kondisi hiperglikemik.. Banyak macam dari antioksidan, beberapa diantaranya adalah glutathion, beta karotin, vitamin C dan vitamin E (Ciofu dan Lykkesfeldt, 2014). Tumbuhan yang dapat digunakan sebagai terapi herbal, salah satunya adalah rumput kebar (*Biophytum petersianum* Klotzsch) merupakan tanaman asli Papua dan diketahui memiliki kandungan flavonoid, dan saponin, dan vitamin E (Hendra dkk, 2011). Rumput kebar adalah tanaman asal Indonesia yang tersebar di Papua dan Jawa. Tanaman ini penampilannya cantik, ramping, menyerupai tanaman kelapa karena hanya memiliki satu batang tanpa ada cabang, tinggi tanaman 10-12 cm, daun letaknya mengumpul di pucuk serta berpasangan. Penampakan secara visual rumput kebar memiliki bunga berwarna kuning dan warna daun hijau muda terutama yang



tumbuh di Papua, sedangkan yang tumbuh di Jawa Barat bentuk daunnya lebih panjang dan berwarna hijau tua (Wajo, 2005).

Antioksidan tersebut merupakan bahan dasar untuk sintesis hormone steroid yang dapat memperbaiki kinerja sistem reproduksi laki-laki. Hasil pengamatan Sembiring dan Darwati (2014), menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan pada rumput Kebar asal Papua lebih baik dibandingkan dari daerah lain. Hal ini ditunjukkan dengan nilai IC 50 (konsentrasi penghambatan 50%) lebih kecil yaitu 27,24 ppm. Menurut Windono dkk (2001), nilai IC 50 berpengaruh terhadap aktivitas penangkapan radikal bebas. Semakin kecil nilai IC-nya, maka semakin baik aktivitas antioksidannya untuk menangkap radikal bebas.

METODE PENELITIAN

Rancangan Penelitian

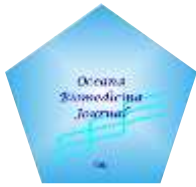
Penelitian ini merupakan penelitian true eksperimental laboratorium yang dilakukan dalam laboratorium. Rancangan penelitian ini tergolong jenis penelitian *post test only control group design*.

Populasi

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah 30 ekor mencit jantan (*Mus musculus*) dewasa.

Sampel

Kriteria inklusi : mencit jantan (*Mus musculus*) dengan diabetes mellitus berumur 6 sampai 8 minggu dan berat badan antara 25 sampai 30 gram.



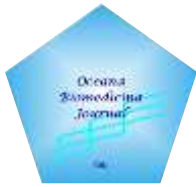
Kriteria eksklusi : mencit jantan (*Mus musculus*) yang tidak berhasil dibuat model diabetes mellitus, mencit sakit selain penyakit diabetes mellitus, mencit mati.

Ekstrak Rumput Kebar

Rumput kebar yang sudah dikeringkan dibawah sinar matahari direbus semua bagian tanamannya baik daun, batang, dan akarnya dengan *aquabidest*. Sebanyak 350 gram simplisia rumput kebar yang sudah dihaluskan, dimaserasi dengan pelarut etanol 70% dengan perbandingan 1:10 dalam tabung selama 3x24 jam, kemudian disaring dan ampasnya dimaserasi kembali sebanyak 2 kali dengan perlakuan yang sama. Maserat yang terkumpul kemudian dievaporasi menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 30°-40° C hingga terbentuk ekstrak kental (Harborne, 1987). Dosis ekstrak rumput kebar ditentukan berdasarkan dosis terbaik dari penelitian Sadsoeitoeboen (2005) adalah sebanyak 67,5 mg/kg bb/hari, 135 mg/kg bb/hari, dan 270 mg/kg bb/hari.

Induksi mencit menjadi diabetes melitus

Pembuatan sediaan streptozotocin dan penginduksian diabetik (Purwanto dan Liben, 2014), pertama kali persiapan mencit dipuasakan terlebih dahulu selama 4 jam untuk mengosongkan lambung dan mengurangi aspirasi. Kebutuhan dosis induksi streptozotocin 40 mg/kg BB. Streptozotocin dilarutkan dalam dapar sitrat dengan konsentrasi streptozotocin 22,5 mg/ml. Larutan streptozotocin diinjeksikan melalui intraperitoneal mencit. Induksi diulang setiap hari dengan dosis yang sama selama 5 hari. Larutan sukrosa 10% diberikan sepanjang malam setelah induksi. Setelah 3 hari, diperiksa gula darahnya dengan mengambil sampel darah dengan spuit needle 30 G di bagian ekor medial mencit.



Penentuan dosis obat metformin

Penentuan dosis pada mencit didasarkan pada mencit dihitung berdasarkan pada dosis

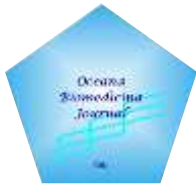
standar yang diberikan pada manusia. Dosis yang diberikan sebanyak 750 mg. Dosis yang diberikan pada mencit ditentukan berdasarkan penghitungan konversi dosis (Laurence dan Bacharah, 1964).

Pengambilan spermatozoa

Spermatozoa diambil dari mencit yang telah diinduksi oleh streptozotocin sehingga menjadi diabetes melitus. Untuk mendapatkan spermatozoa di dalam sekresi kauda epididimis dilakukan menurut Soehadi dan Arsyad (1983). Spermatozoa diambil di kauda dari epididimis setelah mencit di terminasi (*dislocating the cervical*). Kauda epididimis diperoleh dengan cara sayatan pada bagian tengah bawah abdomen, di kauda epididimis adalah tepat dibawah testis. Kauda epididimis diperoleh dengan menyingkirkan sebisa mungkin darah dan lemak. Kauda epididimis dicuci di MEM (*Minimum Essential Medium*) media dan diletakkan pada *petri dish*. Gunting steril digunakan untuk memotong kauda epididimis sehingga spermatozoa akan keluar dari duktus. Spermatozoa dikoleksi dan dicuci di dalam media cuci.

Penghitungan Viabilitas Spermatozoa

Viabilitas spermatozoa diamati melalui warna dimana spermatozoa hidup nampak translusen dan spermatozoa mati berwarna merah. Satu tetes suspensi spermatozoa (40 μ L) diletakkan pada gelas objek, kemudian ditambahkan 10 μ L Eosin-Y 0,5 %, kemudian dicampur. Hasil campuran ditutup dengan penutup gelas objek. Pengamatan dilakukan dengan mikroskop pembesar 400 kali. Spermatozoa



hidup nampak translusen dan spermatozoa mati berwarna merah. Pengamatan dilakukan pada 200 spermatozoa dalam 10 lapangan pandang secara random.

Perhitungan viabilitas spermatozoa dilakukan dengan metode Partodiharjo (1992).

Persentase viabilitas spermatozoa dihitung dengan perhitungan jumlah spermatozoa hidup dibagi dengan jumlah spermatozoa yang diamati dikali 100%. Spermatozoa yang masih hidup tidak berwarna sedangkan yang sudah mati berwarna merah (Bansal dan Bilaspuri, 2008)

$$\% \text{ viabilitas} = \frac{\text{Jumlah spermatozoa hidup}}{\text{Total spermatozoa yang diamati}} \times 100\%$$

Perlakuan

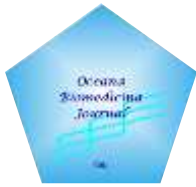
Sampel menggunakan dalam penelitian ini adalah 30 ekor mencit jantan (*Mus musculus*) dewasa, berumur 6-8 minggu, dan berat badan 25-30 gram. Sampel dibagi secara acak ke dalam 5 kelompok perlakuan, sebagai berikut :

Kelompok 1: Kelompok kontrol negatif, merupakan kelompok yang diinduksi dengan streptozotocin dan diberi CMC Na.

Kelompok 2 : Kelompok kontrol positif, merupakan kelompok yang diinduksi dengan streptozotocin dan diberi metformin dosis 2 mg.

Kelompok 3 : Kelompok perlakuan 1, merupakan kelompok yang diinduksi dengan streptozotocin + metformin dosis 2 mg + ekstrak etanol rumput kebar dosis 67,5 mg/kg BB.

Kelompok 4 : Kelompok perlakuan 2, merupakan kelompok yang diinduksi dengan streptozotocin + metformin dosis 2 mg + ekstrak etanol rumput Kebar dosis 137 mg/kg BB.



Kelompok 5 : Kelompok perlakuan 3, merupakan kelompok yang diinduksi dengan streptozotocin + metformin dosis 2 mg + ekstrak etanol rumput Kebar dosis 270 mg/kg BB.

Analisa Data

Untuk menguji distribusi normalitas data menggunakan Saphiro Wilk, apabila data berdistribusi normal analisis data dilanjutkan dengan uji parametrik *One Way ANOVA* dengan derajat signifikansi $\alpha=0,05$. Apabila hasil bermakna analisis data dilanjutkan dengan uji *Post Hoc* LSD. Apabila hasil distribusi data tidak normal maka dilakukan uji non parametrik Kruskal Wallis dan jika hasil bermakna analisis data dilanjutkan dengan uji Mann Whitney.

HASIL

Pengaruh pemberian ekstrak rumput kebar (*Biophytum petersianum* Klotszch) pada viabilitas spermatozoa mencit (*Mus musculus*) model diabetes mellitus

Uji normalitas menggunakan *Saphiro Wilk* karena sampel kecil dengan jumlah 30. Hasil untuk uji normalitas pada viabilitas spermatozoa didapatkan p tidak normal ($p < 0,05$).

Tabel 1 Pengaruh pemberian ekstrak rumput kebar (*Biophytum petersianum* Klotszch) pada viabilitas spermatozoa mencit (*Mus musculus*) model diabetes mellitus

Kelompok	N	Mean	Median	Minimum	Maksimum
K -	6	5,33	26	15	55
K +	6	15,67	54	44	62
P 1	6	14,33	52	43	77
P 2	6	17,75	59,5	51	62
P 3	6	24,42	71,5	53	76

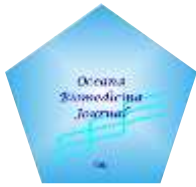
Ket: K- : induksi streptozotocin.

K+: induksi streptozotocin + metformin.

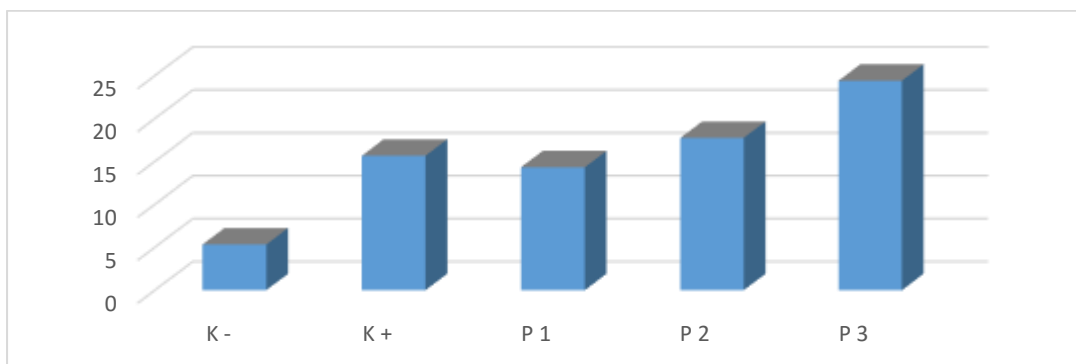
P1: induksi streptozotocin+metformin+rumpu kebar dosis 67,5 mg/kgBB.

P2 :induksi streptozotocin+metformin+rumpu kebar dosis 130 mg/kgBB.

P3: induksi streptozotocin+metformin+rumpu kebar dosis 270 mg/kgBB.



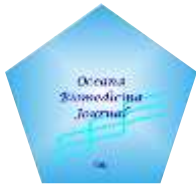
Data pada tabel menggambarkan nilai rata-rata distribusi viabilitas spermatozoa per kelompok. Hasil uji normalitas didapatkan berdistribusi tidak normal, sehingga dilanjutkan uji non parametrik Kruskal Wallis berdasarkan kelompok dengan hasil signifikan $p = 0,005$ pada persentase viabilitas spermatozoa mencit diabetes melitus (kelompok kontrol K- dan K+) dengan $\alpha < 0,05$, terhadap kelompok mencit diabetes melitus yang diberi metformin dan ekstrak rumput kebar pada seluruh kelompok perlakuannya (P1, P2, P3). Dilanjutkan dengan uji Mann Whitney untuk mengetahui perbedaan yang bermakna pada setiap kelompok dan didapatkan hasil adanya beda yang paling bermakna pada kelompok P3 dengan K- dengan nilai $p = 0,04$, kemudian tidak ada beda antara K- dengan seluruh kelompok (K+, P1, dan P2) dengan nilai $p = 0,05$.



Gambar 1 Diagram Batang Pengaruh pemberian ekstrak rumput kebar (*Biophytum petersianum* Klotszch) pada viabilitas spermatozoa mencit (*Mus musculus*) model diabetes mellitus

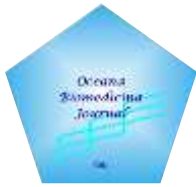
PEMBAHASAN

Pemberian ekstrak rumput kebar menunjukkan pengaruh yang signifikan terhadap persentase daya hidup (viabilitas) spermatozoa ($p < 0,05$) pada seluruh kelompok perlakuan (P1, P2, P3) dibandingkan kelompok kontrol (K- dan K+). Ekstrak rumput



kebar memberikan pengaruh terhadap persentase viabilitas spermatozoa mencit diabetes mellitus terutama pada kelompok perlakuan dengan dosis 270 mg/kg BB (P3). Pada viabilitas kelompok kontrol negatif memiliki persentase yang paling rendah sebesar *median* 26 dengan rentang nilai minimum 15 dan nilai maksimum 55, sedangkan pada kelompok perlakuan dengan dosis 270 mg/kg BB (P3) memiliki persentase tertinggi pada perlakuan 3 sebesar *median* 71,5 dengan rentang nilai minimum 53 dan nilai maksimum 76. Kelompok negatif menunjukkan viabilitas spermatozoa yang paling buruk, sedangkan pada kelompok perlakuan 3 yang diberi penambahan metformin dan ekstrak rumput kebar dosis 270 mg/kg BB menunjukkan hasil yang paling baik. Hasil penelitian ini mendukung hasil penelitian Meliyana (2016) tentang pengaruh rebusan daun binahong (*Anredera cordifolia*) terhadap kualitas spermatozoa mencit (*Mus musculus*) diabetes.

Senyawa flavonoid dan vitamin E pada ekstrak rumput kebar sebagai antioksidan endogen yang melindungi sel dari kerusakan oleh radikal bebas. Flavonoid sangat efektif dalam mencegah peroksidase lipid dan peroksidase lipid bertanggungjawab pada proses rusaknya membran spermatozoa dan DNA mitokondria pada penderita penyakit diabetes mellitus. Phospholipid mempunyai peranan penting dalam struktur dan aktivitas pada spermatozoa. Bila struktur membran sel spermatozoa tidak rusak (integritas utuh) maka viabilitas spermatozoa akan tetap baik. Selain itu flavonoid dan vitamin E pada rumput kebar yang cukup tinggi dapat mengakibatkan produksi testosteron mengalami perubahan. Testosteron merupakan hormon yang penting untuk spermatogenesis dan maturasi spermatozoa sehingga perubahan kadar testosteron akan berdampak langsung terhadap jumlah, morfologi, dan viabilitas



spermatozoa. Pemberian ekstrak rumput kebar dalam proses spermatogenesis mencit selama 35,5 hari dapat menyebabkan efek umpan balik negatif LH di hipofisis sehingga memberikan sinyal kepada sel Leydig mengurangi sintesis testosteron. Kondisi ini dapat memengaruhi spermatogenesis dan maturasi spermatozoa di epididimis.

Secara deskriptif spermatozoa yang memiliki viabilitas baik pada bagian kepalanya tidak berwarna akibat pemberian zat pewarna, tidak demikian dengan spermatozoa yang mempunyai viabilitas jelek, pada bagian kepalanya akan berwarna merah yang disebabkan karena masuknya zat warna akibat membran kepala sperma yang rusak (Ellya, 2010).

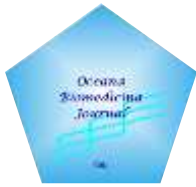
KESIMPULAN

Pemberian ekstrak rumput kebar (*Biophytum petersianum* Klotzsch) dapat meningkatkan viabilitas spermatozoa mencit (*Mus musculus*) model diabetes mellitus.

Dosis terbaik untuk penelitian ini adalah 270 mg/kg BB.

REFERENSI

- Agbaje I.M., D.A. Rogers, D.A. McVicar, N. McClure, A.B. Atkinson, C. Mallidis. 2007. 'Insulin dependant diabetes melitus: implications for male reproductive function'. *Human Reproduction* 22(7): 1871-1877.
- Bansal A.K. and G.S. Bilaspuri. 2008. Effect of manganese on bovine sperm motility, viability, and lipid peroxidation in vitro. *Anim. Reprod.* 5(3):90-96
- Ciofu O. and J. Lykkesfeldt. 2014. 'Antioxidant supplementation for lung disease in cystic fibrosis'. *Cochrane Database Syst Rev.* 7:8.
- Ellya E.S. 2010. *Kesehatan reproduksi dan wanita*. Jakarta: Trans info medika.
- Harbone J.B. 1987. *Metode fitokimia: penentuan cara modern menganalisis tumbuhan*. Edisi Kedua. Kosasih P dan Iwang S, penerjemah. Bandung (ID): ITB Pr. Terjemahan dari: *Phytochemical Methods: A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*.
- Hendra R., S. Ahmad, A. Sukari, M.Y. Shukor, A. Oskoueian. 2011. 'Flavonoid analyses and antimicrobial activity of various parts of *Phaleria macrocarpa* (Scheff) Boerl fruit'. *Int J Mol Sci.* 12(6):3422-31.



- Laurence and Bacharach, 1964, Evaluation of Drug Activities Pharmacometrics, cit: Ngatidjan, 1990, Metode Laboratorium dalam Toksikologi, reviewer: Hakim, L., Pusat Antar Universitas Bioteknologi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Meliyana Y., Sudiastuti, R.A. Nugroho. 2016. 'Pengaruh rebusan daun binahong (*Anredera cordifolia*) terhadap kualitas spermatozoa mencit'. *Bioprospek: Jurnal Ilmiah Biologi*. Vol.11(2):32-40.
- Parhizkar S., M.J. Yusoff, M.A. Dollah, 2013. 'Effect of *Phaleria macrocarpa* on sperm characteristics in adult rats'. *Adv Pharm Bull*. 3(2): 345-52.
- Partodiharjo S. 1992. *Ilmu reproduksi hewan*. Jakarta. Mutiara.
- Purwanto B dan P. Liben. 2014. *Model hewan coba untuk penelitian diabetes*. Surabaya. Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.
- Sadsoeitoeboen P.D. 2005. *Manfaat ekstrak rumput kebar (*Biophytum petersianum* Klotzsch) terhadap penampilan reproduksi mencit putih betina* (Tesis). Fakultas Kedokteran Hewan, Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor. 62 hlm.
- Sembiring S.B. dan I. Darwati. 2014. 'Identifikasi komponen kimia aksesori rumput kebar (*Biophytum petersianum* Klotzsch) asal Papua dan Jawa'. *Bul. Littro*. Vol 25, No 1.
- Soehadi K. dan K.M. Arsyad. 1983. *Analisis sperma*. Surabaya. Airlangga University press.
- Vignera L.S., R. Condorelli, E. Vicari, R. D'Agata, A. Calogero. 2012. 'Diabetes melitus and sperm parameters'. *Journal of Andrology*. 33(2): 145-152.
- Windono T., Soediman, S. Yudawati, U. Ermawati, E. Erowati dan T. Inayah. 2001. 'Uji perendaman radikal bebas terhadap 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) dari ekstrak kulit buah dan biji anggur (*Vitis vinifera* L.) Probolinggo Biri dan Bali'. *Artocarpus*. 1(1): 34-43.