

PEMANFAATAN BIJI LABU KUNING (*Cucurbita moschata*) UNTUK PEMULIHAN MORFOLOGI DAN MOTILITAS SPERMATOZOA MENCIT (*Mus Musculus*) YANG TERPAPAR 2-METOKSIETANOL

Alfiah Hayati, Nina Puspita, dan I.B. Rai Pidada

Prodi S-1 Biologi, Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Airlangga, Surabaya

ABSTRACT

Research has done to investigate the effect of pumpkin seed extract on morphology and motility of the mices after given of 2-ME. Thirty male mices, 56–63 days with 23–27 g weight were used as experimental animals into 5 groups (2 groups is control and 3 groups is treatment), 6 mices each. The first group is K_0 which given 0.1 mL aquades by gavage for 40 days each day, and then K_1 were given 0.05 mL 2-ME 200 mg/kg by intraperitoneally everyday within 5 days, and continued on the giving of aquadest. The next groups are treated groups which given 2-ME, in the first 5 days, then continued to the givings of pumpkin seed extract by gavage. *Cucurbita moschata* seed extract were given in three doses: 0.5; 1.0; and 2.0 g/kg BB for 35 days. Sperm collected from cauda epididymis. Parameter of sperm quality are morphology and motility. The result shown that *Cucurbita moschata* seed extract doses 0.5–1.0 g/kg BB showed no significant effect and then doses 2.0 g/kg BB increased recovery process morphology and motility with significant differences $p < 0.05$. The conclusions were *Cucurbita moschata* seed extract increased recovery process morphology and motility of the mices.

Key words: *Cucurbita moschata* seed, Morphology, Sperm motility

PENGANTAR

Senyawa 2-metoksietanol (2-ME) merupakan hasil metabolit dari *dimethoxy ethylphthalate* (DMEP), DMEP merupakan salah satu turunan dari *phthalic acid ester* (PAEs) yang banyak digunakan sebagai bahan pelentur dalam pembuatan plastik. Jika senyawa DMEP masuk ke dalam tubuh maka akan dihidrolisis menjadi 2-ME yang selanjutnya dioksidasi oleh *alkohol dehidrogenase* menjadi *2-methoxyacetaldehid* (MALD), kemudian di dalam hati diubah menjadi senyawa *methoxyacetic acid* (MAA) oleh *aldehid dehidrogenase*. Senyawa 2-ME merupakan bahan toksik dan teratogenik. Studi laboratorium menunjukkan bahwa senyawa ini dapat menurunkan kualitas spermatozoa, meningkatkan terjadinya oligospermia sampai azoospermia (Hayati, 2007).

Mengingat pentingnya kualitas spermatozoa yang dimiliki oleh setiap individu untuk dapat menghasilkan keturunan, sehingga perlu adanya perbaikan kualitas spermatozoa salah satunya dengan menggunakan bahan alami yang murah dan mudah didapatkan yaitu biji labu kuning (*Cucurbita moschata*). Biji labu kuning mengandung unsur mineral seng (Zn) yang sangat penting bagi organ kesehatan reproduksi, termasuk kelenjar prostat (Anonimus, 2011). Di dalam 100 g biji labu kuning mengandung mineral Zn sebesar 6,5 mg (Widowati *et al.*, 2008). Fungsi dari mineral Zn adalah pengembangan fungsi reproduksi pria dan pembentukan spermatozoa.

BAHAN DAN CARA KERJA

Hewan coba yang digunakan adalah mencit (*Mus musculus* L.) jantan strain BALB C sebanyak 30 ekor dengan berat badan antara 23–27 g dan berumur 56–63 hari. Mencit diperoleh dari Pusat Veterinaria Farma (PUSVETMA), Surabaya.

Bahan-bahan yang diperlukan dalam penelitian ini adalah larutan 2-ME murni produksi WAKO Pure Chemical Industries Ltd. Jepang, aquades, biji labu kuning (*Cucurbita moschata*) dari pasar Sokosari Tuban Jawa Timur, etanol 70%, kloroform, larutan NaCl 0,9%, pewarna Eosin 1% dan Negrosin 10%, pakan mencit Par L produksi Comfed.

Mencit sebanyak 30 ekor diaklimatisasi selama 7 hari serta diberi makan dan minum secara *ad libitum*, kemudian dikelompokkan menjadi 5 kelompok perlakuan yang terdiri atas dua kelompok kontrol (positif dan negatif) dan tiga kelompok perlakuan dengan variasi dosis ekstrak biji labu kuning berturut-turut 0,5; 1,0; dan 2,0 g/kg BB. Setiap kelompok terdiri atas 6 ekor mencit. Pemberian perlakuan secara oral dengan menggunakan *disposable syringe* 1 mL yang ujungnya telah diberi kanul dan injeksi melalui intraperitoneal dan dilakukan pada pagi hari pukul 09.00–10.00 WIB selama 40 hari.

Macam-macam pemberian perlakuan: 1) pada kelompok kontrol negatif (K_0) mencit diberi aquades 0,1 mL/hari selama 40 hari, 2) control positif (K_1) mencit diinjeksi intraperitoneal 0,05 mL 2-ME 200 mg/kg/hari selama

5 hari, kemudian dilanjutkan dengan pemberian aquades 0,1 mL/hari melalui *gavage* selama 35 hari, dan 3) kelompok perlakuan P₁, P₂, dan P₃ masing-masing terdiri atas enam ekor mencit diinjeksi 0,05 mL 2-ME 200 mg/kg melalui intraperitoneal satu kali sehari selama 5 hari, kemudian dilanjutkan dengan pemberian ekstrak biji labu kuning dengan variasi dosis selama 35 hari.

Pengamatan morfologi spermatozoa mencit dilakukan dengan cara membuat *smear* suspensi spermatozoa. Satu tetes spermatozoa mencit diteteskan di satu ujung gelas objek, kemudian diberi 1 tetes eosin 1% dan 1 tetes negrosin 10%. Gelas objek yang lain diletakkan di ujung yang lain dari gelas objek yang pertama dengan membentuk sudut 45°, kemudian digerakkan sampai menyentuh tetesan sperma. Jika sperma telah mengalir rata di tepi dari gelas objek kedua, gelas objek kedua digerakkan kembali ke arah semula sehingga terbentuk lapisan tipis hapusan sperma di gelas objek pertama. Hapusan sperma dikeringanginkan pada suhu kamar selama kurang lebih 5 menit. Pengamatan morfologi spermatozoa mencit dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran mulai dari yang kecil yaitu 40× dilanjutkan dengan perbesaran 100× dan perbesaran 400×. Pengamatan dilakukan pada 100 spermatozoa (%) dengan replikasi pengamatan sebanyak 10 kali untuk setiap mencit (Hayati, *et al.*, 2005). Pengamatan morfologi spermatozoa dibedakan atas spermatozoa normal dan abnormal yang dinyatakan dalam persen. Spermatozoa dikatakan normal apabila bagian kepala melengkung seperti kait, leher lurus dan ekor tunggal berujung bebas. Sedangkan morfologi abnormal bila kepala kecil atau terlalu besar, leher patah atau bercabang, ekor bercabang, menggulung dan patah, terdapat *sitoplasma droplet* pada kepala, leher atau ekor.

Pengamatan motilitas spermatozoa diamati dengan cara suspensi spermatozoa diambil satu tetes dengan

menggunakan pipet tetes kemudian diteteskan ke dalam gelas objek cekung dan ditutup dengan gelas penutup. Pengamatan motilitas spermatozoa dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 100× yang telah dipasang mikrometer pada lensa okuler. Motilitas spermatozoa dihitung setiap 10 detik pada 100 spermatozoa untuk tiap ekor mencit (Hayati, *et al.*, 2005).

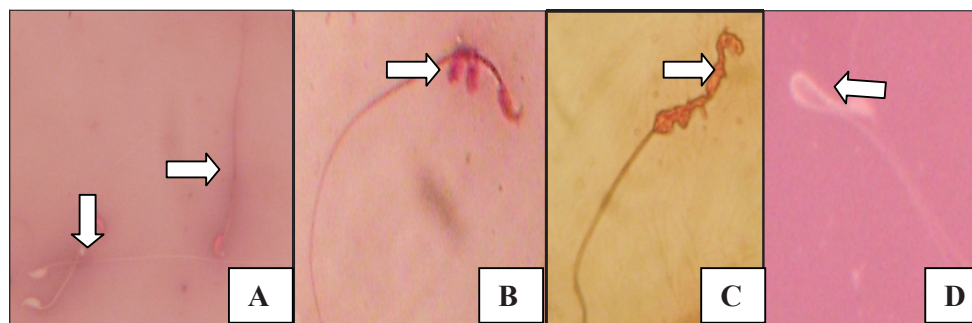
Data yang diperoleh diuji dengan ANOVA satu arah dan dilanjutkan dengan uji beda nyata terkecil (BNT) untuk mengetahui bermakna atau tidaknya perbedaan antar pasangan perlakuan (Steel dan Torrie, 1991).

HASIL

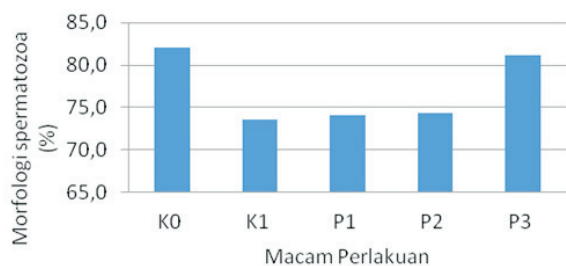
Hasil pengamatan dan penghitungan terhadap morfologi spermatozoa mencit kelompok kontrol (negatif dan positif) dan kelompok perlakuan (variasi dosis ekstrak etanol biji labu kuning 0,5; 1,0; dan 2,0 g/kg BB) dapat dilihat pada Gambar 1.

PEMBAHASAN

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa kelainan morfologi spermatozoa terjadi di semua bagian spermatozoa, yaitu bagian kepala, leher, dan ekor. Bentuk kepala yang tidak beraturan (*amorfus*), kepala kecil (*microcephali*), ekor patah, bengkok, melingkar atau bercabang dan terdapat *cytoplasmic droplet*. Banyaknya spermatozoa yang mempunyai kelainan morfologi tertinggi tampak pada kelompok kontrol positif (K1), namun setelah pemberian ekstrak kelainan morfologi tersebut berangsur menurun. Pada pemberian dosis ekstrak 2,0 g/kgBB, jumlah spermatozoa yang mempunyai kelainan morfologi sangat sedikit. Persentase morfologi saat ini hampir sama dengan kelompok kontrol negatif (K0).



Gambar 1. Morfologi spermatozoa mencit. A. Spermatozoa normal., B-C. Spermatozoa dengan kelainan terdapat *cytoplasmic droplet*., D. Spermatozoa dengan kelainan pada ekor (Perbesaran 400×).

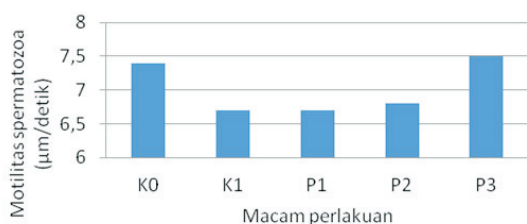


Gambar 2. Diagram batang morfologi spermatozoa mencit (%) kelompok kontrol (K_0 dan K_1) dan kelompok perlakuan (P_1 , P_2 , dan P_3)

Morfologi spermatozoa mengalami kenaikan setelah pemberian ekstrak etanol biji labu kuning. Dari hasil analisis statistik menunjukkan bahwa, kelompok perlakuan mengalami kenaikan morfologi spermatozoa yang signifikan ($p < 0,05$). Widowati *et al.* (2008) menyebutkan bahwa, pemberian mineral Zn menyebabkan meningkatnya sel spermatogenik karena terjadi peningkatan testosteron. Testosteron dari tubulus seminiferus diikat oleh ABP dan ditransportasikan oleh cairan tubulus seminiferus sehingga testosteron mencapai epididimis. Selama di epididimis spermatozoa mengalami proses pendewasaan. Di dalam epididimis testosteron diubah oleh enzim 5α reduktase menjadi DHT yang berfungsi menghilangkan sisa-sisa sitoplasma yang menempel di spermatozoa setelah keluar dari tubulus seminiferus. Meningkatnya DHT menyebabkan mekanisme penghilangan sisa-sisa sitoplasma menjadi lebih efektif, sehingga menimbulkan perbaikan pada morfologi normal spermatozoa.

Hasil pengamatan terhadap kecepatan motilitas spermatozoa antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan (variasi dosis ekstrak 0,5; 1,0; 2,0 g/kg BB) dapat dilihat pada Gambar 3.

Motilitas spermatozoa meningkat setelah pemberian ekstrak etanol biji labu kuning. Dari hasil analisis statistik menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol biji labu kuning meningkatkan motilitas spermatozoa secara signifikan ($p < 0,05$).



Gambar 3. Diagram batang motilitas spermatozoa mencit ($\mu\text{m}/\text{detik}$) kelompok kontrol (K_0 dan K_1) dan kelompok perlakuan (P_1 , P_2 , dan P_3)

Kecepatan motilitas spermatozoa yang rendah dipengaruhi oleh banyak faktor, di antaranya adalah adanya kelainan morfologi. Terdapat korelasi positif antara penurunan persentase morfologi spermatozoa dengan kecepatan motilitasnya (Hayati, 2007). Morfologi yang tidak normal dapat disebabkan karena terjadinya gangguan pada mekanisme spermiogenesis di testis. Hal ini mengakibatkan banyak spermatozoa yang dilepaskan dari epitel germinal mengandung *cytoplasmic droplet*. Selain itu terjadinya gangguan pada proses pembersihan *cytoplasmic droplet* di epididimis juga meningkatkan persentase morfologi yang tidak normal. Adanya *cytoplasmic droplet* ini menyebabkan penurunan motilitas spermatozoa (Agarwal, 2002).

Senyawa 2-ME menurunkan kualitas spermatozoa karena adanya senyawa MAA hasil metabolit 2-ME yang menyebabkan stres oksidatif yang meningkatkan kadar *Reactive Oxygen Species* (ROS). Kadar ROS yang tinggi dapat mengoksidasi lipid, protein dan DNA. Oksidasi lipid pada membran spermatozoa menghasilkan senyawa malondialdehyde (MDA), yang bersifat toksik pada sel, sehingga menyebabkan kerusakan membran spermatozoa (Hayati, 2007). Kerusakan membran spermatozoa menyebabkan struktur vital dan fungsinya berubah.

Selain itu 2-ME juga berpengaruh terhadap kecepatan motilitas spermatozoa. Berdasarkan hasil penelitian kecepatan motilitas spermatozoa kelompok kontrol negatif (K_0) lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok kontrol positif (K_1). Penurunan kecepatan motilitas spermatozoa disebabkan oleh meningkatnya permeabilitas membran spermatozoa oleh MAA yang menyebabkan kerusakan pada mitokondria karena penumpukan ion Ca^{2+} . Kelebihan ion Ca^{2+} akan menghambat fosforilasi oksidatif sehingga cadangan energi (ATP) menjadi berkurang karena dipakai memompa kelebihan Ca^{2+} keluar. Cadangan energi yang berkurang menyebabkan menurunnya kecepatan motilitas pada spermatozoa (Rumanta *et al.*, 2001).

Widowati *et al.* (2008) menyebutkan bahwa, pemberian mineral Zn menyebabkan meningkatnya sel spermatogenik karena terjadi peningkatan testosteron. Mineral Zn ini juga terkandung dalam ekstrak biji labu kuning, sehingga pemberian ekstrak dapat meningkatkan testosteron. Testosteron di epididimis diubah menjadi DHT oleh enzim 5α reduktase. Hormon DHT ini berfungsi menghilangkan *cytoplasmic droplet* pada spermatozoa sehingga spermatozoa yang dilepaskan dari epididimis memiliki motilitas tinggi. Jika testosteron dan DHT di epididimis mengalami peningkatan, maka proses penghilangan *cytoplasmic droplet* menjadi lebih baik dan spermatozoa yang keluar dari epididimis motilitasnya juga akan meningkat.

Kesimpulan dari penelitian ini adalah pemberian ekstrak etanol biji labu kuning dosis 2,0 g/kg BB meningkatkan proses pemulihan morfologi dan motilitas spermatozoa mencit setelah terpapar senyawa 2-metoksietanol.

SARAN

Pemberian ekstrak etanol biji labu kuning dengan dosis 2,0 g/kg BB dapat digunakan untuk membantu proses pemulihan kualitas spermatozoa dari kualitas yang rendah menjadi keadaan normal.

KEPUSTAKAAN

- Agarwal, A. 2002. Significance of Oxidative Stress and Sperm Chromatin Damage in Male Infertility, chapter 13, www.clevelandclinic.org/reproductionresearchcenter/docs/agrach014
- Anonimus. 2011. Khasiat Buah Labu Kuning, <http://khasiatbuah.com>, 30 Oktober 2011.

- Hayati, A., Rahmaninta, A.D., dan Pidada, R. 2005. Spermatozoa Motility and Morphological Recovery Process in Mice after the Induction of 2-Methoxyetanol, *Journal of Folia Medica Indonesiana*, 41(2): 90–95.
- Hayati, A. 2007. Kajian kualitas dan protein membran spermatozoa tikus (*Rattus norvegicus*) akibat pemaparan 2-metoksietanol, Disertasi, UGM, Yogyakarta.
- Rumanta, M., Tien, W.S., dan Sudarwati, S. 2001. Pengaruh Asam Metoksiasetat terhadap Organ Reproduksi Mencit (*Mus musculus*) Swiss Webster Jantan. *Jurnal Kedokteran dan Farmasi* 33: 61–7.
- Sharlip, I.D., Jarow, J.P., Belker, A.M., Lipshultz, L.I., Sigman, M., dan Thomas, A.J. 2002. Best Practice Policies for Male Infertility. *Fertil Steril* 77(5): 829–843.
- Steel, R.G.D., dan J. Torrie. 1991, Prinsip dan Prosedur Statistika Suatu Pendekatan Biometrik, Alih Bahasa Bambang Sumantri, PT Gramedia Pustaka Utama, Jakarta. 51–62.
- Widowati, W., Sastiono, A., dan Rumampuk, R.J. 2008. Efek Toksik Logam. Penerbit Andi Yogyakarta, Yogyakarta. 309–325.