

# FRAGMENTASI DNA SPERMATOZOA PADA TIKUS JANTAN(*RATTUS NORVEGICUS*) DIABETES MELLITUS YANG DIINDUKSI STREPTOZOTOCIN DAPAT DITURUNKAN DENGAN PEMBERIAN SUSPENSI BUBUK KEDELAI KUNING

Wahyu Purwaningsih<sup>1</sup>, Siswanto<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Stikes Aisyiyah Surakarta

Jl. KH. Dewantara No.10 Kentingan Jebres Surakarta

<sup>2</sup>Akademi Keperawatan PPNI Surakarta

## **Abstract**

*Diabetes mellitus disease is one of the degenerative diseases of the year rise and cause various complications. One complication is the distrupsion in the male reproductive system. Every effort began in earnest one with back to nature. Yellow soybean is one of alternative plants that can be utilized because of its content which is useful as anticarcinogenic, antioxidant, and antilipidemik antiabetik. The aims of this study was to measure sperm DNA fragmentation levels of blood glucose, plasma MDA due to a suspension of powdered soy on male rat streptozotocin-induced diabetes mellitus. This research is purely experimental, post test only control group design on white male Wistar rats. The sample consisted of 30 male rats (*Rattus norvegicus*) aged 6-7 weeks weighing 150-300 grams were divided into five groups, namely K1: not induced with STZ and were not given a yellow suspension of soy powder, K2: STZ-induced and not given yellow soybean powder suspension, K3: given a dose of yellow soybean powder suspension 200 mg/kg/day after STZ-induced hyperglycemia and occurs, K4 is given a dose of yellow soybean powder suspension 400 mg/kg/ day after STZ-induced hyperglycemia and occur, given K5 yellow soybean powder suspension dosage 800 mg/kg/day after STZ-induced and occurs hiperglikemi. Before and after treatment was examined for glucose and MDA, the end of the treatment of sperm retrieved from cauda epididymis and was examined for DNA fragmentation by using acridine orange staining. The results of data analysis, ANOVA and t-test showed that there were differences in mean blood glucose, MDA and a good percentage of spermatozoa between groups ( $p = 0,000$ ). The mean sperm DNA fragmentation in STZ-induced diabetic rats fed soybean powder yellow suspension was lower than that which is not given a yellow soybean powder suspension. Giving a yellow suspension of soy powder can lower blood glucose levels and MDA significantly in streptozotocin-induced diabetic rats*

**Key words:** Soybean yellow, sperm DNA fragmentation, Diabetes mellitus

---

## **PENDAHULUAN**

Dampak positif pembangunan menimbulkan adanya pergeseran pola penyakit di Indonesia. Seiring dengan kemakmuran yang meningkat mempengaruhi pola makan dan gaya hidup seseorang. Pola makan dengan komposisi makanan yang terlalu banyak mengandung protein, lemak, gula, garam dan gaya hidup yang sangat sibuk, duduk di belakang meja menyebabkan tidak adanya kesempatan untuk rekreasi atau olah raga sehingga menyebabkan tingginya angka penyakit. Salah satunya mengakibatkan penyakit metabolik seperti DM pada usia muda yang notabene adalah usia produktif. Kelainan metabolik pada DM dihubungkan dengan patofisiologi pada banyak sistem organ. Insiden penyakit ini meningkat cepat. Diabetes Mellitus bisa mengakibatkan komplikasi mikrovaskuler dan makrovaskuler.

Penderita DM terpapar dengan stress oksidatif dan berbagai komplikasi DM merupakan akibat dari stress oksidatif. Diabetes melitus telah lama dikenal dapat mengganggu kesuburan pria dari jalur spermatogenesis dan fungsi ereksi. Baru-baru ini dilaporkan bahwa pria diabetes lebih tinggi secara signifikan memiliki tingkat fragmentasi DNA sperma karena peningkatan stres oksidatif (Agbaje, 2007). Penyebab kerusakan DNA spermatozoa belum bisa diterangkan dengan jelas. Penyebab kerusakan DNA spermatozoa ini meliputi : faktor hormonal, kekurangan protamine , faktor umur , infeksi, tingginya kadar oksigen reaktif spesies , paparan zat kimia/paparan racun, rokok, obat-obatan, testis hipertermia, varikokel, apoptosis.

Pemanfaatan Tumbuhan sebagai salah satu alternatif pilihan. Kedelai kuning merupakan salah satu alternatif tumbuhan yang dapat dimanfaatkan karena kandungannya yang bermanfaat sebagai antikarsinogenik, antioksidan, antibiabetik dan antilipidemic. Kacang kedelai dikenal sebagai makanan terbaik kadar proteinnya, dapat mencapai 35 persen daripada beratnya protein yang terkandung dalam kedelai Protein yang terkandung dalam kedelai kuning diantaranya yaitu asam amino arginin dan glisin, kedua asam amino ini merupakan komponen penyusun hormon insulin dan glukagon yang diskresi oleh kelenjar pankreas dalam tubuh kita. Dalam penelitian Patel (1999), arginin dapat memacu terjadinya pemecahan gula dengan menghambat agen pengganggu untuk memperbesar aktifitas metabolik dan penyedia energi untuk aktifitas sel sperma. Scharchter (1973) juga telah membuktikan bahwa arginin dibutuhkan untuk sintesis protein yang dapat meningkatkan replikasi sel sperma. Isoflavon dan saponin dalam kedelai memiliki efek dalam mengurangi peroksidasi lemak, sehingga dapat mencegah terjadinya atherogenesis yang mampu mencegah dan mengobati berbagai macam penyakit diantaranya adalah hipertensi dan DM. Selain itu, kacang kedelai juga untuk melancarkan metabolisme, melancarkan pencernaan, merupakan nutrisi pelengkap, meningkatkan sistem imunitas, memperkuat struktur matrix tulang, mencegah obesitas, mencegah penyakit ginjal, mengurangi gejala jantung koroner, mengurangi gejala stroke, mengurangi gejala rematik dan asam urat. Isoflavon juga telah terbukti dalam penelitian dapat menurunkan *oksidasi in vivo*, merangsang pembentukan *nitric oxide* (NO), memperbaiki *compliance* arterial sistemik dan mengatur keseimbangan garam dan air (Quan, 2009).

## **METODE PENELITIAN**

Jenis penelitian ini adalah eksperimen murni , *post test only control group design* terhadap tikus putih jantan galur wistar. Sampel terdiri dari 30 ekor tikus jantan galur wistar usia 6-7 minggu dengan berat badan 150 - 300 gram yang dibagi menjadi 5 kelompok, yaitu K1 : tidak diinduksi STZ dan tidak diberi suspensi bubuk kedelai kuning , K2 : diinduksi STZ dan tidak diberi suspensi bubuk kedelai kuning, K3 : diberi suspensi bubuk kedelai kuning dosis I (200 mg/kgBB/hr) setelah diinduksi STZ dan terjadi hiperglikemi, K4 yang diberi suspensi bubuk kedelai kuning dosis II (400 mg/kgBB/hr) setelah diinduksi STZ dan terjadi hiperglikemi, K5 yang diberi suspensi bubuk kedelai kuning dosis III (800 mg/kgBB/hr) setelah diinduksi STZ dan terjadi hiperglikemi. Sebelum diinduksi STZ, sebelum dan sesudah perlakuan dilakukan pemeriksaan glukosa dan MDA, Pada akhir perlakuan Sperma diambil dari Kauda epididimis dan dilakukan pemeriksaan Fragmentasi DNA dengan pengecatan menggunakan *acridine orange*.

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain : Kandang tikus terbuat bahan plastik dengan ukuran 18 cm x 24 cm x 25 cm beserta tempat makan dan tempat minum, kanul spuit untuk memasukkan suspensi bubuk kedelai kuning, alat pembuatan bubuk kedelai (kompor, mesin pengiling, wajan), spuit injeksi, timbangan digital, kandang metabolik, tabung kapiler dan tempat sampel berisi EDTA, sentrifuge, spektrofotometer, tabung sperma steril, tabung reaksi, mikroskop fluorescence, pipet dan mikropipet dan tabung *Polypropen* 13 ml, tikus putih jantan galur wistar, usia 6-7 mg, berat badan 150 – 300 gr sebanyak 30 ekor yang didapat dari LPPT UGM, sperma tikus, reagen GOD PAP, aquades, pakan dibuat khusus dengan komposisi terlampir, streptozotolin merk MP Biomedical inc, bufer sitrat untuk melarutkan STZ, bubuk Kedelai kuning (*glycine max*), reagen HEPES untuk pencucian sperma dan media spermatozoa, acridine orange sebagai pendeteksi kerusakan DNA, Asam fosfat, TEP standart dan larutan TBA.

Pengukuran data dilakukan dengan cara sebagai berikut :

a. Analisis fragmentasi DNA

Sejumlah 5  $\mu$ l sampel dari setiap sampel percobaan dicampurkan dengan 5  $\mu$ l larutan acridine orange. Setelah dicampur lalu diaduk dan dibawah mikroskop fluorescence dengan pembesaran 10X. Pengamatan dilakukan sebanyak 3 lapang pandang. Pada pengamatan akan tampak inti sperma berwarna hijau yang menunjukkan DNA utuh sedangkan inti spermatozoa berwarna merah menunjukkan yang rusak. Hasil akhir dinyatakan dalam persentase spermatozoa dengan DNA utuh dari 100 spermatozoa.

b. Pengukuran kadar glukosa

Serum yang diperoleh diambil sebanyak 10 µl kemudian ditambahkan 1 ml reagen GOD-PAP (*Glukosa Oksidase – Phenol Amino Peroksidase*) , divertek selama 5 detik kemudian diinkubasi pada suhu 37° C selama 10 menit. Absorbansi diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 505 nm. Hasil dinyatakan normal bila kadar glukosa darah 50-135 mg/dl

c. Pengukuran kadar MDA

Malondialdehid diukur dengan metode *Thiobarbituric Acid Reactive Substance* (TBARS), yakni mengukur konsentrasi *Thiobarbituric Acid Reactive Substance*. Asam fosfat sebanyak 750 µl dimasukkan dengan pipet kedalam tabung *Polypropen* 13 ml. Kemudian ditambah 50 µl TEP standar/pengontrol kualitas/sampel plasma/aquades kedalam tabung. Campuran dikocok sampai homogen kemudian ditambahkan 250 µl larutan TBA 40nm. Aquades sebanyak 450 µl ditambahkan kedalam tabung kemudian ditutup rapat. Campuran dididihkan selama satu jam, setelah pemanasan tabung ditempatkan kedalam *ice bath* untuk pendinginan sampel. Sampel yang sudah dingin diaplikasikan kedalam set-pak C 18 colum. Absorbansi diukur dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 532 nm. Hasil dinyatakan normal bila kadar MDA kurang dari 4 nmol/l

Analisa statistik yang dilakukan yaitu untuk mengetahui perbedaan rerata kadar glukosa, kadar MDA dan fragmentasi DNA darah sebelum dan sesudah perlakuan diuji dengan t- tes. Untuk menguji perbedaan rerata glukosa darah, kadar MDA dan fragmentasi DNA pada semua kelompok percobaan. dilakukan analisis varian satu jalur.

**HASIL PENELITIAN**

Berdasarkan hasil penelitian didapatkan rerata kadar glukosa darah, standart deviasi dan uji statistik sebagai berikut :

Tabel 1. Nilai Glukosa Darah Tikus

Kelompok		Mean Kadar glukosa (mg/dl) ± Paired SD	t-test
K 1 (n = 6)	Tanpa perlakuan Hari ke 11	79,83 ± 2,67	0,000
	Tanpa perlakuan Hari ke 44	80,91 ± 2,54	
K 2 (n = 6)	Setelah 4 hari pasca injeksi STZ / Hari ke 11	227,51 ± 4,78	0,066
	Setelah 33 hari pasca injeksi STZ / Hari ke 44	231,67 ± 2,15	
K 3 (n = 6)	Sebelum perlakuan / Hari ke 11	231,29 ± 4,28	0,000
	Sesudah perlakuan / Hari ke 44	169,14 ± 2,88	
K 4 (n = 6)	Sebelum perlakuan / Hari ke 11	231,66 ± 3,91	0,000

K 5 (n = 6)	Sesudah perlakuan/ Hari ke 44	103,87 ± 2,52	0,000
	Sebelum perlakuan/ /Hari ke 11	228,21 ± 5,04	
	Sesudah perlakuan/ Hari ke 44	93,71 ± 0,93	

Setelah dilakukan analisis statistik, diperoleh hasil adanya penurunan kadar glukosa darah perbedaan rerata yang bermakna kadar glukosa darah pada kelompok 1, kelompok 3, kelompok 4 dan kelompok 5, dengan nilai signifikansi  $p = 0,000$ .

Berdasarkan hasil penelitian didapatkan rerata kadar MDA , standart deviasi sebagai berikut :

Tabel 2. Nilai MDA Tikus

Kelompok		Mean Kadar MDA (nm/l) ± SD
Kontrol	K 1 (n = 6)	2,25 ± 0,23
	K 2 (n = 6)	9,99 ± 0,27
Perlakuan	K 3 (n = 6)	4,18 ± 0,32
	K 4 (n = 6)	2,33 ± 0,13
	K 5 (n = 6)	1,87 ± 0,17

Hasil uji t-tes menunjukkan adanya peningkatan kadar MDA pada K2 bila dibandingkan dengan K1.

Hasil pemeriksaan fragmentasi DNA spermatozoa dapat dilihat pada tabel 4 sebagai berikut :

Tabel 4. Rerata dan Standart deviasi Persentase DNA spermatozoa yang masih baik pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan setelah pemberian suspensi bubuk kedelai

Kelompok		Mean DNA spermatozoa baik (%) ± SD
Kontrol	K 1 (n = 6)	92,83 ± 0,98
	K 2 (n = 6)	11,33 ± 0,95
Perlakuan	K 3 (n = 6)	25,17 ± 1,94
	K 4 (n = 6)	43,00 ± 1,67
	K 5 (n = 6)	75,50 ± 3,39

Hasil uji beda rerata pemeriksaan DNA spermatozoa yang masih baik pada kelompok tikus normal, DM dan DM dengan pemberian suspensi bubuk kedelai berbagai dosis menunjukkan rerata yang berbeda secara bermakna dengan nilai signifikan  $p = 0,000$ .

Setelah di analisis lanjut menggunakan Post Hoc Test-Tukey LSD hasilnya pun menunjukkan signifikan. Pada K1(normal) bila dibandingkan dengan K2 (DM) menunjukkan rerata yang berbeda. Pada K2 DNA spermatozoa yang masih baik lebih sedikit dibanding dengan K1.

## **PEMBAHASAN**

Hasil uji beda rerata pemeriksaan DNA spermatozoa yang masih baik pada kelompok tikus normal, DM dan DM dengan pemberian suspensi bubuk kedelai berbagai dosis menunjukkan rerata yang berbeda secara bermakna dengan nilai signifikan  $p = 0.000$ . Setelah di analisis lanjut menggunakan Post Hoc Test-Tukey LSD hasilnya pun menunjukkan signifikan. Pada K1(normal) bila dibandingkan dengan K2 (DM) menunjukkan rerata yang berbeda. Pada K2 DNA spermatozoa yang masih baik lebih sedikit dibanding dengan K1. Faktor yang diduga menyebabkan kerusakan DNA spermatozoa pada K2 ini adalah adanya stres oksidatif yang disebabkan oleh radikal bebas atau ROS. Sumber radikal bebas ini dapat berasal baik dari leukosit ataupun dari spermatozoa. Adapun beberapa penyebab terjadinya stres oksidatif pada sperma diantaranya ada beberapa hal yaitu idiopatik, iatrogenic, infeksi, autoimun, testikular dan penyakit kronik salah satunya adalah DM. Pada keadaan DM seseorang akan mengalami hiperglikemi. Keadaan hiperglikemi yang berkepanjangan akan menyebabkan peningkatan produksi ROS oleh mitochondria, yang kemudian menyebabkan kerusakan strand dari *nuclear DNA*. Kerusakan ini akan mengaktifkan PARP suatu *DNA repair enzyme*, yang kemudian memodifikasi dan menurunkan aktivitas GADPH dengan akibat peningkatan produksi AGEs, aktivasi PKC, aktivasi jalur hexosamine, dan jalur polyol (Kimoto et al, 2003) Selain itu radikal bebas ini dapat berasal dari kebocoran elektron mitokondria sperma. Stres oksidatif yang berupa radikal bebas akan menyebabkan ikatan silang kromatin oksidasi basa DNA dan putusnya ikatan DNA (Lewis SEM dan Aitiken, 2005) Spermatozoa matur hampir tidak memiliki sitoplasma sehingga DNA sperma lebih sensitif terhadap kerusakan yang ditimbulkan oleh ROS. Stres oksidatif akan menginduksi Peroksidasi lemak pada membran yang banyak mengandung asam lemak tidak jenuh sehingga mengurangi keencerannya dan menghasilkan kerusakan pada mitokondria dan DNA(Lewis SEM dan Aitiken, 2005). Pada DNA spermatozoa akan terjadi oksidasi 2-deoxyguanosine menjadi 8-OH-2-deoxyguanosine yang menghasilkan kerusakan DNA dimana nukleotida yang sebelumnya berikatan dengan sitosin akan berpasangan dengan timin

selama replikasi DNA. Implikasi teoritis hasil penelitian ini sejalan dengan hasil pemeriksaan pada MDA yang juga dilakukan pada K2 yang menunjukkan Kadar MDA diatas nilai normal. Pada penelitian ditemukan tingkat kerusakan DNA spermatozoa yang berbeda pada pemberian suspensi bubuk kedelai dengan dosis yang berbeda. Dilihat dari rerata presentase DNA spermatozoa yang masih baik pemberian dosis 800 mg/kgBB menunjukkan fragmentasi DNA spermatozoa lebih rendah bila dibanding dengan pemberian suspensi bubuk kedelai dengan dosis 400 mg/kgBB atau dosis 400 mg/kgBB. Rerata presentase DNA spermatozoa yang masih baik pemberian dosis 400 mg/kgBB menunjukkan fragmentasi DNA spermatozoa lebih rendah bila dibanding dengan pemberian suspensi bubuk kedelai dengan dosis 200 mg/kgBB. Hal ini menunjukkan bahwa peningkatan dosis pemberian suspensi bubuk kedelai mempengaruhi tingkat fragmentasi DNA spermatozoa. Hal ini diduga terjadi akibat aktivitas zat-zat dalam larutan kedelai yang memiliki sifat antioksidan, yaitu isoflapon (rendah genistein) dan saponin. Interaksi kedua antioksidan tersebut dapat mencegah terjadinya reaksi radikal bebas dengan lemak, protein, atau DNA pada sel, maupun memutuskan reaksi rantai dari peroksidasi lemak. isoflapon dapat menangkap oksigen tunggal, radikal peroksil,  $\text{NO}_2$ , OH dan ROS lain kemudian mengubahnya menjadi tidak reaktif. Reaksi tersebut menghasilkan radikal kation ( $\text{Ca}^+$ ) yang dapat mengalami dismutasi atau bereaksi dengan isoflapon bila terdapat di permukaan membran, menjadikan radikal kation tersebut tidak lagi bersifat radikal (Halliwell & Gutteridge, 1999).

## **SIMPULAN**

### **Simpulan**

Rerata fragmentasi DNA spermatozoa pada tikus DM yang diinduksi STZ yang diberi suspensi bubuk kedelai kuning lebih rendah dibanding dengan yang tidak diberi suspensi bubuk kedelai kuning.

### **Saran**

Perlu dilakukan penelitian tentang fragmentasi DNA spermatozoa pada tikus DM dengan metode pemeriksaan fragmentasi DNA spermatozoa yang lebih sensitif (Tunel atau Elektroforesis) dan disertai pengukuran parameter spermatozoa. Selain itu perlu dicoba pemberian kedelai jenis lain untuk pencegahan fragmentasi DNA spermatozoa pada tikus DM.

## DAFTAR PUSTAKA

- Agbaje IM, Rogers DA, McVicar CM, McClure N, Atkinson AB, Mallidis C, Lewis SE. 2007. Insulin Dependant Diabetes Mellitus: Implications For Male Reproductive Function. *Hum Reprod.* 22:1871-1877.
- Halliwell B. & Gutteridge J. 1999. *Free Radical in Biology and Medicine*, Claredon Press, London
- Kimoto K, Suzuki K, Kizaki T, Hitomi Y, Ishida H, Katsuta H, Itoh E, Ookawara T, Suzuki K, Honke K and Ohno H. 2003. Gliclazide Protects Pancreatic  $\beta$ -Cells From Damage By Hydrogen Peroxide. *Biochem Biophys Res Commun.* 303: 112-119
- Lewis SEM dan Aitiken, 2005. DNA Damage To Spermatozoa Has Impacts On Fertilization And Pregnancy. *Cell Tissue Res* 322: 33-41
- Patel AB, Srivastava S, PhandkeRS, Govil G. 1999. Argininacts Asprotectif And Reversal Agent Against Glykolitic Inhibitors In Spermatozoa. *Physiol chem phys MED NMR.* 31 (1):29 - 40
- Schachter A , Goldman JA, Zukerman Z. 1973. Treatmen Of Oligospermi With The Amino Acid Arginin, *J.Urol.* 110: 311-313
- Quan, J., Yin, X and Kanazawa . T. 2009. Efek Of Soybean Hypocotyl Extract On Lipid Peroxidation In GK Rats. *J.Clin Biochem Nutr.* 44(3): 212-217