

HUBUNGAN KADAR MDA SPERMA DENGAN INTEGRITAS MEMBRAN SPERMATOZOA TIKUS (*Rattus norvegicus*) SETELAH PEMAPARAN 2-METHOXYETHANOL

Alfiah Hayati*, Soesanto Mangkoewidjojo**, Aucky Hinting***, Sukarti Moeljopawiro****

*Laboratorium Biologi Reproduksi, Fakultas MIPA UNAIR

**Laboratorium Patologi Klinik, Fakultas Kedokteran Hewan UGM

***Laboratorium Biologi Medik, Fakultas Kedokteran UNAIR

****Laboratorium Biokimia, Fakultas Biologi UGM

ABSTRACT

In the body, 2-methoxyethanol compound may be converted to MAA. MAA is a strong oxidant and may cause oxidation stress in spermatozoa. Oxidation stress is a disturbance on phosphorylation that increases ROS concentration, and it produces lipid peroxide in spermatozoa membrane resulted in high MDA concentration. One of indicator of spermatozoa membrane disturbances is a lack of spermatozoa membrane integrity. The main purpose of this research was to determine the relation ship between MDA concentration in sperm and membrane integrity of spermatozoa in rats. The animal of treated groups (n = 40) were divide into 8 groups of 5 each. The rats were given subcutaneous injection with 0,2 ml of 200 mg/kg/day for 1 day (P₁), 3 days (P₂), 6 days/week (P₃), and 12 days/two weeks (P₄), respectively the control group was injected with physiological saline of the same volume. The concentration of MDA was measured by spectrophotometer and observing membrane integrity used HOS method to watch the spermatozoa response on hypoosmotic condition. The results of the research indicated that 2-ME caused the increasing in sperm MDA concentration and the decrease of spermatozoa membrane integrity. There was negative correlations between MDA concentration and spermatozoa membrane integrity.

Key words: 2-ME, MDA concentration, spermatozoa membrane integrity

PENGANTAR

Infertilitas pria merupakan masalah yang makin meningkat dalam dekade terakhir ini. Di beberapa negara menunjukkan gejala penurunan kualitas sperma yang cukup menyolok pada pria dewasa muda (Hinting, 1996). Salah satu penyebab terjadinya penurunan kualitas ini karena sperma terkontaminasi oleh bahan toksik, di antaranya adalah kelompok senyawa ester ftalat. Ester ftalat sering digunakan sebagai bahan pelentur dalam industri plastik serta pelarut cat, vernis, pewarna, tinta, dan kosmetik (Johanson, 2000). Salah satu senyawa ester ftalat yang paling berbahaya adalah 2-methoxyethyl phthalate (DMEP). Senyawa DMEP dalam tubuh manusia dihidrolisis menjadi 2-methoxyethanol (2-ME) yang selanjutnya akan dioksidasi oleh *alcohol dehidrogenase* menjadi 2-methoxyacetaldehid (MALD), kemudian oleh *aldehid dehidrogenase* diubah menjadi *methoxyacetic acid* (MAA), yang merupakan bahan toksik dan teratogenik (Moslen *et al.*, 1994).

Senyawa 2-ME dapat menyebabkan stres oksidasi pada spermatozoa sehingga menyebabkan kerusakan sel (Millar, 1983) serta pada sistem reproduksi dapat menyebabkan penurunan motilitas dan morfologi spermatozoa (Hayati *et al.*, 2005). Stres oksidasi pada spermatozoa merupakan penyebab utama disfungsi spermatozoa dengan menghambat

proses oksidasi fosforilasi (Sharma, 1999). Oksidasi fosforilasi yang terganggu menyebabkan peningkatan *reactive oxygen species* (ROS) spermatozoa. Kadar ROS yang tinggi dalam sel dapat mengoksidasi lipid, protein, dan DNA. Lipid membran plasma spermatozoa memiliki fosfolipid dengan kadar yang tinggi sehingga menyebabkan spermatozoa sangat rentan terhadap ROS (Sanocka *et al.*, 2004). Hal ini menunjukkan bahwa membran spermatozoa adalah target utama ROS dan lipid merupakan sasaran yang potensial (Lamarande *et al.*, 1997). Oksidasi lipid (*lipid peroksidase*) pada membran spermatozoa menghasilkan senyawa *malondialdehyde* (MDA), yang bersifat toksik pada sel sehingga menyebabkan kerusakan membran spermatozoa. Membran spermatozoa yang rusak akan menyebabkan penurunan integritas membran spermatozoa, sehingga pada akhirnya menyebabkan penurunan kualitas sperma. Berdasarkan uraian di atas maka dilakukan penelitian untuk melihat hubungan MDA sperma dengan integritas membran spermatozoa setelah pemaparan dengan 2-ME dengan variasi lama waktu pemaparannya.

BAHAN DAN CARA KERJA

Hewan coba yang digunakan adalah 40 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan, strain Wistar, umur 3 bulan, berat

badan 125–135 gram, dan dalam kondisi sehat. Tikus diletakkan dalam kandang hewan, temperatur 25–26 °C dengan kelembaban udara 50% dan siklus cahaya \pm 12 jam gelap dan \pm 12 jam terang. Air minum tikus diberikan secara *ad libitum* dari air PDAM dan pakan diberikan setiap hari berupa pelet Hi-Pro-Vite 524-2 produksi PT Charoen Pokphand Indonesia, Surabaya. Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah senyawa 2-ME produksi Wako Co Japan. Pada pemeriksaan MDA digunakan asam trikloroasetat, natrium thiobarbiturat 1% dan asam klorida. Pemeriksaan integritas membran spermatozoa dilakukan dengan metode HOS tes. Bahan untuk *Hypoosmotic swelling* (HOS) tes diperlukan larutan eosin 1% dan negrosin 10% (WHO, 1999, Zeyneloglu *et al.*, 2000).

Tikus dibagi 4 kelompok perlakuan (P_1 , P_2 , P_3 , dan P_4) dan 4 kelompok kontrol (K_1 , K_2 , K_3 , dan K_4), masing-masing terdiri atas 5 ekor. Tikus kelompok perlakuan pertama (P_1) disuntik 0,2 ml 2-ME dosis 200 mg/kgbb/hari secara subkutan selama 1 hari, P_2 selama 3 hari, P_3 selama 6 hari/minggu, dan P_4 selama 12 hari/2 minggu. Kelompok kontrol (K_1 sampai K_4) diberi larutan fisiologis dengan volume dan cara pemberian yang sama dengan kelompok perlakuan.

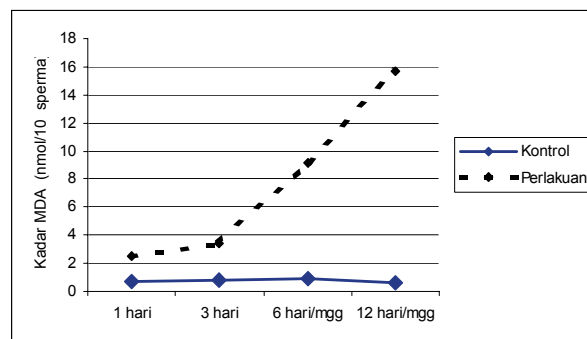
Setelah perlakuan berakhir hewan coba dieutanasi dengan kloroform, kemudian dilakukan nekropsi, spermatozoa diambil dari kauda epididimis dan vas deferens. Koleksi spermatozoa dilakukan dengan cara modifikasi, yang pada garis besarnya seperti berikut. Epididimis bagian kauda dan vas deferens dari masing-masing kelompok dipisahkan dari testisnya, kemudian diletakkan ke dalam cawan Petri yang berisi 4 ml larutan fisiologis. Spermatozoa dikoleksi dengan cara *flusing* dengan menggunakan mikroskop stereo, jarum suntik yang mengandung 1 ml larutan fisiologis dimasukkan ke lubang vas deferens. Selanjutnya jarum ditekan pelan sehingga larutan fisiologis dapat mendorong spermatozoa yang ada di vas deferens dan epididimis, suspensi spermatozoa siap untuk di periksa kadar MDA sperma dan integritas spermatozoa.

Pengukuran kadar MDA dilakukan dengan pemeriksaan sperma yang didapatkan dari kauda epididimis. Sperma dipisahkan dari protein yang ada di sekitarnya dengan penambahan 0,5 ml asam trikloroasetat 20% kemudian disentrifugasi selama 10 menit pada 5000 rpm untuk mempercepat pengendapan protein. Supernatan sperma sebanyak 1000 ml ditambah 200 l natrium thiobarbiturat 1% dan 8,8 ml asam klorida 1 N pada labu ukur. Larutan tersebut kemudian diinkubasi di atas penangas air selama 135 menit dengan suhu 50 °C. Setelah itu larutan berwarna yang mengandung MDA tersebut diamati dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 531,4 nm (Sudjarwo, 2001).

Pengamatan integritas membran spermatozoa dilakukan dengan uji HOS tes. Suspensi sperma 0,5 ml ditambah 4,5 ml larutan pembengkak (0,735 gram *sodium citrat dihydrate* ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) dan 1,351 gram fruktosa dalam 100 ml air destilasi) dicampur dengan hati-hati menggunakan pipet, kemudian diinkubasi di dalam inkubator CO_2 pada suhu 37 °C selama 60 menit. Setelah diinkubasi larutan tersebut diambil satu tetes dan diletakkan pada gelas objek selanjutnya ditambahkan satu tetes larutan eosin 1% dan negrosin 10%. Kemudian dibuat preparat ulas dan diamati di bawah mikroskop fase kontras dengan pembesaran 400 \times . Integritas spermatozoa dihitung dari jumlah spermatozoa yang mengembang setiap 100 spermatozoa (%) (WHO, 1999).

HASIL

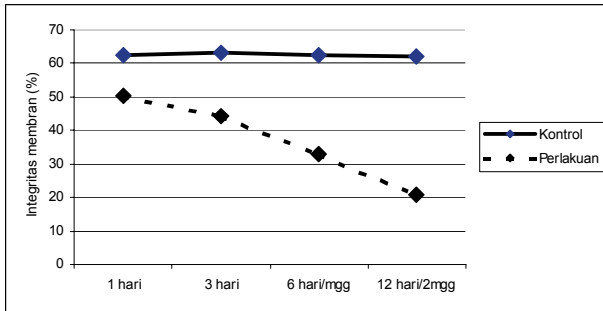
Pemberian 2-ME menyebabkan peningkatan kadar MDA. Semakin lama waktu pemaparan 2-ME, kadar MDA semakin meningkat. Hasil uji Mann-whitney menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antara kadar MDA kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan (K_n - P_n), tetapi antara kelompok kontrol (K_1 sampai K_4) dan juga kelompok perlakuan 1 hari dengan 3 hari (P_1 - P_2) tidak terdapat perbedaan yang signifikan (Gambar 1).



Gambar 1. Rata-rata kadar MDA sperma tikus pada kelompok kontrol dan perlakuan dengan variasi lama pemaparan 2-ME.

Pemberian 2-ME menyebabkan penurunan persentase integritas normal membran spermatozoa. Penurunan integritas membran terjadi dengan bertambahnya lama waktu pemaparan 2-ME. Hasil analisis varian menunjukkan perbedaan yang signifikan antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan (K_n - P_n); antara kelompok kontrol (K_1 - K_4); dan antara kelompok perlakuan (P_1 - P_4) (Gambar 2).

Terdapat korelasi yang negatif antara kadar MDA dan integritas spermatozoa setelah pemaparan 2-ME. Semakin tinggi kadar MDA sperma semakin rendah persentase integritas normal membran spermatozoa.



Gambar 2. Rata-rata persentase integritas membran spermatozoa tikus pada kelompok kontrol dan perlakuan dengan variasi lama pemaparan 2-ME.

PEMBAHASAN

Malondialdehyde (MDA) adalah suatu senyawa yang merupakan hasil dari oksidasi lipid yang menjadi peroksida. Pengukuran kadar MDA merupakan cara pengukuran aktivitas radikal bebas secara tidak langsung, sebab yang diukur adalah produk dari reaksi radikal bebas bukan pengukuran radikal bebas secara langsung (Edyson, 2002).

Hasil pengukuran pada penelitian ini menunjukkan adanya peningkatan kadar MDA sperma pada kelompok perlakuan dibandingkan dengan kontrol ($p < 0,05$). Hal ini dikarenakan MAA sebagai hasil metabolisme 2-ME merupakan oksidan yang kuat dan dapat menyebabkan stres oksidasi pada spermatozoa. Stres oksidasi pada spermatozoa menyebabkan gangguan pada proses oksidasi fosforilasi sehingga terjadi peningkatan produksi ROS spermatozoa. Peningkatan ROS ini disebabkan karena antioksidan yang tersedia dalam sperma tidak mampu lagi mengubah oksigen reaktif (O^*) menjadi senyawa yang netral (O_2). Sperma mengandung antioksidan untuk melawan efek dari peroksidasi lipid dan melindungi kerusakan sperma. Antioksidan tersebut memberikan pertahanan yang sangat efektif terhadap peroksidasi lipid, tetapi stres oksidasi yang berat dapat berakibat pada habisnya antioksidan yang tersedia (Jeffery, 1991). Adanya peroksidasi lipid pada membran spermatozoa menghasilkan senyawa *malondialdehyde* (MDA). Dengan demikian kadar MDA yang tinggi menunjukkan terjadinya kerusakan membran spermatozoa. Keadaan ini diindikasikan dengan menurunnya persentase integritas normal membran spermatozoa. Integritas membran spermatozoa dapat diamati dengan melihat respons spermatozoa pada kondisi hiposmotik. Metode HOS tes berfungsi untuk menguji keutuhan membran plasma, bila membran normal akan mengalami pembengkakan sedang bila membrannya rusak atau integritasnya rendah tidak mengembang.

Dari hasil penghitungan didapatkan penurunan persentase integritas membran spermatozoa setelah pemberian 2-ME. Hal ini dikarenakan membran plasma spermatozoa terdiri dari lipid ganda yang mengandung asam lemak tidak jenuh yang sangat rentan terhadap ROS sehingga menimbulkan peroksidasi lipid (Sjodin *et al.*, 1990). Hasil akhir peroksidasi lipid pada membran spermatozoa adalah terputusnya rantai asam lemak tidak jenuh dan menghasilkan MDA yang bersifat toksik terhadap sel. Senyawa MDA menyebabkan kerusakan membran spermatozoa dan penurunan integritas membran spermatozoa sehingga terjadi penurunan kualitas sperma (Sanocka *et al.*, 2004). Terdapat korelasi negatif antara kadar MDA sperma dan integritas membran spermatozoa dapat dijelaskan bahwa tingginya kadar MDA akan menurunkan integritas membran sel dan kerusakan spermatozoa yang menyebabkan terjadinya penurunan kualitas sperma, sehingga makin tinggi kadar MDA, persentase integritas normal membran spermatozoa makin rendah.

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa senyawa 2-ME yang diberikan pada tikus jantan menyebabkan terjadinya peningkatan kadar MDA sperma dan penurunan integritas spermatozoa sehingga dapat menurunkan kualitas sperma. Semakin lama pemaparan 2-ME semakin rendah kualitas spermanya.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kami ucapkan kepada Pimpinan Proyek DUE-Like Batch III Universitas Airlangga yang mendanai penelitian ini dan para mahasiswa (Jean, Mustaeja, Ratri, Ulul, Ergina, Yuyun, dan Pepe) atas kerja samanya selama proses penelitian berjalan.

KEPUSTAKAAN

- Edyson, 2002. Pengaruh pemberian kombinasi Vit C dan E terhadap aktivitas superoxide dismutase (SOD) dan kadar malondialdehyde (MDA) pada eritrosit rattus norvegicus galur winstar yang diinduksi L-Tiroksin. *Tesis*, Universitas Airlangga. Surabaya.
- Hayati A, Any Devi, Rai Pidada IB, 2005. Spermatozoa Motility and Morphological Recovery Process in Mice after the Induction of 2-Methoxyethanol, *Journal of Folia Medica Indonesiana*, 41(2): 90–95.
- Hinting A, 1996. Perkembangan teknik rekayasa reproduksi. *Seminar penanganan Andrologik pada infertilitas dan impotensi*. Poli andrologi RSUD Dr. Soetomo Lab Biomedik FK Unair, Surabaya.
- Jeffery EH, 1991. Biochemical mechanism of toxic cell injury. In: *Handbook of toxicologic pathology* (Haschek WM, Rousseaux CG eds). Urbana: Academic Press Inc, pp. 49–87.

- Johanson G, 2000. Toxicity review of ethylene glycol monomethyl ether and its acetate ester. *Critical Review in Toxicology* 30(3): 307–45.
- Lamarinde E, Jiang H, Zini A, Kodama H, dan Gagnon C, 1997. Reactive oxygen species and sperm physiology. *Review of Reproduction* 2: 48–54.
- Moslen MT, Kaphalia L, Balasubramanian H, Yin YM, dan Au WW, 1995. Species differences in testicular and hepatic biotransformation of 2-methoxyethanol. *Toxicology* 96: 217–24.
- Sanocka D, dan Kurpisz M, 2004. Reactive oxygen species and sperm cells. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2(12): 1–7.
- Sardjito, 2003. Pengaruh sentrifugasi pada spermatozoa sapi terhadap integritas membran, resistensi dan kelayakan kondisi pada proses kapasitasi in vitro. *Tesis*. Universitas Airlangga Surabaya.
- Sharma RK, dan Agarwal A, 1996. Role of reactive oxygen species in male infertility. *Journal of Urology* 48(6): 835–50.
- Sjodin B, Westing YH, Apple FS, 1990. Biochemical mechanisms for oxygen free radical formation during exercise. *Spons Medicine* 10(4): 236–54.
- Sudjarwo, 2001. Peran mitokondria pada fungsi spermatozoa. *Disertasi*, Universitas Airlangga. Surabaya.
- Suryohudoyo P, 2000. *Kapita selekta ilmu kedokteran molekuler*. Jakarta: Sagung Seto. 31–37.
- WHO, 1999. *WHO Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction*, 4th ed, USA Cambridge University Press. 68–78.
- Zeyneloglu HB, Baltaci V, Ege S, Haberal A dan Batioglu S, 2000. Detection of chromosomal abnormalities by Fluorecent in-situ hybridization in immotile viabel spermatozoa determined by hypo-osmotic sperm swelling tes. *Human Reproduction* 15: 853–56.

Reviewer: **Tim Reviewer**
Seminar Biologi Nasional tahun 2005
Surabaya

EFEK RIMPANG TEMULAWAK TERHADAP JUMLAH ERITROSIT, KADAR PB DAN CD DALAM DARAH TIKUS YANG DIBERI LARUTAN $Pb(NO_3)_2$ dan $CdCl_2$

Sugiharto

Jurusan Biologi - FMIPA, Universitas Airlangga - Surabaya

ABSTRACT

A study on rat (*Rattus norvegicus*) was carried out to determine the effect of tumeric rhizome infuse to examination the number of erythrocyte, and the concentration of lead and cadmium which administrated $Pb(NO_3)_2$ and $CdCl_2$ solution. Pb and Cd were presumed to be link at sulphhydryl groups that may caused an inhibition to several kind of enzymatic process, such as erythropoiesis. Twenty male rats were used in this experiment. They were divided into five treatment groups, i.e. (I) control (treated with 1 ml aquadest from day 1st to day 21st); (II) treated with 1 ml 100 ppm $Pb(NO_3)_2$ solution from day 1st to day 21st; (III) treated with 1 ml 100 ppm $Pb(NO_3)_2$ solution from day 1st to day 21st and continued with 1 ml tumeric rhizome infuse from day 22nd to day 42nd; (IV) treated with 1 ml 100 ppm $CdCl_2$ solution from day 1st to day 21st; (V) treated 1 ml 100 ppm $CdCl_2$ solution from day 1st to day 21st and continued with 1 ml tumeric rhizome infuse from day 22nd to day 42nd. The treatment was given orally every morning using a special modified syringe. After day 22nd and 42nd treatment, the blood samples were taken about 3 ml by heart puncture. The number of erythrocyte was determined using haemocytometer Improved Neubauer, Pb and Cd concentration were determined using by AAS. Data were analyzed by ANOVA and LSD test ($\alpha = 0, 05$). The result of this study shows that on doses of 10% of tumeric rhizome infuse causes significantly decreased of Pb concentration and increasing number of erythrocyte, but not for Cd concentration which administrated by $Pb(NO_3)_2$ and $CdCl_2$ solution.

Key words: tumeric rhizome, erythrocyte, lead, cadmium

PENGANTAR

Industrialisasi Indonesia yang tumbuh dengan cepat dapat menimbulkan dampak negatif bagi masyarakat, yaitu pencemaran lingkungan. Salah satu bahan pencemar yang berbahaya adalah logam berat. Logam berat dapat masuk dalam tubuh manusia melalui makanan (yang terkontaminasi alat masak/makanan kaleng), pernafasan (akibat asap pabrik/ industri dan limbah), atau tanaman pangan yang diberi pupuk dan pestisida yang mengandung logam berat. Beberapa logam berat dapat terlibat di dalam proses enzimatik dan menyebabkan kerusakan jaringan/organ tubuh, misalnya Cu, Zn, Hg, Cd, dan Pb (Darmono, 1995).

Timbal (Pb) dan Cadmium (Cd) dapat berikatan dengan gugus -SH dari suatu enzim. Hal ini merupakan mekanisme utama toksisitas logam (Fuente, *et al.*, 2002). Salah satu indikator terjadinya keracunan logam berat dalam jaringan/organ yang paling mudah dan nyata untuk diamati adalah perubahan nilai pemeriksaan darah (Linder, 1992).

Pb yang berikatan dengan eritrosit menyebabkan defisiensi enzim *Glu-6-P Dehidrogenase* (Glu-6-PD) dan penghambatan enzim *Pirimidin-5'-nukleotidase*, sehingga terjadi degradasi RNA dan ribosom eritrosit. Keadaan ini dapat mengakibatkan eritrosit menjadi rapuh (terjadi kerusakan membran sel), mengurangi kemampuan eritropoiesis, mengurangi masa hidup eritrosit matang, dan

menyebabkan terjadinya anemia hemolitik (Darmono, 1995; Lu, 1995).

Menurut Darmono (1995) pemberian Cd dosis tinggi dalam pakan dapat menyebabkan penurunan ion Fe dan mengakibatkan gejala anemia sebab terdapat penurunan daya absorpsi ion Fe dari sel epitel usus, sehingga terjadi kompetisi antara Cd dengan Fe pada protein carier logam (terutama protein Feritin). Kadar feritin yang rendah merupakan indikator spesifik defisiensi Fe, baik untuk terjadinya anemia atau tidak. Hal ini dapat mengakibatkan penurunan nilai hematokrit dan *mean corpuscular*, serta kadar Hb (Ros dan Mwanri, 2003).

Indonesia merupakan salah satu negara yang kaya penghasil bahan tanaman obat tradisional, salah satunya adalah tanaman temulawak. Komponen utama yang terkandung dalam rimpang temulawak adalah *curcumin*. Ditinjau dari stuktur kimianya, ternyata *curcumin* dapat berpotensi sebagai *chelating agent* karena mempunyai struktur elektron yang bebas dan memungkinkan untuk mengikat logam berat (Pan *et al.*, 1999).



Gambar 1. Struktur molekul curcumin (Pan, *et al.*, 1999).

Berdasarkan fakta di atas, maka peneliti tertarik untuk mengetahui efek rimpang temulawak terhadap jumlah eritrosit dan kadar logam (Pb dan Cd) dalam darah tikus yang diberi perlakuan larutan $Pb(NO_3)_2$ dan $CdCl_2$.

Hasil penelitian ini diharapkan dapat mengungkapkan potensi infus rimpang temulawak sebagai upaya alternatif penanganan keracunan Pb dan Cd (ditinjau dari pemeriksaan jumlah eritrosit, kadar Pb dan Cd), dan memberikan landasan empiri kepada masyarakat khususnya kelompok masyarakat yang berisiko tinggi keracunan Pb dan Cd.

BAHAN DAN CARA KERJA

Bahan

Dua puluh ekor tikus putih jantan berumur sekitar 8 minggu dengan berat 140–160 gram, diaklimasikan selama 7 hari. Selama masa aklimasi dan masa perlakuan, tikus putih diberi pakan dan minum yang sama, yaitu Par L produksi Comfeed sebagai pakan dan air PDAM sebagai air minum.

Larutan uji yang diberikan adalah larutan timbal nitrat $Pb(NO_3)_2$ dan kadmium klorida ($CdCl_2$) dengan dosis 100 ppm. Penentuan dosis berdasarkan penelitian sebelumnya (Sugiharto dan Darmanto, 2004). Untuk membuat larutan timbal 100 ppm, terlebih dulu dihitung berat $Pb(NO_3)_2$ yang akan dilarutkan dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Berat } Pb(NO_3)_2 \text{ (mg)} =$$

$$\frac{\text{Berat senyawa } Pb(NO_3)_2}{\text{Berat atom Pb}} \times 100 \text{ ppm}$$

Larutan timbal 100 ppm diperoleh dengan melarutkan timbal dari hasil perhitungan di atas pada akuades 1000 ml. Selanjutnya dengan cara yang sama dilakukan untuk membuat larutan kadmium 100 ppm.

Pembuatan infus rimpang temulawak 10% dilakukan dengan cara menimbang serbuk rimpang temulawak sebanyak 10 gram dan dilarutkan dalam akuades 100 ml ke dalam gelas Becker. Gelas Becker dipanaskan dalam penangas air selama 15 menit pada suhu $90^\circ C$ dan sesekali diaduk. Larutan yang masih panas disaring dengan kertas saring dan ditambahkan akuades secukupnya sehingga diperoleh volume 100 ml.

Cara Kerja

Setelah mengalami masa aklimasi selama 7 hari, setiap kelompok yang terdiri atas 4 ekor tikus diberi perlakuan sebagai berikut.

Kelompok Perlakuan	Pemberian Perlakuan	
	Hari ke-1–21 (3 minggu)	Hari ke-22–42 (3 minggu)
Kontrol	1 ml aquades	---
Pb	1 ml $Pb(NO_3)_2$ -100 ppm	---
Pb + Temulawak	1 ml $Pb(NO_3)_2$ -100 ppm	1 ml infus rimp temulawak 10%
Cd	1 ml $CdCl_2$ -100 ppm	---
Cd + Temulawak	1 ml $CdCl_2$ -100 ppm	1 ml infus rimp temulawak 10%

Perlakuan diberikan setiap pagi hari (sekitar pukul 08.00–09.00) secara *gavage* dengan menggunakan spuit injeksi yang mempunyai kanula pada ujungnya. Pada hari terakhir perlakuan, tikus diambil darahnya melalui teknik *Heart Puncture (intra cardiac)* menggunakan jarum suntik yang telah dibasahi bagian dalamnya dengan larutan *Ethilen Diamine Tetra Acetic Acid* (EDTA). Darah yang diambil adalah sebanyak 3,0 ml kemudian dimasukkan ke dalam botol vial yang telah diisi serbuk EDTA, larutan dikocok di atas meja dengan gerakan melingkar dengan tujuan agar darah tidak cepat menggumpal. Kemudian dilakukan penghitungan jumlah eritrosit, kadar Pb, dan Cd.

Penghitungan Jumlah Eritrosit

Penghitungan jumlah eritrosit dilakukan menggunakan mikroskop, hemositometer *improved Neubauer* dan reagensia larutan Hayem. Urutan cara kerjanya adalah sebagai berikut (Bijanti, 2002): sampel darah dihisap dengan pipet eritrosit dari Thoma sampai tanda 0,5 dan diencerkan sampai tanda 101 menggunakan larutan Hayem sehingga pengencerannya 200 kali (1:200). Darah dan larutan Hayem dicampur dengan cara menggoyang pipet tegak lurus dengan sumbu pipet. Darah yang telah diencerkan dalam pipet dibuang 4 tetes pertama, kemudian diisikan pada hemositometer dan ditutup gelas penutup lalu dibiarkan 3 menit agar eritrosit mengendap. Hemositometer yang sudah berisi darah diamati di bawah mikroskop, dengan perbesaran lensa objektif $10\times$, sehingga garis batas kamar hitung terlihat jelas. Setelah tampak jelas, lensa objektif diubah $40\times$, eritrosit dihitung dalam 5 kotak bujur sangkar kecil yang berada di tengah.

$$\Sigma \text{ eritrosit / mm}^3 = \frac{\Sigma \text{ eritrosit}}{80} \times 4000 \times 200$$

Pengukuran Kadar Pb dan Cd dalam Darah

Pemeriksaan kadar logam (Pb dan Cd) dalam darah dengan menggunakan AAS (Bijanti, 2002). Cara kerja pengukuran kadar logam adalah sebagai berikut: sampel

darah yang sudah diberi antikoagulan EDTA, ditambahkan 1 ml H_2SO_4 pekat dan 5 ml $H_2ClO_4 : HNO_3$ (dengan perbandingan 2:5). Larutan dipanaskan dalam *oil bath* sampai jernih, kemudian didinginkan pada suhu kamar. Larutan ditambahkan 5 ml larutan standar serta akuades sampai 50 ml, dan siap dibaca pada AAS. Kadar logam (Pb dan Cd) dalam darah dinyatakan dengan mg/L darah.

Percobaan ini merupakan percobaan eksperimental dengan menggunakan metode rancangan acak lengkap (RAL). Data yang dianalisis adalah jumlah eritrosit, kadar Pb dan Cd. Data dianalisis menggunakan SPSS dengan uji Anova dan LSD ($\alpha = 0,05$) untuk mengetahui adanya perbedaan antar-rerata kelompok perlakuan.

HASIL

Hasil pengamatan dan penghitungan data penelitian “efek rimpang temulawak terhadap jumlah eritrosit, kadar Pb dan Cd dalam darah tikus yang diberi perlakuan larutan $Pb(NO_3)_2$ dan $CdCl_2$ ” dapat dirangkumkan dalam tabel 1 dan 2 berikut ini.

Tabel 1. Data kadar Pb dalam darah dan jumlah eritrosit tikus yang hanya diberi $Pb(NO_3)_2$ maupun yang diberi $Pb(NO_3)_2$ dan temulawak

Perlakuan	Ulangan	Kadar Pb (ppm)	Jumlah Eritrosit ($\times 10^6/mm^3$)
Kontrol	1	0,183	7,35
	2	0,099	7,52
	3	0,067	9,85
	4	0,449	7,25
	Rerata	0,20 ($\pm 0,17$)	7,99 ($\pm 1,41$)
Timbal	1	0,399	6,78
	2	0,217	6,68
	3	0,483	4,81
	4	0,666	6,31
	Rerata	0,44 ($\pm 0,18$)	6,15 ($\pm 0,67$)
Timbal + Temulawak	1	0,12	7,41
	2	0,22	6,41
	3	0,08	6,34
	4	0,13	6,69
	Rerata	0,14 ($\pm 0,06$)	6,71 ($\pm 0,42$)

Setelah dilakukan penghitungan uji Anova untuk perlakuan $Pb(NO_3)_2$ terhadap jumlah eritrosit, ternyata $p < 0,05$ sehingga dapat dikatakan bahwa terdapat perbedaan nyata antara berbagai kelompok perlakuan bila dibandingkan dengan kontrol. Setelah dilanjutkan dengan uji LSD, dapat dilihat ada perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan, seperti yang tercantum dalam Tabel 3.

Untuk perlakuan $CdCl_2$ terhadap jumlah eritrosit setelah diuji Anova, ternyata $p < 0,05$ sehingga dapat dikatakan bahwa terdapat perbedaan nyata antara berbagai kelompok

Tabel 2. Data kadar Cd dalam darah dan jumlah eritrosit tikus yang hanya diberi $CdCl_2$ maupun yang diberi $CdCl_2$ dan temulawak

Perlakuan	Ulangan	Kadar Cd (ppm)	Jumlah Eritrosit ($\times 10^6/mm^3$)
Kontrol	1	0,929	7,35
	2	0,941	7,52
	3	0,533	9,85
	4	1,051	7,25
	Rerata	0,86 ($\pm 0,23$)	7,99 ($\pm 1,41$)
Kadmium	1	1,212	5,20
	2	0,951	5,57
	3	1,275	4,64
	4	1,027	3,84
	Rerata	1,12 ($\pm 0,15$)	4,81 ($\pm 0,73$)
Kadmium + Temulawak	1	0,911	5,94
	2	0,916	6,42
	3	1,112	5,27
	4	1,251	5,84
	Rerata	1,05 ($\pm 0,17$)	5,87 ($\pm 0,51$)

Tabel 3. Hasil uji LSD jumlah eritrosit tikus yang hanya diberi $Pb(NO_3)_2$ maupun yang diberi $Pb(NO_3)_2$ dan temulawak

Perlakuan	Kontrol	Pb	Pb + Temulawak
Kontrol		*	ns
Timbal	*		ns
Timbal + Temulawak	ns	ns	

Keterangan: (*) = berbeda nyata
(ns) = tidak berbeda nyata

perlakuan bila dibandingkan dengan kontrol. Setelah dilanjutkan dengan uji LSD, dapat dilihat ada perbedaan yang signifikan antarkelompok perlakuan, seperti yang tercantum dalam Tabel 4.

Tabel 4. Hasil uji LSD jumlah eritrosit tikus yang hanya diberi $CdCl_2$ maupun yang diberi $CdCl_2$ dan temulawak

Perlakuan	Kontrol	Cd	Cd + Temulawak
Kontrol		*	*
Kadmium	*		ns
Kadmium + Temulawak	*	ns	

Keterangan: (*) = berbeda nyata
(ns) = tidak berbeda nyata

Hasil penghitungan uji Anova untuk data kadar Pb dalam darah, ternyata $p < 0,05$ sehingga dapat dikatakan bahwa terdapat perbedaan nyata antara berbagai kelompok perlakuan bila dibandingkan dengan kontrol. Setelah dilanjutkan dengan uji LSD, dapat dilihat ada perbedaan yang signifikan antarkelompok perlakuan, seperti yang tercantum dalam Tabel 5.

Tabel 5. Hasil uji LSD kadar Pb dalam darah tikus yang hanya diberi $Pb(NO_3)_2$ maupun yang diberi $Pb(NO_3)_2$ dan temulawak

Perlakuan	Kontrol	Pb	Pb + Temulawak
Kontrol		*	ns
Timbal	*		*
Timbal + Temulawak	ns	*	

Keterangan: (*) = berbeda nyata
(ns) = tidak berbeda nyata

Hasil penghitungan uji Anova untuk data kadar Cd dalam darah, ternyata $p > 0,05$ sehingga dapat dikatakan bahwa tidak terdapat perbedaan antara berbagai kelompok perlakuan bila dibandingkan dengan kontrol. Namun demikian ada kecenderungan terjadi peningkatan kadar Cd dalam darah tikus yang diberi perlakuan larutan $CdCl_2$ 100 ppm.

PEMBAHASAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, diketahui bahwa pemberian larutan $Pb(NO_3)_2$ dan $CdCl_2$ dapat menyebabkan tingginya kadar Pb dan Cd di dalam tubuh. Hal ini dapat mengakibatkan terganggunya metabolisme tubuh, sebab Pb dan Cd merupakan kelompok logam toksik yang dapat membentuk ligan kompleks dalam tubuh yang dapat mengganggu aktivitas enzim dan dapat menyebabkan kerusakan organ tubuh. Salah satu jalur metabolisme yang sangat dipengaruhi adalah sistem hemopoetik. Pb dan Cd dapat berikatan dengan gugus $-SH$, yang merupakan mekanisme utama toksisitas logam (Fuente *et al.*, 2002). Hal ini dapat dibuktikan dengan menurunnya jumlah eritrosit dalam darah hewan coba (Tabel 1 dan 2).

Penelitian Razif dan Sukatma (2004) menyatakan bahwa telah terjadi peningkatan konsentrasi Pb dalam darah mencit yang terpapar secara inhalasi dalam waktu 40 hari dan semakin lama terpapar maka semakin tinggi konsentrasi Pb yang terkandung dalam darah. Keadaan ini dapat mempengaruhi sistem hematopoetik, antara lain mempengaruhi sintesis heme dengan menghambat enzim δ -ALAD, ferokelatase, dan heme sintetase (Sadikin, 2001; Habal, 2002). Hal ini didukung oleh penelitian Abraham *et al.*, (2002) yang menyatakan bahwa pada penderita keracunan Pb menunjukkan kadar δ -ALA dalam serum yang sangat tinggi (750–1.500 $\mu g/dL$, kadar normalnya bernilai 150–400 $\mu g/dL$).

Selain itu, Pb juga memberikan dampak negatif bagi proses eritropoiesis maupun pematangan eritrosit. Pb yang berikatan dengan eritrosit menyebabkan defisiensi enzim Glu-6-P Dehidrogenase (Glu-6-PD). Defisiensi enzim Glu-

6-PD pada metabolisme glukosa (melalui jalur Heksosa Monofosfat/HMP) untuk energi eritrosit dapat menyebabkan kegagalan regenerasi trifosfopiridin nukleotida (TPNH) yang mengakibatkan gagalnya reduksi GSSG (*glutation teroksidasi*) menjadi GSH (*glutation*) karena tidak terbentuk reduktor NADPH. GSH berperan dalam melenyapkan oksidator kuat pada eritrosit dan melindungi gugus sulfhidril eritrosit, sehingga blokir terhadap enzim Glu-6-PD menyebabkan eritrosit mudah teroksidasi dan lisis. Oksidasi eritrosit menyebabkan terbentuknya methemoglobin dalam jumlah yang banyak dan mengendap di sisi membran dalam eritrosit, sehingga kelenturannya berkurang dan mudah terdestruksi oleh sel fagosit (Sadikin, 2001).

Kadmium (Cd) dapat menyebabkan lesi pada berbagai organ, seperti ginjal, testis, hati, otak, paru, dan sistem hematopoetik. Cd mengakibatkan terjadinya fragmentasi DNA dan mampu menurunkan potensial membran pada mitokondria (Watjen *et al.*, 2002). Hal ini juga didukung oleh Li *et al.*, (2000) yang menyatakan bahwa Cd tidak hanya secara kompetitif menghambat ion Ca dan merusak reseptor vitamin D sehingga menurunkan daya absorpsi Ca, tetapi juga dapat mengakibatkan penghambatan Ca-ATPase pada dosis 100 μM . Akibatnya terjadi perubahan dalam sel, antara lain segregasi sitoplasma, kondensasi nukleus, fragmentasi DNA, dan peningkatan sel yang mengalami nekrosis. Menurut Fernandez *et al.*, (2003) pemberian larutan $CdCl_2$ juga dapat mengakibatkan penurunan aktivitas protein *metallothionein* (MT) yang berfungsi sebagai detoksifikasi logam berat.

Hal ini juga diperkuat oleh penelitian Fuente *et al.*, (2002) yang menyebutkan bahwa secara *in vitro* Pb dan Cd dapat menyebabkan kerusakan membran sel limfosit dan monosit manusia. Horiguchi *et al.*, (2000) menyatakan bahwa larutan Cd mengakibatkan kerusakan tubulus ginjal, sehingga terjadi insufisiensi produksi EPO (*Erythroid Specific Cytokinin Erythropoitin*). *Erythropoitin* merupakan hormon yang berperan dalam proses eritropoiesis. Sedangkan larutan Pb dapat mengakibatkan inhibisi pada proses hematopoiesis (melalui hemolisis atau inhibisi Heme Sintetase). Hal ini diperkuat dengan kenyataan bahwa pada kultur sel yang telah dilakukan, terjadi penekanan ekspresi m-RNA EPO setelah pemberian larutan Cd dosis 1 μM selama 24 jam. Sedangkan pemberian larutan Pb dengan dosis 100 μM , belum menunjukkan pengaruh pada EPO.

Rimpang temulawak mempunyai komponen berupa *curcumin*, minyak atsiri, flavonoid, pati, gula, protein, lemak, serta beberapa kation (Fe, Ca, Na, dan K). Pemberian infus rimpang temulawak pada hewan coba, ternyata dapat

menurunkan kembali kadar Pb dan Cd dalam darah. Diduga keadaan ini mengakibatkan peningkatan kembali jumlah eritrosit tikus putih.

Peranan infus rimpang temulawak dalam penelitian ini, diduga disebabkan oleh *curcumin* sebagai zat aktif temulawak yang berpotensi sebagai *chelating agent* karena mempunyai struktur elektron yang bebas dan memungkinkan untuk mengikat logam berat (Pan *et al.*, 1999). Kandungan ion (Fe, Ca, P, dan K) yang ada dalam rimpang temulawak, diduga juga berperan dalam meningkatkan kompetisi atau menghambat absorpsi ion Pb dan Cd yang ada dalam tubuh (Ros dan Mwanri, 2003). Selain itu, Anonimus (1998) menyebutkan bahwa zat *curcumin* dapat berperan sebagai zat anti oksidan dan detoksikasi dengan cara meningkatkan aktivitas enzim *gluthatione S-transferase* (GST) serta kelompok enzim *gluthatione* yang lain (GS-x) yang terdapat di dalam hepar. Enzim *gluthatione* berperan dalam melenyapkan oksidator kuat (dalam hal ini adalah ion Pb dan Cd) pada eritrosit dan melindungi gugus enzim -SH eritrosit.

Pemberian infus rimpang temulawak dapat menurunkan kadar logam (Pb dan Cd) serta menaikkan jumlah eritrosit darah tikus putih. Penurunan kadar Pb dan kenaikan jumlah eritrosit berbeda signifikan ($p < 0,05$), tetapi penurunan kadar Cd tidak berbeda signifikan ($p > 0,05$).

KEPUSTAKAAN

- Abraham R, Loomba R, dan Pandian JD, 2002. δ -ALA Levels in Serum and Urine: a Diagnostic Tool for Possible Lead Poisoning, *Indian Journal of Clinical Biochemistry* 17(2): 64–7.
- Anonimus, 1998. Mechanisms of Anticarcinogenic Properties of Curcumin, The Effect of Curcumin on Gluthatione Linked Detoxification Enzyme in Rat Liver, *International Journal Biochemistry Cell Biology* 30(4): 445–6.
- Bijanti R, 2002. Patologi Klinik Veteriner, FKH – Unair, Surabaya.
- Darmono, 1995. Logam dalam Sistem Biologi Makhluk Hidup, UI Press, Jakarta.
- Fernandez EL, Gustafon AL, Anderson M, Hellman B, dan Dencker L, 2003. Cadmium Induced Changes in Apoptotic Gene Expression Levels and DNA Damage in Mouse Embryos Are Blocked by Zinc, *Toxicological Sciences* 76(1): 163–70.
- Fuente HD, Perez DP, Baranda L, Barriga FD, Alanis VS, Layseca E, dan Amaro RG, 2002. Effect of Arsenic, Cadmium, and Lead on The Induction Apoptosis of Normal Human Mononuclear Cells, *Clinical and Experimental Immunology* 129: 69–77.
- Habal R., 2002. Lead Toxicity, *e-Medicine Journal* 3(1): 1–5.
- Horiguchi H, Kayama F, Oguma E, Willmore WG, Hradecky P, dan Bunn HF, 2000. Cadmium and Platinum Suppression of Erythropoietin Production in Cell Culture: Clinical Implication, *Blood* 96(12): 3743–3747.
- Li M, Kondo T, Zhao QL, Li FJ, Tanabe K, Arai Y, Zhou ZC, dan Kasuya M, 2000. Apoptosis Induced by Cadmium in Human Lymphoma U-937 Cells Through Ca-calpain and Caspase-mitochondria Dependent Pathways, *The Journal of Biological Chemistry* 275(50): 39702–39709.
- Linder MC, 1992. Biokimia Nutrisi dan Metabolisme, diterjemahkan oleh Aminuddin, UI Press, 1992.
- Lu FC, 1995. Toksikologi Dasar: Azas, Organ Sasaran, dan Penilaian Resiko, UI Press, Jakarta.
- Pan MH, Huang TM, dan Lin JK, 1999. Biotransformation of Curcumin Through Reduction and Glucuronidation in Mice, *Drug Metabolism and Disposition* 27(1): 486–494.
- Razif M dan Sukatma, 2004. Laju Peningkatan Konsentrasi Timbal Dalam Darah Hewan Uji Mencit (*Mus musculus*) di Bengkel Otomotif, *Berkala Penelitian Hayati* 9(2): 143–146.
- Ros C dan Mwanri L, 2003. Lead Exposure, Interactions, and Toxicity: Food for Thought, *Asia Pacific Journal Clinical Nutritions* 12(4): 388–395.
- Sadikin M, 2001. Biokimia Darah, Widya Medika, Jakarta.
- Sugiharto dan Darmanto W, 2004. Uji Toksisitas antara Timbal dan Kadmium pada Pemeriksaan Kadar Hemoglobin, Jumlah Eritrosit, dan Nilai PCV Tikus Putih, *Laporan Lembaga Penelitian Unair Surabaya*, tidak Dipublikasikan.
- Watjen W, Haase H, Biagioli M, dan Beyersmann D, 2002. Induction of Apoptosis in Mammalian Cells by Cadmium and Zinc, *Environmental Health Service* 110: 865–867.

Reviewer: **Drs. Win Darmanto, MSi., PhD.**