UJI AKTIVITAS SUSPENSI SERBUK *SPIRULINA PLATENSIS* TERHADAP KADAR HORMON TESTOSTERON DAN HISTOPATOLOGIK TESTIS TIKUS WISTAR DIABETES YANG DIINDUKSI STREPTOZOTOCIN

Adhi Gunawan¹, Kintoko², Sapto Yuliani², Ayu Shabrina^{3*}

¹Pascasarjana Universitas Ahmad Dahlan

Jalan Prof. Dr. Soepomo, S.H., Janturan, Yogyakarta 55164

²Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan

Jalan Prof. Dr. Soepomo, S.H., Janturan, Yogyakarta 55164

³Fakultas Farmasi Universitas Wahid Hasyim

Jl. Menoreh Tengah X/22, Sampangan, Semarang 50236

*Email: shabrina.pharm@gmail.com

Abstrak

Diabetes mellitus merupakan penyakit metabolik yang dapat mengganggu fungsi reproduksi pada pria yaitu penurunan kadar hormon testosteron dan kerusakan jaringan testis. Spirulina platensis mengandung fikosianin sebagai antioksidan yang efektif untuk menurunkan kadar gula darah dan kerusakan organ reproduksi pria. Tujuan dari penelitian ini untuk mengetahui efek Spirulina platensis (SP) terhadap kadar hormon testosteron serta gambaran histopatologik testis tikus jantan diabetes yang diinduksi Streptozotocin (STZ). Tikus dibagi menjadi 6 kelompok yang terdiri dari K1 (tikus diberikan suspensi CMC-Na), K2 (tikus yang diinduksi STZ dosis tunggal 45 mg/kgBB), K3 (tikus diberikan suspensi SP 36 mg/200gBB), kelompok 4; 5 dan 6 (tikus diabetes diberikan suspensi SP 36 mg/200gBB; 72 mg/200gBB dan 144 mg/200gBB). Penelitian dilakukan selama 28 hari dengan parameter yang diamati adalah kadar gula darah, kadar testosteron dan gambaran histopatologik testis dengan Hematoksin - Eosin (HE). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kelompok perlakuan dengan Spirulina platensis mampu meningkatkan kadar hormon testosteron yaitu 0,82 µG/mL, 1,13 µG/mL dan 1,66 µG/mL ($p < 0,05$) dibandingkan kelompok tikus diabetes. Spirulina platensis juga mampu mencegah kerusakan epitel tubulus seminiferus pada testis dibandingkan kelompok diabetes. Pada hewan uji yang diberikan dosis 144 mg/kgBB memberikan aktivitas paling baik dalam menghambat kerusakan jaringan testis disebabkan oleh induksi STZ.

Kata kunci: diabetes mellitus, gangguan reproduksi, hormon testosteron, *Spirulina platensis*

PENDAHULUAN

Diabetes Melitus (DM) merupakan penyakit metabolik akibat gangguan sekresi insulin, gangguan kerja insulin, maupun keduanya (ADA, 2015). Di Indonesia pada tahun 2011 penderita diabetes mellitus sebanyak 7,2 juta orang dan diduga akan mengalami peningkatan jumlah sebanyak 11,8 juta orang pada tahun 2030 (Whiting dkk., 2011). Pada pria dengan penyakit diabetes mellitus akan terjadi gangguan reproduksi (Mallidis dkk., 2011). Gangguan reproduksi ini termasuk penurunan berat testis, jumlah sperma, motilitas sperma, kadar hormon testosteron, spermatogenesis abnormal dan kerusakan oksidatif dalam testis (Amaral dkk., 2009). Peningkatan stres oksidatif akibat diabetes mampu mengakibatkan stres retikulum endoplasma yang dapat menimbulkan kerusakan jaringan testis (Zhao dkk., 2013). Obat – obat sintetis untuk diabetes dan komplikasinya telah banyak digunakan namun dapat menimbulkan efek samping yaitu hipoglikemi, kenaikan berat badan dan toksisitas pada hepar (Birben dkk., 2012). Penggunaan bahan alam sebagai alternatif saat ini dapat menurunkan dampak diabetes mellitus dan komplikasi yang menyertai (Plutzky, 2011).

Spirulina platensis memiliki efek antidiabetes karena memiliki kemampuan untuk menurunkan kadar gula darah, menstimulasi sel -pankreas untuk memproduksi insulin dan memperbaiki jaringan pankreas (Shazly dkk., 2015). *Spirulina platensis* mampu menghambat stres oksidatif dan meningkatkan enzim antioksidan testis yaitu *superoxide dismutase* (SOD), *glutathione peroxidase* (GPx) dan *catalase* (El-Dosky dkk., 2013). Salah satu spesies *Spirulina maxima* mampu melindungi kerusakan organ testis, memperbaiki kerusakan jaringan testis serta

melindungi organ reproduksi dari stres oksidatif akibat kondisi hiperglikemia pada tikus yang diinduksi STZ (Won dkk., 2012).

Berdasarkan latar belakang di atas maka penelitian ini dilakukan untuk mengetahui aktivitas antidiabetik suspensi serbuk *Spirulina platensis* pada organ reproduksi. Parameter yang diamati adalah kadar hormon testosteron, histopatologi jaringan epitel tubulus seminiferous testis dengan pewarnaan menggunakan Hematoxylin-Eosin. Kerusakan jaringan testis diidentifikasi dengan melihat kepadatan sel-sel yang ada di epitel tubulus seminiferous.

METODE PENELITIAN

1. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah seperangkat alat untuk analisis hormone testosteron, *bioanalyzer* untuk menganalisis kadar gula darah, spuit injeksi dan set bedah laparotomi. Bahan utama yang digunakan yaitu serbuk *Spirulina platensis* hasil pembudidayaan PT Nealgae Indonesia Makmur bertempat di Jalan Panglima Sudirman No 103, Gresik, Jawa Timur, PGA dan CMC-Na, Kit ELISA (*testosterone II from Roche*) untuk mengukur kadar hormone testosterone, pewarnaan hematoxylin-eosin. Tikus yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus jantan galur Wistar yang didapatkan dari Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada.

2. Pembuatan Suspensi SP

Suspensi dibuat dengan cara PGA dan CMC-Na digerus sampai homogen kemudian dilarutkan dengan air sampai terbentuknya mucilago, kemudian bahan yang akan dibuat suspensi ditambahkan gliserin dan digerus sampai homogen pada mortir dan stamper lain. Campuran bahan yang akan dibuat suspensi dan gliserin dituang sedikit demi sedikit ke dalam larutan PGA dan CMC-Na sambil diaduk sampai homogen. Setelah itu, dimasukkan ke dalam gelas ukur beserta dengan air bilasan dari mortir. Terakhir ditambahkan aqua destillata hingga 100 ml (Haq, 2016). Serbuk *Spirulina platensis* diformulasikan menjadi sediaan suspensi dengan formula pada tabel I.

Tabel 1. Formula suspensi SP

Bahan	Konsentrasi (%)	Fungsi
Spirulina	4	Zat Aktif
PGA	1,25	<i>Suspending agent</i>
CMC-Na	1	<i>Suspending agent</i>
Gliserin	10	<i>Wetting agent</i>
Aqua Destillata	66	Cairan pembawa

Dosis *Spirulina* untuk manusia adalah 2 gram/hari (Christwardana dkk., 2013), maka dosis yang dicobakan adalah kelipatan 2 yaitu 2, 4 dan 8 g/KgBB/hari. Konversi dosis manusia (70 kg) terhadap tikus (200 gram) adalah 0,018 (Laurence dan Bacharach, 1964). Dosis *Spirulina platensis* untuk tikus adalah:

- Dosis rendah = $2 \text{ g} \times 0,018 = 0,036 \text{ gram/hari}$
- Dosis sedang = $4 \text{ g} \times 0,018 = 0,072 \text{ gram/hari}$
- Dosis tinggi = $8 \text{ g} \times 0,018 = 0,144 \text{ gram/hari}$

3. Prosedur Perlakuan Hewan Uji

Tikus sebanyak 30 ekor diadaptasi selama 1 minggu dan dibagi menjadi 6 kelompok secara *simple random* sehingga masing – masing kelompok terdiri dari 5 ekor. Pengelompokan tikus dapat dilihat pada Tabel 2.

4. Induksi Streptozotocin (STZ)

Kadar glukosa darah (KGD) dan berat badan (BB) tikus diukur sebelum induksi STZ dilakukan dan dipuasakan semalam selama 12 jam sebelum pengambilan darah dan dilakukan induksi STZ. Penelitian yang dilakukan oleh Won dkk., (2012) menggunakan STZ dosis tunggal 45 mg/kgBB

dengan *loading time* 5 hari dapat menyebabkan DM tipe II. Kadar gula darah hewan uji dianalisis menggunakan *bioanalyzer*.

Tabel 2. Kelompok perlakuan hewan uji

Kelompok	Induksi STZ	Perlakuan
Kelompok 1	-	Tikus normal + Suspensi CMC-Na
Kelompok 2	-	Tikus diabetes yang diinduksi STZ 45 mg/kgBB <i>single dose</i>
Kelompok 3	-	Tikus normal + Suspensi <i>Spirulina platensis</i> dosis 36 mg/kgBB
Kelompok 4	-	Tikus diabetes + Suspensi <i>Spirulina platensis</i> dosis 36 mg/kgBB
Kelompok 5	-	Tikus diabetes + Suspensi <i>Spirulina platensis</i> dosis 72 mg/kgBB
Kelompok 6	-	Tikus diabetes + Suspensi <i>Spirulina platensis</i> dosis 144 mg/kgBB

5. Analisis Kadar Hormon Testosteron

Analisis kadar hormon testosteron diambil dari serum darah tikus yang dikumpulkan dari sinus orbital setelah hewan uji diberi perlakuan selama 28 hari dengan menggunakan kapiler mikrohematokrit. Darah yang keluar ditampung dalam tabung microtube melalui dinding sampai volume ± 2 ml, kemudian didiamkan selama 30 menit, setelah itu dilakukan sentrifuge dengan kecepatan 3500 rpm selama 15 menit. Serum yang terpisah kemudian diambil untuk pemeriksaan kadar hormon testosteron dengan menggunakan metode Enzim Linked Immunosorbent Assay (ELISA) dengan T (Testosteron) ELISA Kit. Hasil dibaca pada panjang gelombang 450 nm dengan spektrofotometer (Microlab).

6. Histopatologi Testis dengan Pewarnaan Hematoksilin-Eosin (HE)

Pembuatan sediaan histologi testis dilakukan dengan metode parafin di Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Organ dibersihkan dengan larutan NaCl 0,9% dan dikeringkan dengan kertas tisu. Fiksasi organ dilakukan dengan larutan formalin. Organ yang telah difiksasi dimasukkan ke dalam alkohol bertingkat 50 hingga 100%, alkohol absolut:xilol, xilol:parafin (1:1), kemudian parafin murni I, II, III. Setelah itu, dilakukan pembenaman jaringan dalam blok parafin. Penyayatan organ dilakukan secara melintang, lalu pita parafin ditempelkan pada gelas benda dengan Meyer's Albumin. Setelah kering, preparat dimasukkan ke dalam xilol murni (15 menit), alkohol bertingkat 95 hingga 50%, aquades, lalu pewarna hematoxylin. Preparat dicuci air mengalir dan aquades, alkohol bertingkat 30 hingga 70% lalu ke pewarna Eosin 0,5% dilanjutkan ke dalam alkohol 70 hingga 100% dan xilol murni. Preparat ditutup gelas penutup dengan bantuan balsam canada. Pemeriksaan histologi testis menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 100 kali (10 X 10) dan 400 kali (10 X 40). Sediaan histologis testis kemudian difoto dengan kamera mikroskopis digital (Optilab®) dengan software Optilab Viewer (Micronos®).

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Parameter Kadar Gula Darah

Hasil induksi STZ dapat dilihat pada tabel 3. Hewan uji dinyatakan mengalami kondisi diabetes tipe 2 apabila kadar glukosa darah antara 250 – 450 mg/dl (Ventura dkk., 2011).

Tabel 3. Kadar gula darah tikus pada hari ke-0 dan hari ke-28

Perlakuan	KGD H0 (mg/dL)	KGD H28 (mg/dL)
Kelompok 1	86,58 $\pm$ 8,26	81,94 $\pm$ 12,75
Kelompok 2	492,28 $\pm$ 19,88*	437 $\pm$ 148,52*
Kelompok 3	90,22 $\pm$ 16,06	73,88 $\pm$ 20,82
Kelompok 4	454,50 $\pm$ 38,27*	342,01 $\pm$ 164,70*
Kelompok 5	444,78 $\pm$ 99,16*	379,48 $\pm$ 160,32*
Kelompok 6	551,84 $\pm$ 85,30*	316,64 $\pm$ 238,02*

*) Berbeda bermakna dibandingkan kelompok normal ($p < 0,05$)

2. Parameter Kadar Hormon Testosteron

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa terjadi penurunan kadar hormon testosteron pada hewan uji yang mengalami diabetes. Hal ini dikarenakan pada penderita diabetes terjadinya resistensi atau depresi insulin yang menyebabkan tidak adanya stimulus insulin pada sel Leydig sehingga terjadi penurunan fungsi sel Leydig yang mengakibatkan produksi hormon testosteron berkurang (Ballester dkk., 2004). Hasil kadar hormon testosterone dapat dilihat pada tabel 4.

Tabel 4. Kadar hormon testosteron tikus normal dan diabetes yang diinduksi STZ dan diberikan suspensi *Spirulina platensis* selama 28 hari perlakuan

Perlakuan	Kadar Hormon Testosteron ($\mu\text{g/mL}$)
K1 (Normal)	5,06 $\pm$ 1,65 ^b
K2 (Diabetes)	0,39 $\pm$ 0,14 ^a
K3 (N+SP 36mg/kgBB)	2,56 $\pm$ 0,36 ^b
K4 (D+SP 36 mg/kgBB)	0,82 $\pm$ 0,07 ^a
K5 (D+SP 72 mg/kgBB)	1,13 $\pm$ 0,29 ^a
K6 (D+SP 144 mg/kgBB)	1,66 $\pm$ 0,23 ^b

Keterangan: (a) P 0,05 terhadap kelompok normal; (b) P 0,05 terhadap kelompok diabetes; (c) P 0,05 P 0,05 terhadap kelompok N+SP 36/kgBB; (d) P 0,05 terhadap kelompok diabetes+SP 144 mg/kgBB.

Dosis suspensi SP 144 mg/kgBB menunjukkan kadar hormon testosteron paling tinggi dari kelompok hewan uji. Adanya kandungan pigmen antioksidan fikosianin dari *Spirulina platensis* dimungkinkan mampu menghambat radikal bebas berdampak pada spermatogenesis sehingga jumlah dan motilitas sperma dapat kembali normal (Bhat dan Madyastha, 2001; Rosidawati dkk., 2017).

3. Histopatologi Testis

Hasil pewarnaan dengan hematoxylin-Eosin pada epitel tubulus seminiferous testis kelompok hewan uji diabetes menunjukkan adanya nekrosis pada epitel testis yaitu dilihat dari kepadatan sel-sel dalam epitel tubulus seminiferus tersebut sedangkan pada kelompok hewan uji normal terlihat bahwa sel-sel spermatogenesis sangat padat yang artinya tidak terjadi nekrosis atau kerusakan pada jaringan testis tersebut. Hasil histopatologi testis dengan pewarnaan Hematoxylin-Eosin dapat dilihat pada gambar 1.

Gambar 1. Hasil pewarnaan Hemotoksin-Eosin pada 1 irisan melintang testis tikus normal dan diabetes yang diinduksi STZ dan diberikan suspensi *Spirulina platensis* selama 28 hari perlakuan.

Kelompok hewan uji diabetes yang diberikan suspensi *Spirulina platensis* dosis 144 mg/kgBB (K6) menunjukkan kepadatan sel dalam jaringan lebih padat dibandingkan K4 dan K5 yaitu hewan uji diabetes yang diberikan dosis SP 36 mg/kgBB dan 72 mg/kgBB. Hal ini menunjukkan *Spirulina platensis* dosis 36 mg/kgBB dan 72 mg/kgBB memiliki aktivitas untuk menghambat kerusakan jaringan testis dan *Spirulina platensis* dosis 144 mg/kgBB memiliki aktivitas dan efektivitas dalam menghambat atau mencegah terjadinya kerusakan jaringan testis yang disebabkan oleh induksi STZ.

Spirulina platensis berpotensi sebagai agen proteksi pada jaringan testis karena kandungan zat antioksidan utama yaitu fikosianin dan fikosianobilin yang mampu melindungi terhadap kerusakan oksidatif sistem P450 dalam sel Leydig (Hanukoglu, 2006). Kadar hormon testosteron dan histopatologi jaringan testis menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan pada kelompok hewan uji diabetes yang diberikan suspensi *Spirulina platensis* dibandingkan kelompok hewan uji diabetes yang diinduksi STZ. Suspensi *Spirulina platensis* pada dosis 144 mg/kgBB menunjukkan efek antidiabetes dalam peningkatan hormon testosteron dan proteksi terhadap kerusakan jaringan testis terbaik dibandingkan suspensi *Spirulina platensis* pada dosis 36 mg/kgBB dan 72 mg/kgBB.

KESIMPULAN

Suspensi *Spirulina platensis* pada dosis 144 mg/kgBB mampu meningkatkan kadar hormon testosteron dan mencegah kerusakan pada jaringan testis yang disebabkan oleh diabetes.

DAFTAR PUSTAKA

- American Diabetes Association, (2015), Standar of Medical Care in Diabetes-2015, Diabetes Care, Vol 38 Suppl 1.
- Amaral, S., Mota, P. C., Lacerda, B., Alves, M., Pereira Mde, L., Oliveira, P. J., and Ramalho-Santos, J. (2009). Testicular mitochondrial alterations in untreated streptozotocin-induced diabetic rats. *Mitochondrion*, 9, 41–50.
- Ballester, J., Munoz M. C., Dominguez, J., *et al.*, (2004), Insulin-dependent diabetes affects testicular function by FSH- and LH-linked mechanisms. *J Androl* 25, 706–719.

- Bhat V. Madyastha K. (2001). Scavenging of peroxynitrite by phycocyanin and phycocyanobilin from *Spirulina platensis*: Protection against oxidative damage to DNA. *Biochemical and Biophysical Research Communications*.
- Birben, E., Murat Sahiner, U., Sackesen, C., Erzurum, S., and Kalayci, O., (2012), Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organ J.* 5(1): 9–19.
- Christwardana, M., Nur M.M.A., Hadiyanto, (2013), *Spirulina platensis*: Potensinya Sebagai Bahan Pangan Fungsional, *Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan*, 1-4.
- El-Dosky G.E., Bashandy S.A., Alhazza I.M., Al-Othman Z., Mourad, Aboul-Soud M., Yusuf K., (2013), Improvement of Mercuric Chloride-Induced Testis Injuries and Sperm Quality Deteriorations by *Spirulina platensis* in Rats, *PLOS One Issue 3 Vol. 8*, 1-9.
- Hanukoglu, I., (2006), Antioxidant Protective Mechanisms against Reactive Oxygen Species (ROS) Generated by Mitochondrial P450 Systems in Steroidogenic Cells, *Drug Metab Rev.* 38(1-2), 171-96.
- Haq, M., (2016), Pengaruh Variasi Konsentrasi Pati Ubi Talas (*Colocasia esculenta* L.) sebagai *Suspending agent* terhadap Sifat Fisik Suspensi Asam Mefenamat, *Skripsi*, Universitas Wahid Hasyim, Semarang.
- Laurence, D.R. and A.L. Bacharach, (1964), *Evaluation of Drug Activities: Pharmacometrics*, Academic Press, London and New York, pp: 135-179.
- Mallidis, C., Agbaje, I., McClure, N., Kliesch, S., (2011), The Influence of diabetes mellitus on male reproductive function : A poorly investigated aspect of male infertility. *Der Urologe* Aug A, 50, 33-37.
- Plutzky, J., (2011), Macrovascular effects and safety issues of therapies for type 2 diabetes, *Am J Cardiol.* 108, 25B–32B.
- Rosidawati, R. W., Rimayanti, Supranianondo, K., (2017), Effect of *Spirulina platensis* on The Number of Spermatogenic Cells in The Seminiferous Tubules of Rat (*Rattus Novergicus*) with Excessive Physical Exercise, *The Veterinary Medicine International Conference*, 84-92.
- Shazly, M.O., Ahmed, K.A., Adel-Mawla., E., (2015), Therapeutic Effect of *Spirulina Platensis* on Streptozotocin-Induced Diabetes Rats, *Egypt. J. Comp. Path & Clinic Path.*, Vol. 28, 18- 31.
- Ventura-Sobrevilla, J., Boone-Villa, V.D., Aguilar CN, Román-Ramos, R., Vega-Ávila, E., Campos-Sepúlveda, E., Alarcón-Aguilar, F., (2011), Effect of Varying Dose and Administration of Streptozotocin on Blood Sugar in Male CD1 Mice, *Proc West Pharmacol Soc*, 54:5–9.
- Whiting DR, Guariguata L, Weil C, Shaw J, (2011). IDF diabetes atlas: global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030, *Diabetes Res Clin Pract.* 2011 Dec; 94(3):311-21. *Epub 2011 Nov 12*.
- Won, H. N., Il, K. K., Hae, S.A., Mi, J.K., Kang, H.G., Jun, J.H., Gye, M.C., (2012), Effect of *Spirulina maxima* on spermatogenesis and steroidogenesis in streptozotocin-induced type I diabetic male rats, *Food Chemistry* 134,173–179.
- Zhao Y., Zhao H., Zhai X., Dai J., Jiang X., Wang G., (2013) Effects of Zn deficiency, antioxidants, and low-dose radiation on diabetic oxidative damage and cell death in the testis. *Toxicol Mech Methods* ;23:42-7.