

PENGARUH PEMBERIAN TEPUNG KEDELAI KAYA ISOFLAVON TERHADAP KADAR MALONALDEHID (MDA), AKTIVITAS SUPEROKSIDA DISMUTASE (SOD) TESTIS DAN PROFIL Cu,Zn-SOD TUBULI SEMINIFERI TESTIS TIKUS JANTAN

[The effects of isoflavone-riched soybean flour on MDA Level, Superoxide dismutase (SOD) activity, and profile of Cu,Zn-superoxide dismutase (Cu,Zn-SOD) in the seminiferous tubules of male rats testes]

Sussi Astuti^{1)*}, Deddy Muchtadi²⁾, Made Astawan²⁾, Bambang Purwantara³⁾
dan Tutik Wresdiyati⁴⁾

¹⁾Jurusan Teknologi Industri Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung, Jl. Prof Sumantri Brojonegoro No. 1 Bandar Lampung

²⁾Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, IPB. PO Box 220, Kampus IPB Darmaga Bogor 16002

³⁾Departemen Klinik, Reproduksi, dan Patologi, Fakultas Kedokteran, Hewan, IPB. Jl. Agatis Kampus IPB Darmaga Bogor 16680

⁴⁾Departemen Anatomi, Fisiologi dan Farmakologi, Fakultas Kedokteran, Hewan, IPB. Jl. Agatis Kampus IPB Darmaga Bogor 16680

Diterima 14 Januari 2009 / Disetujui 29 Desember 2009

ABSTRACT

The objectives of this experiment were to evaluate the effects of isoflavone-riched soybean flour with different treatment level of isoflavone on MDA level, SOD activity, and profile of Cu,Zn-superoxide dismutase (Cu,Zn-SOD) spermatogenic cells in the seminiferous tubules of male rat testes. Diet was given as isonitrogen and isocaloric with 10% of dietary protein. Twenty five males of Sprague Dawley rats were divided into five groups and treated with isoflavone-riched soybean flour by oral administration with different concentrations. The treatment was done for 2 months. The optimum concentration of isoflavone was 1.5 mg/day and resulted in : decreased level of MDA testes (2.29 ± 0.05 nmol/g), maintained high SOD activity of rat testes (729.4 ± 23.73 U/g), and increased content of Cu,Zn-SOD by immunohistochemical technique on spermatocytes and early spermatids. It was concluded that isoflavone-riched soybean flour diet (1.5 mg/day isoflavone) can prevent the formation of lipid peroxide and improve the antioxidant status of rat testes.

Key words: isoflavone - riched soybean flour, lipid peroxide, SOD activity, immunohistochemistry

PENDAHULUAN

Radikal bebas dibentuk oleh metabolisme xenobiotik atau metabolisme sel aerob secara normal. Reaktif oksigen spesies (ROS) adalah radikal bebas yang berperan penting pada beberapa proses fisiologis organ tubuh. Pembentukan ROS dapat menginduksi peroksidasi lipid yang bersifat sitotoksik akibat inisiasi suatu reaksi rantai ke dalam membran, diikuti reaksi propagasi sehingga secara keseluruhan akan mengakibatkan kerusakan sel (Sikka, 2004).

Tubuh memiliki sistem pertahanan enzimatik maupun non enzimatik untuk menetralkan pengaruh toksik senyawa ROS, sehingga ROS hanya terdapat dalam jumlah kecil yang diperlukan untuk menjaga fungsi sel tetap normal. Sistem pertahanan radikal bebas baik enzimatik maupun non enzimatik meliputi proteksi terhadap berbagai kompartemen sel antara lain mitokondria, retikulum endoplasma, peroksisom, sitoplasma dan membran sel. Pemeliharaan integritas sel tergantung pada keseimbangan antara pembentukan radikal bebas dengan sistem pertahanan radikal bebas. Kerusakan sel ketidakseimbangan antara pembentukan ROS dan aktivitas pertahanan enzim antioksidan (*scavenger*). Superoksida dismutase (SOD) dilaporkan merupakan garis

pertahanan terdepan spermatozoa terhadap aktivasi dan toksisitas senyawa ROS (Alvarez *et al.*, 1987; Sikka *et al.*, 1995).

Terdapatnya *radical scavenger* diduga akan membersihkan radikal bebas pada jaringan-jaringan yang memproduksi spermatozoa (Sikka, 2004), serta menstimulasi ekspresi Cu,Zn-SOD sehingga melindungi sel dari serangan stress oksidatif dan mencegah terbentuknya produk peroksidasi lipid (Toda & Sirataki 1999). Bahan pangan alami yang mengandung antioksidan sebagai *scavenger* radikal bebas dilaporkan Sikka (2004) dapat menekan proses oksidasi, peroksidasi lipid dan kerusakan sel spermatozoa mencegah kondisi stres oksidatif, dan meningkatkan status antioksidan.

Kedelai memiliki senyawa bioaktif isoflavon (salah satu golongan flavonoid) yang bersifat sebagai antioksidan (Nijveldt *et al.*, 2001). Kedelai dikenal sebagai fitoestrogen karena struktur molekul isoflavon kedelai mirip dengan struktur molekul estrogen. Hal ini menyebabkan isoflavon kedelai dapat berikatan dengan reseptor estrogen (RE), namun afinitas RE ligan tersebut lebih rendah dibanding estrogen endogen (Miksicek, 1994). Sel epitel dari jaringan reproduksi seperti kelenjar susu, ovari dan testis merupakan subyek dari aksi isoflavon (Anderson & Graner, 2000). Aksi biologis estrogen adalah kemampuannya untuk bertindak sebagai estrogen agonis yang dapat berikatan dengan RE dan menstimulasi respon estrogen, atau bertindak sebagai estrogen antagonis yang dapat berikatan dengan RE namun menghambat respon estrogen (Helferich *et al.*, 2001).

1 Korespondensi penulis : HP.081272359911

E-mail : ifanaffandi2006@yahoo.com

Salah satu produk olahan kedelai yang dapat digunakan sebagai *ingredient* dalam bentuk kapsul atau tablet adalah tepung kedelai kaya isoflavon. Tepung kedelai ini mengandung kadar isoflavon sebesar 3%, dihasilkan dari biji kedelai tanpa proses kimia atau penambahan bahan tambahan pangan, serta mempunyai rasa dan flavour yang disukai (Indiana Soybean Board, 1998).

American Dietetic Association (ADA) melaporkan bahwa konsumsi pangan alami akan memberikan pengaruh positif bagi kesehatan apabila dikonsumsi secara teratur pada dosis yang efektif. Oleh karena itu, perlu dilakukan kajian asupan antioksidan alami (isoflavon) yang terkandung dalam tepung kedelai kaya isoflavon pada berbagai tingkatan dosis terhadap kadar MDA dan aktivitas SOD testis, serta profil Cu,Zn-SOD pada tubuli seminiferi testis melalui deteksi secara imunohistokimia dengan menggunakan tikus jantan sebagai hewan model.

METODOLOGI

Bahan

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian adalah tepung kedelai kaya isoflavon (TKI) dari perusahaan SoyLife Extra ORFFA BELGIUM NV, Ambachtsstraat 6-B-1840 LONDERZEEL. Heksan digunakan untuk mengurangi lemak pada TKI sehingga diperoleh TKI rendah lemak (TKI-RL) (Astuti *et al.*, 2008).

Tikus strain *Sprague Dawley* (SD) jantan umur 21 hari dari PT Indoanilab Bogor digunakan untuk studi *in vivo*. Bahan penyusun ransum adalah kasein, mineral mix, vitamin mix, minyak jagung, selulosa, air dan pati jagung/maizena. Analisis kadar malonaldehid (MDA) testis menggunakan fosfat buffer saline (PBS), HCl, asam tiobarbiturat (TBA), asam trikloroasetat (TCA), BHT, dan 1,1,3,3-tetraetoksipropana (TEP); aktivitas enzim SOD testis menggunakan SOD murni komersial, xantin, xantin oksidase, sitokrom C, buffer fosfat, kloroform dan etanol.

Bahan kimia untuk pembuatan preparat jaringan testis dan proses pewarnaan secara imunohistokimia antara lain NaCl, larutan fiksatif bouin, alkohol, xylol, parafin, neofren, toluen, fosfat buffer saline (PBS), destilated water (DW), H₂O₂, metanol, goat serum albumin (GSA), antibodi monoklonal copper,zinc-superoxida dismutase (Cu,Zn-SOD) (Sigma S2147), dako envision peroksidase system (DEPS) (Dako K1491), diaminobenzidine (DAB), dan hematoksilin.

Metode

Perlakuan hewan percobaan (*in vivo*) dan sampling

Sebanyak 25 ekor tikus jantan SD umur sapih (21 hari) terlebih dahulu diadaptasikan di lingkungan laboratorium tempat percobaan selama 1 minggu. Ransum basal kasein disusun secara isonitrogen dan isokalori dengan kadar protein 10%, modifikasi AOAC (1990) diberikan secara *ad libitum*. Bahan penyusun ransum tikus jantan adalah kasein, mineral mix, vitamin mix, minyak jagung, selulosa, air dan pati jagung/maizena. Setelah masa adaptasi, tikus dibagi dalam 5 kelompok, yaitu : (1) Kontrol, cekok aquades (2) cekok TKI-RL dosis isoflavon (IF) 1,5 mg/ekor/hari, (3) cekok TKI-RL dosis IF 3

mg/ekor/hari, (4) cekok TKI-RL dosis IF 4,5 mg/ekor/hari, dan (5) cekok TKI-RL dosis IF 6 mg/ekor/hari.

TKI-RL diberikan pada tikus jantan dengan cara dicekok menggunakan sonde lambung, dengan melarutkan TKI-RL dalam 1 ml aquades. Pemberian TKI-RL pada tikus jantan secara *in vivo* dilakukan berdasarkan pengukuran kandungan total senyawa isoflavon. Hasil analisis dengan HPLC terhadap TKI-RL menunjukkan adanya tiga komponen senyawa isoflavon yaitu daidzein, genistein, dan glisitein dengan kandungan total senyawa isoflavon sebesar 2,22 g/100 g bb (Astuti *et al.*, 2008). Setelah 2 bulan masa perlakuan, tikus masing-masing kelompok (n=5) dikorbankan dengan dipatahkan tulang leher (*dislocasio cervicalis*). Bagian testis dikoleksi dan dilakukan pengamatan terhadap kadar MDA, aktivitas SOD, serta kandungan Cu,Zn-SOD.

Pengukuran kadar MDA

Sebanyak $\pm 0,5$ g testis segar dicacah dalam kondisi dingin dalam 2,5 ml larutan *phosphat buffer saline* (PBS) yang mengandung 11,5 g/L KCl. Homogenat disentrifugasi dua kali pada 4000 rpm selama 10 menit. 1 ml supernatan jernih ditambah 4 ml HCl dingin (0,25N) yang mengandung 15% TCA, 0,38% TBA, dan 0,5% BHT. Campuran dipanaskan 80°C selama 1 jam. Setelah dingin, campuran disentrifugasi 3500 rpm selama 10 menit. Absorbansi supernatan diukur pada λ 532 nm. Sebagai larutan standar digunakan TEP (Singh *et al.*, 2002).

Pengukuran aktivitas SOD

Sebanyak $\pm 0,5$ g testis segar yang telah dihaluskan, ditambah 1ml buffer fosfat pH 7,4, disentrifugasi pada 10000 rpm, 4°C, selama 20 menit, kemudian diambil bagian cairannya (lisat). Sebanyak 800 μ l larutan kloroform/etanol dingin 37,5/62,5 (v/v) ditambahkan ke dalam 300 μ l lisat, divorteks 30 detik dan disentrifugasi pada 5000 rpm, 4°C, selama 10 menit. Supernatan disimpan pada 2-8°C sampai saat akan dianalisis (Nebot *et al.*, 1993).

Larutan standar dibuat dengan melarutkan SOD murni komersial sehingga menghasilkan beberapa konsentrasi larutan untuk pembuatan kurva standar. Pengukuran aktivitas enzim ini berlangsung pada suhu 25°C, larutan xantin oksidase harus tetap dalam keadaan dingin sebelum digunakan. Sebanyak 2,9 ml campuran larutan xantin dan sitokrom C dimasukkan dalam tabung reaksi 3 mL, ditambah 50 μ L larutan baku (kontrol) atau sampel dan divorteks secara perlahan. Selanjutnya ditambah 50 μ L larutan xantin oksidase dan divorteks secara perlahan. Absorbansi diukur dengan spektrofotometer pada λ 550 nm. Blanko yang digunakan adalah buffer fosfat sebagai pengganti sampel dan sebagai kontrol digunakan aquades (Mc Cord & Fridovich 1969).

Pengamatan profil Cu,Zn-SOD pada tubuli seminiferi testis (imunohistokimia)

Organ testis dicuci dengan NaCl fisiologis 0,9%, difiksasi dalam larutan Bouin selama 24 jam. Jaringan testis kemudian diproses dengan metode standar menggunakan parafin. Blok jaringan yang didapat dipotong ± 4 μ m dan dilekatkan pada gelas obyek yang telah dilem dengan neofren, sehingga diperoleh potongan jaringan (sediaan). Selanjutnya dilakukan proses pewarnaan Imunohistokimia

terhadap potongan jaringan menggunakan metode Wresdiyati *et al.*, (2002).

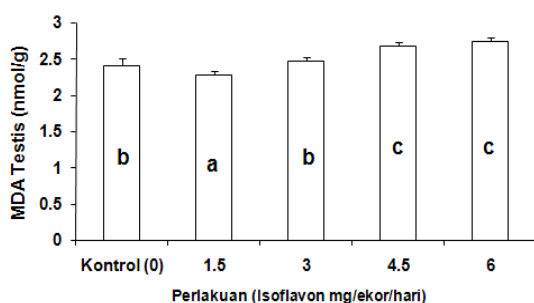
Pewarnaan imunohistokimia dilakukan untuk mengamati profil antioksidan Cu,Zn-SOD pada sel spermatogenik tubuli seminiferi testis tikus. Keberadaan kandungan antioksidan Cu,Zn-SOD terlihat dengan produk reaksi warna coklat. Intensitas warna coklat menunjukkan kandungan Cu,Zn-SOD. Semakin tua warna coklat, semakin banyak kandungan Cu,Zn-SOD. Sel yang tidak mengandung enzim Cu,Zn-SOD atau bereaksi negatif ditunjukkan dengan warna biru. Pengamatan dilakukan secara kuantitatif terhadap jumlah inti sel spermatosit dan spermatid awal pada berbagai tingkat kandungan Cu,Zn-SOD (positif kuat/+++, positif sedang/lemah ++/+, dan negatif/). Pengamatan dilakukan pada sembilan tubuli seminiferi untuk tiap perlakuan.

Analisis data

Data diolah dengan sidik ragam menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) untuk mengetahui pengaruh perlakuan terhadap parameter yang diuji. Untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan, data yang menunjukkan pengaruh nyata selanjutnya diuji dengan Duncan Multiple Range Test (DMRT).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Malonaldehid (MDA) merupakan salah satu produk akhir peroksidasi lipid yang terbentuk setelah aksi senyawa radikal sehingga digunakan sebagai indikator keberadaan radikal bebas dalam tubuh dan indikator kerusakan oksidatif membran sel. Perbedaan nilai MDA terkait dengan proses oksidasi yang terjadi. Rerata nilai MDA testis akibat perbedaan perlakuan pada tikus jantan disajikan pada Gambar 1, sedangkan rerata aktivitas SOD testis disajikan pada Gambar 2. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa peningkatan kadar MDA diikuti dengan penurunan aktivitas antioksidan intrasel, sebaliknya penurunan kadar MDA memperlihatkan peningkatan aktivitas antioksidan intrasel.

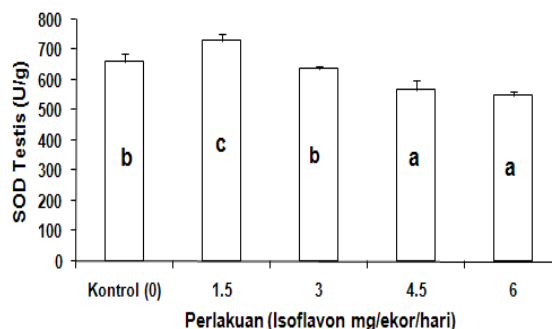


Keterangan : Angka yang diikuti oleh huruf yang berbeda pada kelima perlakuan menunjukkan adanya perbedaan nyata ($p < 0,05$)

Gambar 1. Kadar MDA testis tikus pada berbagai variasi dosis isoflavon

Pengukuran aktivitas enzim Superoksida Dismutase (SOD) testis tikus dilakukan berdasarkan pengukuran enzim secara tidak langsung menggunakan metode spektrofotometri secara kuantitatif. Sebagai data pendukung, dilakukan juga pengamatan terhadap keberadaan dan kandungan antioksidan Cu,Zn-SOD pada tubuli

seminiferi testis tikus melalui produk reaksi yang berwarna coklat, yaitu pengamatan histologis dengan pewarnaan secara imunohistokimia. Intensitas dan distribusi warna coklat menunjukkan kandungan Cu,Zn-SOD pada jaringan tersebut. Apabila warna coklat semakin tua dan semakin merata, berarti kandungan Cu,Zn-SOD semakin banyak. Sel yang tidak mengandung enzim Cu,Zn-SOD atau bereaksi negatif ditunjukkan dengan warna biru. Pada Gambar 3 disajikan fotomikrograf jaringan testis tikus perlakuan yang diwarnai secara imunohistokimia terhadap Cu,Zn-SOD.



Keterangan : Angka yang diikuti oleh huruf yang berbeda pada kelima perlakuan menunjukkan adanya perbedaan nyata ($p < 0,05$)

Gambar 2. Aktivitas superoksida Dismutase (SOD) testis tikus pada berbagai variasi dosis isoflavon.

Kandungan Cu,Zn-SOD diamati pada tahap spermatosit dan spermatid awal karena produk reaksi warna coklat lebih banyak terdistribusi pada tahap tersebut. Hal ini didukung oleh laporan Yoganathan *et al.*, (1989) diacu dalam Peltola *et al.*, (1992), bahwa pada tubuli seminiferi testis tikus, aktivitas SOD yang lebih tinggi ditemukan pada sel spermatosit dan spermatid awal. Dalam penelitian ini, hasil pengamatan terhadap sel spermatogonia dan spermatid akhir menunjukkan bahwa keduanya tidak mengandung enzim Cu,Zn-SOD atau bereaksi negatif, terlihat dengan distribusi warna biru secara merata pada kedua sel tersebut. Hasil perhitungan secara kuantitatif terhadap jumlah inti sel spermatosit dan spermatid awal tubuli seminiferi testis pada berbagai tingkat kandungan Cu,Zn-SOD tersaji pada Tabel 1.

Kadar MDA testis kelompok tikus yang dicekok TKI-RL pada dosis IF 1,5 mg/ekor/hari paling rendah dibanding ketiga kelompok tikus yang dicekok TKI-RL dengan dosis isoflavon lebih tinggi. Penurunan radikal bebas dalam tubuh yang diperlihatkan dengan rendahnya kadar MDA testis kelompok tikus yang dicekok TKI-RL pada dosis IF 1,5 mg/ekor/hari (Gambar 1) dapat meningkatkan secara nyata aktivitas enzim SOD testis sebagai salah satu sistem antioksidan endogen dalam tubuh (Gambar 2). Peningkatan aktivitas enzim SOD testis kelompok tikus yang dicekok TKI-RL pada dosis IF 1,5 mg/ekor/hari didukung oleh tingginya kandungan Cu,Zn-SOD sel spermatosit dan spermatid awal pada tubuli seminiferi testis yang mengalami peningkatan sangat tajam dibandingkan perlakuan lainnya (Tabel 1), terlihat dari jumlah sel spermatosit dan spermatid awal yang memberikan reaksi positif kuat dan positif sedang/lemah paling tinggi secara nyata ($p < 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa pemberian TKI-RL pada dosis IF 1,5 mg/ekor/hari memberikan pengaruh yang paling

baik terhadap kandungan Cu,Zn-SOD sel spermatosit dan spermatid awal pada tubuli seminiferi testis.

Menurut Anderson & Graner (2000), testis merupakan subyek dari aksi isoflavon. Pada pemberian TKI-RL dengan dosis IF 1,5 mg/ekor/hari, diduga isoflavon bersifat antagonis, yaitu menghambat respon estrogen dengan bertindak sebagai antioksidan. Hasil pengukuran terhadap TKI-RL menunjukkan bahwa TKI-RL memiliki aktivitas antioksidan sebesar 54,19% (Astuti *et al.*, 2008). Aktivitas antioksidan isoflavon ditentukan oleh jumlah dan posisi gugus hidroksil (Amic *et al.*, 2002). Peran isoflavon sebagai antioksidan diduga berlangsung melalui dua mekanisme, yaitu kemampuan sebagai donor ion hidrogen dan *scavenger* radikal bebas yang terbentuk selama peroksidasi lipid (Nijveldt *et al.* 2001). Rice-Evans *et al.*, (1997) menyatakan bahwa struktur kimia flavonoid yang memiliki aktivitas sebagai antioksidan ditentukan oleh susunan meta 5,7-dihidroksi pada cincin A, sedangkan sebagai senyawa pengkelat logam adalah gugus 4-okso pada cincin C. Konfigurasi grup hidroksi pada cincin B senyawa flavonoid dilaporkan berperan sebagai *scavenger* senyawa ROS (Heim *et al.*, 2002).

Flavonoid mempunyai kemampuan sebagai antioksidan dan mencegah terjadinya kerusakan akibat radikal bebas melalui mekanisme flavonoid untuk dapat bertindak sebagai *scavenger* radikal bebas secara langsung. Flavonoid (flavonoid-OH) dapat beraksi sebagai *scavenger* radikal peroksil (ROO[•]) yang akan diregenerasi menjadi ROOH. Flavonoid juga dapat bertindak sebagai *scavenger* radikal hidroksil (OH[•]) yang akan diregenerasi menjadi H₂O. Senyawa hasil regenerasi radikal peroksil dan radikal hidroksil bersifat lebih stabil, sedangkan radikal fenoksil yang terbentuk (flavonoid-O[•]) menjadi bersifat kurang reaktif untuk melakukan reaksi propagasi (Nijveldt *et al.*, 2001). Stabilitas radikal fenoksil dilaporkan Pokorny *et al.*, (2001) akan mengurangi laju reaksi propagasi pada proses autooksidasi lipid.

Sel testis mampu mempertahankan diri dari serangan oksidatif senyawa radikal bebas sehingga pembentukan MDA testis dapat dihambat, akibat peran isoflavon sebagai antioksidan. Diduga, dosis IF 1,5 mg/ekor/hari merupakan dosis isoflavon yang paling optimal dan efektif dalam menghambat peroksidasi lipid, di mana sel tidak

mengalami kerusakan (utuh) karena terlindung oleh antioksidan isoflavon. Sel yang normal mempunyai sejumlah enzim pertahanan yang beraksi sebagai antioksidan endogen untuk mendetoksifikasi radikal bebas yang berbahaya dan mencegah kerusakan sel. Potensi pertahanan spermatozoa secara normal adalah cukupnya sistem pertahanan enzim antioksidan endogen. Apabila terbentuk radikal bebas dalam jumlah berlebihan, enzim-enzim yang berfungsi sebagai antioksidan endogen dapat menurun aktivitasnya (Sikka *et al.*, 1995; Halliwell & Gutteridge, 1999).

Enzim Cu,Zn-superoksida dismutase (Cu,Zn-SOD) telah dilaporkan berperan sebagai garis pertahanan pertama terhadap aktivasi dan toksisitas senyawa reaktif oksigen spesies (ROS) melalui dismutasi radikal anion superoksida, serta merupakan pertahanan utama dari spermatozoa yang aktivitasnya berkorelasi kuat dengan kemampuan sel untuk menghambat produk akhir hasil peroksidasi lipid (Alvarez & Storey 1982; Oteiza *et al.*, 1995). Terhambatnya pembentukan MDA testis mengakibatkan meningkatnya status pertahanan antioksidan endogen, sehingga aktivitas enzim SOD serta kandungan Cu,Zn-SOD pada sel spermatosit dan spermatid awal dipertahankan tetap tinggi. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa cekok TKI-RL pada dosis isoflavon paling rendah (1,5 mg/ekor/hari) memberikan pengaruh yang paling menguntungkan terhadap eliminasi radikal bebas. Hal ini didukung oleh pendapat Sikka, (2004), bahwa antioksidan eksogen yang dapat bertindak sebagai penangkap (*scavenger*) radikal bebas akan meningkatkan sistem pertahanan antioksidan endogen dalam tubuh sehingga mampu mengurangi terbentuknya kondisi stres oksidatif akibat berlebarnya pembentukan radikal bebas.

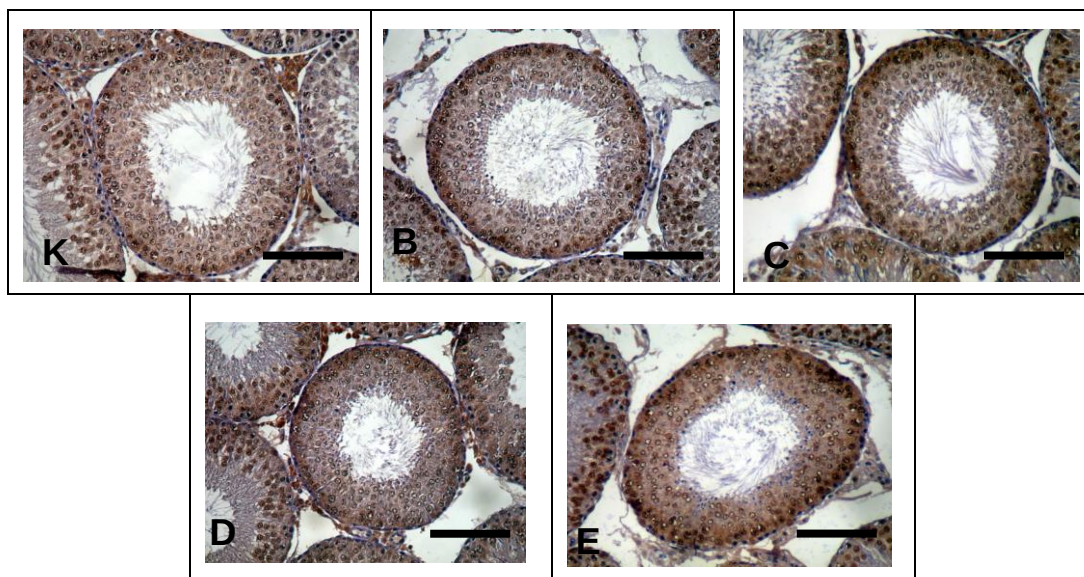
Tidak terlihat adanya perbedaan pada kelompok tikus yang dicekok TKI-RL dengan dosis IF 3 mg/ekor/hari dengan kelompok kontrol (K) yang mendapat cekok aquades terhadap ketiga parameter pengujian. Hasil ini memperlihatkan bahwa pemberian TKI-RL pada dosis IF 3 mg/ekor/hari tidak memberikan pengaruh yang berarti terhadap kadar MDA testis, aktivitas SOD testis, serta kandungan Cu,Zn-SOD sel spermatosit dan spermatid awal pada tubuli seminiferi testis.

Tabel 1. Profil kandungan Cu,Zn-SOD pada sel-sel spermatogenik (spermatosit, spermatid awal, spermatogonia, dan spermatid akhir) per lapang pandang tubuli seminiferi jaringan testis tikus dengan perlakuan isoflavon.

Perlakuan	Jumlah sel-sel spermatogenik pada berbagai tingkat kandungan Cu,Zn-SOD per lapang pandang tubuli seminiferi (perbesaran 200X)				
	Spermatosit dan Spermatid awal		Spermatogonia	Spermatid akhir	
	+++	++/+	-	-	-
Kontrol	149,56±13,69b	71,11±9,61c	40,22±6,69b	40,33±4,82b	130,22±18,17b
Isoflavon 1,5 mg/ekor/hari	166,78±6,92c	85,22±9,24d	32,33±5,27a	48,44±4,82c	164,33±17,94c
Isoflavon 3 mg/ekor/hari	151,78±8,89b	49,22±14,46b	40,78±6,40b	38,78±2,77b	148,67±16,11c
Isoflavon 4,5 mg/ekor/hari	131,56±7,20a	32,44±8,37a	53,56±5,83c	32,00±2,45a	109,67±19,91a
Isoflavon 6 mg/ekor/hari	128,56±7,09a	31,22±4,79a	54,33±3,28c	29,56±2,55a	106,44±16,49a

Keterangan : - Angka yang diikuti oleh huruf berbeda pada kolom yang sama menunjukkan adanya perbedaan nyata ($P < 0,05$)

- Sel-sel spermatosit dan spermatid awal menunjukkan kandungan Cu,Zn-SOD pada berbagai tingkat, yaitu (a) positif dengan kandungan tinggi (+++) berwarna coklat tua, (b) positif dengan kandungan sedang/lemah (++) berwarna coklat muda, dan (c) negatif atau tidak mengandung Cu, Zn-SOD yang berwarna biru.
- Sel-sel spermatogonia dan spermatid akhir menunjukkan negatif (-) atau tidak mengandung Cu,Zn-SOD.



- K = ransum basal kasein, cekok aquadest
 B = ransum basal kasein, cekok TKI-RL 1,5 mg/ekor/hari
 C = ransum basal kasein, cekok TKI-RL 3 mg/ekor/hari
 D = ransum basal kasein, cekok TKI-RL 4,5 mg/ekor/hari
 E = ransum basal kasein, cekok TKI-RL 6 mg/ekor/hari

Gambar 3. Fotomikrograf jaringan testis tikus perlakuan yang diwarnai secara imunohistokimia terhadap Cu,Zn-SOD, skala = 50 μ m

Kelompok tikus yang dicekok TKI-RL dengan dosis IF lebih tinggi (4,5 mg/ekor/hari dan 6 mg/ekor/hari) memperlihatkan pengaruh negatif yang diperlihatkan dengan tingginya kadar MDA testis sebagai produk akhir peroksidasi lipid. Diduga, pada dosis 4,5 mg/ekor/hari dan 6 mg/ekor/hari, isoflavon bersifat sebagai estrogen agonis dengan memacu/menstimulasi respon estrogen sehingga pada dosis tersebut isoflavon berpotensi menimbulkan pengaruh toksik dan mengakibatkan kerusakan oksidatif pada jaringan testis. Kondisi tersebut menunjukkan bahwa pemberian TKI-RL pada dosis IF 4,5 mg/ekor/hari dan 6 mg/ekor/hari tidak mampu menghambat berlanjutnya proses peroksidasi lipid. Kerusakan oksidatif dapat terus terjadi apabila ketidakseimbangan antara radikal bebas dan sistem pertahanan antioksidan terus berlanjut. Menurut Taylor *et al.*, (1988) dan Sikka (2004), ketidakseimbangan terjadi apabila pembentukan radikal bebas lebih tinggi dibandingkan sistem pertahanan antioksidan, sistem pertahanan antioksidan tidak mampu mendetoksifikasi terjadinya perubahan oleh radikal bebas secara terus menerus, atau ketika proses detoksifikasi menurun. Adanya ketidakseimbangan antara radikal bebas dan sistem pertahanan antioksidan mengakibatkan status pertahanan antioksidan intrasel kedua kelompok tersebut tidak mampu atau tidak mencukupi untuk menangkal reaktivitas dan berlebihnya pembentukan radikal bebas, sehingga menurunkan sistem pertahanan enzim SOD intrasel.

Penurunan kemampuan antioksidan SOD intrasel menyebabkan berkurangnya eliminasi senyawa ROS yang bertanggung jawab terhadap kerusakan sel DNA dan protein spermatozoa, serta terbentuknya proses peroksidasi lipid. Kekacauan sistem pertahanan antioksidan tersebut selanjutnya menyebabkan peroksidasi membran fosfolipid oleh radikal bebas. Sebagai konsekuensinya, terjadi perubahan fluiditas dan integritas membran

oleh akumulasi peroksidasi lipid sehingga mengganggu motilitas spermatozoa. Hal ini sejalan dengan pendapat Rajasekaran *et al.*, (1995), bahwa penurunan aktivitas SOD akan mempengaruhi kemampuan pertahanan terhadap senyawa ROS sehingga menyebabkan kerusakan spermatozoa. Reaktivitas tinggi dari radikal bebas dilaporkan menyebabkan pengaruh toksik pada membran plasma spermatozoa (Griveau *et al.*, 1995), serta jaringan yang memproduksi spermatozoa (Sikka, 2004). Karena radikal bebas dapat bereaksi dengan komponen-komponen membran, terjadinya kerusakan diduga tidak hanya berlangsung pada membran plasma, tetapi juga pada bagian internal sel. Akibat peningkatan peroksidasi lipid tersebut, metabolisme sel tidak dapat berlangsung dengan sempurna. Hal ini didukung oleh pendapat beberapa peneliti bahwa terbentuknya peroksida lipid pada membran sel yang terjadi akibat reaksi berantai antara radikal bebas dengan asam lemak tidak jenuh akan menyebabkan perubahan struktur membran sel sehingga mengubah kestabilan dan fungsi membran (Griveau *et al.*, 1995; de Lamirande *et al.*, 1997; Sanocka & Kurpisz, 2004).

Pengaruh patologis akibat berlebihnya senyawa ROS sebagian besar disebabkan oleh konversi anion superoksida menjadi hidrogen peroksida dan diinisiasi oleh peroksidasi lipid. Peningkatan peroksidasi lipid pada kelompok tikus yang dicekok TKI-RL dengan dosis IF 4,5 mg/ekor/hari dan 6 mg/ekor/hari (Gambar 1) menunjukkan bahwa komponen membran sel testis kedua kelompok tersebut bersifat lebih rentan terhadap reaksi oksidasi sehingga tidak mampu mencegah dan menghambat reaktivitas senyawa radikal bebas dalam tubuh, dan berakibat terhadap peningkatan kerusakan membran sel testis, atau kerusakan membran plasma spermatozoa.

KESIMPULAN

Pemberian tepung kedelai kaya isoflavon pada tikus jantan dengan dosis isoflavon 1,5 mg/ekor/hari merupakan dosis isoflavon optimum yang : 1) menghambat pembentukan peroksidasi lipid yang diperlihatkan dengan menurunnya kadar MDA testis, 2) mempertahankan aktivitas enzim SOD testis tetap tinggi, dan 3) meningkatkan kandungan Cu,Zn-SOD tubuli seminiferi testis pada sel spermatosit dan spermatid awal secara imunohistokimia.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai oleh Program Hibah Bersaing XIV DIKTI, Departemen Pendidikan Nasional RI. Penulis mengucapkan terimakasih kepada DITJEN DIKTI DEPDIKNAS.

DAFTAR PUSTAKA

- AOAC. 1990. Official Methods of Analysis of the AOAC. AOAC, Inc. Arlington, Virginia.
- Alvarez JG, Touchstone JC, Blasco L, Storey BT. 1987. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa : superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. *J. Androl.* 8:338-348.
- Amic D, Beslo D, Trinajstić N. 2003. Structure-radical scavenging activity relationship of flavonoids. *Croat Chem Acta* 76(1):56-61.
- Anderson JJB, Garner SC. 2000. The Soybean as a Source of Bioactive Molecules. Di dalam: Schmidl MK & Labuza TP, editor. *Essentials of Functional Foods*. Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland. hlm. 239-266.
- Astuti S, Muchtadi D, Astawan M, Purwantara B, Wresdiyati T. 2008. Kadar peroksida lipid dan aktivitas superoksida dismutase (SOD) testis tikus yang diberi tepung kedelai kaya isoflavon, seng (Zn), dan vitamin E. *Majalah Kedokteran Bandung* 40(2):59-66.
- de Lamirande E, Jiang H, Zini A, Kodama H, Gagnon C. 1997. Reactive oxygen species and sperm physiology. *Rev. Reprod.* 2:48-54.
- Griveau JF, Dumont E, Renard P, Callegari JP, Le Lannou D. 1995. Reactive oxygen species, lipid peroxidation and enzymatic defences systems in human spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 103:17-26.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Third Edition. Oxford University Press, Inc., New York.
- Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. 2002. Flavonoid: chemistry, metabolism and structure-activity relationship. *J. Nutr. Biochem.* 13:572-584.
- Helferich WG, Allred CD, Ju Young-Hwa. 2001. Dietary Estrogens and Antiestrogens. Di dalam : Helferich W & Winter CK, editor. *Food Toxicology*. CRC Press, Boca Raton. hlm. 37-55.
- Indiana Soybean Board. 1998. Isoflavone Concentration in Soy Foods. <http://www.soyfood.com/nutrition/isoflavoneconcentration.html>. [24 Februari 2002].
- Miksicek RJ. 1994. Interaction of naturally occurring nonsteroidal estrogens with expressed recombinant human estrogen receptor. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 49:153-160.
- Mc Cord J, Fridovich I. 1969. Di dalam : Kartikawati D. 1999. Studi Pengaruh Protektif Vitamin C dan Vitamin E terhadap Respon Imun dan Enzim Antioksidan pada Mencit yang Dipapar Paraquat [tesis]. Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.
- Nebot C, Moutet M, Huet P, Xu Jin-Zhu, Yadan Jean-Claude Chaudiere J. 1993. Spectrophotometric assay of superoxide dismutase activity based on the activated autooxidation of a tetracyclic catechol. *Anal. Biochem.* 214:442-451.
- Nijveldt RJ, E. van Nood, DEC van Hoorn, PG Boelens, K Van Norren PAM, van Leeuwen. 2001. Flavonoids : a review of probable mechanism of action and potential applications. *Am. J. Clin. Nutr.* 74:418-425.
- Oteiza PI, Olin KL, Fraga CG, Keen CL. 1995. Zinc deficiency causes oxidative damage to proteins, lipids and DNA in rat testes. *J. Nutr.* 125:823-929.
- Peltola V, Huhtaniemi I, Ahotupa M. 1992. Antioxidant enzyme activity in the maturing rat testis. *J. Androl.* 13(5):450-455.
- Pokorny J, Yanishlieva N, Gordon M. 2001. *Antioxidant in Food*. CRC Press, Boca Raton, USA.
- Rajasekaran M, Hellstrom WJ, Naz RK, Sikka SC. 1995. Oxidative stress and interleukins in seminal plasma during leukocytospermia. *Fertil. Steril.* 64:166-171.
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Sci.* 2:152-159.
- Sanocka D, Kurpisz M. 2004. Reactive oxygen species and sperm cells. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2:12.
- Sikka SC, Rajasekaran M, Hellstrom WJG. 1995. Role of oxidative stress and antioxidants in male infertility. *J. Androl.* 16(6):464-468.
- Sikka SC. 2004. Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. *J. Androl.* 25(1):5-18.
- Singh RP, Murthy KNC, Jayaprakasha GK. 2002. Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using in vitro model. *J. Agric. Food Chem.* 50:81-86.
- Taylor CG, Bettger WJ, Bray TM. 1988. Effect of dietary zinc or copper deficiency on the primary free radical defense system in rats. *J. Nutr.* 118:613-621.
- Toda S, Shirataki Y. 1999. Inhibitory effect of isoflavones on lipid peroxidation by reactive oxygen species. *Phytother. Res.* 13:163-165.
- Wresdiyati T, Mamba K, Adnyane IKM, Aisyah US. 2002. The effect of stress condition on the intracellular antioxidant copper, zinc-superoxide dismutase (Cu,Zn-SOD) in the rat kidney : an immunohistochemical study. *Hayati* 9(3):85-88.