



Ekstrak Etanolik Daun Kelor (*Moringa oleifera*, Lam) Menurunkan Ekspresi Caspase-3 Testis Tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) Model Sindrom Metabolik Terinduksi

Thania Nur Zhahira^{1*}, Dyah Ratna Budiani², Novan Adi Setyawan³

1. Program Studi Kedokteran, Fakultas Kedokteran, Universitas Sebelas Maret, Surakarta, Indonesia
2. Departemen Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret, Surakarta, Indonesia
3. Departemen Biokimia, Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret, Surakarta, Indonesia

Korespondensi : thaniazhahira@gmail.com

ABSTRAK

Pendahuluan: Sindrom metabolik berpengaruh terhadap kesuburan pria karena dapat menyebabkan infertilitas. Infertilitas antara lain disebabkan oleh kematian berlebih sel – sel spermatogenik selama spermatogenesis. Caspase-3 memiliki peran penting sebagai eksekutor apoptosis. Kandungan ekstrak etanolik daun kelor diketahui dapat mencegah apoptosis dengan menurunkan ekspresi caspase-3. Penelitian ini dilakukan dengan tujuan mengetahui pengaruh peningkatan dosis ekstrak etanolik daun kelor terhadap tingkat ekspresi caspase-3 pada jaringan testis tikus Wistar model sindrom metabolik.

Metode: Metode penelitian yang digunakan adalah eksperimental laboratorik. Tikus Wistar berjumlah 30 ekor dibagi menjadi 5 kelompok dengan jumlah yang sama. KI sebagai kelompok kontrol negatif, KII sebagai kelompok sindrom metabolik terinduksi, KIII, KIV, dan KV sebagai kelompok sindrom metabolik terinduksi yang diberi dosis ekstrak etanolik daun kelor secara berurutan sebesar 150 mg/kgBB, 250 mg/kgBB, dan 350 mg/kgBB. Ekspresi caspase-3 dihitung menggunakan metode semikuantitatif IDS. Selanjutnya, ekspresi caspase-3 dianalisis menggunakan uji *One-Way ANOVA*, *Post Hoc Tukey HSD*, dan uji regresi linier.

Hasil: KII memiliki skor ekspresi caspase-3 tertinggi yaitu 89,45 dan KV memiliki skor ekspresi caspase-3 terendah yaitu 25,93. Hasil uji *One-Way ANOVA* ekspresi caspase-3 pada jaringan testis tikus Wistar adalah 0.00 ($p < 0.05$) yang artinya terdapat perbedaan signifikan ekspresi caspase-3 pada semua kelompok. Perbedaan bermakna terdapat antara KI dengan KII dan KII dengan KIII, KIV, dan KV. Hasil uji regresi linier menunjukkan pengaruh negatif antara dosis ekstrak etanolik daun kelor terhadap ekspresi caspase-3.

Kesimpulan: Pemberian dosis ekstrak etanolik daun kelor yaitu 150 mg/kgBB, 250 mg/kgBB, dan 350 mg/kgBB dapat menurunkan ekspresi caspase-3.

Kata Kunci: Caspase-3; Ekstrak Daun Kelor; Sindrom Metabolik; Testis; Spermatogenesis

ABSTRACT

Introduction: *Metabolic syndrome (MetS) affects male fertility because of causing infertility. Infertility caused by an excessive spermatogenic cell death during spermatogenesis. Caspase-3 has an important role as apoptosis executor. Moringa leaf ethanolic extract is known to prevent apoptosis by reducing caspase-3 expression. This study was conducted to know the effect of increasing the dose of Moringa leaf ethanolic extract on the level of caspase-3 expression in the testes of Wistar rats with MetS models.*

Methods: *Research is experimental laboratory. Thirty Wistar rats were divided equally into 5 groups. KI as a negative control group, KII as the induced MetS group, KIII, KIV, and KV as the induced MetS group was given doses of ethanolic extract of Moringa leaves, respectively 150, 250, and 350 mg/kgBW. Caspase-3 expression was calculated using the IDS semiquantitative method. Furthermore, caspase-3 expression was analyzed using the One-Way ANOVA test, Post Hoc Tukey HSD, and linear regression test.*

Results: *KII had the highest (89.45) and KV had the lowest (25.93) caspase-3 expression score. The One-Way ANOVA test of caspase-3 expression's result was 0.00 ($p < 0.05$), meaning that there were significant differences in the expression of caspase-3 in all groups. There are significant differences between KI to KII and KII to KIII,*

KIV, and KV. The results of the linear regression test showed a negative effect between the dose of ethanolic extract of Moringa leaves on the expression of caspase-3.

Conclusion: 150, 250, and 350 mg/kgBW dose of ethanolic extract of Moringa leaves can reduce the expression of caspase-3.

Keywords: Caspase-3; Moringa Leaves Extract; Metabolic Syndrome; Testis; Spermatogenesis

PENDAHULUAN

Menurut International Diabetes Federation, sekitar 25% populasi dunia mengalami sindrom metabolik (Nolan *et al.*, 2017). Peningkatan prevalensi sindrom metabolik ini dapat berpengaruh terhadap penurunan kualitas sperma pada pria dewasa. Dalam suatu penelitian terkait perbandingan prevalensi sindrom metabolik dengan jumlah pria yang infertil menyatakan bahwa terdapat 2.462 pria infertil dengan prevalensi sindrom metabolik mencapai 17%. Selain itu, pria dengan jumlah sperma rendah lebih banyak ditemukan pada penderita sindrom metabolik dibandingkan pria dengan jumlah sperma normal (Lotti *et al.*, 2021).

Salah satu indikasi fertilitas pria adalah adanya keseimbangan antara proliferasi dan apoptosis sel germinal selama spermatogenesis untuk menghasilkan jumlah dan kondisi sperma yang baik. Terjadinya apoptosis pada sel germinal melibatkan caspase-3 yang merupakan enzim eksekutor apoptosis paling penting dalam mekanisme kematian sel. Sementara itu, apoptosis sel germinal yang berlebih menyebabkan keabnormalitasan jumlah dan kondisi sperma yang dapat mengarah pada infertilitas (Almeida *et al.*, 2013).

Pada penderita sindrom metabolik terjadi peningkatan ROS sehingga menyebabkan stress oksidatif yang memicu sinyal – sinyal apoptosis pada testis. Sinyal – sinyal apoptosis tersebut akan membuat pensinyalan apoptosis ekstrinsik maupun intrinsik yang terjadi karena peningkatan regulasi dari pro-apoptosis p53, caspase-8, dan caspase-9 sehingga dapat mengaktifasi caspase-3 (Nna *et al.*, 2019). Peningkatan stress oksidatif pada penderita sindrom metabolik tersebut akan menimbulkan apoptosis berlebih dengan tanda peningkatan caspase-3 sehingga sel – sel di tubulus seminiferus mengalami kematian berlebih yang akan mengganggu spermatogenesis dan merusak DNA sperma (Asadi *et al.*, 2017). Daun kelor dapat digunakan sebagai terapi untuk penderita sindrom metabolik dengan menekan ROS yang berlebih melalui efek antioksidan. Penekanan ROS menyebabkan tidak terjadinya peningkatan stress oksidatif yang dapat memicu peningkatan caspase-3, sehingga apoptosis berlebih yang menyebabkan infertilitas dapat dicegah (López *et al.*, 2018).

Tujuan dilakukannya penelitian ini untuk mengetahui pengaruh pemberian dosis ekstrak etanolik daun kelor (*Moringa oleifera*, Lam) terhadap tingkat ekspresi caspase-3 pada jaringan testis tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) model sindrom metabolik.

METODE

Penelitian dilakukan dengan metode eksperimental laboratorik dan *post-test only control group design*. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Pangan dan Gizi Pusat Studi Pangan dan Gizi (PSPG) Universitas Gadjah Mada Yogyakarta dan Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret Surakarta.

Subjek penelitian yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Wistar dengan syarat diikutsertakan apabila berat badan 150 – 200 gram dan berumur 2 – 3 bulan. Sementara, subjek tidak dapat diikutsertakan jika mengalami piloereksi, kulit tampak longgar dan berat badan menurun drastis setelah adaptasi, kelopak mata sedikit menutup, mata cekung, sekret pada mata berwarna merah, sering mencicit saat dipegang, lebih agresif kemudian menjadi pasif, tidak mau makan dan minum, pucat, napas berbunyi, feses lembek, cair, dan berbau.

Teknik pengambilan sampel yang digunakan adalah *purposive sampling* dengan jumlah sampel sebanyak 30 ekor tikus yang dibagi sama rata ke dalam 5 kelompok secara random yaitu KI sebagai kontrol negatif, KII sebagai kontrol positif yaitu subjek yang diinduksi sindrom metabolik, KIII, KIV, dan KV sebagai kontrol positif yang diberi ekstrak etanolik daun kelor dengan dosis berbeda.

Daun kelor yang diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70% dan disaring sehingga diperoleh filtrat dijadikan ekstrak etanolik dengan dosis yang berbeda pada penelitian ini untuk diberikan kepada subjek penelitian. Dosis 150 mg/kgBB untuk KIII, 250 mg/kgBB untuk KIV, dan 350 mg/kgBB untuk KV.

Setelah diberi ekstrak etanolik daun kelor, ekspresi caspase-3 pada jaringan testis tikus Wistar setiap kelompok diamati menggunakan Mikroskop Olympus CX21 dengan perbesaran 400x. Kemudian, foto diambil menggunakan Optilab Viewer pada sembilan lapang pandang dan dihitung menggunakan Image Raster. Penilaian dilakukan dengan metode semikuantitatif menggunakan *Intensity Distribution Score* (IDS) dengan melihat perubahan warna pada sitoplasma sel setelah pengecatan menggunakan IHC antibodi anti-caspase-3. Kemudian data yang diperoleh dianalisis menggunakan *Statistical Product and Service Solution (SPSS) 23.00 for Windows*. Normalitas distribusi data diperiksa menggunakan Uji *Shapiro-Wilk*, kemudian apabila data terdistribusi normal maka selanjutnya dilakukan uji parametrik *one-way ANOVA* dan analisis *post-hoc* menggunakan *Honest Significant Difference (HSD) test*. Penelitian ini telah lulus kelayakan etik dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan RSUD Dr. Moewardi tanggal 2 Maret 2022 dengan nomor : 267/II/HREC/2022.

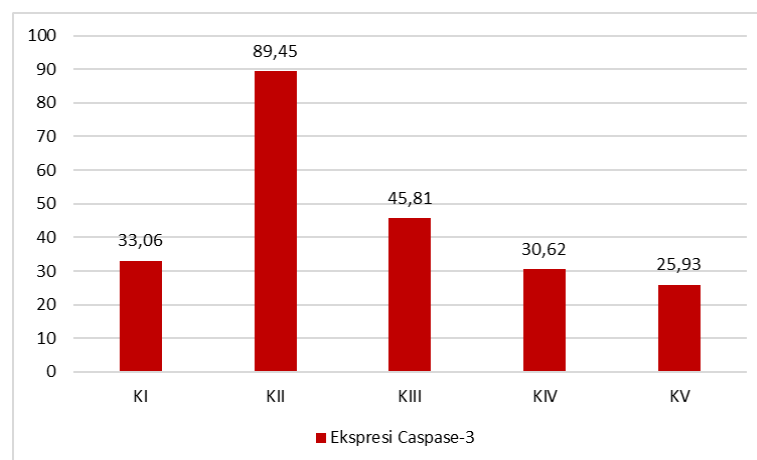
HASIL

Pencapaian Kondisi Sindrom Metabolik

Berdasarkan data primer parameter klinis terdapat presentase peningkatan berat badan >15%, kadar gula darah puasa mengalami peningkatan yaitu >270 mg/dL, kadar gula darah sewaktu mengalami peningkatan yaitu >290 mg/dL, kadar HDL mengalami penurunan yaitu <30 mg/dL, kadar LDL mengalami peningkatan yaitu >80 mg/dL, dan kadar trigliserida mengalami peningkatan yaitu >145 mg/dL.

Ekspresi Caspase-3 Jaringan Testis

Setelah dilakukan penilaian IDS, didapatkan rerata skor IDS ekspresi caspase-3 pada jaringan testis tikus Wistar seperti Gambar 1. Rerata Skor IDS Ekspresi Caspase-3 Jaringan Testis Tikus Wistar.



Gambar 1. Rerata Skor IDS Ekspresi Caspase-3 Jaringan Testis Tikus Wistar

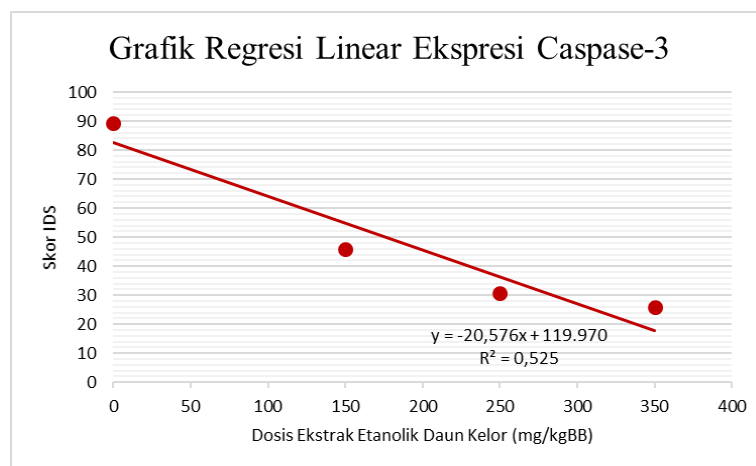
Berdasarkan gambar 1, KII memiliki skor IDS ekspresi caspase-3 paling tinggi yaitu 89,45 dan KV memiliki skor IDS ekspresi caspase-3 paling rendah yaitu 25,93.

Analisis Data Ekspresi Caspase-3 Jaringan Testis

Setelah dilakukan perhitungan, dilakukan uji normalitas *Shapiro-Wilk* dan didapatkan nilai p KI, KII, KIII, KIV, dan KV secara berurutan yaitu 0.198; 0.115; 0.052; 0.647; dan 0.725 dimana $p > 0.05$ yang artinya persebaran data setiap kelompok normal. Setelah itu, dilakukan uji parametrik *One-Way ANOVA* dan didapatkan nilai $p = 0.00$ ($p < 0.05$) artinya terdapat perbedaan tingkat ekspresi caspase-3 pada setiap kelompok tikus. Nilai $p < 0.05$ dari uji parametrik *One-Way ANOVA* juga menandakan dapat dilakukan uji *Tukey-HSD* dan terdapat perbedaan bermakna antara KI dengan KII dengan nilai $p = 0.000$ dan KII dengan KIII, KIV, dan KV dengan nilai p secara berurutan yaitu 0.005; 0.000; dan 0.000.

Analisis Data Hubungan Ekspresi Caspase-3 dengan Dosis Ekstrak Etanolik Daun Kelor

Untuk mengetahui ada tidaknya hubungan antara dosis ekstrak etanolik daun kelor dengan tingkat ekspresi caspase-3 jaringan testis tikus Wistar setiap kelompok diperlukan uji regresi linier dan didapatkan hasil seperti yang tercantum pada Gambar 2 berikut.



Gambar 2. Hasil Uji Regresi Linier Dosis Ekstrak Etanolik Daun Kelor dengan Tingkat Ekspresi Caspase-3

Berdasarkan uji regresi linier, besar nilai korelasi atau R adalah 0.725 dan R^2 adalah 0.525 yang artinya pengaruh variabel bebas terhadap variabel terikat sebesar 5.25%. Selain itu, didapatkan juga persamaan $y = 119.970 - 20.576x$ ($y = a + bx$) dimana nilai a atau konstanta menunjukkan bahwa tingkat ekspresi caspase-3 jaringan testis tikus sebesar 119.970 ketika dosis ekstrak etanolik daun kelor tidak diberikan atau dosis 0. Nilai b atau koefisien regresi adalah -20.576 yang artinya dosis ekstrak etanolik daun kelor berpengaruh negatif terhadap tingkat ekspresi caspase-3 dimana tingkat ekspresi caspase-3 testis tikus mengalami penurunan sebesar 20.576 setiap peningkatan 1 mg/kgBB dosis ekstrak etanolik daun kelor.

PEMBAHASAN

Pencapaian Kondisi Sindrom Metabolik

Subjek penelitian KII, KIII, KIV, dan KV telah memenuhi 3 dari 5 kriteria sindrom metabolik yaitu peningkatan presentase berat badan $> 8\%$, glukosa darah puasa dan sewaktu > 200 mg/dL, dan kadar HDL < 35 mg/dL.

Uji Beda antara Kelompok Kontrol Negatif (KI0 dan Kelompok Positif (KII)

Didapatkan nilai $p = 0.000$ ($p < 0.05$) setelah dilakukan uji Tukey HSD antara KI dan KII yang artinya terdapat perbedaan bermakna tingkat ekspresi caspase-3 pada jaringan testis tikus Wistar. Nilai IDS ekspresi caspase-3 KII lebih tinggi dibandingkan KI. Hal tersebut menandakan bahwa pemberian diet tinggi lemak dan injeksi STZ-NA yang dilakukan pada tikus KII berpengaruh terhadap peningkatan nilai IDS ekspresi caspase-3.

Obesitas yang disebabkan oleh diet tinggi lemak menyebabkan peningkatan jaringan lemak yang dapat memproduksi adipokin – adipokin seperti IL-1, IL-6, IL-8 dan TNF- α sehingga terjadi inflamasi. Inflamasi tersebut meningkatkan ROS pada jaringan testis, saluran reproduksi, dan semen sehingga terjadi peningkatan caspase-3 yang menandakan adanya peningkatan apoptosis (Zhu *et al.*, 2021).

Hiperglikemia meningkatkan ekspresi FoxO1, protein FasL, dan mRNA di jaringan testis. FoxO1 berikatan secara spesifik dengan Fas pada membran sel spermatogenik dan mengaktivasi caspase – caspase yang berperan dalam apoptosis. Selain itu, hiperglikemia juga menyebabkan iskemia dan hipoksia jaringan lokal sehingga menstimulasi pelepasan sitokin seperti IL-6 dalam jumlah yang besar. Sitokin – sitokin tersebut berperan dalam respon imun terhadap inflamasi di dalam tubuh. Ketika IL-6 berikatan dengan kompleks reseptor spesifik, akan terjadi peningkatan ekspresi FoxO1 dan ekspresi FasL meningkat yang berujung pada apoptosis berlebih (Wang *et al.*, 2020).

Diet tinggi lemak juga meningkatkan masuknya asam lemak jenuh dan tidak jenuh dalam darah. Testis kaya akan asam lemak tidak jenuh tetapi lemah dalam pertahanan antioksidan sehingga sangat rentan terjadi kerusakan oksidatif. Hal tersebut yang menyebabkan terjadinya apoptosis spermatosit dan sel – sel spermatogenik.⁹ Peningkatan produksi radikal bebas dapat menghambat enzim – enzim antioksidan di testis (Cheng *et al.*, 2020).

Uji Beda antara KII dengan KIII, KIV, dan KV

Setelah dilakukan uji Tukey HSD antara KII dengan KIII, KIV, dan KV didapatkan nilai p secara berturut – turut adalah 0.000; 0.005; 0.000; 0.000 ($p < 0.05$) artinya tingkat ekspresi caspase-3 jaringan testis tikus Wistar pada KII memiliki perbedaan yang bermakna dengan KIII, KIV, dan KV, dimana nilai IDS ekspresi caspase-3 KII lebih tinggi dibandingkan dengan KIII, KIV, dan KV. Hal tersebut berarti pemberian dosis ekstrak etanolik (150 mg/kgBB, 250 mg/kgBB, 350 mg/kgBB) pada KIII, KIV, dan KV dapat menurunkan tingkat ekspresi caspase-3 pada jaringan testis tikus Wistar.

Tingkat ekspresi caspase-3 pada jaringan testis KIII, KIV, dan KV yang menurun diduga karena pengaruh kandungan berupa komponen bioaktif yang terdapat pada ekstrak etanolik daun kelor (Vergara-Jimenez *et al.*, 2017). Ekstrak daun kelor berfungsi sebagai antioksidan, anti-inflamasi, anti-kanker, hepatoprotektif, neuroprotektif, hipoglikemik, mengurangi kandungan lipid dalam darah, anti-diabetes, dan anti-infertilitas. Fungsi ekstrak daun kelor tersebut berhubungan dengan komponen bioaktif yang terkandung di dalamnya (Kou *et al.*, 2018).

Hubungan Ekspresi Caspase-3 dengan Spermatogenesis

Berdasarkan hasil penelitian yang yaitu gambar histopatologi dengan pengecaatan IHC jaringan testis tikus Wistar perbesaran 100x dan 400x, dapat ditemukan pada KI struktur tubulus seminiferus normal, maturasi sel baik mulai dari spermatogonia sampai spermatozoa, dan spermatozoa dalam jumlah yang cukup pada bagian lumen. Sementara itu, pada KII, struktur tubulus seminiferus berukuran lebih kecil (atrofi), maturasi sel terganggu, hanya terdapat spermatogonia sampai spermatosit primer, dan tidak ditemukan adanya spermatozoa pada lumen. Selanjutnya, pada KIII, KIV, dan KV struktur tubulus seminiferus normal, maturasi sel baik mulai dari spermatogonia sampai spermatozoa, dan pada lumennya terdapat jumlah spermatozoa yang cukup.

Caspase memiliki peran penting dalam spermatogenesis yaitu dalam proses apoptosis. Peningkatan aktivasi caspase pada spermatozoa manusia berhubungan dengan penurunan konsentrasi, morfologi, dan motilitas sperma. Pada testis yang mengalami kerusakan yang disebabkan oleh keadaan – keadaan tertentu seperti sindrom metabolik, terjadi peningkatan aktivasi caspase-3 yang merupakan caspase eksekutor dan penanda penting apoptosis. Oleh karena itu, peningkatan caspase-3 dapat ditemukan pada kondisi azoospermia dan hipospermatogenesis (Hiffnawy *et al.*, 2020).

Pria yang mengalami sindrom metabolik membutuhkan proses metabolisme yang tinggi untuk mengembalikan keseimbangan energi di dalam tubuh. Oleh karena itu, pemakaian oksigen di dalam tubuh meningkat menyebabkan produksi berlebih ROS melalui kerja mitokondria. Produksi ROS berlebih menyebabkan peningkatan stress oksidatif yang akan memicu apoptosis berlebih. Apoptosis melibatkan peran caspase-3 sebagai caspase eksekutor sehingga kadar caspase-3 juga ikut meningkat. Terjadinya apoptosis berlebih pada testis juga mengganggu spermatogenesis sehingga sel – sel germinal testis berkurang, maturasi sel terganggu, dan spermatozoa tidak dapat terbentuk (Pereira *et al.*, 2020). Hal inilah yang menyebabkan pada lumen tubulus seminiferus KII tidak terdapat spermatozoa.

Mekanisme Kerja Komponen Bioaktif Ekstrak Etanolik Daun Kelor dalam Spermatogenesis

Setelah dilakukan uji beda, terdapat penurunan bermakna ekspresi caspase-3 pada jaringan testis tikus Wistar antara KII dengan KIII, KIV, dan KV. Berdasarkan hasil uji regresi linier, terdapat pengaruh negatif dari dosis ekstrak etanolik daun kelor terhadap ekspresi caspase-3 sebesar 52,5%. Hal tersebut diduga karena adanya efek baik untuk fertilitas pria yang berasal dari komponen bioaktif di dalam ekstrak etanolik daun kelor.

Ekstrak daun kelor dapat meningkatkan kesuburan dan menyembuhkan penyakit reproduksi pada pria (Ajuogu *et al.*, 2019). Hal tersebut dikarenakan di dalam ekstrak daun kelor terdapat banyak antioksidan yang dapat melindungi kerusakan sel yang disebabkan oleh paparan radikal bebas seperti ROS yang terbentuk saat reaksi oksidasi sel – sel biologis (Abd *et al.*, 2020).

Asam fenolat yang terkandung dalam ekstrak daun kelor memiliki hubungan dengan spermatogenesis yaitu berfungsi sebagai antioksidan di dalam tubuh dengan cara mengikat radikal bebas berupa hidroksil (OH) dan *nitric oxide* (NO). Mekanisme asam fenolat mengikat OH dikarenakan adanya komponen polifenol yang akan memberikan atom hidrogen untuk OH, dengan demikian proses oksidasi terhambat dan mengurangi jumlah radikal bebas sehingga dapat mencegah stress oksidatif yang menyebabkan apoptosis berlebih (Oboh *et al.*, 2015). Selain itu, asam fenolat yang bekerja sebagai antioksidan juga meningkatkan regulasi dari enzim SOD dan enzim katalase yang berperan dalam menyeimbangkan radikal bebas di dalam tubuh (Saibabu *et al.*, 2015). Fungsi asam fenolat lainnya yang berhubungan dengan spermatogenesis yaitu sebagai anti-inflamasi (Adewoyin *et al.*, 2017). Asam fenolat akan mengurangi produksi sitokin – sitokin pro-inflamasi seperti TNF- α dan IL-1 sehingga kadar ROS tetap seimbang dan tidak terjadi stress oksidatif yang berujung pada apoptosis sel – sel spermatogenic (Kiokias and Oreopoulou, 2021).

Flavonoid yang merupakan molekul amfipatik dapat menembus membran *lipid bilayer* dan mencegah kerusakan oksidatif, sehingga memberikan perlindungan untuk seluruh spermatozoa, membran akrosom, dan memastikan reaksi akrosom sperma yang dibutuhkan untuk pembuahan. Sebagai antioksidan, flavonoid juga dapat melemahkan akumulasi ROS dengan meningkatkan aktivitas enzim antioksidan. Flavonoid dapat meningkatkan protein Bcl-2 yang merupakan protein anti-apoptosis dan menurunkan kadar protein bax yang merupakan protein pro-apoptosis sehingga caspase-3 juga mengalami penurunan. Selain itu, flavonoid juga mampu menurunkan fragmentasi DNA dan meningkatkan potensial membran mitokondria sehingga menekan induksi apoptosis. Flavonoid juga mampu melemahkan apoptosis yang diinduksi H₂O₂ dalam sel Leydig dengan mengaktifkan jalur pensinyalan protein kinaseB yang berperan penting dalam menghambat apoptosis

sel. Suatu penelitian juga menyatakan bahwa pemberian rutin flavonoid dapat melindungi testis dari stress yang menyebabkan kerusakan testis, mencegah pembelahan PARP-1, dan penurunan caspase-3 pada testis. Sebagai anti-inflamasi, flavonoid dapat menurunkan kadar sitokin pro-inflamasi dan menginduksi aktivitas antioksidan. Selain itu, flavonoid juga dapat menghambat ekspresi NF- κ B sehingga menurunkan kadar NO di testis. Kadar TNF- α juga ditekan dengan cara meningkatkan aktivasi IL-10 yang merupakan sitokin anti-inflamasi (Ye *et al.*, 2020).

Tannin sebagai antioksidan dapat mengikat radikal bebas sesuai dengan strukturnya yaitu peningkatan efek anti-radikal sesuai dengan peningkatan derajat polimerisasinya. Tannin dapat menghambat peroksidasi lipid dan lipoksigenase. Beberapa penelitian juga menyatakan bahwa tannin memiliki kemampuan mengikat hidroksil, superoksida, dan peroksil sehingga menyeimbangkan oksidatif di dalam tubuh. Aktivitas enzim antioksidan seperti enzim SOD dan GPx juga mengalami peningkatan (Smeriglio *et al.*, 2017). Selain itu, sebagai anti-inflamasi, tannin dapat memblokir jalur stress retikulum endoplasma dan jalur inflamasi NF- κ B. Dalam mempengaruhi spermatogenesis, tannin juga mengatur hormon seks, mengatur autofagi di dalam testis, dan memperbaiki sperma dari penyimpangan kromosom (Pourmirzaei *et al.*, 2021).

Saponin dapat mengikat H₂O₂ dengan cara menghasilkan radikal hidroksil yang sangat reaktif sehingga tidak terjadi stress oksidatif yang dapat menyebabkan apoptosis sel – sel spermatogenik. Saponin juga dapat meningkatkan aktivitas enzim – enzim antioksidan seperti SOD, katalase, dan GPx yang bekerja sebagai pertahanan seluler melawan ROS yang dapat menyebabkan kerusakan sel – sel spermatogenik. Saponin juga dapat melindungi skrotum dari kerusakan spermatogenik yang disebabkan oleh peningkatan suhu dan menyembuhkan fungsi testicular dengan mengembalikan pertahanan antioksidan intrinsic (Singh and Chaudhuri, 2018).

Fungsi Proteksi Ekstrak Etanolik Daun Kelor

Nilai IDS ekspresi caspase-3 pada KV dan KIV lebih rendah dibandingkan dengan KI, hal ini menandakan bahwa ekstrak etanolik daun kelor memiliki efek proteksi. Hal tersebut didukung oleh suatu penelitian yang menyatakan bahwa daun kelor memiliki kandungan yang dapat menjaga jaringan tubuh seperti hepar, retina, jantung, sistem saraf, dan testis dari berbagai macam penyakit (Nayak *et al.*, 2020). Ekstrak etanolik daun kelor mengandung 28.50% karbohidrat, 25.02% protein, 10.42% lemak, 11.83 serat makanan, 1.108 mg beta karoten, 326.4 μ g/100 g vitamin B1, 15.2 mg/100 g vitamin C, dan asam amino esensial. Suatu studi menyatakan bahwa asam amino esensial dapat meningkatkan motilitas sperma dan kesuburan. Histidin yang merupakan asam amino esensial dapat memberikan efek proteksi terhadap stress oksidatif yang disebabkan oleh peningkatan ROS akibat sindrom metabolik. Kadar histidine banyak terkandung dalam daun kelor (González-Burgos *et al.*, 2021). Asam amino esensial juga mampu mengurangi radikal bebas, melindungi sel dari denaturasi, dan menyediakan substrat yang dapat dioksidasi untuk spermatozoa. Mekanisme asam amino esensial dalam memberikan efek proteksi adalah dengan menginhibisi peroksidasi lipid dan menyeimbangkan struktur membran menjadi lebih kuat sehingga sel sperma terlindungi dari kerusakan akibat radikal bebas (Ugur *et al.*, 2020).

KESIMPULAN

Ekstrak etanolik daun kelor (*Moringa oleifera*, Lam) dapat menurunkan ekspresi caspase-3 pada jaringan testis tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) model sindrom metabolik terinduksi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih ditujukan kepada Riza Noviarta Pesik, dr., M.Kes yang telah memberikan kritik dan saran selama pelaksanaan penelitian dan seluruh staf bagian Laboratorium Patologi Anatomi serta semua pihak yang ikut membantu namun tidak dapat disebutkan satu persatu.

DAFTAR PUSTAKA

- Abd HH, Ahmed HA and Mutar TF (2020). Moringa Oleifera Leaves Extract Modulates Toxicity, Sperms Alterations, Oxidative Stress, and Testicular Damage Induced by Tramadol in Male Rats. *Toxicology Research*, (February), pp.: 101-106. <https://doi.org/10.1093/toxres/tfaa009>
- Adewoyin M, Ibrahim M, Roszaman R, Isa M, Alewi N, Rafa A and Anuar M (2017). Male Infertility: The Effect of Natural Antioxidants and Phytocompounds on Seminal Oxidative Stress. *Diseases*, 5(1), pp.: 9. <https://doi.org/10.3390/diseases5010009>
- Ajuogu PK, Mgbere OO, Bila DS and McFarlane JR (2019). Hormonal Changes, Semen Quality and Variance in Reproductive Activity Outcomes of Post Pubertal Rabbits Fed Moringa Oleifera Lam. Leaf Powder. *Journal of Ethnopharmacology*, 233, pp.: 80-86. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.12.036>
- Almeida, C., Correia, S., Rocha, E., Alves, A., Ferraz, L., Silva, J., Sousa, M., & Barros, A. (2013). Caspase signalling pathways in human spermatogenesis. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 30(4), 487-495. <https://doi.org/10.1007/s10815-013-9938-8>
- Asadi N, Bahmani M, Kheradmand A and Rafieian-Kopaei M (2017). The Impact of Oxidative Stress on Testicular Function and the Role of Antioxidants in Improving It: A Review. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 11(5), pp.: IE01-IE05. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2017/23927.9886>
- Cheng L, Yi X, Shi Y, Yu S, Zhang L, Wang J and Su P (2020). Abnormal Lipid Metabolism Induced Apoptosis of Spermatogenic Cells by Increasing Testicular HSP60 Protein Expression. *Andrologia*, 52(11), pp.: 1-10. <https://doi.org/10.1111/and.13781>
- González-Burgos, E., Ureña-Vacas, I., Sánchez, M., & Gómez-Serranillos, M. P. (2021). Nutritional Value of Moringa oleifera Lam. Leaf Powder Extracts and Their Neuroprotective Effects via Antioxidative and Mitochondrial Regulation. *Nutrients*, 13(7), 2203. <https://doi.org/10.3390/nu13072203>
- Hifnawy MS, Aboseada MA, Hassan HM, Aboul Magd AM, Tohamy AF, Abdel-Kawi SH, Rateb ME, El Naggat EMB, et al. (2020). Testicular Caspase-3 and β -Catenin Regulators Predicted via Comparative Metabolomics and Docking Studies. *Metabolites*, 10(1). <https://doi.org/10.3390/metabo10010031>
- Kiokias S and Oreopoulou V (2021). A Review of the Health Protective Effects of Phenolic Acids against a Range of Severe Pathologic Conditions (Including Coronavirus-Based Infections). *Molecules*, 26(17). <https://doi.org/10.3390/molecules26175405>
- Kou X, Li B, Olayanju JB, Drake JM and Chen N (2018). Nutraceutical or Pharmacological Potential of Moringa Oleifera Lam. *Nutrients*, 10(3). <https://doi.org/10.3390/nu10030343>
- López M, Ríos-Silva M, Huerta M, Cárdenas Y, Bricio-Barrios JA, Díaz-Reval MI, Urzúa Z, Huerta-Trujillo M, et al. (2018). Effects of Moringa Oleifera Leaf Powder on Metabolic Syndrome Induced in Male Wistar Rats: A Preliminary Study. *Journal of International Medical Research*, 46(8), pp.: 3327-3336. <https://doi.org/10.1177/0300060518781726>
- Lotti F, Marchiani S, Corona G and Maggi M (2021). Metabolic Syndrome and Reproduction. *International*

Journal of Molecular Sciences, 22(4), pp.: 1-28. <https://doi.org/10.3390/ijms22041988>

- Nayak G, Rao A, Mullick P, Mutalik S, Kalthur SG, Adiga SK and Kalthur G (2020). Ethanolic Extract of Moringa Oleifera Leaves Alleviate Cyclophosphamide-Induced Testicular Toxicity by Improving Endocrine Function and Modulating Cell Specific Gene Expression in Mouse Testis. Journal of Ethnopharmacology, 259(November 2019), pp.: 112922. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112922>
- Nna VU, Bakar ABA, Ahmad A, Eleazu CO and Mohamed M (2019). Oxidative Stress, NF-KB-Mediated Inflammation and Apoptosis in the Testes of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats: Combined Protective Effects of Malaysian Propolis and Metformin. Antioxidants, 8(10). <https://doi.org/10.3390/antiox8100465>
- Nolan, P. B., Carrick-Ranson, G., Stinear, J. W., Reading, S. A., & Dalleck, L. C. (2017). Prevalence of metabolic syndrome and metabolic syndrome components in young adults: A pooled analysis. Preventive medicine reports, 7, 211-215. <https://doi.org/10.1016/j.pmedr.2017.07.004>
- Oboh G, Ademiluyi AO, Ademosun AO, Olasehinde TA, Oyeleye SI, Boligon AA and Athayde ML (2015). Phenolic Extract from Moringa Oleifera Leaves Inhibits Key Enzymes Linked to Erectile Dysfunction and Oxidative Stress in Rats' Penile Tissues. Biochemistry Research International, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/175950>
- Pereira SC, Crisóstomo L, Sousa M, Oliveira PF and Alves MG (2020). Metabolic Diseases Affect Male Reproduction and Induce Signatures in Gametes That May Compromise the Offspring Health. Environmental Epigenetics, 6(1), pp.: 1-18. <https://doi.org/10.1093/eep/dvaa019>
- Pourmirzaei F, Ranjbaran M, Kadkhodae M, Kianian F, Lorian K, Abdi A, Hajiaghahi M and Seifi B (2021). Sperm and Testicular Dysfunction during Cecal Ligation and Puncture-Induced Sepsis in Male Rats and Effects of Tannic Acid through Reducing Testicular Oxidative Stress and Inflammation. Iranian Journal of Basic Medical Sciences, 24(11), pp.: 1554-1560. doi: 10.22038/IJBMS.2021.59375.13183.
- Saibabu, V., Fatima, Z., Khan, L. A., & Hameed, S. (2015). Therapeutic Potential of Dietary Phenolic Acids. Advances in pharmacological sciences, 2015, 823539. <https://doi.org/10.1155/2015/823539>
- Singh D and Chaudhuri PK (2018). Structural Characteristics, Bioavailability and Cardioprotective Potential of Saponins. Integrative Medicine Research, 7(1), pp.: 33-43. <https://doi.org/10.1016/j.imr.2018.01.003>
- Smeriglio A, Barreca D, Bellocchio E and Trombetta D (2017). Proanthocyanidins and Hydrolysable Tannins: Occurrence, Dietary Intake and Pharmacological Effects. British Journal of Pharmacology, 174(11), pp.: 1244-1262. <https://doi.org/10.1111/bph.13630>
- Ugur, M. R., Dinh, T., Hitit, M., Kaya, A., Topper, E., Didion, B., & Memili, E. (2020). Amino Acids of Seminal Plasma Associated With Freezability of Bull Sperm. Frontiers in cell and developmental biology, 7, 347. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00347>
- Vergara-Jimenez M, Almatrafi MM and Fernandez ML (2017). Bioactive Components in Moringa Oleifera Leaves Protect against Chronic Disease. Antioxidants, 6(4), pp.: 1-13. <https://doi.org/10.3390/antiox6040091>
- Wang Y, Gao Y, Ding H, Liu S, Han X, Gui J and Liu D (2017). Subcritical Ethanol Extraction of Flavonoids from Moringa Oleifera Leaf and Evaluation of Antioxidant Activity. Food Chemistry, 218, pp.: 152-158. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.058>
- Ye RJ, Yang JM, Hai DM, Liu N, Ma L, Lan XB, Niu JG, Zheng P, et al. (2020). Interplay between Male Reproductive System Dysfunction and the Therapeutic Effect of Flavonoids. Fitoterapia, 147, pp.:

104756. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2020.104756>

Zhao J, Zhai L, Liu Z, Wu S and Xu L (2014). Leptin Level and Oxidative Stress Contribute to Obesity-Induced Low Testosterone in Murine Testicular Tissue. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014(1). <https://doi.org/10.1155/2014/190945>

Zhu G, Zhang Yuting, Dong J, Liu Y, Zhao F, Li T, Shi Z, Zhang Yanping, et al. (2021). Association between Body Mass Index and Male Sperm Apoptosis and Apoptosis-Related Factors. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*, 14, pp.: 1043-1051. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S289923>