

Potensi Anti-Hiperglisemia *Lunasia amara* dan Kesannya terhadap Parameter Kesuburan Tikus Jantan Teraruh-Diabetes (*Lunasia amara* Anti-Hyperglycemic Potential and its Effect towards Fertility Parameters in Diabetes-Induced Male Rat)

NOR-RAIDAH RAHMAT, AMIRA KAMALRUDIN, SHAZRUL FAZRY & MAHANEM MAT NOOR*

ABSTRAK

Lunasia amara telah digunakan dalam perubatan tradisi untuk merawat diabetes mellitus. *L. amara* dilaporkan mampu meningkatkan kesuburan tikus jantan normal pada dos 60 mg/kg berat tubuh. Kajian ini dijalankan untuk menentukan potensi ekstrak akuas batang *L. amara* sebagai agen anti-hiperglisemia dan keupayaannya mempertingkatkan parameter kesuburan tikus jantan teraruh-diabetes. Tikus teraruh-diabetes dibahagikan kepada enam kumpulan (n=5), masing-masing menerima perlakuan secara suap paksa ekstrak akuas *L. amara* (dos 60, 120, 250 dan 500 mg/kg berat tubuh), 500 mg/kg berat tubuh metformin dan air suling setiap hari selama tujuh hari. Manakala, kumpulan ke-tujuh merupakan kawalan normal (n=5) tanpa aruhan diabetes yang menerima perlakuan air suling (1 mL/tikus). Berdasarkan hasil kajian, dos anti-hiperglisemia yang berkesan iaitu 250 dan 500 mg/kg berat tubuh *L. amara* dipilih untuk melihat pengaruhnya ke atas kualiti sperma dan histologi testis tikus teraruh-diabetes. Hanya tikus teraruh-diabetes dengan perlakuan 500 mg/kg berat tubuh ekstrak *L. amara* digunakan untuk melihat taburan pengambilan 2-(N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il)amino)-2-deoksiglukosa (2-NBDG) di dalam testis. Selepas 30 hari perlakuan, tikus teraruh-diabetes dengan perlakuan 250 dan 500 mg/kg berat tubuh *L. amara* didapati merencat kesemua parameter kesuburan jantan yang dikaji walaupun berkesan dalam menurunkan aras glukosa darah. Perlakuan dengan dos 500 mg/kg berat tubuh *L. amara* juga tidak berupaya menggalakkan pengambilan 2-NBDG ke dalam sel testis tikus teraruh-diabetes berbanding kumpulan kawalan. Ini menunjukkan mekanisme anti-hiperglisemia *L. amara* tidak melibatkan pembaikan fungsi insulin daripada segi pengambilan 2-NBDG ke dalam testis serta tidak mampu menyumbang kepada pembaikan parameter kesuburan tikus jantan teraruh-diabetes.

Kata kunci: 2-NBDG; diabetes mellitus; kesuburan jantan; *Lunasia amara*

ABSTRACT

Lunasia amara has been used in folk medicine to treat diabetes mellitus. It has been reported to have pro-fertility effects in normal male rats at a dose of 60 mg/kg body weight. This study was conducted to investigate the potential of *L. amara* aqueous extract as an anti-hyperglycemic agent and its ability to improve fertility parameters in diabetes-induced male rats. Six groups (n=5) of diabetes-induced rats were force-fed with *L. amara* aqueous extract (60, 120, 250, and 500 mg/kg body weight), 500 mg/kg body weight metformin, and distilled water, respectively, for seven consecutive days. Whereas, the seventh group is the normal control (n=5) without diabetic induction given distilled water (1 mL/rat). Doses of 250, and 500 mg/kg body weight *L. amara* extract were found to be effective for anti-hyperglycemic activity when given to diabetes-induced rats. Hence, only these two doses were used to further study the effect of *L. amara* on sperm quality and testis histology in diabetes-induced rats. The effect of testicular 2-(N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino)-2-deoxyglucose (2-NBDG) uptake in diabetes-induced rats was studied only at the dose of 500 mg/kg body weight *L. amara*. After 30 days of treatment, 250, and 500 mg/kg body weight *L. amara* were both found to inhibit all of the male fertility parameters studied despite their ability to lower the blood glucose level. Furthermore, testicular cells of diabetes-induced rats treated with 500 mg/kg body weight *L. amara* showed poor 2-NBDG uptake compared to control groups. The findings indicate that the anti-hyperglycemic mechanism of *L. amara* neither improves insulin function in term of 2-NBDG uptake into the testis nor contributes to the improvement of male fertility parameters in diabetes-induced rats.

Keywords: 2-NBDG; diabetes mellitus; *Lunasia amara*; male fertility

PENDAHULUAN

Pesakit diabetes lelaki lebih cenderung untuk mengalami pelbagai masalah kesuburan. Penurunan kualiti sperma daripada segi bilangan, motiliti dan morfologi turut dilaporkan berlaku pada pesakit diabetes (Bhattacharya

et al. 2014; Singh et al. 2016). Kajian potensi tumbuhan dalam mengatasi masalah diabetes telah dijalankan secara meluas. Sebatian bioaktif tumbuhan mengawal aras glukosa darah melalui pelbagai mekanisme seperti meningkatkan perembesan insulin daripada pankreas,

sebagai pemeka-insulin atau perencat α -glukosidase (El-Abhar & Schaaln 2014). *Lunasia amara* yang lebih dikenali sebagai sanrego, dengan kandungan alkaloid yang tinggi dicadangkan mempunyai sebatian bioaktif yang merendahkan aktiviti glikolisis. Bagaimanapun, sehingga kini tiada kajian dilakukan untuk memahami mekanisme penurunan aras glukosa darah oleh *L. amara*. Selain daripada kesan anti-hiperglisemia, *L. amara* juga dilaporkan mempunyai keupayaan merawat masalah seksual lelaki serta meningkatkan kualiti sperma. Tikus yang diberikan ekstrak akuas batang *L. amara* pada dos 60 mg/kg berat tubuh menunjukkan peningkatan bilangan sperma iaitu sebanyak $(49.30 \pm 2.43) \times 10^6$ sperma berbanding $(35.33 \pm 4.74) \times 10^6$ pada kumpulan kawalan normal (Muhammad Ja'far & Mahanem 2009).

Beberapa tumbuhan dilaporkan berjaya memperbaiki kedua-dua keadaan hiperglisemia dan kualiti sperma. Sebagai contoh, ekstrak daun *Gynura procumbens* pada dos 50 dan 300 mg/kg berat tubuh meningkatkan bilangan dan motiliti sperma tikus teraruh-diabetes serta menurunkan aras glukosa darah (Nani Rahayu & Mahanem 2012). Untuk memahami fenomena pengambilan glukosa oleh sel, penanda glukosa 2-(N-(7-nitrobenz-2-oksia-1,3-diazol-4-il) amino)-2-deoksiglukosa iaitu 2-NBDG telah digunakan secara meluas dalam kajian metabolisme glukosa. Sebatian ini lazim digunakan dalam kajian anti-diabetes untuk memahami tapak jalan pengisyratan yang merangsang pengambilan glukosa oleh sel seperti pankreas (Yamamoto et al. 2015) dan juga untuk menilai sebatian anti-diabetes yang mempunyai kesan menyamai insulin (Beh et al. 2010).

Sehingga kini, tiada kajian saintifik telah dilakukan bagi mengenal pasti potensi *L. amara* sebagai agen anti-hiperglisemia dan kesannya dalam merawat masalah parameter kesuburan jantan diabetes. Oleh yang demikian, penyelidikan ini dijalankan untuk menilai kemampuan *L. amara* menurunkan aras glukosa darah serta meningkatkan parameter kesuburan tikus jantan teraruh-diabetes. Asai 2-NBDG dijalankan untuk memahami kesan ekstrak *L. amara* ke atas taburan pengambilan glukosa oleh sel testis tikus teraruh-diabetes.

BAHAN DAN KAEDAH

PENYEDIAAN EKSTRAK AKUAS BATANG *LUNASIA AMARA*

Persampelan batang *L. amara* dilakukan di Universiti Gadjah Mada, Indonesia (No Voucher: 53/BFAR/020307). Ekstrak akuas batang *L. amara* disediakan mengikut kaedah Gonzales et al. (2006) dengan sedikit modifikasi. Sebanyak 200 g serbuk batang *L. amara* direbus di dalam 1000 mL air suling (nisbah 1:5) pada suhu 80°C selama satu jam sebelum dituras menggunakan kertas turas (Whatman 3.0, Thomas Scientific). Larutan ekstrak dibekukan pada suhu -20°C sebelum melalui kaedah pengeringan beku-kering (LabConco Corporation, Amerika Syarikat). Sampel beku-kering yang terhasil disimpan pada suhu 4°C sehingga

digunakan. Serbuk ekstrak batang *L. amara* ditimbang mengikut dos dan dilarutkan di dalam air suling.

HAIWAN KAJIAN

Tikus jantan Sprague-Dawley (250-300 g) berumur 12 minggu diperolehi dari Rumah Haiwan, Universiti Kebangsaan Malaysia (UKM). Pelet makanan (Barastock Rat and Mouse Pelleted Feed, Australia) dan minuman diberikan secara *ad libitum* setiap hari. Tikus kajian menerima cahaya selama 12 jam sehari pada suhu 29°C. Tikus dipuaskan semalaman sebelum diaruh diabetes melalui suntikan intravena tunggal 55 mg/kg berat tubuh streptozotisin (STZ) (Sigma-Aldrich, Amerika Syarikat) yang telah dilarutkan dalam larutan penimbal natrium sitrat (pH4.5). Setelah lima hari, aras glukosa darah tikus puasa diukur menggunakan glukometer (Accu-Check Performa, Roche). Hanya tikus yang mencapai aras glukosa melebihi 13 mmol/L dikategorikan sebagai diabetes dan dipilih untuk meneruskan kajian. Kajian haiwan ini mendapat kelulusan daripada Jawatankuasa Etika Haiwan Universiti Kebangsaan Malaysia (Nombor kelulusan UKMAEC: FST/2013/MAHANEM/31-JAN./492-FEB.-2013-FEB.-2015).

KAJIAN ANTI-HIPERGLISEMIA

Sebanyak 35 ekor tikus dibahagikan kepada tujuh kumpulan ($n=5$). Enam kumpulan terdiri daripada tikus teraruh-diabetes iaitu kumpulan kawalan positif yang menerima perlakuan 500 mg/kg berat tubuh metformin, kumpulan kawalan negatif yang menerima perlakuan 1 mL/tikus air suling dan empat kumpulan rawatan yang menerima perlakuan ekstrak akuas batang *L. amara* pada dos 60, 120, 250 dan 500 mg/kg berat tubuh. Semua perlakuan diberikan secara suap paksa setiap hari selama tujuh hari. Kumpulan ke-tujuh terdiri daripada tikus normal tanpa aruhan diabetes yang menerima perlakuan suap paksa air suling (1 mL/tikus) dan bertindak sebagai kawalan normal. Setelah tamat tujuh hari tempoh perlakuan, tikus kajian dipuaskan selama 12-16 jam sebelum aras glukosa darah diukur. Perbezaan bacaan aras glukosa darah di akhir perlakuan *L. amara* dibandingkan dengan bacaan sebelum perlakuan untuk menentukan dos anti-hiperglisemia yang paling berkesan. Dua dos yang paling berkesan mengurangkan aras glukosa darah dipilih untuk kajian kualiti sperma dan asai 2-NBDG.

ANALISIS KUALITI SPERMA

Sebanyak 25 ekor tikus dibahagikan kepada lima kumpulan ($n=5$). Tikus teraruh-diabetes dibahagikan kepada empat kumpulan iaitu yang menerima perlakuan ekstrak akuas *L. amara* (250 dan 500 mg/kg berat tubuh) sebagai kumpulan rawatan, 500 mg/kg berat tubuh metformin sebagai kawalan positif dan kumpulan perlakuan air suling sebagai kawalan negatif. Tikus kawalan normal kumpulan ke lima pula menerima perlakuan air suling. Perlakuan diberikan setiap hari selama 30 hari. Setelah tamat tempoh perlakuan,

tikus dikorbankan melalui suntikan intravena tunggal 130 mg/kg sodium pentobarbital dan tisu epididimis kauda diasingkan mengikut kaedah Robb et al. (1978) dengan modifikasi. Tisu ini dicuci dengan 0.9% natrium klorida sebelum dipotong kecil menggunakan gunting bedah dan dieram di dalam 15 mL medium Biggers, Whitten, Whittingham (BWW) (Biggers et al. 1971). Sampel sperma dieram selama 30 min pada suhu 37°C di dalam inkubator 5% CO₂ untuk mengaktifkan sperma. Parameter kualiti sperma yang merangkumi bilangan, motiliti progresif dan viabiliti sperma dikaji mengikut kaedah WHO (2010).

HISTOLOGI TESTIS

Penyediaan sampel untuk histologi testis adalah mengikut kaedah Humason (1979). Sampel testis direndam semalaman di dalam larutan Bouin. Tisu tersebut kemudiannya direndam di dalam beberapa siri larutan alkohol untuk proses penghidratan sebelum direndam di dalam toluena dan dibenamkan di dalam lilin paraffin. Tisu testis dihiris setebal 5-7 µm dan diwarnakan dengan pewarnaan Hematoksin dan Eosin (H&E). Slaid testis dikaji secara kualitatif menggunakan mikroskop cahaya (Olympus BX51, Jepun) dan perisian *Analysis Pro*, manakala kajian kuantitatif dilakukan dengan mengukur diameter tubul seminiferus menggunakan perisian *AxiVision Rel.* versi 4.6 (Hasanin et al. 2017).

PENGASAIAN TABURAN PENGAMBILAN 2-NBDG

Sebanyak 20 ekor tikus dibahagikan kepada empat kumpulan ($n=5$). Tikus teraruh-diabetes terdiri daripada tiga kumpulan iaitu kawalan negatif, kawalan positif (500 mg/kg berat tubuh metformin) dan kumpulan rawatan (500 mg/kg berat tubuh akwas ekstrak *L. amara*). Kumpulan ke-empat merupakan kawalan normal. Kesemua perlakuan diberikan secara suap paksa setiap hari selama 30 hari sebelum asai 2-NBDG dijalankan. Asai taburan pengambilan 2-NBDG pada sel testis dilakukan mengikut kaedah Itoh et al. (2004). Sebanyak 0.1 mg 2-NBDG dilarutkan ke dalam 0.1 mL larutan stok 1M PBS (Sheth et al. 2009) sebelum disuntik ke dalam testis tikus yang dipuasakan selama

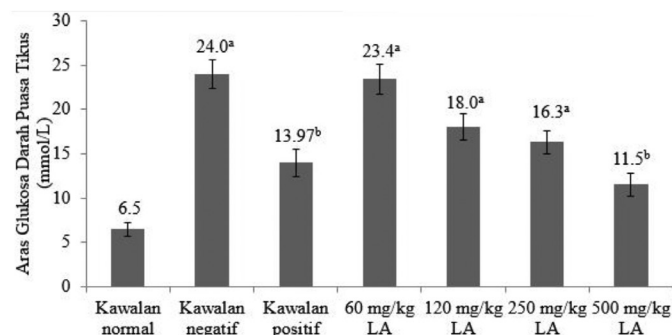
16 jam. Selepas 45 minit suntikan, tikus dikorbankan melalui suntikan intravena tunggal 130 mg/kg sodium pentobarbital. Seterusnya, organ testis diasingkan untuk dibekukan di dalam larutan nitrogen (-196°C). Organ dihiris dengan ketebalan 5 µm menggunakan kriostat (Leica CM1900) pada suhu -20°C. Slaid diperhatikan di bawah mikroskop pendarflour (Leica DM 2500) pada gelombang 485-535 nm.

ANALISIS STATISTIK

Analisis statistik dilakukan menggunakan perisian SPSS versi 22. Perbezaan data antara kumpulan kawalan dan perlakuan yang dianalisis menggunakan ujian-t dengan nilai $p<0.05$ dianggap signifikan. Data dipersembahkan dalam min \pm min ralat piawai (SEM).

KEPUTUSAN DAN PERBINCANGAN

Streptozotosin (STZ) yang digunakan sebagai bahan aruhan diabetes bertindak merosakkan sel β pankreas secara apoptosis dan menyebabkan gangguan pada penghasilan insulin (Sanchez-Lira et al. 2017). Perlakuan *L. amara* berjaya menurunkan aras glukosa darah tikus teraruh-diabetes mengikut dos yang diberikan (Rajah 1). Bagaimanapun, hanya perlakuan metformin dan dos 500 dan 250 mg/kg berat tubuh ekstrak *L. amara* menurunkan aras glukosa darah tikus teraruh-diabetes secara signifikan ($p<0.05$) iaitu masing-masing sebanyak 41.79% (13.97 ± 1.58 mmol/L), 52.08% (11.5 ± 1.25 mmol/L) dan 32.08% (16.3 ± 1.3 mmol/L) berbanding kumpulan kawalan negatif (24.0 ± 1.62 mmol/L). Kajian terdahulu menunjukkan bahawa ekstrak metanol *L. amara* berupaya merencatkan enzim α -amilase dan α -glukosidase secara *in vitro* (Rochman 2015). Kehadiran kedua-dua enzim ini di dalam usus membantu penyerapan glukosa ke dalam darah. Oleh itu, perencatan aktiviti α -amilase dan α -glukosidase oleh *L. amara* mungkin merupakan salah satu mekanisme yang menyumbang kepada penurunan aras glukosa darah tikus teraruh-diabetes di dalam kajian ini. Walaupun aras glukosa darah pada dos perlakuan 60 dan 120 mg/kg berat tubuh ekstrak *L. amara* menunjukkan pola penurunan



^a $p<0.05$ berbanding kawalan normal dan ^b $p<0.05$ berbanding kawalan negatif, LA = *L. amara*

RAJAH 1. Kesan ekstrak akwas *L. amara* ke atas aras glukosa darah puasa pada hari ke-tujuh tikus teraruh-diabetes berbanding kumpulan kawalan

berbanding kawalan negatif namun pengurangan dicerap tidak signifikan ($p>0.05$). Ini mencadangkan keberkesanan *L. amara* sebagai agen anti-hiperglisemia berkadar terus dengan dos ekstrak *L. amara*. Seterusnya, dos perlakuan 250 dan 500 mg/kg berat tubuh *L. amara* dipilih untuk mengkaji kualiti sperma tikus jantan teraruh-diabetes.

Sebanyak tiga parameter kualiti sperma dikaji iaitu bilangan, viabiliti dan motiliti progresif sperma. Perbandingan bilangan, viabiliti dan motiliti progresif sperma tikus kajian ditunjukkan dalam Jadual 1. Bilangan sperma tikus kawalan negatif dicerap berkurangan secara signifikan ($p<0.05$) sebanyak 36% iaitu $(21.38 \pm 0.75) \times 10^6$ berbanding tikus kawalan normal iaitu $(33.4 \pm 1.99) \times 10^6$. Tikus perlakuan 250 dan 500 mg/kg *L. amara* menunjukkan penurunan secara signifikan ($p<0.05$) bilangan sperma masing-masing iaitu sebanyak $(21.92 \pm 2.04) \times 10^6$ sperma (34.37%) dan $(20.25 \pm 0.39) \times 10^6$ sperma (39.37%) berbanding tikus kawalan normal. Manakala tiada perbezaan signifikan ($p>0.05$) dicerap dalam bilangan sperma antara perlakuan tikus *L. amara* bagi kedua-dua dos dengan tikus kawalan negatif dan positif. Peratus viabiliti sperma tikus perlakuan 250 dan 500 mg/kg berat tubuh *L. amara* juga memberikan bacaan tidak signifikan ($p>0.05$) berbanding tikus kawalan negatif iaitu masing-masing $39.89 \pm 6.06\%$ dan $42.88 \pm 6.38\%$ sperma hidup. Daripada segi motiliti, pemberian dos perlakuan 250 dan 500 mg/kg berat tubuh *L. amara* kepada tikus teraruh-diabetes tidak menunjukkan pembaikan pada gred progresif apabila masing-masing memberi bacaan peratus yang rendah ($p>0.05$) iaitu $25.30 \pm 2.30\%$ dan $28.49 \pm 4.46\%$ berbanding tikus kumpulan kawalan (Jadual 1). Secara keseluruhan, hasil daripada kajian kualiti sperma mencadangkan perlakuan *L. amara* pada dos 250 dan 500 mg/kg berat tubuh tidak menunjukkan kesan pembaikan pada bilangan, viabiliti dan motiliti progresif sperma tikus teraruh-diabetes.

Rajah 2(a)-2(e) menunjukkan histologi testis tikus teraruh-diabetes diberi perlakuan *L. amara* dan kumpulan kawalan. Sel spermatogenik testis tikus kawalan normal (Rajah 2(a)) pada semua peringkat menunjukkan struktur normal yang jelas kelihatan tersusun termasuk spermatogonium, spermatosit, spermatid dan spermatozoa apabila diperhatikan di bawah mikroskop cahaya (Desai et al. 2013). Sel Sertoli kelihatan memenuhi ruangan antara

sel spermatosit dan sel Leydig kelihatan di luar tubul seminiferus. Keratan rentas testis tikus teraruh-diabetes diberi perlakuan 250 mg/kg berat tubuh *L. amara* (Rajah 2(d)) menunjukkan sel spermatogenik berada dalam keadaan normal dan tersusun rapi pada semua peringkat seperti keratan testis kumpulan tikus kawalan normal dan positif. Spermatozoa juga kelihatan padat memenuhi ruang tengah lumen tubul seminiferus pada keratan testis tikus kumpulan kawalan normal, kawalan positif dan kumpulan dos perlakuan 250 mg/kg berat tubuh *L. amara*. Bagaimanapun, testis tikus kumpulan dos perlakuan 500 mg/kg berat tubuh *L. amara* menunjukkan degradasi sel testis berlaku dengan debris sel kelihatan di ruang lumen. Susunan sel spermatogen juga kelihatan tidak tersusun rapi apabila spermatozoa berada berhampiran basal tubul seminiferus (Rajah 2(e)).

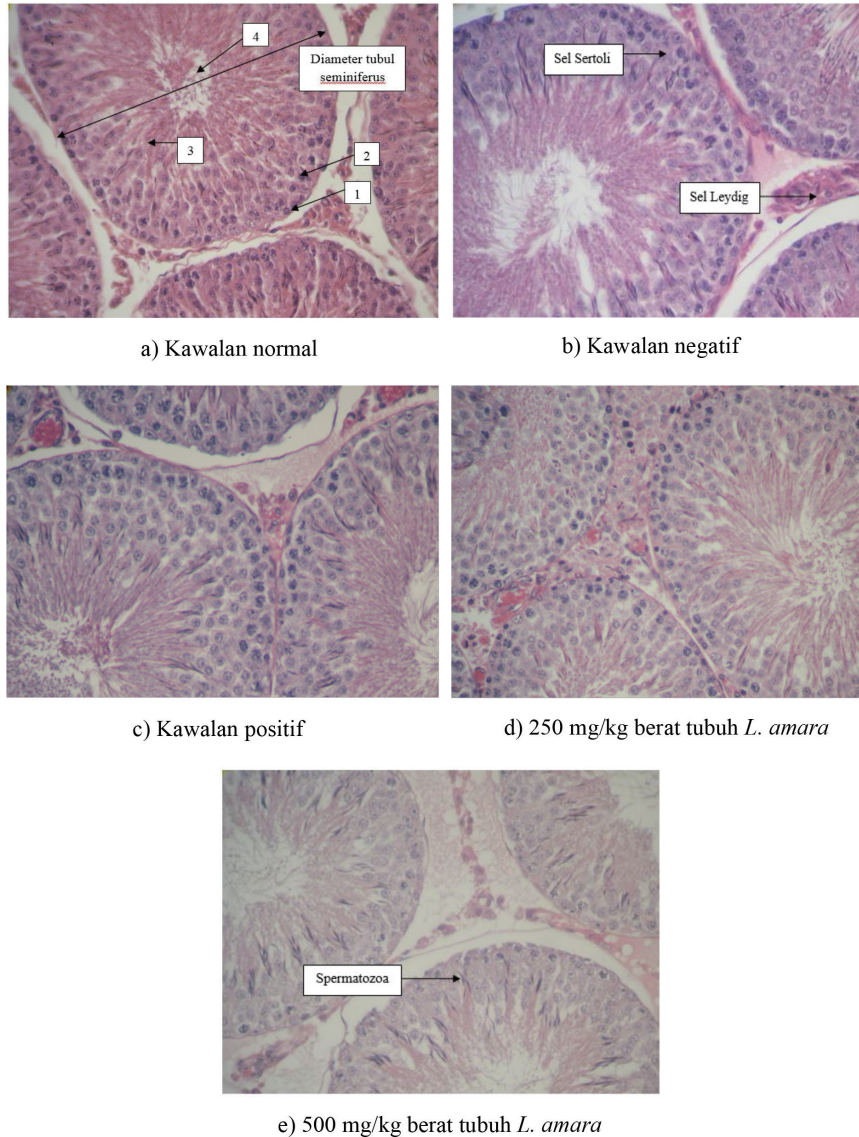
Kajian histologi testis secara kuantitatif dilakukan dengan mengukur diameter tubul seminiferus testis tikus teraruh-diabetes dengan perlakuan *L. amara* berbanding tikus kumpulan kawalan normal, negatif dan positif. Purata diameter tubul seminiferus pada kedua-dua kumpulan tikus perlakuan ekstrak akuas batang *L. amara* menunjukkan peningkatan tidak signifikan ($p>0.05$) iaitu masing-masing $22.44 \pm 0.54 \mu\text{m}$ (dos perlakuan 250 mg/kg) dan $24.67 \pm 0.55 \mu\text{m}$ (dos perlakuan 500 mg/kg) berbanding kumpulan kawalan normal ($21.37 \pm 0.36 \mu\text{m}$) dan positif ($22.23 \pm 0.40 \mu\text{m}$) (Jadual 2). Data ini selari dengan hasil kajian yang dijalankan oleh Muhammad Ja'far dan Mahanem (2009) pada tikus normal dengan dos perlakuan 60 mg/kg berat tubuh ekstrak akuas batang *L. amara*. Pemberian *L. amara* pada tikus normal tidak mengubah saiz diameter tubul seminiferus. Oleh yang demikian, bilangan sperma yang terhasil tidak berkorelasi dengan purata diameter tubul seminiferus yang terbentuk.

Asai 2-NBDG dijalankan untuk mengkaji keupayaan ekstrak *L. amara* menggalakkan pengambilan 2-NBDG ke dalam sel spermatogen sekaligus mengkaji mekanisme *L. amara* dalam menurunkan aras glukosa darah. Rajah 3 menunjukkan taburan pengambilan 2-NBDG oleh sel spermatogenik testis tikus teraruh diabetes dengan perlakuan 500 mg/kg berat tubuh *L. amara* berbanding tikus kawalan. Taburan pengambilan 2-NBDG oleh sel spermatogenik diukur melalui keamatan cahaya pendarflour. Sel testis tikus kawalan normal dan kawalan

JADUAL 1. Kesan perlakuan ekstrak *L. amara* ke atas bilangan, viabiliti dan motiliti progresif sperma tikus teraruh-diabetes berbanding kumpulan kawalan

Kumpulan	Bilangan sperma ($\times 10^6$)	Viabiliti sperma (%)	Motiliti progresif sperma (%)
Kawalan normal ($n = 5$)	33.40 ± 1.99	65.09 ± 2.14	57.90 ± 4.06
Kawalan positif ($n = 5$)	30.88 ± 5.38	43.73 ± 9.09	35.45 ± 9.83
Kawalan negatif ($n = 5$)	$21.38 \pm 0.75^*$	41.39 ± 10.59	30.10 ± 6.24
250 mg/kg <i>L. amara</i> ($n = 5$)	$21.92 \pm 2.04^*$	$39.89 \pm 6.06^*$	$25.30 \pm 2.30^*$
500 mg/kg <i>L. amara</i> ($n = 5$)	$20.25 \pm 0.39^*$	42.88 ± 6.38	$28.49 \pm 4.46^*$

*Berbeza secara signifikan ($p<0.05$) berbanding kumpulan kawalan normal
Nota gred motiliti sperma mengikut WHO (2010)



RAJAH 2. Keratan rentas tubul seminiferus testis tikus kajian. Pewarnaan H&E ($\times 400$).
1: spermatogonium; 2: spermatosit; 3: spermatid; 4: spermatozoa

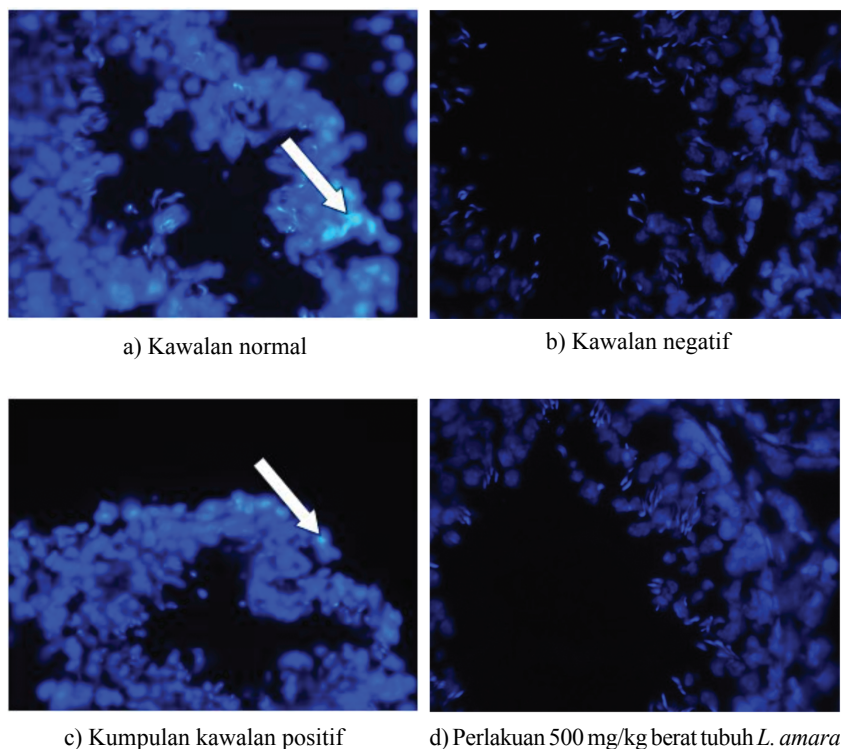
JADUAL 2. Purata diameter tubul seminiferus testis tikus teraruh-diabetes dengan perlakuan ekstrak akuas *L. amara* berbanding tikus kumpulan kawalan

Kumpulan	Purata diameter tubul seminiferus (μm)
Kawalan normal (n = 5)	21.37 ± 0.36
Kawalan negatif (n = 5)	26.04 ± 0.44^a
Kawalan positif (n = 5)	22.23 ± 0.40^b
250 mg/kg <i>L. amara</i> (n = 5)	22.44 ± 0.54^b
500 mg/kg <i>L. amara</i> (n = 5)	$24.67 \pm 0.55^{a,c}$

^a $p < 0.05$ berbanding kawalan normal, ^b $p < 0.05$ berbanding kawalan negatif dan ^c $p < 0.05$ berbanding kawalan positif

positif menunjukkan pengambilan 2-NBDG yang tinggi di dalam sel spermatogonia dan spermatozoa (Rajah 3(a) dan 3(c)). Data ini selari dengan kajian terdahulu yang mendapati glukosa merupakan substrat utama bagi penjana tenaga bagi sel spermatogonia (Bajpai et al. 1998) dan spermatozoa (Mann 1964). Bagaimanapun, sel

spermatosit dan spermatid tidak menggunakan glukosa sebagai sumber tenaga utama tetapi menggunakan laktat sebagai sumber asas aktiviti metabolisme sel (Boussouar & Benahmed 2004; Nakamura et al. 1984). Dalam kajian ini, perlakuan metformin kelihatan meningkatkan pengambilan glukosa pada sel spermatogonia tikus



Magnifikasi $\times 400$. (\rightarrow : keamatan cahaya pendarfluor 2-NBDG)

RAJAH 3. Taburan pengambilan 2-NBDG oleh sel spermatogenik tikus teraruh-diabetes dengan perlakuan ekstrak *L. amara* berbanding tikus kawalan normal, negatif dan positif

teraruh-diabetes disebabkan oleh mekanisme metformin yang mempertingkatkan fungsi insulin (Rena et al. 2013). Dalam keadaan hiperglisemia, sel β pankreas tidak dapat merembes insulin atau berlaku kerintangan terhadap insulin yang dihasilkan (Tangvarasittichai 2015). Keadaan kekurangan insulin atau kerintangan insulin pada tikus teraruh-diabetes kawalan negatif dan perlakuan 500 mg/kg berat tubuh ekstrak *L. amara* menyebabkan 2-NBDG tidak dapat diambil oleh sel spermatogonia dan spermatozoa (Rajah 3(b) dan 3(d)). Hasil keamatan cahaya pendarfluor yang rendah pada sel testis tikus teraruh-diabetes perlakuan ekstrak *L. amara* menunjukkan sel spermatogonia dan spermatozoa kurang berupaya mengambil 2-NBDG. Sebatian bioaktif yang terkandung dalam ekstrak akuas batang *L. amara* ini berkemungkinan tidak terlibat dalam pembaikan fungsi pengawalan glukosa sebagaimana insulin. Hal ini mengakibatkan bilangan, viabiliti dan motiliti sperma yang dihasilkan menurun disebabkan oleh kekurangan glukosa yang diperlukan oleh sel untuk kemandirian sperma (Takei et al. 2014).

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil kajian yang diperoleh, dapat disimpulkan bahawa ekstrak akuas batang *L. amara* pada dos 250 dan 500 mg/kg berat tubuh merupakan agen anti-hiperglisemia yang berkesan. Bagaimanapun,

pemberian kedua-dua dos tersebut didapati merencat parameter kesuburan tikus teraruh-diabetes. Pemberian dos 250 dan 500 mg/kg berat tubuh ekstrak akuas batang *L. amara* kepada tikus teraruh-diabetes menunjukkan penurunan kualiti sperma pada bilangan, viabiliti dan motiliti progresif serta penurunan aras glukosa darah secara signifikan ($p < 0.05$). Pemerhatian histologi testis secara kualitatif menunjukkan perlakuan dos 500 mg/kg berat tubuh ekstrak *L. amara* memberi kesan toksik daripada segi kualiti sperma walaupun data kuantitatif menunjukkan tiada perubahan pada saiz diameter tubul seminiferus. Analisis taburan pengambilan 2-NBDG pada sel testis tikus teraruh-diabetes dengan perlakuan 500 mg/kg berat tubuh *L. amara* menunjukkan sel spermatogenik mengalami masalah dalam pengambilan glukosa ke dalam sel untuk menjana tenaga. Analisis ini memberi gambaran tentang mekanisme pengambilan glukosa oleh sel testis yang mampu memberi kesan ke atas kualiti sperma yang dihasilkan. Kesimpulannya, mekanisme penurunan aras glukosa darah oleh ekstrak batang *L. amara* tidak menyebabkan pembaikan pada parameter kesuburan jantan teraruh-diabetes.

PENGHARGAAN

Penulis berterima kasih kepada Fakulti Sains dan Teknologi, UKM atas kemudahan penyelidikan yang disediakan serta geran penyelidikan STGL-006-2007.

RUJUKAN

- Bajpai, M., Gupta, G. & Setty, B.S. 1998. Changes in carbohydrate metabolism of testicular germ cells during meiosis in the rat. *European Journal of Endocrinology* 138: 322-327.
- Bhattacharya, S.M., Ghosh, M. & Nandi, N. 2014. Diabetes mellitus and abnormalities in semen analysis. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research* 40(1): 167-171.
- Beh, J.E., Latip, J., Abdullah, M.P., Ismail, A. & Hamida, M. 2010. *Scoparia dulcis* (SDF7) endowed with glucose uptake properties on L6 myotubes compared insulin. *Journal of Ethnopharmacology* 129: 23-33.
- Biggers, J.D., Whitten, W.K. & Whittingham, D.G. 1971. The culture of mouse embryos *in vitro*. Dlm. *Methods in Mammalian Embryology*, disunting oleh Daniel, J.C. San Francisco: Freeman. hlm. 86-116.
- Boussouar, F. & Benahmed, M. 2004. Lactate and energy metabolism in male germ cells. *TRENDS in Endocrinology and Metabolism* 15(7): 345-350.
- Desai, N., Ludgin, J., Sharma, R., Anirudh, R.K. & Agarwal, A. 2013. Female and male gametogenesis. Dlm. *Clinical Reproductive Medicine and Surgery: A Practical Guide*, disunting oleh Falcone, T. & Hurd, W.W. New York: Springer Science. hlm. 43-61.
- El-Abhar, H.S. & Schaalan, M.F. 2014. Phytotherapy in diabetes: Review on potential mechanistic perspectives. *World Journal of Diabetes* 5(2): 176-197.
- Gonzales, C., Rubio, J., Gasco, M., Nieto, J., Yucra, S. & Gonzales, G.F. 2006. Effect of short-term and long-term treatments with three ecotypes of *Lepidium meyenii* (MACA) on spermatogenesis in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 103: 448-454.
- Hasanin, N.A., Sayed, N.M., Ghoneim, F.M. & Al-sherief, S.A. 2017. Histological and ultrastructure study of the testes of acrylamide exposed adult male albino rat and evaluation of the possible protective effect of vitamin E intake. *Journal of Microscopy and Ultrastructure* 6(1): 23-34.
- Humason, G.L. 1979. *Animal Tissue Techniques*. Ed. Ke-4. San Francisco: Freeman, W.H.
- Itoh, Y., Abe, T., Takaoka, R. & Tanahashi, N. 2004. Fluorometric determination of glucose utilization in neurons *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 24: 993-1003.
- Mann, T. 1964. Metabolism of semen: Fructolysis, respiration and sperm energetics. Dlm. *Biochemistry of Semen and of Male Reproductive Tract*. London: Methuen. hlm. 265-307.
- Muhammad Ja'far, L. & Mahanem, M.N. 2009. Kesan ekstrak akua *Lunasia amara* Blanco terhadap kualiti sperma, kesuburan dan kelakuan seksual tikus jantan. *Sains Malaysiana* 38(5): 793-797.
- Nakamura, M., Okinaga, S. & Arai, K. 1984. Metabolism of round spermatids: Evidence that lactate is preferred substrate. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 247(2): 234-242.
- Nani Rahayu, M.R. & Mahanem, M.N. 2012. Kesan antihiperglisemia ekstrak metanol *Gynura procumbens* terhadap kesuburan dan libido tikus jantan teraruh diabetes. *Sains Malaysiana* 41(12): 1549-1556.
- Rena, G., Pearson, E.R. & Sakamoto, K. 2013. Molecular mechanism of action of metformin: Old or new insights? *Diabetologia* 56: 1898-1906.
- Robb, G.W., Amann, R.P. & Killian, G.J. 1978. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. *Journal of Reproduction and Fertility* 54: 103-107.
- Rochman, J. 2015. Studi aktiviti ekstrak daun Bungur (*Lagerstroemia speciosa*) dan Maitan (*Lunasia amara* Blanco) sebagai antioksidan dan inhibitor α -amilase dan α -glukosidase. Tesis Sarjana Sains, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember (tidak diterbitkan).
- Sanchez-Lira, N.M.V., Morales-Miranda, A., Garcia de la Morab, G., Contreras, J.C.L., Gonzalez-Sanchez, I., Valenciae, N., Cerbon, M. & Morimotoa, S. 2017. Orcinol derivative compound with antioxidant properties protects Langerhans islets against streptozotocin damage. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 69(3): 305-313.
- Sheth, R.A., Josephson, L. & Mahmood, U. 2009. Evaluation and clinically relevant applications of a fluorescent imaging analog to fluorodeoxyglucose positron emission tomography. *Journal of Biomedical Optics* 14(6).
- Singh, K., Devi, S. & Pankaj, P.P. 2016. Diabetes associated male reproductive dysfunctions: Prevalence, diagnosis and risk factors. *International Journal of Drug Development and Research* 8(2): 007-010.
- Takei, G.L., Miyashiro, D., Mukai, C. & Okuno, M. 2014. Glycolysis plays an important role in energy transfer from the base to the distal end of the flagellum in mouse sperm. *Journal of Experimental Biology* 217: 1876-1886.
- Tangvarasittichai, S. 2015. Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus. *World Journal of Diabetes* 6(3): 456-480.
- Whalen, R.E. 1974. Estrogen-progesterone induction of mating in female rats. *Hormones and Behavior* 5(2): 157-162.
- WHO. 2010. *WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen*. Geneva: World Health Organization.
- Yamamoto, N., Ueda-Wakagi, M., Sato, T., Kawasaki, K., Sawada, K., Kawabata, K., Akagawa, M. & Ashida, H. 2015. Measurement of glucose uptake in cultured cells. *Current Protocols in Pharmacology* 71(1):12.14.1-12.14.26.

Pusat Pengajian Biosains dan Bioteknologi
Fakulti Sains dan Teknologi
Universiti Kebangsaan Malaysia
43600 UKM Bangi, Selangor Darul Ehsan
Malaysia

*Pengarang untuk surat-menyurat; email: mahanem@ukm.edu.my

Diserahkan: 31 Julai 2017
Diterima: 6 September 2018