

EFEK EKSTRAK ETIL ASETAT DAUN LAMUN [*ENHALUS ACOROIDES* (L.F) ROYLE] TERHADAP KADAR MDA DAN GSH MENCIT JANTAN TUA

EFFECT OF ETIL ACETAT ENHAUS ACOROLDES EXTRACT TO OLD MICE'S MDA AND GSH LEVEL

Novita Rina Antarsih

Jurusan Kebidanan Poltekkes Kemenkes Jakarta III Indonesia

Jl. Arteri JORR Jatiwarna Pondok Melati Bekasi

Email : novitanuradi@gmail.com

Hp: 0817791115

ABSTRAK

*Pada laki-laki tua akan mengalami penurunan kualitas hidup dan infertilitas yang disebabkan oleh akumulasi stres oksidatif karena peningkatan kadar malondialdehyde (MDA), dan penurunan antioksidan glutathione (GSH). Daun Enhalus acoroides mengandung antioksidan yang dapat menangkal radikal bebas. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui efek ekstrak etil asetat daun lamun [*Enhalus acoroides* (L.f.) Royle] terhadap stres oksidatif mencit jantan tua. Metode penelitian ini secara eksperimental in vivo, menggunakan hewan coba mencit putih (*Mus musculus*). Mencit jantan galur DDY yang dibagi dalam 8 kelompok yaitu 2 kelompok tanpa perlakuan atau tidak diberi apapun sebagai kontrol negatif (DK dan TK); 2 kelompok kontrol positif diberi minyak zaitun (DP1 dan TP1); dan 4 kelompok diberikan ekstrak dengan berbagai konsentrasi. (DP2, DP3, TP2, TP3). Kelompok perlakuan diberikan ekstrak dan minyak zaitun selama 14 hari dengan 4 kali ulangan. Pengukuran kadar MDA dan GSH mencit jantan tua yang diberi ekstrak dengan mencit jantan tua tanpa perlakuan tidak terdapat perbedaan yang bermakna ($p > 0.005$). Dengan demikian dapat diambil kesimpulan bahwa pemberian ekstrak daun *Enhalus acoroides* tidak menyebabkan adanya perbedaan pada tingkat stres oksidatif.*

Kata Kunci: Enhalus acoroides, daun lamun, MDA, GSH

ABSTRACT

*The decline in the quality of life and infertility will occurs generally in older men is caused by the accumulation of oxidative stress due to increased levels of malondialdehyde (MDA), and decreased antioxidant glutathione (GSH). The leaves of *Enhalus acoroides* contain antioxidants that can counteract free radicals. This research was conducted to find out the effect of ethyl acetate seagrass extract *Enhalus acoroides* to oxidative stress of old male mice. The method of this research experimentally in vivo, using male mice (*Mus musculus*). The mice which are divided into 8 groups ie 2 groups without treatment or not given anything (DK and TK); 2 group were given olive oil (DP1 and TP1); and 4 groups were given extracts with various concentrations. (DP2, DP3, TP2, TP3). Treatment group was given extract and olive oil for 14 days with 4 replications. Measurements of MDA and GSH levels of old male mice extracted with old male mice without treatment showed no significant difference ($p > 0.005$). Thus it can be concluded that the administration of *Enhalus acoroides* leaf extract did not cause any difference in oxidative stress level.*

Keywords: Enhalus acoroides, lamun leave, MDA, GSH

PENDAHULUAN

Radikal bebas adalah suatu molekul atau senyawa yang memiliki elektron tidak berpasangan di orbit terluarnya dan bersifat reaktif sehingga cepat menyerang atau bereaksi dengan atom lain.¹ Radikal bebas terpenting dalam tubuh adalah radikal derivat oksigen yang disebut kelompok oksigen reaktif (*Reactive Oxygen Species/ ROS*).² Sel terus menerus mengalami stres dan kerusakan dari sumber endogen (ROS, hidrolisis, alkilasi) dan sumber eksogen (sinar ultra violet).³ Kerusakan ini dapat berakhir dengan kematian sel, sehingga mempercepat timbulnya berbagai penyakit degeneratif.⁵

Pada laki-laki setelah umur 40 tahun level testosteronnya akan turun 1-2% per tahun karena terjadinya perubahan degeneratif dari sel Leydig testis akibat penuaan. Hal ini dikenal dengan *Testosterone Deficiency Syndrome* (TDS) yang akhirnya dapat menurunkan kualitas hidup dan infertilitas pada laki-laki.⁶ Pada pemeriksaan biomolekuler terlihat peningkatan pembentukan senyawa ROS dan penurunan kapasitas antioksidan yang memicu terjadinya stres oksidatif. Hal ini dapat dideteksi dengan peningkatan kadar MDA dan penurunan antioksidan GSH.⁷

MDA merupakan hasil dari peroksidasi lipid dalam tubuh, kerusakan akibat reaksi ionisasi senyawa radikal bebas, hasil samping biosintesis prostaglandin, dan juga bisa terbentuk dari reaksi molekul lemak dengan asam lemak tak jenuh yang karbon metilennya

telah teroksidasi. Senyawa-senyawa ini dikenal toksik terhadap sel.⁸ Mekanisme pertahanan terhadap kerusakan oksidatif dapat dilakukan oleh antioksidan. Antioksidan merupakan senyawa pemberi elektron atau reduktan.⁹ GSH adalah salah satu antioksidan endogen yang paling melimpah di intraseluler, terdapat dalam konsentrasi millimolar di semua sel aerobik, eukariotik dan prokariotik.¹⁰

Sedangkan antioksidan eksogen yaitu antioksidan sintetis dan antioksidan alami. Antioksidan alami memiliki keunggulan karena bersifat aman bila dikonsumsi.¹¹ *Enhalus acoroides* merupakan jenis lamun (*seagrass*) yang tumbuh terbenam di perairan laut dangkal dan pesisir pantai di Indonesia.¹² Lamun ini mengandung antioksidan yaitu senyawa golongan fenolik, tannin dan glikosida.^{13,14} Menurut Kannan tahun 2010 kadar antioksidan totalnya setara dengan 1 gram asam askorbat. Di negara maju lamun ini digunakan untuk mencegah berbagai penyakit degeneratif dan sebagai antioksidan.¹⁵ Wakano tahun 2013 melaporkan bahwa masyarakat di Maluku memanfaatkan daunnya untuk meningkatkan daya tahan tubuh terhadap penyakit degeneratif.¹⁶

METODE

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental *in vivo* menggunakan hewan coba mencit putih (*Mus musculus*) dengan rancangan acak lengkap (*Completely Randomized Design*)

Analisis Data

Kemaknaan statistik dari semua hasil dievaluasi menggunakan uji normalitas Shapiro Wilk. Uji homogenitas varians dilakukan menggunakan uji Levene kemudian dilakukan uji parametrik One Way ANOVA. Selanjutnya diikuti dengan uji *Least Significant Difference* (LSD). Jika tidak memenuhi syarat uji parametrik maka dilakukan uji Kruskal Wallis dilanjutkan dengan uji Mann Whitney. Analisis dilakukan dengan sistem komputerisasi Perbedaan dianggap bermakna bila $p \leq 0.05$.

Hewan Coba

Penelitian ini telah mendapatkan izin tertulis dari komite etik penelitian kesehatan FKUI-RSCM dengan nomor 80/ UN2.F1/ ETIK/2016. *Mus musculus* galur *Deutch Democratic Yokohama* (DDY) jantan disebut dewasa setelah berusia sekitar 2 bulan,¹⁷ sedangkan mencit berusia tua jika berumur sekitar 14 bulan.^{18,19} Mencit tersebut berasal dari Laboratorium Patologi Institut Pertanian Bogor dan telah mengalami proses aklimatisasi selama 1 minggu di *animal house* Laboratorium Departemen Biologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Mencit diberi makanan biasa, minuman secara *ad libitum* dengan perlakuan sesuai dengan kode etik komisi penanganan dan penggunaan hewan coba.

Mencit dibagi dalam 8 kelompok yaitu 2 kelompok tanpa perlakuan atau tidak diberi

apapun sebagai control negatif (DK dan TK); 2 kelompok kontrol positif diberi minyak zaitun (DP1 dan TP1); dan 4 kelompok diberikan ekstrak daun lamun dengan berbagai konsentrasi. (DP2, DP3, TP2, TP3). Mencit mendapat perlakuan selama 14 hari, kemudian pada hari ke-15 dimatikan.¹⁹⁻²¹

Bahan Kimia

Daun *Enhalus acoroides* dalam penelitian ini diambil dari Pulau Pari Kepulauan Seribu DKI Jakarta, setelah mendapatkan ijin dari Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia Pusat Penelitian Oseanografi UPT LPKSDM Oseanografi Pulau Pari dengan nomor: 228/IPK. 12/UM/VII/2015

Pembuatan ekstrak menggunakan etil asetat, sedangkan pelarut ekstrak daun *Enhalus acoroides* menggunakan minyak zaitun.²⁰ Reagen untuk uji kadar MDA antara lain: *tiobarbituric acid* (TBA) 0,67% dari Sigma Aldrich Amerika, *Trichloro Acetic acid* (TCA) 20% dari Merck Jerman, larutan buffer fosfat pH 7 dari Merck Jerman, HCL 1M dari Merck Jerman, NaCl dari Merck Jerman, *Phosphate Buffer Saline* (PBS) 0,1 M pH 7,2 dari Merck Jerman. *Bovine Serum Albumin* (BSA) dari Sigma Aldrich Amerika. Reagen untuk uji GSH antara lain: *ditio bisnitro benzoate* (DTNB) 39,6% dari Sigma Aldrich Amerika, *Trichloro Acetic acid* (TCA) 5% dari Merck Jerman, larutan dapar fosfat 0,1 M pH 7.0 dari Merck Jerman, larutan dapar fosfat pH 8.0. dari Merck Jerman

Prosedur Penelitian

Pembuatan ekstrak etil asetat daun lamun dilakukan di Laboratorium Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat (BALITTRO) Bogor. Daun *Enhalus acoroides* segar dibersihkan dari kotoran yang melekat kemudian dicuci dengan air mengalir dan dibilas, dipotong menjadi ukuran yang lebih kecil, selanjutnya dikeringkan dengan dijemur selama 4 hari atau sampai mencapai berat konstan. Daun yang telah kering kemudian dihaluskan menggunakan mesin grinding.

Serbuk simplisia *Enhalus acoroides* (L.f) Royle ditimbang, dimasukkan dalam wadah yang terbuat dari *stainless steel*. Etil asetat dimasukkan ke dalam bahan (perbandingan bahan dan etil asetat = 1:5 atau 1 kg bahan : 5 liter etil asetat). Campuran diaduk dengan pengaduk listrik dengan kecepatan ± 100 rpm, kemudian dibiarkan selama 1 malam. Keesokan harinya (campuran serbuk daun lamun dalam etil asetat) disaring dan cairannya ditampung dalam botol (saringan pertama). Bagian ampas ditambah pelarut etil asetat dengan perbandingan bahan dengan etil asetat 1:2. Campuran diaduk dengan kecepatan ± 100 rpm selama 1 jam, kemudian disaring dengan kertas saring.

Hasil saringan (cairan jernih saringan pertama dan kedua atau filtrat 1 + filtrat 2) dirotavapor atau diuapkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 50°C dan tekanan vakum sampai semua etil asetat teruapkan. Ekstrak pekat yang dihasilkan ditimbang.

Ekstrak daun *Enhalus acoroides* 25 mg/KgBB dan 50 mg/KgBB dilarutkan dalam

minyak zaitun 10 mL diberikan secara oral per sonde per hari setiap hari selama 14 hari. Masing-masing kelompok dimatikan secara bertahap setiap hari ke-15 dengan cara dislokasi servikalis. Selanjutnya dilakukan pembedahan untuk mengangkat testis untuk pemeriksaan kadar MDA dan GSH di Laboratorium Departemen Biokimia dan Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.

Pemeriksaan tingkat stres oksidatif dilakukan dengan cara membuat *homogenate* testis terlebih dahulu, yaitu homogenisasi 100 mg jaringan testis dalam 1 mL PBS 0.1 M pH 7.4. Tingkat stres oksidatif ditentukan dengan mengukur kadar MDA menurut metode Wills yaitu hasil produk peroksidasi lipid direaksikan dengan TBA suhu 96°C akan membentuk senyawa warna merah muda yang akan memberikan serapan pada $\lambda 523$ nm. Serapan dibandingkan dengan larutan standar yang telah diketahui kadarnya.²²

Kadar antioksidan GSH diperiksa menurut metode Ellman dengan menggunakan spektrofotometer. Prinsip pemeriksaannya yaitu GSH direaksikan dengan pereaksi DTNB akan menghasilkan senyawa tinonitro benzoate berwarna kuning yang ekuivalen dengan kadar GSH dengan serapannya pada $\lambda 412$ nm. Serapan larutan uji dibandingkan dengan serapan larutan standar GSH yang telah diketahui.²³

Uji Fitokimia Ekstrak Daun *Enhalus acoroides* Dan Penapisan Fitokimia

Kandungan senyawa metabolit sekunder dari ekstrak simplisia daun *Enhalus acoroides* menggunakan etil asetat berdasarkan sertifikat pengujian No: 170/T/LAB/VIII/15 DF5.10.1.2 diperoleh hasil sebagai berikut:

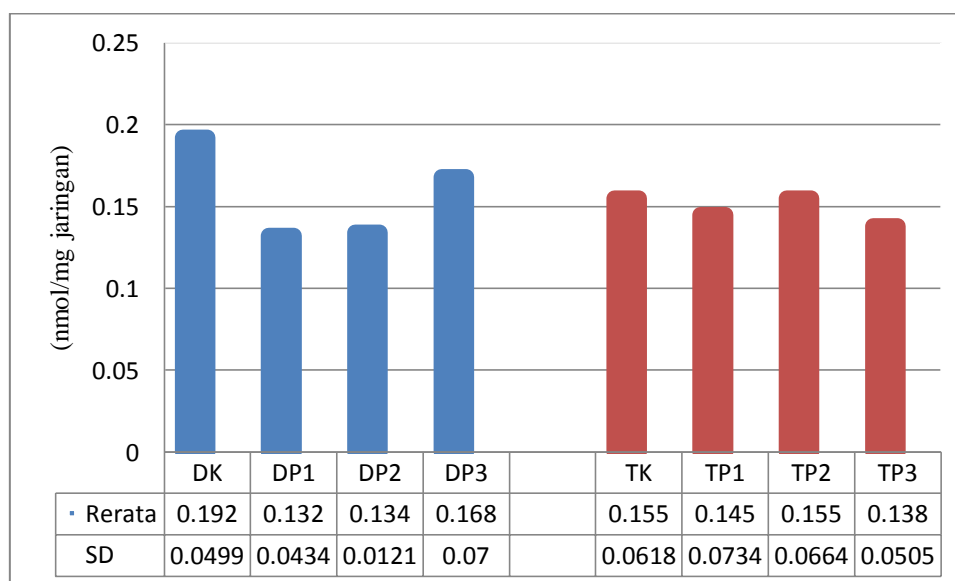
Tabel 1. Pengujian Simplisia Daun *Enhalus acoroides*

NO	Jenis	Jenis Pengujian/Pemeriksaan	Hasil Pengujian/Pemeriksaan	Metode Pengujian
1	Simplisia Daun <i>Enhalus acoroides</i>	-Ekstrak etil asetat Randemen (%) Uji Fitokimia: - Saponin - Tanin - Alkaloid - Fenolik - Flavonoid - Triterpenoid - Steroid - Glikosida	1,14 + + + - - - + +	Maserasi Kualitatif

Kadar MDA

Hasil uji parametrik One Way ANOVA diperoleh nilai $p > 0.05$ ($p = 0.227$), sehingga dapat disimpulkan bahwa tidak ada perbedaan yang bermakna data rerata kadar MDA mencit dewasa. Hasil uji parametrik One Way ANOVA diperoleh nilai $p > 0.05$ ($p = 0.925$), sehingga dapat disimpulkan bahwa tidak ada

perbedaan yang bermakna data rerata kadar MDA mencit tua. Hasil uji parametrik One Way ANOVA diperoleh nilai $p > 0.05$ ($p = 0.733$), sehingga dapat disimpulkan bahwa tidak ada perbedaan yang bermakna data rerata kadar MDA mencit tua dan mencit dewasa.



Gambar 1. Rerata kadar MDA jaringan testis mencit.

Berdasarkan gambar 1 dapat dilihat rerata kadar MDA jaringan testis mencit [*] = berbeda bermakna (One Way ANOVA; Post Hoc; $p \leq 0.05$). **DK** = dewasa kontrol 1 (mencit dewasa tanpa perlakuan); **DP1**=dewasa kontrol 2 (mencit dewasa minyak zaitun); **DP2**=dewasa perlakuan 1 (mencit dewasa ekstrak 25 mg/KgBB); **DP3**=dewasa perlakuan 2 (mencit dewasa ekstrak 50 mg/KgBB); **TK**=tua kontrol 1 (mencit tua tanpa perlakuan); **TP1**=tua kontrol 2 (mencit tua minyak zaitun); **TP2**=tua perlakuan 1 (mencit

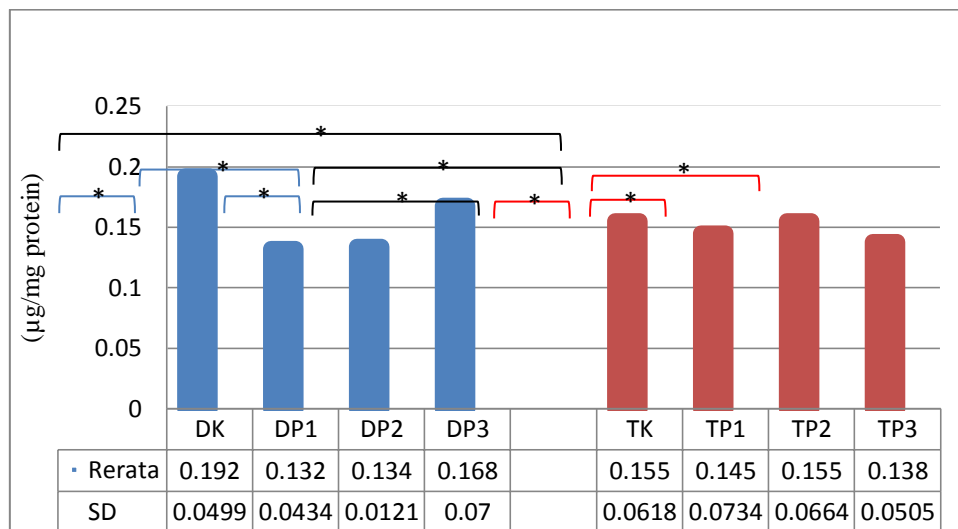
tua ekstrak 25 mg/KgBB); **TP3**=tua perlakuan 2 (mencit tua ekstrak 50 mg/KgBB). Dapat di amati pada gambar 1. terlihat tidak ada perbedaan yang bermakna pada kadar MDA testis baik dalam kelompok mencit dewasa, tua, maupun antara kelompok mencit dewasa dan tua. Namun terdapat kecenderungan penurunan kadar MDA pada mencit tua dengan dosis 50 mg/KgBB dibandingkan dengan mencit tua dengan dosis 25 mg/KgBB meskipun tidak bermakna.

Kadar GSH

Berdasarkan gambar 2 dapat dilihat rerata Kadar GSH jaringan testis. [*] = berbeda bermakna (Kruskal Wallis; Mann Whitney; $p \leq 0.05$). **DK** = dewasa kontrol 1 (mencit dewasa tanpa perlakuan); **DP1**=dewasa kontrol 2 (mencit dewasa minyak zaitun); **DP2**=dewasa perlakuan 1 (mencit dewasa ekstrak 25 mg/KgBB); **DP3**=dewasa perlakuan 2 (mencit dewasa ekstrak 50 mg/KgBB); **TK**=tua kontrol 1 (mencit tua tanpa

perlakuan); **TP1**=tua kontrol 2 (mencit tua minyak zaitun); **TP2**=tua perlakuan 1 (mencit tua ekstrak 25 mg/KgBB); **TP3**=tua perlakuan 2 (mencit tua ekstrak 50 mg/KgBB).

Berdasarkan gambar 2 (garis biru) terlihat bahwa dalam kelompok mencit dewasa terdapat adanya perbedaan yang bermakna rerata kadar GSH yaitu antara : DK lebih rendah dibandingkan DP1 ($p = 0.008$),



Gambar 2. Rerata Kadar GSH jaringan testis

DP1 lebih tinggi dibandingkan DP3. ($p = 0.008$), dan DP2 lebih tinggi dibandingkan DP3. (0.049). Pada kelompok mencit tua (garis merah pada Gambar 2), juga terdapat perbedaan yang bermakna rerata kadar GSH jaringan testis mencit yaitu antara: DK lebih rendah dibandingkan TP1 ($p = 0.014$), DP3 lebih rendah dibandingkan TP1 ($p = 0.014$), DP3 lebih rendah dibandingkan TK ($p = 0.044$).

Berdasarkan gambar 2 pula (garis hitam) bahwa terdapat perbedaan yang bermakna kadar GSH jaringan testis mencit antara kelompok mencit dewasa dan mencit tua: TK lebih rendah dibandingkan TP1 ($p = 0.035$), TP1 lebih tinggi dibandingkan TP2 ($p = 0.049$), dan TP1 lebih tinggi dibandingkan TP3 ($p = 0.036$).

Berdasarkan gambar 2 terlihat bahwa kadar GSH tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara mencit tua yang diberi ekstrak daun *Enhalus acoroides* dengan mencit tua tanpa perlakuan. Namun terjadi kecenderungan

peningkatan kadar GSH pada mencit tua dengan dosis 25 mg/KgBB dan penurunan kadar GSH pada dosis 50 mg/KgBB bila dibandingkan dengan mencit tanpa perlakuan.

PEMBAHASAN

Uji fitokimia

Ekstrak daun *Enhalus acoroides* yang diperoleh dari Pulau Pari Kepulauan Seribu DKI Jakarta pada penelitian ini menggunakan etil asetat dengan hasil uji fitokimia secara kualitatif mengandung saponin, tanin, alkaloid, steroid, dan glikosida. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun lamun.

Menurut Rumiatin tahun 2011 menyebutkan bahwa ekstrak *Enhalus acoroides* yang diambil dari pulau Pramuka Kepulauan Seribu DKI Jakarta mempunyai kandungan fenolik yang sangat kuat dari ekstrak yang menggunakan etil asetat. Komponen bioaktif yang terdapat pada ekstrak etil asetat meliputi flavonoid, fenol hidrokuinon, steroid dan triterpenoid.²⁴ Hal ini di duga karena pengambilan sampel pada

penelitian ini hanya daun sedangkan Rumiati tahun 2010 menggunakan seluruh bagian tanaman sehingga pengambilan sampel yang berbeda akan menghasilkan senyawa metabolit sekunder yang berbeda

Kadar MDA

Pada penghitungan rerata kadar MDA terdapat adanya penurunan kadar MDA pada mencit tua dengan dosis 50 mg/KgBB dibandingkan dengan mencit tua dengan dosis 25 mg/ KgBB meskipun tidak bermakna.

Hal tersebut diduga pada mencit tua yang diberi ekstrak daun *Enhalus acoroides* 50 mg/ KgBB kandungan antioksidannya dapat menangkal kerusakan oksidatif pada testis sehingga kadar MDA pada mencit tua yang diberi ekstrak daun *Enhalus acoroides* 50 mg/ KgBB lebih rendah..

Menurut Harman pada tahun 1954, menegaskan bahwa produksi ROS secara terus menerus terutama dihasilkan dari kerusakan mitokondria dan mtDNA (*mitochondrial deoxyribonucleic acid*) serta dari kerusakan makromolekuler yang mengakibatkan penurunan kapasitas fungsi seluler terkait dengan penuaan sel dan penuaan pada umumnya.²⁵

Pada penuaan laki-laki terjadi akumulasi kerusakan oksidatif yang progresif terutama meningkatnya produksi ROS dalam spermatozoa dan penurunan kapasitas antioksidan enzimatis.^{10,26} Adanya hubungan antara penuaan dengan *down-regulation* gen yang memperbaiki kerusakan akibat radikal

bebas pada sel Leydig yang menua yaitu *Cu-Zn superoxide dismutase* (SOD1), *microsomal glutathione S-transferase* (MGST1), dan *glutathione S-transferase* (GSTM2). Aktivitas antioksidan SOD1, SOD2 dan *glutathione peroxidase-1* (GPX-1) ditemukan menjadi berkurang terutama glutathion.²⁷

Menurut Wakano tahun 2013 melaporkan bahwa masyarakat Maluku sudah lama memanfaatkan daun lamun untuk meningkatkan daya tahan tubuh terhadap penyakit degeneratif.¹⁶ Penelitian sebelumnya menyebutkan bahwa daun *Enhalus acoroides* memiliki potensi antioksidan yang kuat karena kandungan fenolik yang tinggi. Aktivitas antioksidan total daun *Enhalus acoroides* setara dengan asam askorbat/ gram.¹⁵

Kandungan senyawa fenol dari ekstrak etil asetat yang terdapat dalam lamun diduga mampu bersifat sebagai antioksidan sehingga dapat mengurangi kerusakan oksidatif akibat radikal bebas.²⁴ Antioksidan senyawa fenolik dapat menghentikan atau menghambat tahapan inisiasi dengan bereaksi dengan radikal asam lemak atau menghambat propagasi dengan bereaksi dengan radikal peroksi atau radikal alkoksi. Oleh karena itu semakin tinggi kandungan senyawa fenolik dalam ekstrak seperti tanin, antosianin, dan asam-asam fenolat akan memberikan efek penghambatan peroksidasi lebih besar.²⁸

Kadar GSH

Pada perbandingan antara kelompok mencit tua yang diberi ekstrak daun *Enhalus*

acoroides dengan kelompok mencit tua tanpa perlakuan tidak terdapat perbedaan yang bermakna. Hal ini diduga kandungan antioksidan dalam ekstrak daun *Enhalus acoroides* yang menggunakan etil asetat dengan pelarut minyak zaitun belum terlalu kuat untuk dapat mencegah kerusakan oksidatif akibat penuaan.

Hal ini didukung oleh peneliti sebelumnya menyebutkan bahwa ekstrak daun *Enhalus acoroides* mempunyai kandungan fenolik yang sangat kuat secara berturut-turut didapat dari ekstrak yang menggunakan metanol, etil asetat, dan n-heksana.²⁴

Pada penuaan juga terjadi akumulasi kerusakan oksidatif yang progresif terutama meningkatnya produksi ROS dalam spermatozoa dan penurunan kapasitas antioksidan enzimatik.^{28,29} Adanya hubungan antara penuaan dengan *down-regulation* gen yang memperbaiki kerusakan akibat radikal bebas pada sel Leydig yang menua yaitu SOD1, MGST1, dan GSTM2. Aktivitas antioksidan SOD1, SOD2 dan GPX-1 ditemukan menjadi berkurang terutama glutation. Di pihak lain produksi ROS dan lipid peroksidasi meningkat.²⁷

Hal ini didukung oleh penelitian sebelumnya yang menyebutkan bahwa daun *Enhalus acoroides* memiliki potensi antioksidan yang kuat karena kandungan fenolik yang tinggi.¹⁵ Antioksidan senyawa fenolik dapat menghentikan atau menghambat tahapan inisiasi dengan bereaksi dengan radikal asam lemak atau menghambat

propagasi dengan bereaksi dengan radikal peroksi atau radikal alkoksi. Oleh karena itu semakin tinggi kandungan senyawa fenolik dalam ekstrak seperti tanin, antosianin, dan asam-asam fenolat akan memberikan efek penghambatan peroksidasi lebih besar.²⁸

KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian ini dapat disimpulkan bahwa pengaruh ekstrak daun *Enhalus acoroides* tidak ada perbedaan pada tingkat stres oksidatif.

SARAN

Hendaknya pada penelitian berikutnya menggunakan hewan coba yang lebih tua lagi dengan memelihara terlebih dahulu dari lahir sampai usia di atas 14 bulan, karena kesulitan mendapatkan yang bisa bertahan hidup di atas 12 bulan, meskipun secara teori umur paling tua bisa mencapai 3 tahun.

Hendaknya dilakukan penilaian derajat histopatologi sel Leydig tua untuk mendukung data pengaruh ekstrak daun *Enhalus acoroides* terhadap penundaan degenerasi sel Leydig dan menggunakan pemeriksaan kuantitatif.

UCAPAN TERIMAKASIH

PUSTANSERDIKJUT PPSDM
Kemenkes RI, Program Magister Ilmu
Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas
Indonesia, Lembaga Ilmu Pengetahuan
Indonesia Pusat Penelitian Oseanografi UPT
LPKSDM Oseanografi Pulau Pari, dan
BALITTRO Bogor.

DAFTAR PUSTAKA

1. Uttara B, Singh AV, Zamboni P, Mahajan RT. Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: a review of Upstream and Downstream Antioxidant Therapeutic Option. *Curr Neuropharmacol*. 2009;7:65–74.
2. Proctor PH, Reynolds ES. Free Radicals and Disease in Man. *Physiol Chem Phys Med*. 1984;16:175–95.
3. Hoeijmakers JHJ. DNA Damage, Aging, and Cancer. *Eng J Med*. 2009;36(15):1475–85.
4. Gilley D, Tanaka H, Herbets BS. Telomere Dysfunction in Aging and Cancer. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005;37:1000–13.
5. Valco M, Leibfritz D, Moncol J, Cronon MTD, Mazur M, Telser J. Free Radical and Antioxidants in Normal Physiological Function and Human Diseases. *Inter J Biochem Cell Biol*. 2007;39:44–84.
6. Chung E, Al-Bermani OS, Fowler RP, Gillman MP. Testosterone Deficiency and Erectile Dysfunction: A Practical Approach to Diagnosis and Management. *J Endocrinol Diabetes Obes*. 2013;1(2):1012 (1-5).
7. Midzak AS, Chen H, Westbrook V, Zirkin BR. Leydig Cell Aging and the Mechanisms of Reduced Testosterone Synthesis. Elsevier Irel Ltd. 2008;299:23–31.
8. Favier AE, Cadet J, Kalyanaraman B, Fontecave M, Piere J. Analysis free radical in biological system. Birkhauser verlag;Deutch: Bibliothek Cataloging; 1995.
9. Winarsi H. Antioksidan Alami dan Radikal Bebas. Yogyakarta: Kanisius; 2007.
10. Poljsak B, Milisav I. Aging, Oxidative Stress and Antioxidants. In: *Oxidative Stress And Chronic Degenerative Diseases - A Role For Antioxidants*. Croatia: InTech; 2013. p. 332–53.
11. Shahidi F. *Bailey's Industrial Oils and Fat Products*. 6th ed. New York: John Wiley and Sons Inc. Publication; 2005.
12. Christon, Djunaedi O, Purba N. Pengaruh Pasang Surut Terhadap Pertumbuhan dan Biomassa Daun Lamun Enhalus acoroides di Pulau Pari Kepulauan Seribu Jakarta. *J Perikan Dan Kelaut*. 2012;3(3):287–94.
13. Dewi CS, Soedharma D, Kawaroe M. Komponen Fitokimia dan Toksisitas Senyawa Bioaktif dari Lamun Enhalus Acoroides dan Thalassia Hemprichii dari Pulau Pramuka, DKI Jakarta. *J Teknol Perikan Dan Kelaut*. 2012;3(1):23–8.
14. Rohmatussolihat. Antioksidan, Penyelamat Sel-sel Tubuh Manusia. *Biotrends*. 2009;4(1).
15. Kannan RRR, Arumugam R, Anantharaman P. In vitro Antioxidant Activities of Ethanol Extract from Enhalus acoroides (L.f.) Royle. *Asian Pac J Trop Med*. 2010;898–901.
16. Wakano D. Pemanfaatan Buah Lamun Enhalus acoroides sebagai Sumber Makanan Alternatif Masyarakat Desa Lomin Seram Bagian Timur. *Pros FMIPA Univ Pattimura*. 2013;
17. Malole MB, Pramono CSV. Penggunaan Hewan-hewan Percobaan di Laoratorium. Depdikbud Pusat Antar Universitas Bioteknologi IPB; 1989.
18. Schwiebert R. The Laboratory Mouse. In: *Rodent Users Wet Lab Handout*. Singapore: University of Singapore; 2007. p. 3–23.
19. Pramesemara IGN. Pemberian Growth Hormone Meningkatkan Jumlah Sel Spermatogenesis, Sel Leydig, Dan Sel Sertoli Pada Mencit (mus Musculus) Tua. Pasca UNUD. 2015;
20. Rosmilawati M. Pengaruh Pemberian Ekstrak Etil Asetat Enhalus acoroides (L.f) Royle Secara Oral Terhadap Kualitas Spermatozoa Mus Muculus L (Mencit) Jantan Galur DDY. FMIPA Universitas Indonesia; 2009.
21. Hiola SF, Adnan, Bahri A. Pengaruh Fitosterol Tumbuhan Lamun (Enhalus acoroides) Terhadap Fertilitas Mencit (Mus musculus) ICR Jantan. *Bionature*. 2010;11(1):1–6.
22. Wills E. Mechanism of lipid peroxide formation in animal tissues. Vol. 99. *Biochem J*; 1966. 667–676 p.
23. Ellman G. Tissue sulfhydryl groups. Vol. 82. *Arch Biochem Biophys*; 1959. 70–77 p.
24. Rumiatin RO. Kandungan Fenol, Komponen Fitokimia dan Aktivitas Antioksidan Lamun

- Enhalus acoroides. FPIK Inst Pertan Bogor. 2011;
25. Desai N, Sabanegh Jr E, Kim T, Agarwal A. Free Radical Theory of Aging: Implications in Male Infertility. *Urology*. 2009;XX(XXX):1–6.
 26. Amar S, Ramalho-Santos J. Aging, Mitochondria and Male Reproductive Function. In: *Current Aging Science*. Bentham Science Publishers Ltd.; 2009. p. 165–73.
 27. Chen H, Ge R, Zirkin BR. Leydig Cell: From Stem Cell to Aging. *Mol Cell Endocrinol*. 2009;306(1–2):9–16.
 28. Sahidi F, Warnasundara PKJ. Phenolic Antioxidant. *Crit Rev J Food Sci Nutr*. 1997;
 29. Ruiz - Gutierrez V, Perez-Espinosa A, Vazquez CM, Santa-Maria C. . Effects of dietary fats (Fish, olive and high oleic acid sunflower oils) on lipid composition and antioxidant enzymes in rat liver. *Br J Nutr*. 1999;82(3):233–41