

Penggumpalan Sperma Mencit dengan Protein Total yang Diekstrak dari Endosperm Biji Ketapang (*Terminalia catappa*)

Mouse Sperm Agglutination with Total Protein Extracted from Endosperm Seeds of *Terminalia catappa*

Hery Haryanto^{1*}, Aceng Ruyani², dan Selfianti³

¹Jur. Biologi, FMIPA Universitas Bengkulu Indonesia

²Jur. Pendidikan Biologi, FKIP Universitas Bengkulu Indonesia

³Pendidikan Dokter, FKIK Universitas Bengkulu Indonesia

Email: heryharyanto@unib.ac.id *Penulis untuk korespondensi

Abstract

The aim of the research was to agglutinate sperm of mice with total protein extracted from endosperm seed of *Terminalia catappa*. The total proteins contain a protein like lectins. Lectins are glycoproteins that can bind to specific carbohydrate residues. Endosperm of *T. catappa* seed was homogenized with extracting buffer. The homogenate was stirred overnight with a stirring bar at 4°C, centrifuged at 2500rpm at 4°C for 15 minutes. The supernatant was added with ammonium sulfate to a concentration of 50% (w/v), stirred with a stirring bar for 3 hours, then centrifuged 10,000 rpm at 4°C for 15 minutes. Precipitated protein was purified with 12,000 MWCO dialysis bag. The protein precipitate was dissolved in buffer and the concentration was quantified by Biuret method. Mice were killed by cervical dislocation, dissected to take out its epididymal duct. Sperm suspension was made by soaking the epididymal duct in 0.9% (w/v) NaCl, then the proximal part of epididymis was cut then pressed gently to expel the sperm from of epididymal duct. Agglutination test was performed by mixing 5 µl per m suspension with 5 µl total protein extract of dialysis fraction at concentration 4.23, 8.97, 13.2, and 17.4mg/dl, or fraction of ammonium sulfate, or crude extract fraction. The fastest agglutination was showed by dialysis fraction containing 17.4g/dl protein. Endosperm of *T. catappa* seed contained protein-like lectin that could agglutinate mouse sperm.

Keywords: lectin, total protein, endosperm, *Terminalia catappa*, agglutination, sperm, mouse

Abstrak

Penelitian ini bertujuan menggumpalkan sperma mencit dengan ekstrak total protein dari endosperm biji ketapang. Biji ketapang mengandung protein yang berperilaku seperti lektin. Lektin adalah glikoprotein yang dapat berikatan dengan residu karbohidrat spesifik. Buah ketapang masak dipecahkan, diambil bagian endospermnya dan dicuci bersih dengan akuades. Endosperm biji dihomogenasikan dalam larutan buffer pengeksrak. Homogenat diaduk semalam dengan batang magnet berputar pada suhu 4°C. Selanjutnya homogenat disentrifus 2500 rpm 4°C selama 15 menit. Supernatan ditambahkan ammonium sulfat sampai konsentrasi 50% (w/v), diaduk selama 3 jam, selanjutnya disentrifus 10.000 rpm at 4°C selama 15 menit. Protein terpresipitasi dimurnikan dengan kantong dialisis ukuran 12.000 MWCO (*molecular weight cut off*). Protein terpresipitasi dilarutkan dalam buffer dan diukur kadar proteinnya dengan metode Biuret. Mencit dimatikan secara *cervical dislocation*, dibedah, dan diambil saluran epididymis. Suspensi sperma dibuat dengan merendam epididymis dalam larutan NaCl 0,9% (w/v), selanjutnya bagian proksimal epididymis dipotong lalu ditekan perlahan hingga sekresi cairan epididymis keluar dan tersuspensi dengan NaCl 0,9%. Uji agglutinasi dilakukan dengan mencampur suspensi 5 µl sperma mencit dengan 5 µl ekstrak potein total fraksi dialyisis dari konsentrasi 4,23; 8,97; 13,2 dan 17,4 µg/dl, fraksi ammonium sulfat, dan fraksi ekstrak kotor. Laju penggumpalan sperma mencit yang paling cepat yaitu fraksi amonium sulfat yang mengandung 17,4 µg/dl protein. Endosperm biji ketapang mengandung lektin yang dapat menggumpalkan sperma mencit.

Kata kunci: lektin, protein total, endosperma, *Terminalia catappa*, aglutinasi, sperma, mencit

Diterima: 19 September 2015, disetujui: 30 Oktober 2015

Pendahuluan

Ketapang (*Terminalia cattapa*) merupakan tumbuhan program penghijauan di sepanjang daerah pantai, karena tumbuhan tersebut sangat toleran dengan salinitas, mempunyai estetika sebagai tanaman pelindung dengan cabang horizontal, tahan terhadap terpaan angin, pencegah abrasi, dan bijinya yang edibel dikenal dengan “*tropical almond*” (Mile, 2007).

Lektin merupakan molekul glikoprotein yang dapat mengikat gugus karbohidrat spesifik. Lektin terdapat pada bagian tumbuhan (terutama endosperm biji), invertebrata, ikan (Kumar dkk., 2012; Sharon, 2007). Lektin merupakan glikoprotein asal tumbuhan dan hewan yang dapat berikatan secara spesifik dengan residu glikokonjugat pada permukaan sel (Sharon, 2007). Aktivitas lektin berperan dalam berbagai fungsi biologi (Kumar dkk., 2012, Sharon 2007), antara lain sebagai petunjuk adanya sel-sel tumor (Muchtadi, 1989), sebagai spermisida (Anuja dkk., 2011; Nicolson dkk., 1977, Martinez dkk., 2012).

Mekanisme pengikatan lektin terhadap gugus karbohidrat spesifik pada membran sel berupa ikatan non-kovalen. Ikatan ini memang lemah, tetapi jika terbentuk lebih dari satu ikatan, baik antarmolekul maupun di dalam molekul lektin, maka cukup kuat untuk menggumpalkan sel (Alroy dkk., 1988). Semua molekul lektin memiliki dua atau lebih tempat ikatan dengan karbohidrat, sehingga sangat memungkinkan lektin untuk menggumpalkan sel darah merah dan bereaksi dengan struktur glikoprotein atau glikolipid pada keadaan fisiologi maupun patologi (Vorki, 1993).

Penelitian ini bertujuan menguji penggumpalan spermatozoa Mencit (*Mus musculus*) dengan ekstrak protein total dari endosperma biji Ketapang (*Terminalia catappa*). Hal ini terkait dengan penelitian awal yang menunjukkan ekstrak protein kotor biji ketapang dapat menggumpalkan eritrosit semua golongan darah manusia (Ratnasari, 2014). Ini menunjukkan bahwa biji ketapang mengandung suatu protein yang berperilaku sebagai lektin.

Metode Penelitian

Ekstraksi Protein Endosperm Biji Ketapang

Biji ketapang dipecahkan kulitnya, dipisahkan endosperm dari bagian yang lain. dicuci bersih dengan akuades. Lima puluh gram dihomogenasikan dalam 150 ml larutan buffer dingin yang mengandung 50 mM Tris-Hydroxymethyl-Amino Methane, 50 mM NaHCO₃, 50 mM MgCl₂, 5 mM Na₂S₂O₃ pada pH 7,4 dan homogenat diaduk semalam dengan batang magnet berputar pada suhu 4°C, setelah itu disaring dengan menggunakan kain kasa. Hasil saringan disentrifugasi pada kecepatan 2500 rpm selama 15 menit pada suhu 4°C. Supernatan ditambah dengan amonium sulfat 50% (w/v). (Singh dkk., 2009). Selanjutnya dilakukan sentrifugasi 10.000 rpm selama 30 menit pada suhu 4°C untuk memisahkan protein total terpresipitasi dengan supernatan. Protein terpresipitasi dilarutkan dalam buffer 2 mL, selanjutnya dimasukkan dalam kantong dialysis ukuran 12.000 MWCO dan direndam dalam buffer selama 12 jam dengan 2 kali pergantian buffer sambil diaduk dengan *magnetic stirrer*. Proses pemurnian secara dialysis dilakukan pada suhu kamar, sedangkan protein hasil pemisahan secara dialysis disimpan dalam kulkas dengan suhu 4°C dan digunakan dalam prosedur berikutnya.

Penentuan Kadar Protein

Kadar protein ditentukan dengan metode Biuret dengan Bovine Serum Albumin (BSA) sebagai protein standar dengan menggunakan spektrofotometer Genesys pada panjang gelombang 540 nm (Robyt dan White, 1987). Kadar protein yang diukur adalah fraksi ekstrak kotor, fraksi amonium sulfat, dan fraksi dialisis

Pembuatan Suspensi Sperma Mencit

Mencit umur 8–12 minggu dan berat 25–35 gram dimatikan dengan cara *cervical dislocation*, dibedah, dan diambil bagian saluran epididimis, diletakkan ke dalam cawan petri yang berisi NaCl 0,9% sebanyak 1 mL. Bagian proksimal epididimis tersebut dipotong lalu ditekan perlahan hingga sekresi cairan epididimis keluar dan tersuspensi dalam garam fisiologis (Suparni, 2009).

Uji Penggumpalan Spermatozoa

Ekstrak total protein fraksi dialysis diuji aglutinasi dengan suspensi sperma mencit dengan variasi konsentrasi 4,23; 8,97; 13,2 dan 17,4 µg/dL. Uji aglutinasi spermatozoa juga dilakukan pada fraksi ekstrak kotor, dan fraksi amonium sulfat. Prosedur uji aglutinasi sebagai berikut : suspensi sperma sebanyak 5 µL diteteskan di atas kaca objek ditambahkan dengan 5 µL ekstrakprotein, diaduk dengan tusuk gigi 3 putaran, dan sekalian pencatat waktu dihidupkan, kemudian diamati di bawah mikroskop selama 5 menit (300 detik) dan didokumentasikan. Bila uji penggumpalan spermatozoa lebih dari 5 menit tidak ada penggumpalan dinotasikan sebagai 300 detik.

Analisis Data

Data laju uji penggumpalan spermatozoa dianalisis sidik ragam (ANOVA). Apabila terdapat perbedaan yang signifikan dan dilanjutkan dengan uji Duncan.

Hasil dan Pembahasan

Kadar Total Protein Pada Endosperm Biji *T. catappa*

Uji Biuret untuk kadar protein endosperm biji *T. Catappa* fraksi ekstrak kotor, fraksi amonium sulfat, dan fraksi dialysis dapat dilihat pada Tabel 1. Fraksi amonium sulfat menunjukkan kadar protein lebih tinggi daripada fraksi dialysis. Ini memberi petunjuk bahwa pada proses dialysis ada protein yang berat molekulnya kurang dari 12.000 kD keluar dari kantong dialysis. Karena ukuran kantong dialysis adalah 12.000 MWCO.

Penggumpalan Sperma Mencit dengan Ekstrak Protein Total Endosperm Biji *T. catappa*

Pengamatan penggumpalan spermatozoa mencit dengan mikroskop menunjukkan ada tiga macam tipe pengikatan antarspermatozoa yang dijumpai oleh protein lektin. Pengikatan antara bagian kepala dengan kepala-kepala, kepala-ekor, ekor-ekor dari spermatozoa (Gambar 1). Ini menunjukkan bahwa pada bagian kepala dan ekor spermatozoa mencit terdapat glikolipid dan glikoprotein yang dapat

berikatan dengan protein yang berperilaku lektin. Pengamatan mikroskop menunjukkan dari ketiga macam ikatan tersebut yang paling banyak terjadi adalah ikatan antara kepala-kepala spermatozoa. Hal ini menunjukkan bagian kepala spermatozoa, atau bagian akrosoma lebih banyak terdapat glikolipid dan glikoprotein dari bagian ekor (Nicolson dkk, 1977).

Membran sel sperma bagian akrosom terdapat $\alpha(1-4)$ galaktosil transferase yang merupakan segmen prinsipal dari akrosom dan berfungsi menginisiasi ikatan antara kepala sperma dengan zona pelusida sel telur khususnya pada zona pelusida 3 (ZP3) (Youkim dkk., 1996). Protein lektin dari endosperm biji ketapang memiliki sifat yang sama dengan ZP3 karena sama-sama dapat mengikat karbohidrat spesifik yang terdapat pada membran sel sperma terutama pada bagian kepala dengan bantuan ikatan dari glikoprotein galaktosil transferase.

Pengujian Laju Penggumpalan Sperma dengan Protein Total Endosperm Biji *T. catappa*

Pengukuran laju penggumpalan sperma dengan fraksi ekstrak kotor, fraksi amonium sulfat, dan fraksi dialysis dengan 5 variasi konsentrasi protein (0; 4,23; 8,97; 13,2 dan 17,4 µg/dl) (Gambar 2A). Pada semua kontrol sampai 300 detik (5 menit) suspensi sperma mencit tidak nampak adanya penggumpalan spermatozoa. Namun pada semua konsentrasi dari semua fraksi terjadi penggumpalan dengan laju yang berbeda. Semakin tinggi konsentrasi total protein endosperm pada semua fraksi berkecenderungan semakin cepat. Fraksi protein dari hasil dialysis menunjukkan penggumpalan yang paling cepat. Sementara perbandingan rata-rata laju penggumpalan sperma mencit pada ketiga fraksi tersebut menunjukkan protein total dari fraksi dialysis menunjukkan paling cepat menggumpal (Gambar 2B).

Analisis Sidik Ragam Fraksi Dialysis Protein Total Data Endosperm Biji *T. Catappa*

Analisis sidik ragam penggumpalan spermatozoa mencit dengan protein total dari fraksi dialysis menunjukkan perbedaan yang nyata, artinya ada pengaruh konsentrasi terhadap kecepatan penggumpalan spermatozoa mencit. Semakin tinggi konsentrasi total protein semakin

Penggumpalan Sperma Mencit dengan Protein Total

cepat proses penggumpalannya. Oleh karena dilanjutkan uji *Duncan* untuk mengetahui beda nyata terkecil dari laju penggumpalan sperma setiap perlakuan konsentrasi (Tabel 2). Uji ini menunjukkan konsentrasi 17,47 µg/dl fraksi dialysis protein total berbeda nyata dengan konsentrasi lainnya. Sementara konsentrasi 13,2; 8,97 dan 4,23 µg/dl tidak ada perbedaan nyata diantara konsentrasi tersebut.

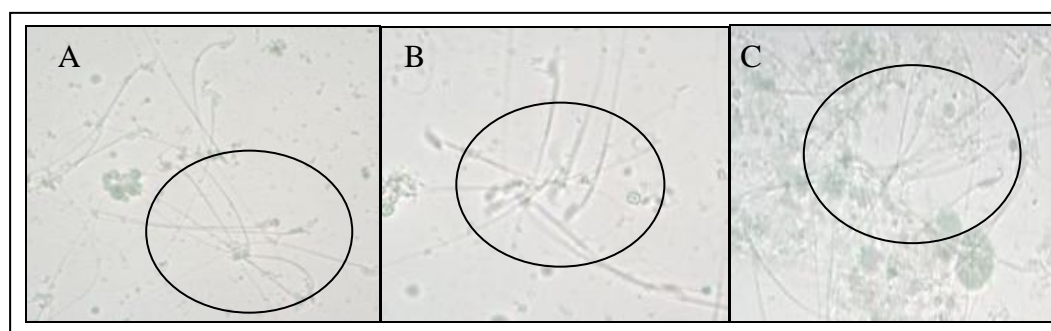
Endosperm biji ketapang mengandung protein berperilaku sebagai lektin yang dapat menggumpalkan spermatozoa mencit. Ini menunjukkan bahwa membran permukaan sel spermatozoa mencit terdapat gugus karbohidrat dari glikolipid dan glikoprotein yang dapat berikatan dengan lektin dari endosperm biji ketapang.

Tabel 1. Pengukuran kadar protein ketiga jenis ekstrak biji *T. catappa*

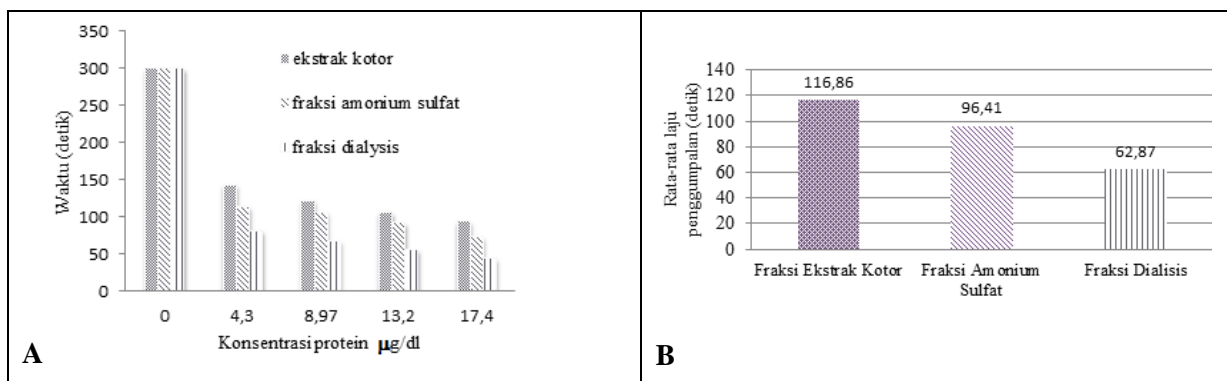
No.	Jenis Fraksi	Kadar Protein (µg/dl)
1	Fraksi ekstrak kotor	17,40
2	Fraksi ammonium sulfat	26,40
3	Fraksi dialysis	17,47

Tabel 2. Uji *Duncan* rata-rata laju penggumpalan sperma pada fraksi dialysis endosperm biji *T. catappa*

No	Konsentrasi µg/dl	Rata-ratalaju penggumpalan (detik)	Notasi
1	17,4	44,8	a
2	13,2	56,12	b
3	8,97	68,33	b
4	4,23	82,22	b



Gambar 1. Tiga macam penggumpalan sperma oleh ekstrak protein total endosperm biji ketapang, penggumpalan antara kepala-kepala (A), antara kepala-ekor (B), dan antara ekor-ekor (C).



Gambar 2. Penggumpalan spermatozoa mencit dengan ekstrak kotor, fraksi amonium sulfat, dan fraksi dialysis. **A.** Semakin tinggi konsentrasi total protein endosperm pada semua fraksi berkecenderungan semakin cepat. **B.** Perbandingan laju aglutinasi total protein endosperm pada semua fraksi. Ekstrak protein total fraksi dialysis menunjukkan penggumpalan spermatozoa mencit paling cepat.

Simpulan dan Saran

Simpulan

Protein total yang diekstrak endosperm biji ketapang (*Terminalia catappa*) fraksi ekstrak kotor, fraksi amonium sulfat, dan fraksi dialysis dapat menggumpalkan spermatozoa mencit.

Laju penggumpalan sperma mencit yang paling cepat adalah fraksi dialysis dengan kadar protein 17,4 µg/dl dan konsentrasi 17,4 µg/dl tersebut berbeda nyata dengan konsentrasi lainnya.

Saran

Perlu penelitian lanjutan kromatografi total protein untuk separasi semua fraksi protein yang berperilaku sebagai lektin.

Penelitian lanjutan karakterisasi protein berperilaku protein lektin, misalnya elektroforesis mengetahui profil protein lektin dari biji *T. catappa* tersebut.

Daftar Pustaka

- Alroy, J., Ucci, A.A. dan Pierra. 1988. Lectin histochemistry: an update, advances in immunohistochemistry and histochemistry. Ed. RA DeLellis, Raven Press NY: 93–131.
- Anuja, M.M., Nithya, R.S., Swathy, S.S., Rajamanickam, C. dan Indira, M. 2011. Spermicidal action of a protein isolated from ethanolic root extracts of *Achyranthes aspera*: An in vitro study. *Phytomedicine*, 18: 776–782.
- Kumar, K.K., Lalith, P.C.K., Sumanthi, J., Reddy, G.S., Shekar, P.C., Reddy, B. 2012. Biological role of lectins: A review. *Journal Orofac Sci.*, 4: 20–5.
- Martinez, D.S.T., Freire, M.G.M., Mazzafera, P., Araujo-Júnior, R.T., Bueno, R.D. dan Macedo, M.L.R. 2012. Insecticidal effect of labramin, a lectin-like protein isolated from seeds of the beach apricot tree, *Labramia bojeri*, on the Mediterranean flour moth, *Ephestia kuehniella*. *Journal of Insect Scienc*, 12 (62): 2–12.
- Mile, M.Y. 2007. Pengembangan species tanaman pantai untuk rehabilitasi dan perlindungan kawasan pantai pasca tsunami. *Info teknis*, 5 (2): 1–8.
- Nicolson, G.L., Usui, N., Yanagimachi, R., Yanagimachi, H. dan Smith, J.R. 1977. Lectin-binding site on the plasma membranes of Rabbit spermatozoa. *The Journal of Cell Biology*, 74 : 950–962.
- Ratnasari, N.P. 2014. Pengaruh protein lektin dari ekstrak biji ketapang (*Terminalia catappa*) terhadap hemaglutinasi eritrosit pada manusia. *Skripsi*. Bengkulu: Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Bengkulu
- Robyt, J.F. and White, B.J. 1987. *Biochemical Techniques – Theory and Practice*. Waveland Press, Inc. Prospect Height, Illinois.
- Sharon, N. 2007. Lectins: Carbohydrate-specific reagents and biological recognition molecules. *J. Biol. Chem.*, 282: 2753–2764.
- Singh, R.S., Thakur, G. dan Bhari, R. 2009. Optimization of culture conditions and characterization of a new lectin from *A. niger*. *Indian J. Microbiol*, 49: 221.
- Suparni. 2009. Pengaruh pemberian vitamin c terhadap jumlah sperma dan morfologi sperma mencit jantan dewasa (*Mus musculus* L.) yang dipaparkan monosodium glutamate (MSG). Tesis. Medan: Sekolah Pascasarjana USU.
- Vorki, A. 1993. Biological role of oligosaccharides all theories are correct. *Glycobiology*, 3: 97– 107.
- Youkim, A., Hathaway, H.J., Miller, D.J., Gong, X. dan Shur, B.D. 1996. Overexpressing sperm surface $\alpha(1,4)$ -galactosyltransferase in transgenic mice affects multiple aspects of sperm-egg interactions. *The Journal of Cell Biology*, 126 (6): 1573–1583.