

## Pengaruh Ekstrak Daun Sawo Manila (*Manilkara zapota* L.) terhadap Jumlah Sel Leydig dan Spermatogenik Mencit Diabetes

### *The Effect of Sapodilla Leaf Extract (*Manilkara zapota* L.) Leaf Extract on the Amount of Leydig and Spermatogenic Cells in Diabetic Mice*

Gressia Katrisna Octavyani\*, Nur Kuswanti, Firas Khaleyla

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Universitas Negeri Surabaya

\*e-mail: gressia.17030244028@mhs.unesa.ac.id

**Abstrak.** Diabetes melitus dapat menyebabkan gangguan reproduksi terutama pada sel-sel testis. Daun sawo mengandung senyawa myricetin yang bersifat antidiabetes. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak daun sawo terhadap jumlah sel Leydig dan spermatogenik testis mencit. Studi ini adalah penelitian eksperimental dengan menggunakan rancangan acak lengkap (RAL). Penelitian menggunakan 24 ekor mencit jantan dengan 6 kelompok yaitu kelompok negatif (KN), kelompok positif (KP), kelompok glibenclamide (KG), konsentrasi 1 (K1:28mg/kgBB), K2: 56mg/kgBB dan K3: 112mg/kgBB, dengan 4 pengulangan. Mencit diabetes dibuat menggunakan *alloxan* dosis 0,08ml/20kgBB secara intraperitoneal. Ekstrak daun sawo manila (*Manilkara zapota* L.) diberikan secara oral 2 kali sehari selama 14 hari. Data sel Leydig dan sel spermatogenik diperoleh melalui pengamatan preparat jaringan testis dengan pewarnaan HE. Data dianalisis menggunakan uji Kruskal-Wallis, dilanjutkan dengan Mann-Whitney. Hasil analisis menunjukkan bahwa ekstrak daun sawo berpengaruh terhadap jumlah sel Leydig ( $p < 0,001$ ). Perbedaan nyata terjadi antara perlakuan K1, K3, KP dan KG dengan K2 dan KN. Ekstrak daun sawo tidak mempengaruhi jumlah spermatogonium dan spermatosit ( $P > 0,05$ ), namun berpengaruh terhadap jumlah spermatid ( $P < 0,001$ ) dengan perbedaan signifikan antar perlakuan. Jumlah spermatid pada perlakuan ekstrak lebih tinggi daripada KP, pada K2 hampir menyamai KN. Disimpulkan bahwa, ekstrak daun sawo (*M. zapota* L.) mempengaruhi jumlah sel Leydig dan spermatid, dengan perlakuan optimum pada konsentrasi 2 (16,8 mg/20grBB).

**Kata kunci:** Daun sawo; diabetes; sel Leydig; sel spermatogenik

**Abstract.** Diabetes mellitus can cause reproductive disorders especially in testicular cells. Sapodilla leaf contains myricetin which is an antidiabetic agent. The purpose of this study was to determine the effects of sapodilla leaves extracts on the amount of Leydig and spermatogenic cells of mice testicles. This experimental research used a complete randomized design (RAL). Twenty-four male mice were divided into 6 groups, namely negative (KN), positive (KP), glibenclamide (KG), concentration 1 (K1:28mg/kgBW), K2: 56mg/kgBW and K3: 112mg/kgBW groups with 4 repetitions each. Diabetic mice were developed by inducing 0,08ml/20kgBW of *alloxan* intraperitoneally. Sapodilla leaf extract (*Manilkara zapota* L.) was given twice a day for 14 days. The data of Leydig and spermatogenic cells were obtained through observation of HE stained testicular slides. These were analyzed using Kruskal-Wallis test, followed by Mann-Whitney's. Sapodilla leaf extract affected the number of Leydig cells ( $p < 0,001$ ). Noticeable differences occurred between the treatment group of K1, K3, KP and group of K2 and KN. These results showed that sapodilla leaf extract didn't affect the number of spermatogonium and spermatocytes ( $P > 0,05$ ), however it influenced spermatids' ( $P < 0,001$ ), with significant differences among treatments. The number of spermatids with extract treatment was higher than KP's, meanwhile K2's was almost matched with KN's. The conclusion was sapodilla (*M. zapota* L.) leaf extract affected the number of Leydig cells and spermatids, with an optimum treatment at the concentration of 2 (16,8mg/20grBW).

**Kata kunci:** Diabetic; Leydig cells; spermatogenic cells; Sapodilla leaves

## PENDAHULUAN

Diabetes melitus (DM) merupakan penyakit metabolik yang umum terjadi pada masyarakat. Penyakit ini ditandai dengan kondisi hiperglikemia kronis. DM terbagi menjadi 2 tipe yaitu Tipe 1 dan Tipe 2. Diabetes melitus (DM) tipe 1 merupakan kelainan yang disebabkan reaksi autoimun. Reaksi autoimun menyebabkan kerusakan pada sel- $\beta$  pankreas serta kondisi hiperglikemi kronik

karena kurangnya insulin dalam jumlah besar (Himawan dkk., 2016). Diabetes melitus (DM) tipe 2 merupakan kelainan yang antara lain terjadi akibat kerusakan sel- $\beta$  pankreas yang menghasilkan insulin (Ramadhan dkk., 2019). DeFronzo dkk. (2015) menambahkan bahwa DM tipe 2 merupakan hasil dari resistensi insulin, sekresi insulin yang terganggu atau kombinasi keduanya. Menurut Sumangkut dkk. (2013), terdapat hubungan antara DM tipe 2 dengan pola makan yang kurang sehat. Pada manusia, dikatakan menderita DM apabila kadar glukosa darah puasa sebesar  $\geq 126$  mg/dL (Arman dkk., 2021).

Kondisi hiperglikemia pada penderita DM meningkatkan *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang memicu berbagai gangguan dalam tubuh, salah satunya adalah kelainan sel *Leydig* yang akan menyebabkan gangguan sekresi testosteron. Sel *Leydig* merupakan sel yang terdapat pada jaringan interstitial di antara tubulus seminiferus. Sel *Leydig* dapat menghasilkan hormon testosteron (Rahmawati, 2013). Kelainan pada sel *Leydig* menurunkan replikasi sel *Leydig* sehingga kepadatan jaringan interstitial testis akan menurun yang ditunjukkan dengan penurunan jumlah sel *Leydig* per ruang interstitial terutama karena penurunan SCF (*Stem Cells Factor*) (Adnyana dkk., 2017)

Kelainan pada testis akibat DM juga mempengaruhi spermatogenesis. Spermatogenesis adalah proses perkembangan sel spermatogenik. Proses ini terdiri dari 3 tahap yaitu tahapan proliferasi, meiosis dan spermiogenesis. Sel induk spermatogonia akan mengalami proliferasi yang terjadi melalui pembelahan secara mitosis. Proliferasi ini akan menghasilkan spermatosit primer. Spermatosit sekunder akan terbentuk dari spermatosit primer karena terjadinya pembelahan meiosis I. Tahapan-tahapan pembelahan meiosis I terdiri dari profase, metafase, anafase dan telofase. Spermatosit sekunder akan menjadi spermatid melalui pembelahan meiosis II. Proses spermiogenesis akan mengubah spermatid menjadi oval berekor yang semula berbentuk bulat sehingga disebut spermatozoa. Spermatogenesis difasilitasi oleh keberadaan ABP (*Androgen Binding Protein*) yang merupakan glikoprotein pengikat testosteron. Testosteron dari sel *Leydig* berikatan dengan AR (*Androgen Receptor*) pada sel sertoli penghasil ABP dan inhibin yang membantu proses spermatogenesis (Hasbi dan Gustina, 2018). ABP disekresikan sel sertoli masuk ke dalam lumen tubulus seminiferus sehingga testosteron diangkut masuk ke dalam lumennya (Sukmaningsih, 2009). Penurunan jumlah sperma yang dihasilkan merupakan tanda tingkat abnormalitas meningkat pada proses spermatogenesis. Berkaitan dengan hal ini, di dalam tubulus seminiferus hewan uji tikus DM menunjukkan adanya apoptosis pada sel germinal (spermatogonium dan spermatosit) yang meningkat (Ronasky dkk., 2020).

Penderita DM di Indonesia umumnya menggunakan obat oral anti-diabetes golongan sulfonilurea, yaitu Glibenklamid (Setiawan dkk., 2011). Namun, efek samping mengonsumsi obat-obatan dengan dosis dan penggunaan berlebihan dalam jangka panjang dapat mengakibatkan hipoglikemia (Athiyah dkk., 2014). Selain menggunakan obat-obatan sintetis, masyarakat Indonesia juga banyak menggunakan bahan alami baik hewani maupun nabati seperti daun belimbing wuluh yang mengandung flavonoid (Kurniawaty dan Lestari, 2016).

Jenis tanaman yang sering digunakan untuk bahan pengobatan tradisional antara lain sawo manila (*Manilkara zapota* L.). Sawo memiliki kandungan metabolit sekunder sehingga menyebabkan tanaman ini sering digunakan sebagai tanaman obat-obatan (Octaviani dan Syafrina, 2018). Biji dan daun sawo menunjukkan adanya aktivitas antihiperglikemia. Ekstrak daun sawo menunjukkan adanya aktivitas antioksidan (Barbalho dkk., 2015).

Senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam daun sawo manila yaitu senyawa saponin, flavonoid, triterpenoid, tannin, alkaloid, dan glikosid (Octaviani dan Syafrina, 2018). Flavonoid memiliki peran sebagai antioksidan yang mampu menangkap radikal bebas seperti RNS dan ROS. Flavonoid mampu memperbaiki jaringan yang rusak karena terkait dengan gugus OH fenolik. Flavonoid diketahui berperan sebagai antidiabetes karena dapat meregenerasi sel pulau Langerhans (Prameswari dan Widjanarko, 2014). Di dalam daun sawo ditemukan adanya flavonoid jenis myricetin-3-O-a-L-rhamnoside (Barbalho dkk., 2015). Myricetin dilaporkan memiliki manfaat sebagai antioksidatif kuat, antikanker, antidiabetes, *anti-inflammatory* dan pelindung hati (Zhang dkk., 2019). Myricetin juga dapat meningkatkan motilitas, dan viabilitas gamet jantan (Aquila dkk., 2013). Berdasarkan uraian yang telah disampaikan, diperlukan adanya penelitian mengenai peranan daun sawo dalam menambah jumlah sel *Leydig* dan sel spermatogenik testis penderita DM.

Mencit jantan jenis *Balb/c* berusia 8-11 minggu yang memiliki berat badan (BB)  $\pm 25$  gram digunakan sebagai hewan coba dalam penelitian ini. Hewan coba ini dipilih karena dapat diinduksikan penyakit pada manusia. Kemiripan struktur gen, tingkah laku, dan karakter biologis mencit dengan manusia dapat menunjang keakuratan hasil penelitian (Putri, 2018).

## BAHAN DAN METODE

Studi ini merupakan penelitian eksperimental dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Hewan coba mencit sebanyak 24 ekor dibagi dalam enam kelompok perlakuan yaitu konsentrasi 1 (K1: 28mg/kgBB), K2: 56mg/kgBB, K3: 112mg/kgBB, kelompok negatif (KN), kelompok positif (KP), dan kelompok *glibenclamide* (KG) masing-masing dengan 4 pengulangan. Penelitian dilakukan di Laboratorium Fisiologi, Jurusan Biologi, FMIPA, UNESA pada bulan September sampai Desember 2020. Penanganan preparat jaringan testis dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi, FK UNAIR.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun sawo (*M. zapota* L.), kertas saring, Na-CMC 1% (Natrium Karboksimetil Selulosa 1%), *Glibenclamide*, *Alloxan monohydrate* 0,08 ml/ 20 kg BB, *sodium citrate buffer* pH 4 0,1 M, mencit jantan usia 8-11 minggu dengan berat badan (BB)  $\pm$ 25 gram, pakan mencit, NBF 10% (*Neutral Buffer Formalin* 10%), etanol 96%, alkohol 70%, 80%, dan 90%, etanol I dan II, xylol, parafin, dan pewarna Hematoxylin-Eosin.

Daun sawo tua dikoleksi kemudian dicuci dan dikering anginkan agar kandungan kadar air dalam daun dapat berkurang. Daun sawo yang sudah kering diblender untuk menghaluskannya sehingga menjadi simplisia atau serbuk kemudian ditimbang. Daun sawo diekstraksi dengan merendam 500 g simplisia daun sawo dalam 4500 ml etanol 96%. Perendaman dilakukan selama 24 jam, kemudian rendaman tersebut disaring. Perendaman simplisia dilakukan sebanyak 3 kali. Hasil dari perendaman simplisia dikentalkan dengan menggunakan *rotary vacuum evaporator*. Ekstrak yang telah kental dimasukkan dalam botol vial dan disimpan dalam *freezer*.

Hewan coba mencit sebanyak 24 ekor diaklimasi dalam kandang selama 7 hari agar mampu beradaptasi dengan lingkungan laboratorium. Mencit dipelihara di dalam kandang plastik dengan menggunakan serbuk kayu sebagai alas. Pembersihan kandang dilakukan 2 hari sekali. Air minum diberikan pada mencit sebanyak sehari sekali dengan volume 6 ml. Pakan diberikan sehari sekali dengan berat 5gram per mencit.

Hewan model DM dibuat dengan induksi *alloxan* setelah aklimasi selama 7 hari. *Alloxan monohydrate* yang telah dicampur dengan 0,1 M sodium citrate buffer diinduksikan secara intraperitoneal pada hari ke-(-3) perlakuan ekstrak sebanyak satu kali (Rahman dkk., 2017).

Kadar glukosa darah (KGD) mencit DM diukur setelah dipuaskan selama 10 jam pada hari ke-(-1) (saat sebelum penginduksian *alloxan*), hari ke-0 (tiga hari setelah penginduksian *alloxan*), hari ke-7 dan hari ke-14 perlakuan ekstrak. Pengukuran KGD dilakukan untuk mengetahui bahwa *alloxan* berfungsi membuat mencit DM dan memastikan bahwa mencit yang digunakan adalah mencit DM. Darah diambil melalui vena ekor mencit yang telah dibersihkan dengan *alcohol swab* 70% dengan menggunakan jarum *lancet*, kemudian diukur kadar glukosanya dengan alat *glucometer*. Pembacaan hasil kadar glukosa darah akan muncul pada layar apabila *strip test* glukosa sudah terdeteksi oleh alat *glucometer* dalam satuan mg/dl.

Ekstrak daun sawo diberikan kepada mencit dengan disonde menggunakan syringe 1 ml dan sonde nomor 5. Jumlah ekstrak yang diberikan pada mencit sesuai dengan konsentrasi sebesar 28mg/kgBB, 56 mg/kgBB, dan 112mg/kgBB (Odoh dan Obiano, 2020) 2 kali sehari selama 14 hari.

Mencit kemudian dibius menggunakan kloroform dan dibedah. Testis mencit diambil dan difiksasi dengan *neutral buffer formalin* 10%. Testis mencit dipotong dan dimasukkan ke dalam *tissue cassette*. Jaringan testis kemudian didehidrasi secara bertingkat dengan menggunakan alkohol sebesar 70%, 80%, 90%, etanol I dan etanol II secara berurutan masing-masing selama 5 menit. Jaringan kemudian melalui proses *clearing* menggunakan xylol selama 15 menit lalu dicetak dalam blok parafin dan disimpan dalam *refrigerator* selama 24 jam. Blok tersebut kemudian dipotong dengan mikrotom setebal 4-5 $\mu$ m. Hasil potongan blok parafin diapungkan dalam air hangat bersuhu 60°C agar jaringan tidak terlipat. Hasil potongan diangkat dan diletakkan pada gelas objek dan dilanjut dengan pewarnaan Hematoxylin dan Eosin (HE). Preparat kemudian dapat diamati di bawah mikroskop (Jannah dkk., 2018). Jumlah sel Leydig dan sel spermatogenik dihitung melalui pengamatan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400x. Pengamatan dilakukan pada preparat tiap perlakuan dengan lima pengulangan.

Data sel Leydig dan sel spermatogenik yang diperoleh dianalisis dengan uji Kruskal-Wallis. Ekstrak dinyatakan berpengaruh jika data memiliki nilai signifikansi dengan  $P < 0,05$ , sebaliknya dinyatakan tidak berpengaruh jika nilai signifikansi dengan  $P > 0,05$ . Data dengan  $P < 0,05$  dianalisis lanjutan dengan uji Mann-Whitney yang bertujuan untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan. Data yang telah diperoleh dianalisis dengan menggunakan SPSS 21.

## HASIL

Pemberian ekstrak daun sawo pada mencit DM bertujuan untuk menurunkan kadar glukosa darah mencit DM hasil induksi *alloxan* sehingga mengurangi kerusakan sel-sel pada testis dan mengembalikannya pada kondisi normal. Mencit DM hasil induksi *alloxan* yang telah diberi perlakuan ekstrak daun sawo dibedah setelah 14 hari perlakuan. Testis mencit DM diambil untuk diproses menjadi preparat awetan dengan pewarnaan HE. Preparat jaringan testis diamati menggunakan mikroskop perbesaran 400x dan dihitung jumlah sel Leydig dan sel spermatogeniknya. Hasil penghitungan sel Leydig dapat dilihat pada **Tabel 1**.

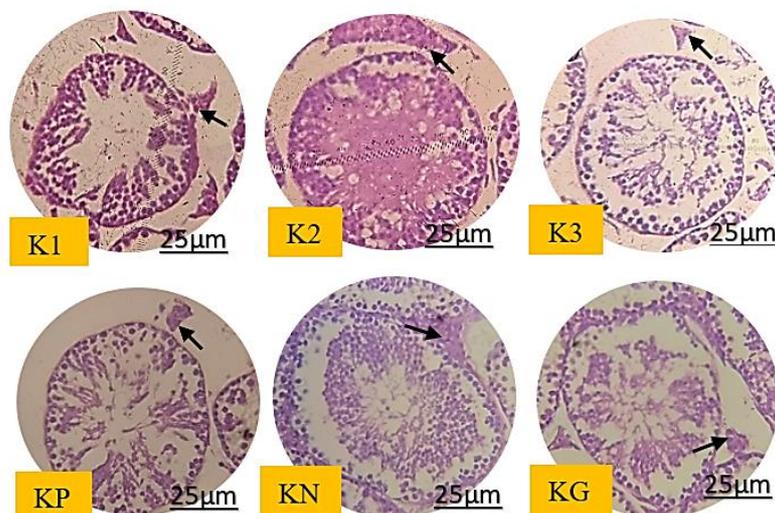
**Tabel 1.** Jumlah Sel Leydig setelah perlakuan *M. zapota* L.

| Variabel          | Perlakuan | Jumlah Sel                  | P     |
|-------------------|-----------|-----------------------------|-------|
| Jumlah Sel Leydig | K1        | 45.35 ± 17.848 <sup>b</sup> | 0.000 |
|                   | K2        | 69.15 ± 24.160 <sup>a</sup> |       |
|                   | K3        | 51.25 ± 28.099 <sup>b</sup> |       |
|                   | KP        | 42.30 ± 15.712 <sup>b</sup> |       |
|                   | KN        | 72.35 ± 26.818 <sup>a</sup> |       |
|                   | KG        | 50.35 ± 14.780 <sup>b</sup> |       |

Keterangan: Notasi huruf yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan. K1 (Konsentrasi 28mg/kg BB); K2 (Konsentrasi 56mg/kg BB); K3 (Konsentrasi 112mg/kg BB); KP (Kelompok hewan diabetes tanpa perlakuan ekstrak); KN (Kelompok hewan tanpa induksi *alloxan*); KG (Kelompok Glibenklamid).

Data pada **Tabel 1** dianalisis dengan uji *Kruskal-Wallis* dan menunjukkan bahwa ekstrak daun sawo mempengaruhi jumlah sel Leydig dengan  $P < 0,05$ . Data kemudian diuji dengan Post Hoc Mann Whitney dan terlihat adanya perbedaan nyata antara kelompok perlakuan K1, K3, KP, dan KG dengan KN dan K2. Hasil tersebut menunjukkan bahwa daun sawo meningkatkan jumlah sel Leydig mencit diabetes hasil induksi *alloxan* terutama pada perlakuan K2.

Hasil pengamatan histologi juga menunjukkan bahwa ekstrak daun sawo mempengaruhi jumlah sel Leydig pada tiap kelompok perlakuan yang ditunjukkan dengan kepadatannya (**Gambar 1**).



**Gambar 1.** Kepadatan sel-sel Leydig pada ruang interstitial (tanda panah) dengan perbesaran 400x (Garis skala 25µm). Keterangan: K1 (Konsentrasi 28mg/kg BB); K2 (Konsentrasi 56mg/kg BB); K3 (Konsentrasi 112mg/kg BB); KP (Kelompok hewan diabetes tanpa perlakuan ekstrak); KN (Kelompok hewan tanpa induksi *alloxan*); KG (Kelompok Glibenklamid).

Dari Gambar 1 terlihat bahwa K1, K3, KP dan KG memiliki jumlah sel Leydig pada ruang interstitial sangat sedikit dibandingkan dengan KN. K2 memiliki jumlah sel Leydig yang lebih tinggi dibanding kelompok perlakuan konsentrasi lainnya. K2 (Konsentrasi 56mg/kg BB) memberikan hasil terbaik dalam menambah jumlah sel Leydig karena memiliki hasil yang lebih tinggi dibanding KP dan relatif sama dengan KN. Dari hasil statistik juga dapat dilihat bahwa K1, K3, KP dan KG tidak berbeda nyata.

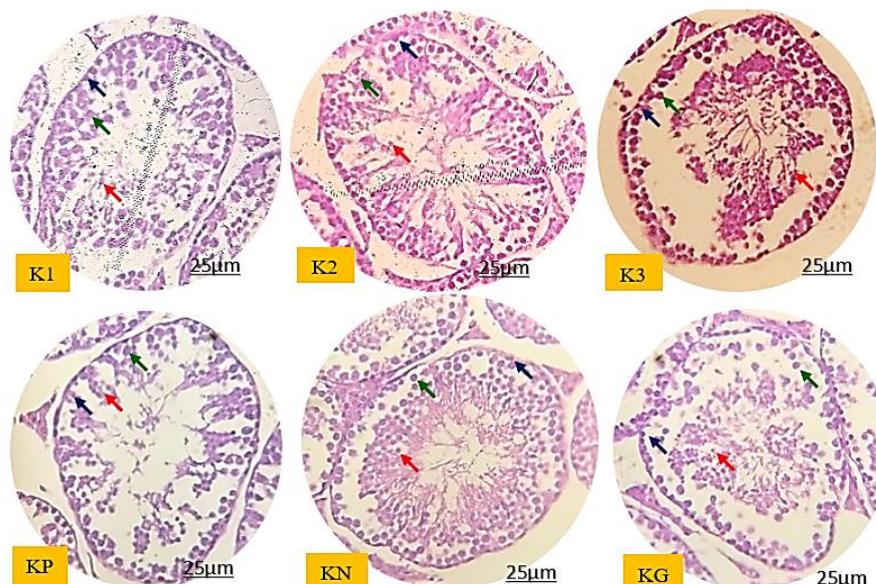
Jumlah sel spermatogenik (spermatogonium, spermatisit dan spermatid) masing-masing perlakuan setelah pemberian ekstrak daun sawo berdasarkan pengamatan di bawah mikroskop dapat dilihat pada Tabel 2.

**Tabel 2.** Jumlah Sel Spermatogenik Setelah Pemberian Ekstrak Daun Sawo (*M. zapota* L.).

| Jenis Sel      | Jumlah Sel Spermatogenik pada perlakuan |                             |                             |                             |                              |                             | P     |
|----------------|---|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|-------|
|                | K1                                      | K2                          | K3                          | KP                          | KN                           | KG                          |       |
| Spermatogonium | 56.25 ± 11.951 <sup>a</sup>             | 62.95 ± 10.787 <sup>a</sup> | 59.35 ± 17.907 <sup>a</sup> | 52.35 ± 17.012 <sup>a</sup> | 59.95 ± 16.168 <sup>a</sup>  | 52.65 ± 8.506 <sup>a</sup>  | 0.098 |
| Spermatisit    | 61.15 ± 15.662 <sup>a</sup>             | 63.90 ± 11.657 <sup>a</sup> | 61.85 ± 10.917 <sup>a</sup> | 55.00 ± 13.773 <sup>a</sup> | 65.65 ± 13.922 <sup>a</sup>  | 56.65 ± 11.948 <sup>a</sup> | 0.094 |
| Spermatid      | 80.30 ± 13.669 <sup>d</sup>             | 84.30 ± 13.834 <sup>b</sup> | 72.05 ± 18.320 <sup>c</sup> | 75.20 ± 14.446 <sup>c</sup> | 102.50 ± 26.395 <sup>a</sup> | 73.15 ± 18.308 <sup>d</sup> | 0.000 |

Keterangan: Notasi huruf yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan. K1 (Konsentrasi 28mg/kg BB); K2 (Konsentrasi 56mg/kg BB); K3 (Konsentrasi 112mg/kg BB); KP (Kelompok hewan diabetes tanpa perlakuan ekstrak); KN (Kelompok hewan tanpa induksi *alloxan*); KG (Kelompok Glibenklamid).

Tabel 2 menunjukkan bahwa tidak terdapat pengaruh konsentrasi ekstrak daun sawo terhadap jumlah spermatogonium dan spermatisit ( $P > 0,05$ ). Sementara ekstrak daun sawo berpengaruh terhadap jumlah spermatid ( $P < 0,05$ ), oleh karena itu uji dilanjutkan dengan Post Hoc Mann-Whitney. Hasil uji Post Hoc Mann-Whitney memperlihatkan adanya perbedaan nyata jumlah spermatid ( $P < 0,05$ ) pada kelompok perlakuan K2 dan KN dengan kelompok perlakuan lainnya. Jumlah sel spermatogenik setelah pemberian ekstrak daun sawo yang ditunjukkan dengan kepadatannya (Gambar 2).



**Gambar 2.** Kepadatan sel Spermatogenik dalam Tubulus Seminiferus Mencit dengan Perbesaran 400x (Garis skala 25µm). Keterangan: (♣) Spermatogonium, (♠) Spermatisit, (♠) Spermatid. K1 (Konsentrasi 28mg/kg BB); K2 (Konsentrasi 56mg/kg BB); K3 (Konsentrasi 112mg/kg BB); KP (Kelompok hewan diabetes tanpa perlakuan ekstrak); KN (Kelompok hewan tanpa induksi *alloxan*); KG (Kelompok Glibenklamid).

Dari Gambar 2 terlihat bahwa KP dan K3 memiliki jumlah sel spermatogenik yang paling sedikit dibandingkan dengan perlakuan lainnya. Data statistik juga menunjukkan bahwa K1, K3, KP dan KG tidak berbeda nyata. KN dan K2 (Konsentrasi 56mg/kg BB) memiliki pengaruh yang lebih baik dibanding kelompok perlakuan lainnya, dapat dilihat dari kepadatan sel spermatogenik yang tinggi pada tubulus seminiferus.

## PEMBAHASAN

Pada penelitian ini, induksi *alloxan* bertujuan untuk membuat mencit diabetes yang memiliki kadar glukosa darah tinggi. Hal ini disebabkan karena *alloxan* merupakan zat diabetogenik terutama karena memiliki struktur mirip dengan glukosa. Meskipun bukan glukosa, tetapi transporter tersebut

tetap berfungsi, sehingga bisa memasukkan alloxan ke dalam sel beta pankreas dan menyebabkan nekrosis, selanjutnya menyebabkan keadaan hiperglikemia (Lenzen, 2008). Keadaan hiperglikemia memunculkan zat radikal berupa ROS melalui rantai oksidasi *xanthine*, *lipoxygenase*, *cyclooxygenase*, *nitric oxide synthases*, dan peroksidase (Volpe dkk., 2018). Stress oksidatif ini mengakibatkan perubahan DNA mitokondria dalam fosforilasi oksidatif dan kelainan struktural dan penurunan ATP (Rahmawati, 2013). Radikal bebas juga menurunkan motilitas sperma karena hilangnya ATP intraseluler. Hilangnya ATP intraseluler diakibatkan oleh perubahan DNA mitokondria dalam fosforilasi oksidatif sehingga menyebabkan perubahan struktur *axoneme* dan abnormalitas pada ekor spermatozoa (Sebai dkk., 2015).

Pada penelitian, beberapa kelompok perlakuan yang telah diberi ekstrak daun sawo selama 14 hari mengalami penurunan kadar glukosa darah, terutama pada perlakuan konsentrasi 2 (Konsentrasi 56mg/kg BB) (Data tidak diperlihatkan). Flavonoid jenis myricetin yang terdapat dalam daun sawo dapat menurunkan kadar glukosa darah mencit DM. Studi oleh Kandasamy dan Ashokkumar (2014) menunjukkan bahwa tikus DM dengan perlakuan myricetin memiliki peningkatan jumlah insulin dalam darah yang mengarah pada perangsangan pemanfaatan glukosa dengan aktivasi enzim glikolitik, sintase glikogen dengan *insulin-signaling* molekul seperti GLUT-2 & GLUT-4, IRS-1 & IRS-2 dan PKB. Kondisi ini mengurangi aktivitas enzim glukoneogenik dan fosforilase glikogen. Efek perlindungan myricetin juga terjadi melalui pengurangan radikal bebas, sehingga mempertahankan regenerasi sel- $\beta$  yang bertanggung jawab atas sekresi insulin. Myricetin juga dilaporkan secara signifikan mampu menurunkan hiperglikemia melalui peningkatan penyerapan glukosa pada otot dan hati, serta meningkatkan aktivitas sintesis glikogen dan sintesis glikogen pada hepatosit penderita DM (Li dan Ding, 2012).

Testis merupakan organ yang rentan terhadap radikal bebas sehingga keberadaan dan tingginya senyawa ini mengganggu spermatogenesis dan keutuhan membran sel spermatogenik. Sel spermatogenik memiliki membran yang mengandung asam lemak tak jenuh berantai ganda. Pertemuan sel spermatogenik dengan radikal bebas akan menyebabkan reaksi peroksidasi lipid. Gangguan integritas membran, peningkatan fluiditas membran, serta inaktivasi ikatan membran dengan enzim dan reseptor karena adanya reaksi peroksidasi lipid (Sukmaningsih dkk., 2011). Spermatogenesis pada testis juga dipengaruhi keberadaan sel Leydig yang mensekresikan testosteron untuk digunakan dalam tubulus seminiferus. Dalam spermatogenesis, testosteron diperlukan sel germinal agar dapat membelah sehingga membentuk spermatozoa, terutama saat membentuk spermatosit sekunder pada tahapan pembelahan meiosis (Permatasari dan Widhiantara, 2017). Jika jumlah sel Leydig yang menurun, maka proses spermatogenik juga akan terhambat. Kondisi ini menyebabkan terjadinya abnormalitas sel-sel spermatogenik sehingga jumlah sperma yang terbentuk menurun (Ronasky dkk., 2020) seperti yang terlihat pada Gambar 1. Mencit diabetes memiliki lapisan epitel tubulus seminiferus lebih tipis akibat menurunnya spermatogenesis dan terjadinya apoptosis sel spermatogenik. Apoptosis yang disebabkan karena ROS juga bisa menyebabkan jumlah sel Leydig menurun dan hilangnya jaringan penghubung pada ruang interstitial (Sulistyoningrum dkk., 2018).

Pada permukaan sel Leydig terdapat TLR (*Toll-Like Receptor*) yang berperan penting terhadap mekanisme pertahanan testis. Reseptor ini berfungsi untuk mengenali ligan endogen maupun eksogen dan memicu aktivasi sinyal kaskade sebagai respon inflamasi. Salah satu TLR yang terdapat di permukaan sel Leydig adalah TLR4. Peningkatan glukosa pada darah akan meningkatkan ekspresi TLR4 yang berakibat pada peningkatan ROS pada sel Leydig. Sel Leydig sangat rentan terhadap stress oksidatif karena dalam sel Leydig terdapat sumber produksi ROS (Karpova dkk., 2020). Kelainan yang terjadi pada sel Leydig dapat menyebabkan sekresi testosteron menurun yang berakibat pada penurunan libido dan spermatogenesis. Jumlah sel Leydig per ruang interstitial akan mengalami penurunan akibat terganggunya proses regenerasi sel Leydig, sehingga jaringan interstitial kehilangan kepadatannya (Adnyana dkk., 2017). Rendahnya jumlah bisa terjadi pada sel Leydig muda maupun dewasa. Sel Leydig muda dapat memproduksi metabolit testosteron dalam jumlah yang sangat besar. Sel Leydig dewasa juga dapat memproduksi testosteron dalam jumlah besar yang berperan dalam spermatogenesis dan fungsi lainnya (Chen dkk., 2009). Apabila jumlah sel Leydig menurun, maka jumlah testosteron juga akan menurun yang dapat menyebabkan terganggunya spermatogenesis.

Ekstrak daun sawo mampu meningkatkan produksi sel Leydig dan spermatogenik. Peningkatan ini bisa disebabkan karena ekstrak mengandung flavonoid yang dapat menurunkan ROS pada jaringan testis (Sulistyoningrum dkk., 2018). Penurunan ROS meningkatkan sinyal LH sehingga mempengaruhi produksi cAMP serta pengangkutan kolesterol melalui StAR dan TSPO

sehingga dapat meningkatkan produksi sel Leydig dan menurunnya perusakannya (Chen dkk., 2009). Flavonoid memiliki kemiripan struktur dengan kolesterol dan steroid lainnya, sehingga senyawa ini dapat mempengaruhi produksi androgen pada sel Leydig. Flavonoid dapat menghambat proses apoptosis pada sel germinal testis tikus diabetes dan juga memiliki efek *cytoprotective* pada sel testis sehingga meningkatkan spermatogenesis (Sulistyoningrum dkk., 2018). Myricetin merupakan salah satu jenis flavonoid yang ditemukan di dalam daun sawo. Berdasarkan studi oleh Cormier dkk. (2017), induksi myricetin pada mencit diabetes dapat meningkatkan *cAMP-dependent* ekspresi dari *StAR*, *Cyp11a1*, dan *Fdx1*, yang berkontribusi pada peningkatan steroidogenesis dalam sel Leydig. Myricetin sangat efektif untuk menghilangkan berbagai ROS dan mengeksekusi aktivitas anti-oksidatif karena sejumlah besar kelompok hidroksil aktif. Myricetin dapat mengurangi peningkatan produksi radikal bebas selama pembengkakan sel dan cedera iskemik (Li dan Ding, 2012). Berdasarkan studi oleh Aquila dkk. (2013), myricetin dengan konsentrasi rendah dapat meningkatkan motilitas, dan viabilitas gamet jantan.

Dari hasil penelitian terlihat bahwa, ekstrak daun sawo tidak berpengaruh terhadap spermatogonium dan spermatisit. Di dalam daun sawo terdapat senyawa saponin. Saponin dapat berupa triterpenoid glikosida dan steroid. Efek saponin dapat mengganggu permeabilitas membran dan antifertilitas. Saponin dapat membentuk pori-pori pada membran sehingga dapat memasuki sel dan menghambat gen yang bertanggung jawab pada steroidogenesis (Nita dkk., 2019). Dalam hal ini, saponin memiliki sifat sitotoksik sehingga dapat menurunkan jumlah sel spermatogenik (Harlis dkk., 2019). Gejala ini dapat terlihat pada perlakuan konsentrasi ekstrak tinggi atau K3 (konsentrasi 112mg/kg BB) menghasilkan jumlah sel *Leydig* dan spermatid paling sedikit dibandingkan dengan kelompok perlakuan ekstrak lainnya.

Spermatozoa sangat sensitif terhadap kadar ROS dalam jumlah yang tinggi (Celino dkk., 2011). Sistem reproduksi memerlukan ROS dalam konsentrasi rendah agar proses reproduksi dapat berlangsung. ROS berguna untuk proses kompleks proliferasi dan pematangan *germ-cell* jantan, dari spermatogonia diploid melalui meiosis hingga spermatozoa haploid dewasa (Guerriero dkk., 2014). Penurunan jumlah sel spermatogenik diduga karena terjadinya peningkatan metabolisme yang berlebih dan menyebabkan peningkatan produksi radikal bebas sehingga menyebabkan sel spermatogenik menjadi tidak stabil (Nurkarimah dkk., 2017). Efisiensi spermatogenesis bergantung pada proliferasi spermatogonia dan hilangnya *germ cell* selama meiosis dan spermiogenesis. Disfungsi testis akibat DM dapat terjadi sementara maupun permanen bergantung pada tingkat, durasi, faktor pertumbuhan, parakrin dan berbagai hormon lainnya (Altay dkk., 2003). Membran spermatozoa memiliki asam lemak tak jenuh sehingga sangat cocok dengan radikal bebas. Peroksidasi lipid pada membran spermatozoa merupakan salah satu dampak yang terjadi akibat ROS, yang dapat menyebabkan peningkatan permeabilitas membran dan gangguan pada rantai respiratoris dan produksi ATP (Sebai dkk., 2015). Pada penelitian ini terjadi peningkatan jumlah spermatid dengan perlakuan daun sawo terutama pada mencit K2 (perlakuan konsentrasi 56mg/kg BB) yang mengindikasikan bahwa peningkatan ini terjadi pada tahap-tahap meiosis 2 (Nurkarimah dkk., 2017).

Pengaruh ekstrak daun sawo dalam meningkatkan jumlah sel Leydig dan spermatid dapat dilihat pada mencit K2 (konsentrasi 56mg/kg BB). Jika dibandingkan dengan mencit KP dan kelompok perlakuan lainnya, maka jumlah sel Leydig pada ruang interstitial dan sel spermatid mencit K2 paling tinggi. Dari penjabaran tersebut dapat diduga bahwa konsentrasi 1 terlalu rendah untuk meningkatkan jumlah normal sel sedangkan konsentrasi 3 terlalu tinggi. Menurut Aquila dkk. (2013), jumlah konsentrasi ekstrak yang tinggi mengurangi efektivitas seperti menurunnya motilitas dan viabilitas. Sehingga konsentrasi 2 memiliki pengaruh paling optimum terhadap peningkatan jumlah sel Leydig dan spermatid meskipun jumlah spermatid masih lebih rendah dibanding pada hewan normal (KN).

## SIMPULAN

Pemberian ekstrak daun sawo (*Manilkara zapota* L.) mempengaruhi jumlah sel Leydig dan spermatid mencit DM dan cenderung meningkatkan jumlah sel. Pemberian konsentrasi sebesar 56mg/kg BB merupakan konsentrasi optimum untuk meningkatkan jumlah sel Leydig dan spermatid testis mencit diabetes yang mendekati jumlah sel Leydig dan spermatid pada mencit normal. Saran untuk penelitian selanjutnya agar melakukan penelitian lebih lanjut mengenai ekstrak daun sawo terhadap sel Leydig dan sel spermatogenik.

## DAFTAR PUSTAKA

- Adnyana IDPA, Meles DK, Wurlina, Zakaria S, dan Suwasanti N, 2017. Efek Anti Diabetes Buah Pare (*Momordica charantia* Linn.) Terhadap Kadar Glukosa Darah, Sel Penyusun Pulau Langerhans dan Sel Leydig pada Tikus Putih Hiperglikemia. *Acta VETERINARIA Indonesiana*, Vol 4 (2): 43-50.
- Altay B, Çetinkalp Ş, Doğanavşargil B, Hekimgil M, dan Semerci B, 2003. Streptozotocin-induced diabetic effects on spermatogenesis with proliferative cell nuclear antigen immunostaining of adult rat testis. *Fertility and Sterility*, Vol 80 (2): 828-831.
- Aquila S, Santoro M, De Amicis F, Guido C, Bonofiglio D, Lanzino M, Cesario MG, Perrotta I, Sisci D, dan Morelli C, 2013. Red wine consumption may affect sperm biology: The effects of different concentrations of the phytoestrogen Myricetin on human male gamete function. *Molecular reproduction and development*, Vol 80 (2): 155-165.
- Arman E, Harmawati H, dan Gusli E, 2021. Pengaruh Rebusan Daun Sirih Merah (*Piper crocatum*) terhadap Penurunan Kadar Gula Darah Pada Pasien Diabetes mellitus Tipe II. *Prosiding Seminar Nasional Stikes Syedza Saintika*, Vol 1 (1).
- Athiyah U, Riskayanti E, Fenitasari D, Rakhmawati D, Nugraheni G, dan Nita Y, 2014. Profil informasi obat pada pelayanan resep metformin dan glibenklamid di apotek di wilayah Surabaya. *Jurnal Farmasi Komunitas*, Vol 1 (1): 5-10.
- Barbalho SM, Bueno PCDS, Delazari DS, Guiguer EL, Coqueiro DP, Araújo AC, De Souza MDSS, Farinazzi-Machado FMV, Mendes CG, dan Groppo M, 2015. Antidiabetic and antilipidemic effects of manilkara zapota. *Journal of medicinal food*, Vol 18 (3): 385-391.
- Celino FT, Yamaguchi S, Miura C, Ohta T, Tozawa Y, Iwai T, dan Miura T, 2011. Tolerance of spermatogonia to oxidative stress is due to high levels of Zn and Cu/Zn superoxide dismutase. *Plos one*, Vol 6 (2): e16938.
- Chen H, Ge RS, dan Zirkin BR, 2009. Leydig cells: From stem cells to aging. *Molecular and cellular endocrinology*, Vol 306 (1-2): 9-16.
- Cormier M, Ghouili F, Roumaud P, Martin LJ, dan Touaibia M, 2017. Influence of flavonols and quercetin derivative compounds on MA-10 Leydig cells steroidogenic genes expressions. *Toxicology in Vitro*, Vol 44: 111-121.
- DeFronzo RA, Ferrannini E, Groop L, Henry RR, Herman WH, Holst JJ, Hu FB, Kahn CR, Raz I, Shulman GI, Simonson DC, Testa MA, dan Weiss R, 2015. Type 2 diabetes mellitus. *Nature reviews Disease primers*, Vol 1 (1): 1-22.
- Guerriero G, Trocchia S, Abdel-Gawad FK, dan Ciarcia G, 2014. Roles of reactive oxygen species in the spermatogenesis regulation. *Frontiers in endocrinology*, Vol 5 (56).
- Harlis WO, Septiana A, dan Arjuni A, 2019. Spermatogenesis Mencit (*Mus musculus*, L.) Pasca Pemberian Ekstrak Brotowali (*Tinospora crispa*, L.). *BioWallacea: Jurnal Penelitian Biologi (Journal of Biological Research)*, Vol 6 (1): 919-926.
- Hasbi H, dan Gustina S, 2018. Androgen Regulation in Spermatogenesis to Increase Male Fertility. *Wartazoa*, Vol 28 (2): 13-22.
- Himawan IW, Pulungan AB, Tridjaja B, dan Batubara JRL, 2016. Komplikasi Jangka Pendek dan Jangka Panjang Diabetes Mellitus Tipe 1 (Short- and long-term complications of type 1 diabetes mellitus). *Sari Pediatri*, Vol 10 (6): 367-372.
- Jannah R, Setiasih NLE, dan Suastika P, 2018. Histopatologi Testis Tikus Penderita Diabetes Mellitus Pasca Pemberian Ekstrak Daun Kelor. *Buletin Veteriner Udayana*, Vol 10 (2): 176-182.
- Kandasamy N, dan Ashokkumar N, 2014. Protective effect of bioflavonoid myricetin enhances carbohydrate metabolic enzymes and insulin signaling molecules in streptozotocin-cadmium induced diabetic nephrotoxic rats. *Toxicology and applies pharmacology*. Vol 279 (2): 173-185.
- Karpova T, de Oliveira AA, Naas H, Priviero F, dan Nunes KP, 2020. Blockade of Toll-like receptor 4 (TLR4) reduces oxidative stress and restores phospho-ERK1/2 levels in Leydig cells exposed to high glucose. *Life sciences*, Vol 245: 117365.
- Kurniawaty E, dan Lestari EE, 2016. Uji Efektivitas Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) Sebagai Pengobatan Diabetes Melitus. *Jurnal Majority* Vol 5 (2): 32-36.
- Lenzen S, 2008. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*, Vol 51 (2): 216-226.
- Li Y, dan Ding Y, 2012. Minireview: Therapeutic potential of myricetin in diabetes mellitus. *Food Science and Human Wellness*, Vol 1 (1): 19-25.
- Nita S, Hayati L, dan Subandrate S, 2019. Mekanisme Antifertilitas Fraksi Biji Pepaya pada Tikus Jantan. *Sriwijaya Journal of Medicine*, Vol 2 (1): 52-58.
- Nurkarimah DA, Hestianah EP, Wahjuni RS, Hariadi M, Kuncorojakti S, dan Hermadi HA, 2017. Effect of Propolis on Spermatogenic Cells Number and Diameter of Seminiferous Tubules in Male Mice (*Mus musculus*). *KnE Life Sciences*, Vol 3 (6): 677-683.
- Octaviani M, dan Syafrina, 2018. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun dan Kulit Batang Sawo ( *Manilkara zapota* ( L . ) Van Royen ) (Antibacterial Actifity of Etanol Extract From Leaves and Bark of Sapodilla (*Manilkara zapota* ( L . ) Van Royen )). *Jurnal of Global Biosciences*, Vol 9 (5): 7280-7306.
- Permatasari AAAP, dan Widhiantara IG, 2017. Terapi Testosteron Meningkatkan Jumlah Sel Leydig dan Spermatogenesis Mencit ( *Mus Musculus* ) yang Mengalami Hiperlipidemia [Testosterone Therapy Increases the Number of Leydig Cells and Spermatogenesis in Mice (*Mus Musculus*) with

- Hyperlipidemia]. *Jurnal media sains*, Vol 1 (2): 77-83.
- Prameswari OM, dan Widjanarko SB, 2014. Uji Efek Ekstrak Air Daun Pandan Wangi Terhadap Penurunan Kadar Glukosa Darah dan Histopatologi Tikus Diabetes Melitus. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*, Vol 2 (2): 16-27.
- Putri FM, 2018. Urgensi Etika Medis Dalam Penanganan Mencit Pada Penelitian Farmakologi. *Jurnal Kesehatan Madani Medika*, Vol 9 (2): 51-61.
- Rahman SS, Yasmin N, Rahman ATM, Zaman A, Rahman MH, dan Rouf SMA, 2017. Evaluation and optimization of effective-dose of alloxan for inducing type-2 diabetes mellitus in long evans rat. *Indian J Pharm Educ Res*, Vol 51: 661-666.
- Rahmawati I, 2013. Pengaruh Nikotin Terhadap Jumlah Sel Leydig Pada Mencit (*Mus musculus*). *STOMATOGNATIC-Jurnal Kedokteran Gigi*, Vol 10 (2): 82-85.
- Ramadhan S, Iswari RS, Marianti A, Ramadhan S, Iswari RS, dan Marianti A, 2019. Pengaruh Ekstrak Daun Sirih Merah (*Piper crocatum Ruiz & Pav .*) terhadap Kadar Glukosa Darah dan Kadar Glutation Peroksidase Tikus Jantan Hiperglikemik Effect of Red Betel (*Piper crocatum Ruiz & Pav .*) Leaves Extract on Blood Glucose Levels and Glutathi. *Biotropika: Journal of Tropical Biology*, Vol 07 (1): 1-10.
- Ronasky T, Ismy J, dan Dasrul D, 2020. Pengaruh Pemberian Vitamin E terhadap Morfologi Testis Tikus Strain Wistar (*Rattus novergicus*) dengan Diabetes Melitus Tipe I. *Jurnal Ilmu Bedah Indonesia*, Vol 47 (2): 33-59.
- Sebai H, Selmi S, Rtibi K, Gharbi N, dan Sakly M, 2015. Protective effect of *Lavandula stoechas* and *Rosmarinus officinalis* essential oils against reproductive damage and oxidative stress in alloxan-induced diabetic rats. *Journal of medicinal food*, Vol 18 (2): 241-249.
- Setiawan AS, Yulinah E, Adnyana IK, Permana H, dan Sudjana K, 2011. Glibenklamid pada Penderita Diabetes Melitus Tipe 2 Antidiabetic Effect of Garlic Extract (*Allium sativum Linn .*) and Curcumin Extract (*Curcumma domestica Val .*) Combination Compared to Glibenclamide in Type 2. *Majalah Kedokteran Bandung*, Vol 43 (1): 26-34.
- Sukmaningsih ASA, 2009. Penurunan Jumlah Spermatisit Pakiten dan Spermatisid Tubulus Seminiferus Testis pada Mencit (*Mus musculus*) yang Dipaparkan Asap Rokok. *Jurnal Biologi Udayana*, Vol 13 (2): 31-35.
- Sukmaningsih AS, Ermayanti IG, Wiratmini NI, dan Sudatri NW, 2011. Gangguan Spermatogenesis Setelah Pemberian Monosodium Glutamat pada Mencit (*Mus musculus l.*). *Jurnal Biologi Udayana*, Vol 15 (2): 49-52.
- Sulistiyoningrum E, Pradipta DM, Fanana S, Haikhah JA, dan Putro MDH, 2018. Protective effect of *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl extract on the testicular damage of streptozotocin and nicotinamide-induced type 2 diabetic rats. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, Vol 8 (6): 139-146.
- Sumangkut S, Wenny S, dan Franly O, 2013. Hubungan Pola Makan Dengan Kejadian Penyakit Diabetes Melitus Tipe-2 Di Poli Interna Blu. RSUP. Prof. Dr. RD Kandou Manado. *eJournal Keperawatan*, Vol 1 (1).
- Volpe CMO, Villar-Delfino PH, Dos Anjos PMF, dan Nogueira-Machado JA, 2018. Cellular death, reactive oxygen species (ROS) and diabetic complications review-Article. *Cell death & disease*, Vol 9 (2): 1-9.
- Zhang S, Wang R, Zhao Y, Tareq FS, dan Sang S, 2019. Biotransformation of Myricetin: A Novel Metabolic Pathway to Produce Aminated Products in Mice. *Molecular Nutrition & Food Research*, Vol 63 (14): 1900203.

**Available Online:** 30 November 2021

**Published:** 31 Januari 2022

**Authors:**

Gressia Katrisna Octavyani, Universitas Negeri Surabaya, Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Surabaya, Jln. Ketintang, Gayungan, Surabaya, 60231, Indonesia, e-mail: gressia.17030244028@mhs.unesa.ac.id

Nur Kuswanti, Universitas Negeri Surabaya, Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Surabaya, Jln. Ketintang, Gayungan, Surabaya, 60231, Indonesia, e-mail: nurkuswanti@unesa.ac.id

Firas Khaleyla, Universitas Negeri Surabaya, Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Surabaya, Jln. Ketintang, Gayungan, Surabaya, 60231, Indonesia, e-mail: firaskhaleyla@unesa.ac.id

**How to cite this article:**

Octavyani GK, Kuswanti N, dan Khaleyla F, 2022. Pengaruh Ekstrak Daun Sawo Manila (*Manilkara zapota L.*) terhadap Jumlah Sel Leydig dan Spermatogenik Mencit Diabetes. *LenteraBio*; 11(1): 113-121