

**AKTIVITAS EKSTRAK LADA HITAM (*Piper nigrum L*) TERHADAP  
PERBAIKAN DISFUNGSI REPRODUKSI TIKUS JANTAN  
HIPERGLIKEMIA YANG DIINDUKSI *ALLOXAN* :  
STUDI PERILAKU, HORMONAL, HISTOLOGI  
TESTIS DAN EKSPRESI GEN *NITRIC  
OXIDE SYNTHASE***

**(DISERTASI)**

Oleh

**EXSA HADIBRATA**

**2337061006**



**PROGRAM DOKTOR  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS LAMPUNG  
2026**

**AKTIVITAS EKSTRAK LADA HITAM (*Piper nigrum L*) TERHADAP  
PERBAIKAN DISFUNGSI REPRODUKSI TIKUS JANTAN  
HIPERGLIKEMIA YANG DIINDUKSI *ALLOXAN* :  
STUDI PERILAKU, HORMONAL, HISTOLOGI  
TESTIS DAN EKSPRESI GEN *NITRIC  
OXIDE SYNTHASE***

**Oleh  
EXSA HADIBRATA**

**Disertasi  
Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Mencapai Gelar  
DOKTOR**

**Pada  
Program Studi Doktor MIPA  
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung**



**PROGRAM DOKTOR  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS LAMPUNG  
2026**

**ABSTRAK****AKTIVITAS EKSTRAK LADA HITAM (*Piper nigrum L*) TERHADAP PERBAIKAN DISFUNGSI REPRODUKSI TIKUS JANTAN HIPERGLIKEMIA YANG DIINDUKSI *ALLOXAN* : STUDI PERILAKU, HORMONAL, HISTOLOGI TESTIS DAN EKSPRESI GEN *NITRIC OXIDE SYNTHASE***

Oleh

**EXSA HADIBRATA**

**Latar Belakang:** Diabetes melitus (DM) menyebabkan terjadinya disfungsi reproduksi pria dalam berbagai tingkatan. Kontrol endokrin terhadap spermatogenesis, libido, dan ereksi penis semuanya terpengaruh efek negatif.

**Tujuan:** Menganalisis pengaruh pemberian ekstrak lada hitam (*Piper nigrum L*) dalam memperbaiki disfungsi reproduksi pada tikus jantan hiperglikemia yang diinduksi *Alloxan*, dengan penilaian komprehensif meliputi perilaku (libido dan ereksi), hormonal (kadar testosteron intratestikular), histologi testis (jumlah sel spermatosit dan sel Leydig), ekspresi gen NOS, dan analisis spermatozoa

**Metode:** Penelitian ini menggunakan *Posttest-only Randomized Control Group* pada tikus jantan sebanyak 30 ekor yang terbagi menjadi 5 kelompok. Semua kelompok diberikan pakan standar. K1 hanya diberikan pakan standar saja. K2, K3, P1, dan P2 diinduksi *Alloxan* 150 mg/kgBB. K3 mendapat tambahan sildenafil 1 mg/kgBB atau asam askorbat 1mg/kgBB + Zinc 0,6 mg/kgBB. P1 dan P2 diberikan ekstrak etanol lada hitam 122,5 mg/kgBB dan 245 mg/kgBB. Fungsi reproduksi dinilai dari berbagai aspek yaitu: ekspresi gen NOS, kadar testosteron intratestikular, fungsi ereksi, analisis spermatozoa, libido, dan histologi testis tikus. Data dianalisis menggunakan uji normalitas *Shapiro-Wilk* dan uji homogenitas, dilanjutkan dengan uji *one way ANOVA*, uji non parametrik *Kruskal Wallis* dan uji *Pos Hoc*.

**Hasil:** Pemberian ekstrak lada hitam dosis 122,5 mg/KgBB dapat meningkatkan aspek ekspresi gen *Nitric Oxide Synthase* (NOS) pada *Corpus Cavernosum*, fungsi ereksi, dan perilaku seksual (libido) pada tikus jantan model hiperglikemia. Sementara itu, dosis 245 mg/KgBB terbukti meningkatkan kadar testosteron intratestikular, jumlah sel Leydig, serta kualitas spermatozoa pada tikus jantan model hiperglikemia.

**Simpulan:** Pemberian ekstrak lada hitam terbukti dapat memperbaiki gangguan fungsi reproduksi tikus jantan model hiperglikemia.

**Saran:** Peneliti selanjutnya disarankan melakukan uji klinis untuk menilai keamanan, efek samping, dan toksisitas ekstrak lada hitam karena berpotensi menjadi terapi afrodisiaka tambahan bagi pasien diabetes melitus dengan gangguan reproduksi.

**Kata Kunci:** Disfungsi reproduksi, ekstrak lada hitam, hiperglikemia, tikus jantan.

**ABSTRACT**  
**ACTIVITY OF BLACK PEPPER EXTRACT (*Piper nigrum* L.) ON  
IMPROVING REPRODUCTIVE DYSFUNCTION IN MALE  
RATS ALLOXAN-INDUCED HYPERGLYCEMIA:  
A STUDY BEHAVIORAL, HORMONAL, AND  
HISTOLOGICAL TESTICULAR AND  
NITRIC OXIDE SYNTHASE  
GENE EXPRESSION**

**By**

**EXSA HADIBRATA**

**Background:** Diabetes mellitus (DM) causes male reproductive dysfunction at various levels. Endocrine control of spermatogenesis, libido, and penile erection all negatively impact these effects.

**Objective:** To analyze the effect of black pepper (*Piper nigrum* L.) extract on improving reproductive dysfunction in alloxan-induced hyperglycemic male rats. A comprehensive assessment included behavioral (libido and erection), hormonal (intracerebral testosterone levels), testicular histology (spermocyte and Leydig cell counts), NOS gene expression, and spermatozoa analysis.

**Methods:** This study used a posttest-only randomized control group with 30 male rats divided into five groups. All groups were fed a standard diet. K1 was fed only the standard diet. K2, K3, P1, and P2 were induced by alloxan at 150 mg/kgBW. K3 received additional sildenafil at 1 mg/kgBW or ascorbic acid at 1 mg/kgBW + zinc at 0.6 mg/kgBW. P1 and P2 were given 122.5 mg/kgBW and 245 mg/kgBW of black pepper ethanol extract. Reproductive function was assessed using various aspects, including NOS gene expression, intratesticular testosterone levels, erectile function, spermatozoa analysis, libido, and testicular histology. Data were analyzed using the Shapiro-Wilk normality test and homogeneity test, followed by one-way ANOVA, the non-parametric Kruskal-Wallis test, and the post-hoc test.

**Results:** Administration of black pepper extract at a dose of 122.5 mg/kgBW increased Nitric Oxide Synthase (NOS) gene expression in the Corpus Caverosum, erectile function, and sexual behavior (libido) in male rats with hyperglycemia. Meanwhile, a dose of 245 mg/kgBW increased intratesticular testosterone levels, Leydig cell count, and spermatozoa quality in male rats with hyperglycemia.

**Conclusion:** Administration of black pepper extract has been proven to improve reproductive dysfunction in male rats with hyperglycemia.

**Suggestion:** Further researchers are advised to conduct clinical trials to assess the safety, side effects, and toxicity of black pepper extract because it has the potential to be an additional aphrodisiac therapy for diabetes mellitus patients with reproductive disorders.

**Keyword:** Black pepper extract, hyperglycemia, male rats, reproductive dysfunction.

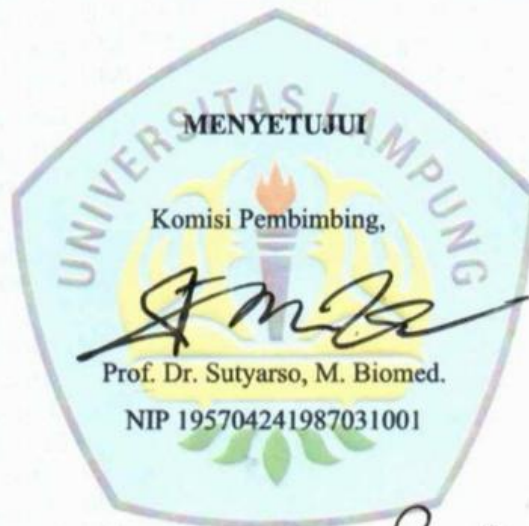
Judul Disertasi : AKTIVITAS EKSTRAK LADA HITAM (*Piper nigrum L*) TERHADAP PERBAIKAN DISFUNGSI REPRODUKSI TIKUS JANTAN HIPERGLIKEMIA YANG DIINDUKSI *ALLOXAN* : STUDI PERILAKU, HORMONAL, HISTOLOGI TESTIS DAN EKSPRESI GEN *NITRIC OXIDE SYNTHASE*

Nama Mahasiswa : Exsa Hadibrata

Nomor Pokok Mahasiswa : 2337061006

Program Studi : Doktor MIPA

Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



*[Signature]*

Prof. Dr. Hendri Busman, M.Biomed.

NIP 195901011987031001

*[Signature]*

Dr. dr. Syazili Mustofa, M.Biomed

NIP 198507132008121003

Ketua Program Studi Doktor MIPA,

*[Signature]*

Dr. Khoirin Nisa, S.Si, M.Si

NIP 19740726000032001

## MENGESAHKAN

## 1. Tim Penguji

Ketua : Mulyono, S.Si., M.Si, Ph.D

Sekretaris : Dr. Khoirin Nisa, S.Si, M.Si

Anggota : Prof. Dr. Sutyarso, M. Biomed.

Anggota : Prof. Dr. Hendri Busman, M. Biomed.

Anggota : Dr. dr. Syazili Mustofa, M.Biomed.

Anggota : Dr. dr. Ratna Dewi Puspita Sari, Sp.OG

Anggota : Dr. Nuning Nurcahyani, M.Sc

Anggota : Dr. dr. Indrawarman, Sp.U(K)

## 2. Dekan Fakultas MIPA

Dr. Eng. Heri Satria, S.Si., M.Si

NIP 197110012005011002

## RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan di Jakarta. Lahir pada tanggal 8 Desember 1986 dari pasangan Pardjono dan Sumarlin. Penulis adalah anak pertama dari dua bersaudara.

Pada tahun 1998 penulis menyelesaikan Sekolah Dasar di SDN 3 Sukamaju Baru, Depok, Jawa Barat. Kemudian pada tahun 2001 penulis menyelesaikan Sekolah Menengah Pertama di SMPN 7 Depok. Pada tahun 2004 penulis lulus dari Sekolah Menengah Umum SMUN 1 Depok dan kemudian pada tahun yang sama melanjutkan pendidikan ke Program Studi Pendidikan Dokter di Fakultas Kedokteran Universitas Lampung sehingga mendapatkan gelar Sarjana Kedokteran pada tahun 2008. Selanjutnya penulis melanjutkan pendidikan di Program Profesi Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Lampung kemudian mendapatkan gelar dokter pada tahun 2010. Pada tahun 2013 penulis melanjutkan Pendidikan Dokter Spesialis Urologi di Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada dan mendapatkan gelar Spesialis Urologi pada tahun 2018. Pada tahun 2023, Penulis melanjutkan pendidikan ke jenjang doktoral di Program Studi Doktor MIPA Universitas Lampung.

Penulis adalah dosen pada Fakultas Kedokteran Universitas Lampung sejak tahun 2010 sampai sekarang dengan jabatan lektor pada Ilmu Bedah sejak tahun 2022. Selain itu penulis juga berprofesi sebagai dokter spesialis urologi sejak tahun 2018 sampai sekarang.

Karya ini adalah amalanku yang hanya aku tujukan kepada TuhanKu, Allah Subhanahu wa Ta'ala, Yang Maha Suci dan Maha Tinggi, yang tidak ada yang berhak disembah dengan benar kecuali Dia. Semoga Allah meredhoi amalan ini dan memberikan pahala bagiku di Akhirat. Semoga dengan amalan ini semakin mendekatkan Aku kepadaNya, semakin aku berserah diri sepenuhnya, patuh dan taat kepadaNya. Semoga Allah memberikan kepadaku ilmu yang bermanfaat, rizqi yang baik, dan amalan sholih yang diterimaNya.

**LEMBAR PERNYATAAN**

Dengan ini saya menyatakan dengan sebenarnya, bahwa:

1. Disertasi dengan judul “**AKTIVITAS EKSTRAK LADA HITAM (*Piper nigrum L*) TERHADAP PERBAIKAN DISFUNGSI REPRODUKSI TIKUS JANTAN HIPERGLIKEMIA YANG DIINDUKSI ALLOXAN : STUDI PERILAKU, HORMONAL, HISTOLOGI TESTIS DAN EKSPRESI GEN *NITRIC OXIDE SYNTHASE***” adalah hasil karya saya sendiri dan tidak melakukan penjiplakan atau pengutipan atas karya penulis lain dengan cara tidak sesuai tata etika ilmiah yang berlaku dalam masyarakat akademik atau yang disebut plagiarisme.
2. Hal intelektual atas karya ilmiah ini diserahkan sepenuhnya kepada Universitas Lampung.

Atas pernyataan ini, apabila di kemudian hari ternyata ditemukan adanya ketidakbenaran, saya bersedia menanggung akibat dan sanksi yang diberikan kepada saya.

Bandar Lampung, 6 Mei 2026

Pembuat Pernyataan



Exsa Hadibrata

## UCAPAN TERIMA KASIH

Alhamdulillahirobbilalamin. Pujian itu hanya bagi Allah Tuhan semesta alam. Yang Maha Suci lagi Maha Tinggi. Yang tidak ada yang berhak disembah dengan benar kecuali Dia. Berkat kasih dan sayangNya, nikmatNya dan keridhoanNya, Penulis dapat menyelesaikan disertasi ini. Semoga Alloh Subhanahu Wa Ta'ala memberikan keselamatan kepada rosul nya, Nabi Muhammad SAW, beserta para keluarganya.

Diabetes melitus (DM) merupakan suatu kumpulan kelainan metabolisme yang ditandai dengan tingginya kadar glukosa dalam darah (hiperglikemia). Diabetes melitus (DM) menyebabkan terjadinya disfungsi reproduksi pria dalam berbagai tingkatan. Kontrol endokrin terhadap spermatogenesis, ereksi penis, dan inisiasi pubertas semuanya terpengaruh efek negatif. Ekstrak lada hitam (*Piper nigrum L*) memiliki kandungan utama piperin yang berperan sebagai antioksidan. Penelitian efek ekstrak lada hitam terhadap fungsi reproduksi tikus hiperglikemia masih sangat kurang di Indonesia. Penelitian ini diharapkan menjadi temuan awal dalam merintis *road map* penelitian ekstrak lada hitam terhadap fungsi reproduksi tikus hiperglikemia di Indonesia.

Kemudian, Penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar besarnya kepada:

1. Pimpinan Universitas Lampung, Ibu Rektor, Prof. Dr. Ir. Lusmeilia Afriani, D.E.A.IPM, ASEAN Eng, beserta jajaran.
2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung, Bapak Dr. Eng. Heri Satria, S.Si., M.Si, beserta jajaran.
3. Direktur Program Pasca Sarjana Universitas Lampung, Bapak Prof. Dr. Ir. Murhadi, M.Si, beserta jajaran.
4. Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Lampung, Ibu Dr. dr. Evi Kurniawaty, M.Sc, beserta jajaran.
5. Ketua Program Studi Doktor MIPA Universitas Lampung. Dr. Khoirin Nisa, S.Si., M. Si, dan Sekertaris Program Studi Doktor MIPA Universitas Lampung, dan Dosen Dosen di Program Studi Doktor MIPA Universitas Lampung, beserta Staf Akademik. Terima kasih atas bimbingan, koreksi, dan ilmu pengetahuan yang telah dicurahkan kepada penulis dari awal perkuliahan hingga saat ini.

6. Bapak Prof. Dr. Sutyarso, M. Biomed, selaku ketua komisi pembimbing, promotor, dosen pembimbing akademik dan mentor. Beliau adalah guru penulis, yang banyak sekali memberikan nasihat, arahan, motivasi dan teladan bagi penulis. Terima kasih atas kasih sayang, bimbingan, arahan, ilmu, pencerahan dan semangat yang diberikan kepada penulis dari awal masuk menjadi dosen Unila, dan kemudian dari awal studi sampai dengan penyelesaian studi di Program Doktor MIPA Universitas Lampung. Penulis masih tetap membutuhkan arahan dan nasihat dari beliau dalam dunia akademik sampai sekarang.
7. Bapak Prof. Dr. Hendri Busman, M.Biomed, selaku pembimbing disertasi dan kopromotor. Beliau adalah guru penulis, yang banyak sekali teladan bagi penulis. Terima kasih atas kasih dan sayang, perhatian, semangat dan ilmu pengetahuan yang telah dicurahkan kepada penulis dari awal perkuliahan hingga saat ini. Penulis masih tetap akan membutuhkan contoh dan arahan dari beliau di bidang akademik sampai saat ini.
8. Bapak Dr. dr. Syazili Mustofa, M.Biomed, selaku pembimbing disertasi, kopromotor, dan senior. Beliau adalah pembimbing yang selalu memotivasi bimbingannya untuk terus bersemangat dan bekerja dengan tekun. Terima kasih atas kasih sayang, arahan, motivasi, bimbingan, koreksi, dan ilmu pengetahuan yang telah dibagi kepada penulis dari awal penulis menjadi dosen hingga saat ini.
9. Ibu Dr. dr. Ratna Dewi Puspita Sari, Sp. OG selaku pembimbing disertasi, penguji, dan senior. Beliau adalah pembimbing yang memberikan banyak contoh teladan yang bisa diambil dalam dunia akademik. Terima kasih atas, motivasi, arahan, bimbingan, kasih sayang, saran, koreksi, dan ilmu pengetahuan yang telah dicurahkan kepada penulis sejak dari tahun 2011 hingga saat ini.
10. Ibu Dr. dr. Evi Kurniawaty, M. Sc, selaku penguji, senior dan rekan kerja. Terima kasih atas, kasih sayang, masukan, bimbingan, arahan, dukungan moril dan meteril, bantuan, dan pengetahuan dan masukan yang sangat berharga kepada penulis sejak tahun 2010 hingga saat ini.
11. Ibu Dr. Nuning Nurcahyani, M.Sc, selaku penguji disertasi, dan senior. Beliau adalah pembahas yang selalu memotivasi bimbingannya untuk terus bersemangat dan bekerja dengan tekun. Terima kasih atas kasih sayang, arahan, motivasi,

bimbingan, koreksi, dan ilmu pengetahuan yang telah dibagi kepada penulis dari awal penulis menjadi dosen hingga saat ini

12. Bapak Dr. dr. Indrawarman, Sp.U(K), selaku penguji dan senior. Terima kasih atas masukan, bimbingan, arahan, dukungan moril, batuan, dan pengetahuan yang telah diberikan kepada penulis.
13. Bapak Wawan Abdullah Setiawan, M. Si, Terima kasih atas, keridhoan, kerja keras, masukan, bantuan, dan kerjasama yang sangat baik sehingga penelitian dapat berjalan dengan baik.
14. Kedua orang tua tercinta, Bapak Pardjono dan Ibu Sumarlin Terima kasih atas kasih sayang yang telah diberikan, doa dan harapan Semoga Allah subhanahu wa ta'ala membalasnya. Dan kepada Bapak dan Ibu mertua tercinta, Papa hasferi, Mama Zahara. Terima kasih atas kasih sayang dan perhatian yang telah diberikan.
15. Istriku tercinta, Ninoy Friza Amalia, Terima kasih atas cinta, kasih sayang, waktu, tenaga, semangat, motivasi, pengorbanan dan rasa tenang yang telah diberikan kepada penulis.
16. Teman teman dosen di Universitas Lampung.
17. Teman teman mahasiswa Program Studi Doktor MIPA, angkatan 2023
18. Pihak pihak lain yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

Semoga Allah subhanahu wa taala membalas kebaikan Bapak, Ibu dan Saudara dengan balasan yang lebih baik. Aamiin

Bandar Lampung, 6 Mei 2026

Exsa Hadibrata

## DAFTAR ISI

DAFTAR ISI .....	xii
DAFTAR TABEL .....	xiv
DAFTAR GAMBAR.....	xvi
DAFTAR LAMPIRAN .....	xviii
DAFTAR SINGKATAN .....	xix
I. PENDAHULUAN .....	21
1.1 Latar Belakang.....	21
1.2 Rumusan Masalah.....	25
1.3 Tujuan.....	27
1.4 Manfaat.....	27
1.5 <i>Novelty</i> /Kebaruan .....	28
1.6 Kerangka Konseptual Teori .....	29
1.7 Hipotesis.....	30
1.7.1 Hipotesis Alternatif (Ha).....	30
1.7.2 Hipotesis Null (H0).....	31
II. TINJAUAN PUSTAKA .....	32
2.1 Penelitian Terdahulu.....	32
2.2 Literatur Terkait.....	33
2.2.1 Nitric Oxide Synthase (NOS) dan Nitric Oxide (NO).....	33
2.2.2 Testosteron.....	37
2.2.3 Disfungsi Ereksi.....	39
2.2.4 Perilaku Seksual (Libido) .....	42
2.2.5 Spermatogenesis .....	43
2.2.6 Hiperglikemia .....	45
2.2.7 Dampak Hiperglikemia terhadap <i>Nitric Oxide Synthase</i> (NOS), <i>Nitric Oxide</i> (NO), dan Testosteron .....	47
2.2.8 Dampak Hiperglikemia terhadap Perilaku Seksual (Libido).....	50
2.2.9 Dampak Hiperglikemia pada Spermatogenesis .....	52
2.2.9.1 Efek Hiperglikemia pada Sel Spermatisit.....	55
2.2.10. Efikasi Ekstrak <i>Piper Nigrum L</i> terhadap Disfungsi Ereksi .....	55
2.2.11 Efikasi Ekstrak <i>Piper nigrum L</i> terhadap Gangguan Libido.....	57
2.2.12 Efikasi Ekstrak <i>Piper nigrum L</i> terhadap Spermatogenesis .....	58
2.2.13 Tikus Model Simulasi Ereksi dan Libido .....	58
2.2.14 Anatomi Penis Tikus dan Manusia .....	59
2.2.15 Lada Hitam ( <i>Piper nigrum L</i> ).....	61
2.2.16 Analisis Berbasis Liquid chromatography–mass spectrometry (LC–MS) .....	62
2.2.17 Analisis berbasis <i>Quantitative PCR</i> (qPCR).....	63
2.2.18 Analisis Berbasis <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (ELISA) .....	63
III. METODE .....	6
3.1. Desain Penelitian .....	65
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian.....	65
3.3 Alat dan Bahan Penelitian .....	66

3.3.1	Alat Penelitian.....	66
3.3.2	Bahan Penelitian .....	67
3.4.	Prosedur Penelitian .....	68
3.4.1.	Pengadaan Hewan Uji .....	68
3.4.2.	Pemeliharaan Hewan Uji.....	68
3.4.3.	Pengamatan dan Terminasi Hewan Uji.....	69
3.4.4.	Pembuatan Ekstrak Lada Hitam.....	69
3.4.5.	Profiling Senyawa Aktif Ekstrak Lada Hitam dengan LC-MS.....	70
3.4.6.	Induksi <i>Alloxan</i> .....	70
3.4.7.	Tingkat Ekspresi eNOS mRNA di <i>Corpus cavernosum</i> .....	71
3.4.7.1	Ekstraksi RNA Total .....	72
3.4.7.2	Analisi Konsentrasi, Kemurnian, dan Integritas RNA Hasil .... Ekstraksi .....	75
3.4.7.3	Sintesis DNA Komplementari (cDNA) .....	76
3.4.7.4	Analisis Ekspresi Gen dengan Quantitative PCR (qPCR) .....	76
3.4.7.5	Analisis Perbandingan Konsentrasi Gen Target dengan Gen Internal Kontrol .....	77
3.4.7.6	Analisis Tingkat Ekspresi Gen dengan PCR Konvensional ..	78
3.4.7.7	Verifikasi Hasil Amplifikasi PCR Konvensional .....	79
3.4.7.8	Verifikasi Gen eNOS melalui Sekuensing .....	79
3.4.8.	Uji Hormon Testosteron Intratestikular .....	78
3.4.9.	Pembuatan Preparat Histologi Testis .....	79
3.4.9.1	Perhitungan Sel Leydig .....	82
3.4.9.2	Perhitungan Sel Spermatisit .....	83
3.4.10.	Penilaian Fungsi Ereksi .....	83
3.4.11.	Pengamatan Perilaku Seksual (Libido) .....	84
3.4.12.	Pengamatan Kualitas Spermatozoa .....	84
3.5.	Definisi Operasional Variabel .....	86
3.6.	Analisis Statistik .....	90
3.7.	Alur Penelitian ( <i>Flowchart</i> ) .....	91
3.8.	Etik Penelitian.....	92
V.	KESIMPULAN DAN SARAN.....	93
5.1	Kesimpulan .....	93
5.2	Saran .....	94
5.2.1	Saran Penelitian Selanjutnya .....	94
5.2.2	Saran Untuk Masyarakat .....	94
	DAFTAR PUSTAKA.....	95

## DAFTAR TABEL

<b>Tabel</b>	<b>Halaman</b>
Tabel 1. Taksonomi tanaman lada hitam.....	63
Tabel 2. Definisi operasional variabel penelitian .....	87
Tabel 3. LC-MS data ekstrak lada hitam.....	95
Tabel 4. Properti Termodinamika dan Fisikokimia Primer <i>eNOS</i> .....	97
Tabel 5. Hasil BLAST dari sekuens gen eNOS pada <i>Rattus norvegicus Sprague-Dawley</i> .....	100
Tabel 6. Analisis CT Value Dari Beta Actin dan eNOs tiap kelompok .....	101
Tabel 7. Perbandingan Konsentrasi Gen Target Dengan Gen Internal Kontrol Dianalisis Berdasarkan Metode Livak.....	102
Tabel 8. Hasil BLAST dari sekuens gen eNOS pada <i>Rattus norvegicus Sprague-Dawley</i> .....	102
Tabel 9. Hasil uji <i>one oway ANOVA</i> ekspresi gen NOS metode RT-PCR .....	103
Tabel 10. Efek ekstrak lada hitam pada kadar testosteron <i>intratesticular</i> tikus jantan ( <i>R. norvegicus</i> ) .....	104
Tabel 11. Hasil Uji <i>Post Hoc LSD</i> data kadar testosteron intratestikular tikus setelah pemberian Ekstrak Lada Hitam .....	105
Tabel 12. Efek ekstrak lada hitam terhadap fungsi ereksi.....	106
Tabel 13. Hasil Uji <i>Post Hoc LSD</i> Data Parameter TPR Tikus Setelah Pemberian Ekstrak Lada Hitam.....	107
Tabel 14. Efek ekstrak lada hitam pada parameter libido tikus.....	108
Tabel 15. Hasil Uji <i>Mann Whitney</i> Data Parameter Libido Latensi Percumbuan Tikus Setelah Pemberian Ekstrak Lada Hitam.....	110
Tabel 16. Hasil Uji <i>Post Hoc LSD</i> Data Parameter Libido Latensi Penunggang Tikus Setelah Pemberian Ekstrak Lada Hitam.....	111
Tabel 17. Hasil Uji <i>Post Hoc LSD</i> Data Parameter Libido Frekuensi Penunggang Tikus Setelah Pemberian Ekstrak Lada Hitam.....	112
Tabel 18. Efek Ekstrak Lada Hitam pada Parameter Spermatozoa Tikus.....	113
Tabel 19. Hasil Uji <i>Post Hoc LSD</i> Parameter Konsentrasi Spermatozoa .....	114

Tabel 20. Hasil Uji <i>Post Hoc LSD</i> Parameter Motilitas Progresif Spermatozoa .....	115
Tabel 21. Hasil Uji <i>Post Hoc LSD</i> Parameter Morfologi Spermatozoa Normal .....	116
Tabel 22. Efek ekstrak lada hitam pada histologi testis tikus.....	117
Tabel 23. Hasil uji <i>post hoc LSD leydig cell count</i> .....	118
Tabel 24. Hasil uji <i>Post Hoc LSD spermatosit count</i> .....	119

## DAFTAR GAMBAR

<b>Gambar</b>	<b>Halaman</b>
Gambar 1. Kerangka konseptual penelitian.....	30
Gambar 2. <i>State of art</i> penelitian.....	34
Gambar 3. Perubahan L-arginin menjadi L-citrulin dan NO oleh enzim NOS.....	35
Gambar 4. Mekanisme Biomolekuler terjadinya Relaksasi Otot Cavernosa dan Ereksi Penis .....	37
Gambar 5. Sintesis hormon testosteron melalui aksis hipotalamus-hipofisis .....	38
Gambar 6. Etiologi disfungsi ereksi .....	43
Gambar 7. Proses Spermatogenesis pada Manusia .....	45
Gambar 8. Proses terjadinya hiperglikemia.....	47
Gambar 9. Dampak hiperglikemia terhadap NOS dan NO .....	49
Gambar 10. Hubungan antara hipotestosteron dengan resistensi insulin .....	50
Gambar 11. Mekanisme dampak hiperglikemia terhadap perilaku seksual .....	53
Gambar 12. Mekanisme dampak hiperglikemia terhadap fungsi reproduksi termasuk spermatogenesis dan kualitas sperma.....	55
Gambar 13. Struktur kimia piperin dan piperilin .....	56
Gambar 14. Mekanisme kerja piperin .....	57
Gambar 15. Anatomi Penis Manusia dan Tikus .....	61
Gambar 16. Lada Hitam .....	62
Gambar 17. Prosedur uji hormon intratestikular metode ELISA .....	80
Gambar 18. Sel Leydig Tikus putih perbesaran 100x .....	83
Gambar 19. Refleks genital tikus <i>Rattus norvegicus</i> .....	84
Gambar 20. Alur Penelitian .....	92
Gambar 21. Hasil Analisis LC-MS Ekstrak EtOH <i>Black Pepper</i> .....	96
Gambar 22. Hasil HRM untuk ketiga pasangan primer hasil desain menggunakan alat BIOER LineGene MiniS (Hangzhou, Tiongkok).....	98
Gambar 23. Hasil validasi elektroforesis dan spesifitas ampikon.....	99
Gambar 24. Hasil pengurutan gen eNOS pada <i>Rattus norvegicus</i> .....	99
Gambar 25. Analisis ekspresi gen dengan PCR kuantitatif (qPCR) .....	101

Gambar 26. Diagram batang efek ekstrak lada hitam pada ekspresi gen NOS metode RT-PCR .....	103
Gambar 27. Percumbuan dan penunggangan tikus jantan dan betina .....	108
Gambar 28. Skema efek Ekstrak Lada Hitam Terhadap Ekspresi Gen NOS .....	124
Gambar 29. Skema efek ekstrak lada hitam terhadap kadar testostosterone intratesticular .....	128
Gambar 30. Skema efek ekstrak lada hitam terhadap fungsi ereksi .....	130
Gambar 31. Skema efek ekstrak lada hitam terhadap libido tikus .....	131
Gambar 32. Skema efek pemberian ekstrak lada hitam terhadap spermatogenesis .....	139
Gambar 33. Skema efek piperin terhadap sel Leydig.....	144
Gambar 34. Flowchart efek ekstrak lada hitam sebagai terapi alternatif disfungsi reproduksi pada tikus hiperglikemia.....	154

**DAFTAR LAMPIRAN**

<b>Lampiran</b>	<b>Halaman</b>
Lampiran 1. Lembar Persetujuan Etik .....	172
Lampiran 2. Sertifikat Analisis <i>Alloxan</i> .....	173
Lampiran 3. Dokumentasi Penelitian .....	174
Lampiran 4. Data Penelitian .....	179
Lampiran 5. Analisis Data .....	183
Lampiran 6. Tabulasi sel Leydig dan Spermatozoit .....	192

## DAFTAR SINGKATAN

CCTV	: <i>Closed Circuit Television</i>
cDNA	: <i>Complementary Deoxyribonucleic Acid</i>
cGMP	: <i>Cyclic Guanosine 3', 5' – Monophosphate</i>
DAG	: <i>Diacylglycerol</i>
DE	: <i>Disfungsi Ereksi</i>
DM	: <i>Diabetes Melitus</i>
DNA	: <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
ELISA	: <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
eNOS	: <i>Endothelial Nitric Oxide Synthase</i>
ERS	: <i>Endoplasmic Reticulum Stress</i>
FDA	: <i>Food and Drug Administration</i>
FSH	: <i>Follicle-Stimulating Hormone</i>
GnRH	: <i>Gonadotropin Releasing Hormone</i>
GSH	: <i>Glutathione</i>
HDL	: <i>High Density Lipoprotein</i>
HPG	: <i>Hipotalamus-Hipofisis-Gonad</i>
IGF-1	: <i>Insulin Like Growth Factor 1</i>
IIEF-5	: <i>International Indeks of Erectile Function 5</i>
LC-MS	: <i>Liquid Chromatography-Mass Spectrometry</i>
LH	: <i>Luteinizing Hormone</i>
L-NAME	: <i>N<sup>G</sup>-Nitro-L-Arginine Methyl Ester</i>
MAP	: <i>Mean Arterial Pressure</i>
mRNA	: <i>Messenger Ribonucleic Acid</i>
NAD <sup>+</sup>	: <i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide<sup>+</sup></i>
NADH	: <i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide</i>
NADPH	: <i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Hydrogen</i>

NANC	: <i>Non-adrenergic non-cholinergic</i>
nNOS	: <i>Neural Nitric Oxide Synthase</i>
NO	: <i>Nitric Oxide</i>
NOS	: <i>Nitric Oxide Synthase</i>
qPCR	: <i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
RAGE	: <i>Receptor Advanced Glycation End products</i>
RNA	: <i>Ribonucleic Acid</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
SD	: <i>Sexual Dysfunction</i>
sGC	: <i>Soluble Guanylate Cyclase</i>
TPR	: <i>Total Penile Reflex</i>
WHO	: <i>World Health Organization</i>

## I. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Diabetes Melitus (DM) merupakan suatu kumpulan kelainan metabolisme yang ditandai dengan tingginya kadar glukosa dalam darah (hiperglikemia) akibat ketidakaturan produksi atau fungsi insulin. Diabetes melitus merupakan penyakit degeneratif tidak menular yang diperkirakan akan mengalami peningkatan prevalensi pada tahun-tahun mendatang (Sun *et al.*, 2022). Pada individu dengan penyakit diabetes melitus yang sudah berlangsung lama, yaitu dengan durasi lebih dari 5 tahun dan kadar glukosa darah yang tidak terkontrol, akan terjadi gangguan tersendiri baik pada sel saraf maupun pembuluh darah. Gangguan ini terjadi baik pada pembuluh darah kecil (mikrovaskular) maupun pembuluh darah besar (makrovaskular). Kerusakan mikrovaskuler terjadi pada mata, ginjal, dan saraf. Selain itu, adanya kerusakan signifikan pada arteri darah besar dapat mempercepat perkembangan aterosklerosis (La Sala *et al.*, 2019).

Prevalensi diabetes melitus di Indonesia terus menunjukkan tren peningkatan yang mengkhawatirkan, menempatkan negara ini dalam jajaran episentrum krisis penyakit tidak menular secara global. Berdasarkan laporan *International Diabetes Federation (IDF) Diabetes Atlas*, Indonesia menduduki peringkat kelima di dunia dengan jumlah penderita diabetes dewasa (rentang usia 20-79 tahun) mencapai lebih dari 19,5 juta jiwa, dengan angka prevalensi yang diperkirakan menyentuh 11,3% (IDF, 2024). Di tingkat nasional, data Survei Kesehatan Indonesia (SKI) tahun 2023 mengonfirmasi eskalasi ini dengan mencatat prevalensi diabetes berdasarkan diagnosis dokter pada penduduk usia 15 tahun ke atas sebesar 2,2%, mengalami kenaikan dari angka 2,0% yang sebelumnya dilaporkan pada Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) 2018 (Badan Kebijakan Pembangunan Kesehatan, 2023).

Hiperglikemia saat ini merupakan penyakit yang menetap dan berkembang dan mempunyai dampak besar di beberapa wilayah di dunia, memengaruhi beberapa sistem tubuh. Hal ini dapat mengakibatkan disfungsi ereksi penis pada pria, yaitu ketidakmampuan untuk mendapatkan dan mempertahankan ereksi yang cukup untuk melakukan hubungan seksual yang sukses (Defeudis *et al.*, 2022). Disfungsi ereksi pada pria hiperglikemia sering kali disebabkan oleh perubahan mikrovaskuler, neuropati, dan disfungsi endotel. Indeks Fungsi Ereksi Internasional (IIEF) adalah instrumen diagnostik yang menggunakan skala lima poin untuk mengukur fungsi ereksi pria. Skor di bawah 22 pada IIEF-5 menunjukkan adanya disfungsi ereksi. (Tamrakar *et al.*, 2021).

Komplikasi jangka panjang dari hiperglikemia termasuk makroangiopati, mikroangiopati dan neuropati. Hiperglikemia, juga merupakan penyebab penting dari disfungsi seksual pada pria, yang dapat berupa penurunan libido maupun gangguan ereksi penis (Defeudis *et al.*, 2022). Tingginya prevalensi gangguan seksual pada pasien DM dapat disebabkan oleh hiperglikemia berkepanjangan yang menyebabkan gangguan fungsi seksual dengan menyebabkan aterosklerosis, neuropati diabetik, disfungsi endotel dan perubahan endokrinologis (Asefa *et al.*, 2019).

Hiperglikemia dapat disebabkan oleh gangguan sekresi insulin, resistensi terhadap insulin di jaringan tubuh, atau keduanya. Kondisi hiperglikemia kronis ini dapat berinteraksi dengan masalah metabolik lainnya dalam tubuh penderita diabetes melitus, menyebabkan kerusakan pada berbagai organ dan mengakibatkan munculnya komplikasi serius yang mengancam jiwa, terutama yang terkait dengan makrovaskular (stroke dan penyakit kardiovaskular) serta mikrovaskular (retinopati, nefropati, dan neuropati) (Goyal *et al.*, 2023). Endotel pembuluh darah seharusnya memproduksi *Nitric Oxide* (NO) untuk melebarkan pembuluh darah. Namun, defisiensi insulin menghambat aktivitas NO sehingga aliran darah yang diperlukan untuk fungsi fisiologis organ tidak memadai. Hal tersebut menyebabkan organ-organ pada tubuh tidak dapat bekerja secara normal. Hal ini terjadi pada keadaan ereksi dimana pelebaran pembuluh darah di penis dibutuhkan untuk mencapai keadaan

ereksi yang adekuat. Defisiensi insulin menyebabkan peningkatan arginase II di korpus kavernosum menghambat aktivitas NO, sehingga aliran darah ke penis tidak memadai dan disfungsi ereksi dapat terjadi (Wowor *et al*, 2021).

Hiperglikemia juga dapat memengaruhi aksis Hipotalamus-Hipofisis-Gonad (HPG). Hal ini karena terjadi gangguan respon hipofisis terhadap hormon pelepas gonadotropin (GnRH) yang menyebabkan kadar LH dan FSH menjadi tidak normal sehingga menurunkan produksi hormon testosteron (Huang *et al.*, 2024). Keadaan hiperglikemia persisten juga telah diuji pada tikus percobaan dan ditemukan peningkatan rangsangan *Endoplasmic Reticulum Stress* (ERS) yang dapat memicu penghentian siklus sel dan apoptosis sel Leydig. Hal ini dapat menyebabkan terjadinya defisiensi hormon testosteron dan disfungsi ereksi (Du *et al.*, 2018).

Menurut penelitian terdapat 30% pasien Diabetes Melitus mengalami penurunan libido. Diabetes Melitus menjadi faktor risiko utama terjadinya disfungsi seksual (Afdal *et al.*, 2023). Disfungsi seksual disebabkan oleh kadar hormon testosteron yang menurun dan berperan dalam mengatur libido seksual seseorang. Menurut Russo *et al.*,(2021) pada sepertiga pria penderita Diabetes Melitus (DM) tipe 2 memiliki kadar hormon testosteron yang rendah. Menurut statistik, 20% hingga 80,4% pria dengan DM memiliki kadar hormon testosteron yang rendah (Liu *et al.*, 2022).

Hiperglikemia menyebabkan terjadinya kerusakan pada sel endotel pembuluh darah serta mengarah pada mikroangiopati yang menghambat distribusi nutrisi dari pembuluh darah ke jaringan yang memproduksi spermatozoa, sehingga proses spermatogenesis di testis tidak dapat berjalan dengan baik. Selain itu, juga dapat merusak aksis hipotalamus-hipofisis-gonad, yang menyebabkan ketidaknormalan dalam sekresi hormon, sehingga proses spermatogenesis juga terpengaruh, yang dapat menurunkan jumlah spermatozoa dan akhirnya mengarah pada masalah infertilitas pria (Defeudis *et al.*, 2022).

Hiperglikemia kronik pada diabetes terbukti mengganggu fungsi reproduksi pria melalui kombinasi perubahan endokrin, stres oksidatif, inflamasi, dan gangguan

mikro-sirkulasi testis. Bukti sintesis terkini menunjukkan bahwa diabetes berkaitan dengan penurunan kualitas semen (motilitas, viabilitas, dan integritas DNA sperma) serta perubahan histologis jaringan testis yang pada akhirnya menurunkan fertilitas. Secara mekanistik, peningkatan radikal bebas dan produk glikasi lanjut (AGEs) memicu disfungsi mitokondria, apoptosis sel germinal, serta ketidakseimbangan regulasi spermatogenesis (Maresch *et al.*, 2018; Huang *et al.*, 2024).

Tingginya kasus hiperglikemia yang diderita oleh masyarakat, sehingga diperlukan bahan alam yang mampu mengurangi dampak tersebut. Alasan diperlukannya bahan alam adalah karena obat yang sudah ada di pasaran saat ini yaitu golongan Fosfodiesterase inhibitor, memiliki efek samping yang berbahaya khususnya pada penderita penyakit jantung. Salah satu bahan alam yang telah diketahui dapat memperbaiki sistem reproduksi pria adalah lada hitam (*Piper nigrum* L). Ekstrak lada hitam *Piper nigrum* L memiliki beragam senyawa kimia seperti saponin, flavonoid, minyak esensial, kavisin, resin, protein, amilum, piperin, piperilin, piperoleine, poperanin, piperonal, dihidrokarveol, kanyo-fillene oksida, kariptone, tran piocarrol, serta minyak lada (Iskandar, 2021). Lada hitam mengandung alkaloid amida piperin (*piperine*) sebagai senyawa bioaktif utama yang memberi sensasi pedas. Berbagai studi melaporkan bahwa piperin memiliki aktivitas antioksidan, antimikroba termasuk antijamur, serta menunjukkan efek hepatoprotektif pada berbagai model eksperimental (Alves *et al.*, 2023). Pemberian ekstrak buah lada hitam (*Piper nigrum* L) dengan dosis 3,33mg/kgBB menghasilkan peningkatan kadar hormon testosteron pada tikus albino jantan (Sutyarso *et al.*, 2015). Penelitian tentang *The Effect of Black Pepper Fruits (Piper nigrum L.) on the Increase of Erection*, menemukan bahwa ekstrak buah lada hitam memiliki efek afrodisiak dan meningkatkan kadar testosteron pada tikus Wistar jantan (Septiyorini *et al.*, 2020).

Studi lain menunjukkan bahwa ekstrak lada hitam (*Piper nigrum*) memiliki efek menguntungkan terhadap fungsi reproduksi tikus jantan (*Rattus norvegicus*). Pemberian ekstrak ini secara signifikan meningkatkan perilaku seksual (libido), yang ditandai dengan peningkatan frekuensi mounting, intromission, dan ejakulasi, serta penurunan mount latency dan intromission latency (Isvari *et al.*, 2025). Selain itu,

ekstrak etanol *Piper nigrum* juga meningkatkan jumlah spermatogonia pada tikus jantan diabetes dibandingkan kelompok tanpa terapi, yang diduga melalui efek piperin dalam menurunkan stres oksidatif dan memperbaiki lingkungan mikro testis sehingga mendukung proliferasi sel germinal dan proses spermatogenesis (Talin *et al.*, 2025).

Lada hitam sendiri merupakan tanaman rempah-rempah yang termasuk dalam kategori komoditas perkebunan dan mempunyai andil besar dalam pembangunan perekonomian Indonesia. Perusahaan budidaya lada di Indonesia sebagian besar terkonsentrasi di wilayah luar Pulau Jawa, antara lain Kepulauan Bangka Belitung, Lampung, Sumatera Selatan, Sulawesi Selatan, dan Kalimantan Timur. Menurut statistik Direktorat Jenderal Perkebunan, kelima provinsi ini menyumbang 71% dari total produksi lada di negara ini. Di Indonesia, terdapat dua jenis lada yang berbeda: Lada Hitam Lampung yang berasal dari Lampung, dan Lada Putih Muntok yang sebagian besar dibudidayakan di Kepulauan Bangka Belitung (Naufal *et al.*, 2022). Oleh karena itu, perluasan pemanfaatan lada hitam selain sebagai rempah-rempah ini berpotensi meningkatkan nilai jual lada hitam sehingga berdampak pula pada sektor ekonomi.

Berdasarkan uraian latar belakang masalah di atas, peneliti mengkaji lebih dalam tentang pengaruh pemberian ekstrak lada hitam (*Piper nigrum*) pada fungsi reproduksi, fungsi ereksi, perilaku seksual (libido), pengaruh terhadap jumlah spermatisit, jumlah sel Leydig, peningkatan ekspresi gen *Nitric Oxide Synthase*, dan kadar hormon testosteron pada intratestikular tikus (*Rattus norvegicus*) model hiperglikemia. Penggunaan hewan ini sebagai hewan model yaitu didasarkan pada kemiripan dengan manusia dari aspek kedekatan genetik dan fisiologi reproduksi (Szpirer, 2020).

## 1.2 Rumusan Masalah

Terjadinya penurunan fungsi reproduksi pada pria dengan kondisi hiperglikemi adalah akibat perubahan mikrovaskuler, neuropati, endokrin, dan disfungsi endotel. Studi menunjukkan bahwa, jumlah pasien hiperglikemia di dunia masih tinggi. Pada pria dengan hiperglikemia, akan terjadi penurunan aktivitas NOS, disfungsi ereksi,

penurunan libido, gangguan pada analisis spermatozoa, serta penurunan kadar hormon testosteron. Lada hitam (*Piper nigrum L.*) dapat digunakan untuk mengobati disfungsi ereksi serta memperbaiki fungsi dari organ reproduksi pria karena kandungan piperine yang tinggi, suatu alkaloid dengan sifat antioksidan. Pemberian ekstrak buah lada hitam mampu meningkatkan level hormon testosteron. Ekstrak buah lada hitam juga mempunyai efek erotogenik dan meningkatkan kadar testosteron tikus wistar jantan. Dari uraian diatas, maka dapat dirumuskan masalah penelitian sebagai berikut:

1. Apa saja kandungan fitokimia yang terdapat pada lada hitam (*Piper nigrum L.*)?
2. Apakah pemberian ekstrak lada hitam (*Piper nigrum L.*) dapat meningkatkan ekspresi gen *Nitric Oxide Synthase* (NOS) pada corpus cavernosum tikus jantan model hiperglikemia yang diinduksi *Alloxan*?
3. Bagaimana pengaruh pemberian ekstrak lada hitam (*Piper nigrum L.*) terhadap kadar hormon testosteron intratestikular pada tikus jantan model hiperglikemia yang diinduksi *Alloxan*?
4. Bagaimana pengaruh pemberian ekstrak lada hitam (*Piper nigrum L.*) terhadap fungsi ereksi pada tikus jantan model hiperglikemia yang diinduksi *Alloxan*?
5. Bagaimana pengaruh pemberian ekstrak lada hitam (*Piper nigrum L.*) terhadap perilaku seksual (libido) pada tikus jantan model hiperglikemia yang diinduksi *Alloxan*?
6. Bagaimana pengaruh pemberian ekstrak lada hitam (*Piper nigrum L.*) terhadap kualitas spermatozoa pada tikus jantan model hiperglikemia yang diinduksi *Alloxan*?
7. Bagaimana pengaruh pemberian ekstrak lada hitam (*Piper nigrum L.*) terhadap jumlah sel Leydig dan Spermatisit pada tikus jantan model hiperglikemia yang diinduksi *Alloxan*?

### 1.3 Tujuan

Tujuan penelitian ini adalah :

1. Menganalisa kandungan fitokimia lada hitam menggunakan metode *Liquid chromatography–mass spectrometry* (LC–MS)
2. Memvalidasi desain primer *nitric oxide synthase* (NOS) dan menganalisa peningkatan ekspresi gen *nitric oxide synthase* (NOS) pada *Corpus cavernosum* tikus model hiperglikemia yang diinduksi *Alloxan* setelah pemberian ekstrak lada hitam (*Piper nigrum L.*)
3. Menganalisa kadar hormon testosteron intratesticular pada tikus jantan model hiperglikemia yang diinduksi *Alloxan* setelah pemberian ekstrak lada hitam (*Piper nigrum L.*)
4. Menganalisa fungsi ereksi pada tikus jantan model hiperglikemia yang diinduksi *Alloxan* setelah pemberian ekstrak lada hitam (*Piper nigrum L.*)
5. Menganalisa perilaku seksual (libido) pada tikus jantan model hiperglikemia yang diinduksi *Alloxan* setelah pemberian ekstrak lada hitam (*Piper nigrum L.*)
6. Menganalisa kualitas spermatozoa pada tikus jantan model hiperglikemia yang diinduksi *Alloxan* setelah pemberian ekstrak lada hitam (*Piper nigrum L.*)
7. Menganalisa jumlah sel Leydig dan Spermatisit pada tikus jantan model hiperglikemia yang diinduksi *Alloxan* setelah pemberian ekstrak lada hitam (*Piper nigrum L.*)

### 1.4 Manfaat

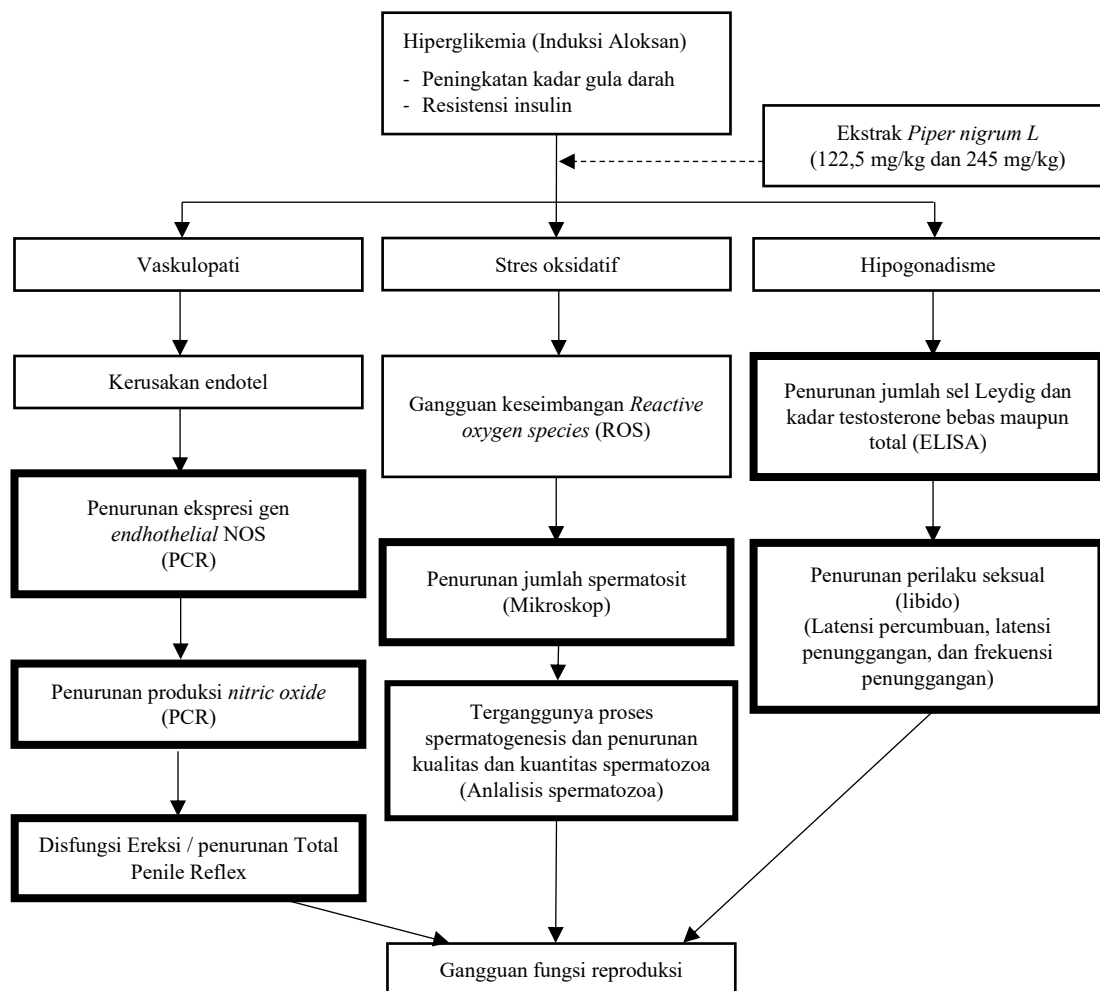
Penelitian ini dapat berkontribusi dalam penanggulangan masalah reproduksi pada pria yang mengalami hiperglikemia yang dimana saat ini menjadi salah satu penyakit paling banyak di derita masyarakat Indonesia maupun dunia. Pemberian lada hitam (*Piper nigrum L.*) yang memiliki kandungan alkaloid piperin terbukti mempunyai efek erotogenik dan meningkatkan kadar testosteron. Sehingga dapat direkomendasikan untuk membuat obat dengan bahan dasar lada hitam untuk mengatasi masalah disfungsi seksual.

### 1.5 Novelty/Kebaruan

Kebaruan penelitian ini adalah:

1. Mengungkap peningkatan ekspresi gen NOS pada tikus model hiperglikemik yang diberikan ekstrak lada hitam (*Piper nigrum L.*)
2. Mengungkap peningkatan jumlah sel Leydig dan kadar hormon testosteron pada tikus model hiperglikemik yang diberikan ekstrak lada hitam (*Piper nigrum L.*)
3. Mengungkap peningkatan perilaku seksual (libido) pada tikus model hiperglikemik yang diberikan ekstrak lada hitam (*Piper nigrum L.*)
4. Mengungkap peningkatan jumlah spermatosit dan analisis spermatozoa pada tikus model hiperglikemik yang diberikan ekstrak lada hitam (*Piper nigrum L.*)
5. Membuktikan bahwa ekstrak lada hitam (*Piper nigrum L.*) dapat digunakan sebagai obat herbal untuk pengobatan disfungsi reproduksi.

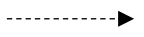
## 1.6. Kerangka Konseptual Teori



Keterangan :



Menggambarkan pengaruh



Menggambarkan penghambat



Parameter yang akan diperiksa

**Gambar 1.** Kerangka konseptual penelitian

Sumber : Sutyarso *et al.*, 2015; Septiyorini *et al.*, 2020; Abdullah Gul *et al.*, 2020; Ahn.,

Hiperglikemia yang diinduksi *Alloxan* menyebabkan peningkatan kadar gula darah dan resistensi insulin yang kemudian memicu berbagai gangguan sistem reproduksi. Kondisi ini menimbulkan tiga jalur utama, yaitu vaskulopati, stres oksidatif, dan hipogonadisme. Pada jalur vaskulopati terjadi kerusakan endotel yang ditandai dengan penurunan ekspresi gen *endothelial nitric oxide synthase* (eNOS) yang diukur dengan PCR, sehingga produksi *nitric oxide* (NO) menurun dan berujung pada disfungsi ereksi yang dinilai melalui TPR. Pada jalur stres oksidatif terjadi gangguan keseimbangan *reactive oxygen species* (ROS) yang menyebabkan penurunan jumlah spermatisit (diamati secara mikroskopis), sehingga proses spermatogenesis terganggu dan kualitas serta kuantitas spermatozoa menurun berdasarkan analisis sperma. Sementara itu, pada jalur hipogonadisme terjadi penurunan jumlah sel Leydig dan kadar testosteron bebas maupun total (diukur dengan ELISA), yang berdampak pada penurunan perilaku seksual atau libido, meliputi peningkatan latensi percumbuan, latensi penunggang, serta penurunan frekuensi penunggang. Ketiga jalur tersebut secara bersama-sama menyebabkan gangguan fungsi reproduksi. Pemberian ekstrak *Piper nigrum L.* dengan dosis 122,5 mg/kg dan 245 mg/kg ditunjukkan dalam diagram sebagai intervensi yang berpotensi memperbaiki kondisi hiperglikemia dan dampak turunannya terhadap fungsi reproduksi.

## 1.7 Hipotesis

### 1.7.1 Hipotesis Alternatif (Ha)

1. Ekstrak lada hitam (*Piper nigrum L.*) mengandung berbagai senyawa fitokimia yang dapat diidentifikasi.
2. Pemberian ekstrak lada hitam (*Piper nigrum L.*) dapat meningkatkan ekspresi gen *Nitric Oxide Synthase* (NOS) pada *Corpus Cavemosum* tikus jantan model hiperglikemia yang diinduksi *Alloxan*.
3. Pemberian ekstrak lada hitam (*Piper nigrum L.*) dapat meningkatkan kadar hormon testosteron intratestikular pada tikus jantan model hiperglikemia yang diinduksi *Alloxan*.

4. Pemberian ekstrak lada hitam (*Piper nigrum L.*) dapat meningkatkan fungsi ereksi pada tikus jantan model hiperglikemia yang diinduksi *Alloxan*.
5. Pemberian ekstrak lada hitam (*Piper nigrum L.*) dapat meningkatkan perilaku seksual (libido) pada tikus jantan model hiperglikemia yang diinduksi *Alloxan*.
6. Pemberian ekstrak lada hitam (*Piper nigrum L.*) dapat memperbaiki kualitas spermatozoa pada tikus jantan model hiperglikemia yang diinduksi *Alloxan*.
7. Pemberian ekstrak lada hitam (*Piper nigrum L.*) dapat meningkatkan jumlah sel Leydig dan Spermatisit pada tikus jantan model hiperglikemia yang diinduksi *Alloxan*.

### 1.7.2 Hipotesis Null (H0)

1. Pemberian ekstrak lada hitam (*Piper nigrum L.*) tidak menunjukkan kandungan fitokimia yang dapat diidentifikasi.
2. Pemberian ekstrak lada hitam (*Piper nigrum L.*) tidak meningkatkan ekspresi gen *Nitric Oxide Synthase* (NOS) pada *Corpus Cavemosum* tikus jantan model hiperglikemia yang diinduksi *Alloxan*.
3. Pemberian ekstrak lada hitam (*Piper nigrum L.*) tidak meningkatkan kadar hormon testosteron intratestikular pada tikus jantan model hiperglikemia yang diinduksi *Alloxan*.
4. Pemberian ekstrak lada hitam (*Piper nigrum L.*) tidak meningkatkan fungsi ereksi pada tikus jantan model hiperglikemia yang diinduksi *Alloxan*.
5. Pemberian ekstrak lada hitam (*Piper nigrum L.*) tidak meningkatkan perilaku seksual (libido) pada tikus jantan model hiperglikemia yang diinduksi *Alloxan*.
6. Pemberian ekstrak lada hitam (*Piper nigrum L.*) tidak memperbaiki kualitas spermatozoa pada tikus jantan model hiperglikemia yang diinduksi *Alloxan*.
7. Pemberian ekstrak lada hitam (*Piper nigrum L.*) tidak dapat meningkatkan jumlah sel Leydig dan Spermatisit pada tikus jantan model hiperglikemia yang diinduksi *Alloxan*.

## II. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Penelitian Terdahulu

Penelitian sebelumnya mengenai buah lada hitam sudah ada yaitu, penelitian tentang *Effects of Black Pepper (Piper nigrum Linn.) Extract on Sexual Drive in Male Mice*, didapatkan bahwa pemberian ekstrak buah lada hitam (*Piper nigrum L*) dengan dosis 3.33mg/kgBB mampu meningkatkan level hormon testosteron pada tikus albino jantan (Sutyarso *et al*, 2015). Dilanjutkan dengan Penelitian tentang *The Effect of Black Pepper Fruits (Piper nigrum L.) on the fertility potential of male albino*, mendapatkan hasil bahwa ekstrak lada hitam meningkatkan kadar serum testosteron dan terjadi peningkatan kualitas dan kuantitas spermatozoa (Sutyarso *et al*, 2016). Penelitian lain yang menggunakan ekstrak lada hitam yang berjudul *The Effect of Black Pepper Fruits (Piper nigrum L.) on the Increase of Erektion*, mendapatkan hasil bahwa ekstrak buah lada hitam mempunyai efek erotogenik dan meningkatkan kadar testosteron tikus wistar jantan (Septiyorini *et al*, 2020). Penelitian tentang gen *Nitric Oxide Synthase* (NOS) juga sudah dilakukan sebelumnya. yaitu melakukan penelitian ekspresi gen NOS pada tikus yang diberikan obat phosphodiesterase inhibitor jenis tadalafil (Abdulah Gul *et al.*, 2020). Namun penelitian tersebut menggunakan pewarnaan imunohistokimia pada otot polos penis tikus.

Berdasarkan uraian diatas masih ada ruang yang bisa dijadikan subyek penelitian terbaru mengenai efek buah lada hitam *Piper nigrum L*, sebagai obat alam yang memperbaiki fungsi reproduksi, dengan efek samping minimal bagi tubuh manusia. Penelitian mengenai buah lada hitam *Piper nigrum L* perlu dilanjutkan menjadi penelitian komprehensif mengenai perilaku seksual, histologis testis, hormonal, dan biomolekuler ekspresi gen. Tinjauan biomolekuler dengan menilai ekspresi gen NOS

dan hormon testosteron, karena dianggap kedua materi materi tersebut bertanggung jawab pada proses ereksi. Penelitian gen NOS juga lebih baik untuk dikerjakan melalui pemeriksaan quantitative polymerase chain reaction (qPCR) untuk mendapatkan hasil yang akurat, sedangkan pemeriksaan hormon testosteron dapat dikerjakan dengan prosedur ELISA.



**Gambar 2.** *State of art* penelitian

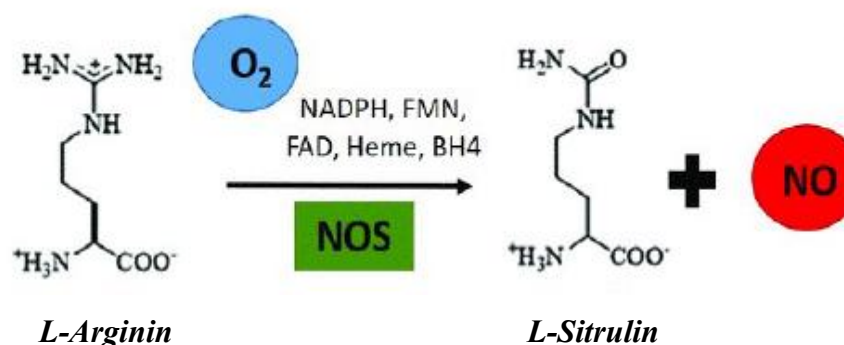
Sumber : Sutyarso *et al*, 2015; Sutyarso *et al*, 2016; Septiyorini *et al.*, 2020; Gul *et al.*, 2020.

## 2.2 Literatur Terkait

### 2.2.1 Nitric Oxide Synthase (NOS) dan Nitric Oxide (NO)

Nitric oxide (NO) merupakan mediator utama relaksasi otot polos corpus cavernosum pada proses ereksi melalui jalur NO-sGC-cGMP. NO diproduksi

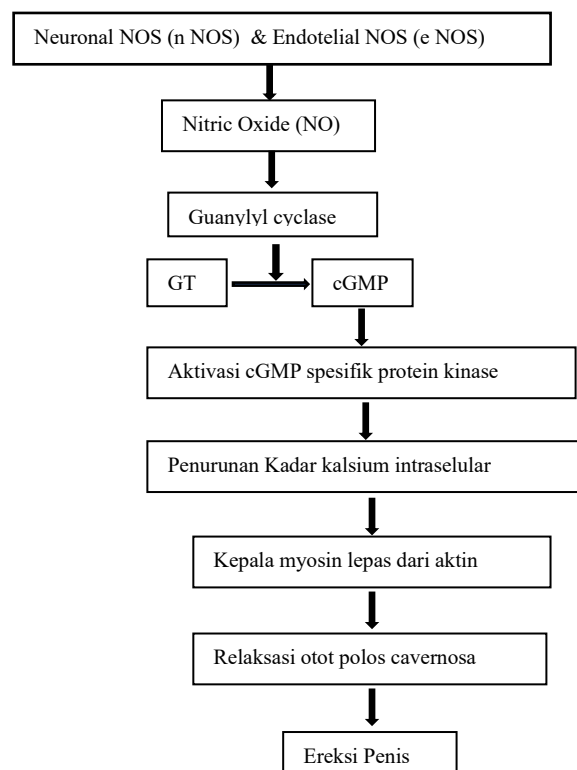
oleh enzim nitric oxide synthase (NOS), terutama dua isoform konstitutif, yaitu neuronal NOS (nNOS/NOS1) pada serabut saraf nitregrik/ujung saraf otonom penis dan endothelial NOS (eNOS/NOS3) pada sel endotel sinusoid jaringan ereksi; secara fisiologis, NO dari nNOS berperan dominan pada inisiasi ereksi, sedangkan NO dari eNOS (dipicu shear stress) membantu mempertahankan rigiditas selama ereksi (Souza *et al*, 2022). NO juga menimbulkan ereksi ketika disuntikkan ke dalam sistem intracerebroventrikular, menurut mekanisme yang tidak berhubungan dengan transmisi saraf oksitosinergik (Stephen, 2024). NO diyakini sebagai *nonadrenergic noncholinergic* (NANC) neurotransmitter vasoaktif utama untuk ereksi di korpora kavernosa (penis). Enzim NOS, yang mengkatalisis NO dari konversi L-arginin menjadi L-sitrulin, terdapat pada jaringan saraf, endotel, dan epitel dalam struktur panggul dan urogenital manusia dan berbagai spesies hewan. Respon ereksi dipicu dengan pelepasan awal NO oleh serabut saraf dilator NANC otonom yang mempersarafi korpora kavernosa, endotel vaskular dan sinusoidal. NO kemudian berdifusi melintasi membran otot polos dan mengaktifkan *guanylate cyclase* (sGC) terlarut, yang mengkatalisis produksi 3',5'-siklik guanosin monofosfat (cGMP). Kemudian cGMP spesifik protein kinase aktif dan menyebabkan penurunan kadar kalsium intraseluler otot polos. Hal ini menyebabkan terjadinya relaksasi otot polos *cavernosa* dan ereksi penis (Partin *et al.*,2020).



**Gambar 3.** Perubahan *L-Arginin* menjadi *L-Sitrulin* dan NO oleh enzim NOS  
Sumber : Estefania *et al.*, 2022

NO dikenal sebagai faktor kunci dalam inisiasi ereksi penis dengan menginduksi relaksasi otot polos di korpus kavernosum. Sebagai neurotransmitter dan pengatur tonus pembuluh darah, produksi NO diatur secara ketat oleh sintase *nitric oxide konstitutif* (cNOSs), seperti neuronal NOS (nNOS), pada neuron penis yang menginervasi korpus kavernosum. Endotel NOS (eNOS) aktif dalam sel endotel vaskular penis dan dalam jaringan trabekuler yang diaktifkan oleh aliran darah (Abdulah Gul *et al.*, 2020).

NO diproduksi dari L-arginin, O<sub>2</sub> dan NADPH oleh *nitric oxide synthase* (NOS). Ada tiga isoenzim NOS yang dikodekan oleh tiga gen terpisah, neuronal NOS (nNOS), NOS endotel (eNOS) dan NOS yang dapat diinduksi sitokin (iNOS). nNOS, yang paling terkenal isoform NOS, ditemukan pertama dan terutama di sistem saraf, dimana ia bertanggung jawab untuk produksi NO. Selain ekspresinya dalam elemen saraf, nNOS juga telah diamati pada sel non-neuron seperti spermatosit dan sel Sertoli dari testis dewasa dan eosinophil dari jaringan ikat. DM adalah hiperglikemia, yang terjadi karena tidak ada cukup insulin untuk membantu transportasi glukosa ke dalam sel seperti sel otot rangka, adiposit dan hepatosit. hiperglikemia yang diinduksi diabetes ini diketahui terkait dengan peningkatan oksigen *reactive oxygen species* (ROS), yang dapat membebani kemampuan sistem antioksidan endogen, yang menyebabkan stres oksidatif. Peningkatan tingkat stres oksidatif mengarah ke perkembangan penyakit mikro dan makrovaskular (Emerald *et al.*, 2022).



**Gambar 4.** Mekanisme Biomolekuler terjadinya relaksasi otot *cavernosa* dan ereksi penis

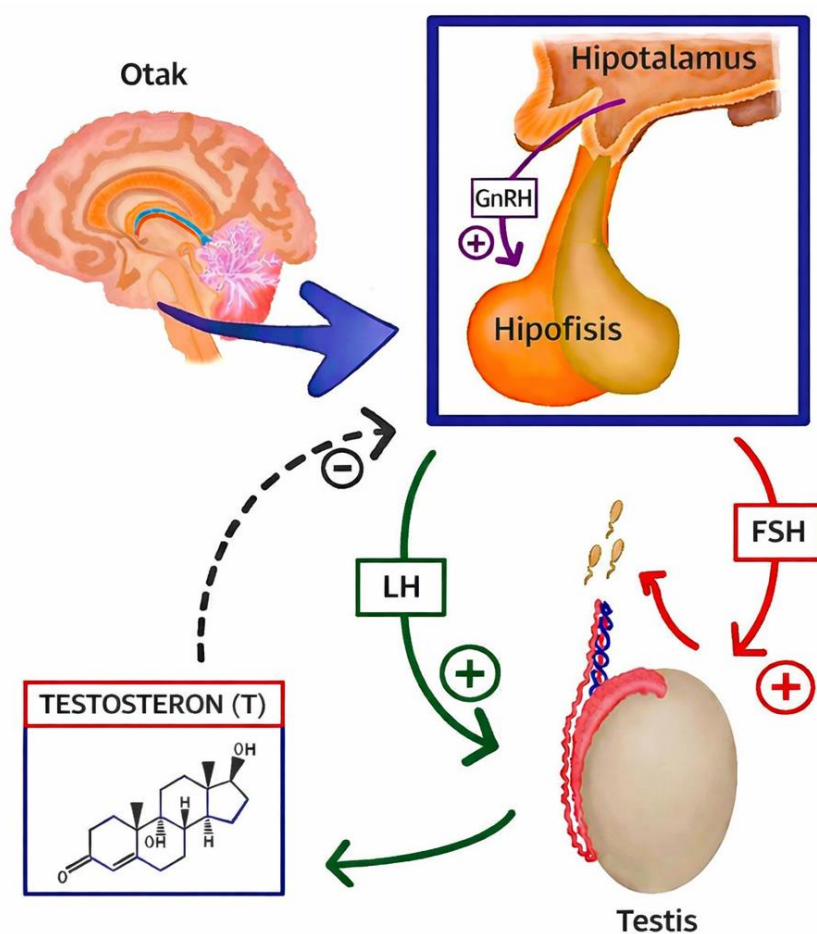
Sumber: Partin *et al* 2020

Setelah kontraksi, relaksasi otot terjadi setelah penurunan konsentrasi  $\text{Ca}^{2+}$  bebas dalam sarcoplasma. Calmodulin terlepas dari MLC kinase dan menonaktifkannya. Myosin didefosforilasi oleh MLCP dan terlepas dari filamen aktin, sehingga otot rileks. Mekanisme lain relaksasi otot polos adalah melalui adenosin monofosfat siklik (cAMP) dan cGMP, yang merupakan *second messenger* utama yang terlibat dalam relaksasi otot polos. Mereka mengaktifkan protein kinase yang bergantung pada cAMP dan cGMP, yang memfosforilasi protein dan kanal ion tertentu, mengakibatkan (1) pembukaan kanal kalium dan hiperpolarisasi; (2) penangkapan kalsium intraseluler oleh retikulum endoplasma; dan (3) penghambatan kanal kalsium yang bergantung pada tegangan, yang menghambat aliran kalsium. Akibatnya adalah penurunan kalsium bebas sitosolik dan relaksasi otot polos. Jalur Sinyal Monofosfat

Guanosin Siklik (cGMP). Molekul sinyal dalam jalur cGMP meliputi NO, CO, hidrogen sulfida (H<sub>2</sub>S), dan peptida natriuretic (Partin *et al.*, 2020).

### 2.2.2 Testosteron

Testosteron merupakan hormon seks yang memainkan peran penting pada fisiologi tubuh manusia. Testosteron terutama disintesis pada organ gonad (testis pada laki-laki). Sintesis testosteron diatur secara sentral oleh aksis hipotalamus-hipofisis. Terdapat mekanisme umpan balik negatif dalam hal ini. Rendahnya kadar testosteron ini dikenal dengan istilah hipotestosteron. Hal ini menyebabkan berbagai manifestasi klinis, tidak hanya di bidang reproduksi, tetapi juga berbagai bidang lainnya termasuk di bidang metabolik dan endokrin (Muslim, 2017; Decroli, 2018).



**Gambar 5.** Sintesis hormon testosteron melalui aksis hipotalamus-hipofisis

Sumber : Li *et al.*, 2024

Gambar diatas menjelaskan sumbu hipotalamus–hipofisis–gonad (HPG axis) yang mengatur sintesis hormon testosteron. Proses dimulai dari otak, tepatnya hipotalamus, yang melepaskan *Gonadotropin Releasing Hormone* (GnRH) untuk merangsang kelenjar hipofisis. Sebagai respon, hipofisis mengeluarkan dua hormon gonadotropin, yaitu LH (*Luteinizing Hormone*) dan FSH (*Follicle Stimulating Hormone*). LH terutama bekerja pada sel Leydig di testis untuk memproduksi testosteron (T), sedangkan FSH berperan mendukung fungsi sel Sertoli dan proses spermatogenesis, sekaligus membantu lingkungan testis agar produksi hormon dan pembentukan sperma berjalan optimal. Testosteron yang terbentuk kemudian memberikan efek biologis pada berbagai jaringan target, serta menjalankan mekanisme umpan balik (*feedback*) ke hipotalamus dan hipofisis untuk menjaga kadar hormon tetap stabil; ketika testosteron meningkat, sinyal ke pusat pengatur akan menekan pelepasan GnRH/LH/FSH sehingga produksi testosteron tidak berlebihan, dan sebaliknya saat testosteron menurun, stimulasi akan meningkat untuk mempertahankan keseimbangan hormonal (Li *et al*, 2024).

Testosteron memainkan peran yang vital dalam fisiologi manusia. Testosteron dan metabolitnya,  $5\alpha$ -dihydrotestosteron, meregulasi metabolisme energi, pertumbuhan otot, menghambat adipogenesis, dan memodulasi fungsi reproduksi dan seksual pria. Peran lainnya yaitu regulasi metabolisme tulang, eritropoiesis, fungsi endotel, dan fungsi hati. Kadar testosteron dalam tubuh diatur oleh aksis hipotalamus-hipofisis. Pada pria, 95% testosteron dalam sirkulasi berasal dari produksi testis (3-10mg/dl). Defisiensi testosteron (hipotestosteron) berkaitan dengan peningkatan massa lemak, penurunan sensitivitas insulin, toleransi glukosa terganggu, peningkatan trigliserida dan kolesterol, dan penurunan kadar HDL. FDA mendefinisikan hipotestosteron apabila kadar testosteron 300 ng/dL atau kurang, tanpa memperhatikan adanya gejala atau tidak (Muslim, 2017; Decroli, 2018).

Testosteron merupakan androgen utama di lingkungan intratestikular (testis) pada mamalia dan berperan krusial dalam mempertahankan spermatogenesis

melalui aksi androgen pada sel Sertoli. Secara fisiologis, kadar testosteron di dalam testis harus jauh lebih tinggi dibandingkan kadar sirkulasi (serum) untuk menjaga proses meiosis, pematangan sel germinal, serta pelepasan spermatozoa; pada tikus dewasa, konsentrasi testosteron intratestikular dilaporkan berada pada kisaran  $\pm 50\text{--}70$  ng/mL, yang menegaskan kebutuhan kadar lokal testis yang tinggi untuk mempertahankan spermatogenesis (Zhou *et al*, 2019). Konsentrasi testosteron intratestikular juga dilaporkan sekitar 40 kali lebih tinggi daripada testosteron serum, dan kondisi ini dipandang penting untuk kuantitas produksi sperma yang normal (Grande *et al*, 2022).

Masih sedikit data yang diketahui mengenai interaksi antara kadar testosteron dengan sensitivitas insulin pada pria. Beberapa studi menunjukkan bahwa terdapat hubungan terbalik antara testosteron dan kadar insulin puasa pada pria secara independen. Hubungan antara defisiensi testosteron dan diabetes juga ditunjukkan dengan studi bahwa pria dengan diabetes tipe 2 memiliki kadar testosteron yang lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol non-diabetes. Sebuah studi menunjukkan bahwa kadar testosteron berkorelasi tidak hanya dengan sensitivitas insulin tapi juga fungsi mitokondria yang menunjukkan bahwa testosteron mungkin memodulasi sensitivitas insulin pada pria. Pada pria, kadar testosteron yang rendah menjadi faktor predisposisi obesitas sentral dan perkembangan menuju sindroma metabolik dan diabetes mellitus tipe 2 (Muslim, 2017; Decroli, 2018).

Beberapa studi menyebutkan bahwa defisiensi testosteron memiliki efek negatif terhadap mood dan gejala depresi. Pria dengan defisiensi testosteron sering terganggu dengan hilang atau berkurangnya libido, disfungsi ereksi, disforia, fatigue, dan iritabilitas. Gejala-gejala ini biasa didiagnosis sebagai depresi mayor.

### **2.2.3 Disfungsi Ereksi**

Disfungsi ereksi (DE) adalah ketidakmampuan terus-menerus untuk mencapai atau mempertahankan ereksi penis yang cukup untuk aktivitas seksual.

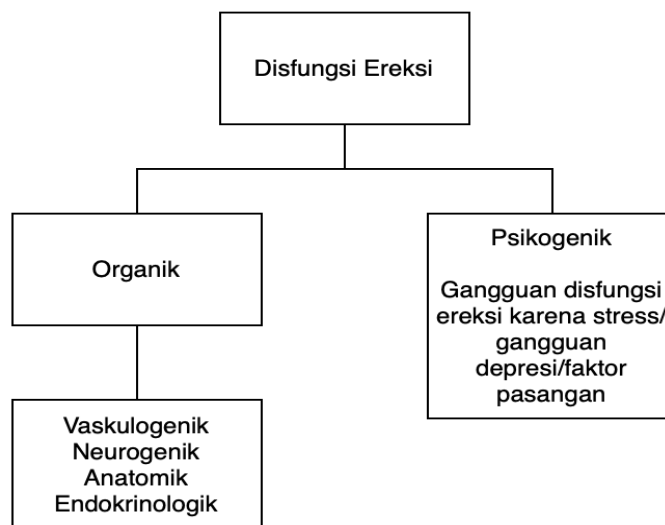
Disfungsi ereksi adalah masalah kualitas hidup yang signifikan bagi semua pria dan fungsi seksual yang buruk dikaitkan dengan kualitas hidup terkait kesehatan yang lebih buruk. Permasalahan ini dapat berdampak buruk pada kualitas hidup pria; kebanyakan pasien mempunyai gejala depresi dan kecemasan terkait dengan kinerja seksual. Gejala-gejala ini, pada gilirannya, memengaruhi dirinya pengalaman seksual pasangan dan kualitas hidup pasangan (Mazzilli, 2022).

Penyebab DE dapat dibedakan oleh gangguan hasrat seksual hipoaktif dan hasrat seksual normoaktif. Kondisi pertama terkadang bisa bergantung pada berkurangnya ketertarikan terhadap pasangan, yang bisa disebabkan oleh penyakit atau hanya karena lamanya hubungan pasangan tersebut. Selain itu, bisa juga terkait dengan kondisi psikogenik atau penyakit organik. Kondisi psikogenik sering kali dikaitkan dengan kesalahpahaman dalam pasangan atau unit keluarga, serta masalah terkait aktivitas kerja, yang seringkali memengaruhi hasrat seksual. Bahkan terjadinya episode awal DE, serta disfungsi seksual lainnya, dapat menyebabkan kecemasan kinerja dan dengan demikian merupakan reaksi mengelak untuk menghindari kegagalan. Di antara penyakit organik, penyebab endokrin terpenting adalah kondisi hipogonadisme, dimana testosteron adalah pendorong utama hasrat seksual (Mazzilli, 2022).

Berbagai penyakit organik dapat mendorong terjadinya disfungsi ereksi, termasuk salah satunya yaitu hiperglikemia. Keterjadian dan prevalensi hiperglikemia terus meningkat setiap tahun. Komplikasi jangka panjang hiperglikemia termasuk makroangiopati, mikroangiopati dan neuropati serta disfungsi seksual (SD) pada pria dan wanita. Disfungsi ereksi (DE) tercatat sebagai SD paling penting pada pria hiperglikemia. Prevalensi DE kira-kira 3,5 kali lipat lebih tinggi pada pria penderita hiperglikemia dibandingkan pria tanpa hiperglikemia (Defeudis *et al.*, 2022).

Vaskulopati diabetik terdiri dari makrovaskulopati, mikrovaskulopati, dan disfungsi endotel, yang semuanya berperan dalam patofisiologi disfungsi ereksi. Penyakit makrovaskuler, yang merupakan komplikasi hiperglikemia, dan penyakit penyerta lainnya yang umumnya dikaitkan dengan hiperglikemia, diperkirakan memainkan peran penting dalam patofisiologi disfungsi ereksi dengan mengurangi aliran darah menuju penis. Disfungsi endotel diperkirakan mendahului dan memengaruhi terjadinya aterosklerosis, pembentukan plak, dan trombosis yang menyebabkan penyakit makrovaskular oklusif. Sedangkan, penyakit mikrovaskuler yang berhubungan dengan hiperglikemia menyebabkan iskemia saraf selain kerusakan saraf langsung, yang menyebabkan neuropati otonom dan perifer. Disfungsi endotel menyebabkan penurunan aktivitas eNOS, sehingga berkurang produksi NO. Hal ini menyebabkan kurangnya relaksasi otot polos pembuluh darah corpora cavernosa yang mengakibatkan disfungsi ereksi (Defeudis *et al.*, 2022).

Selanjutnya, mekanisme disfungsi ereksi pada neuropati otonom disebabkan oleh berkurangnya atau tidak adanya aktivitas parasimpatis yang diperlukan untuk relaksasi otot polos corpus cavernosum. Aksi parasimpatis diperlukan untuk menurunkan kadar norepinefrin serta meningkatkan asetilkolin, menghasilkan peningkatan aktivitas enzim NOS, yang melepaskan NO dari sel endotel dan neuron nonadrenergik dan nonkolinergik. Neuropati perifer akibat diabetes menyebabkan gangguan impuls sensorik dari batang dan glans penis ke pusat ereksi refleksogenik. Neuron motorik saraf pudendal mengaktifkan otot dasar panggul yang menyebabkan kontraksi otot bulbo-kavernosa dan iskiokavernosa (Chen *et al.*, 2020).



**Gambar 6.** Etiologi disfungsi ereksi

Sumber : Defeudis *et al.*, 2022

#### 2.2.4 Perilaku Seksual (Libido)

*World Health Organization* (WHO) membagi gangguan seksual pada pria atas gangguan hasrat seksual (libido), disfungsi ereksi, disfungsi orgasme, dan ejakulasi dini. Gangguan libido seksual dapat didefinisikan sebagai penurunan pikiran seksual dan penurunan untuk aktivitas seksual (Sasaki, 2016). Dalam hal ini tidak didapatkan adanya pikiran, fantasi seksual ataupun respon terhadap suatu hasrat seksual. Motivasi sebagai faktor pendorong untuk meningkatkan hasrat seksual jarang atau bahkan tidak ada sama sekali. Hilangnya ketertarikan atau kurangnya hasrat seksual berhubungan dengan model respon seksual manusia (Clayton *et al.*, 2018).

Disfungsi seksual termasuk gangguan hasrat, gairah seksual, lubrikasi, orgasme, dan rasa nyeri saat bersenggama. Masalah tersebut terjadi tanpa melihat faktor usia, dan dapat memberikan dampak negatif terhadap kualitas hidup maupun kesehatan (Conn and Hodges, 2023). Gangguan seksual lebih sering terjadi pada laki-laki, prevalensinya 10% terjadi pada semua usia, lebih dari 50% terjadi pada laki-laki dengan usia antara 50-70 tahun. Laki-laki

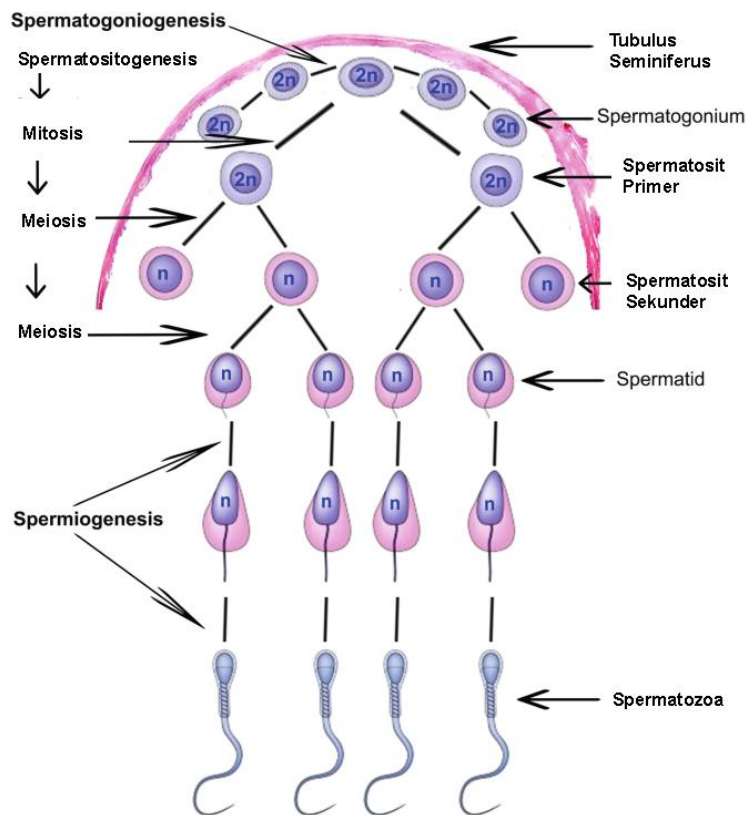
dengan usia 50-59 tahun prevalensi penurunan libido tiga kali lebih tinggi dari laki-laki dengan usia lebih muda.

### **2.2.5 Spermatogenesis**

Spermatogenesis adalah serangkaian langkah yang mencakup regenerasi dan diferensiasi spermatogonium, pematangan serta pembelahan spermatosit, dan transisi sel sperma. Proses ini berlangsung di dalam testis, khususnya di struktur yang dinamai tubulus seminiferus. Tahapan ini dimulai selama masa pubertas, ketika produksi hormon gonadotropin sudah berada pada tingkat yang optimal untuk merangsang pembentukan spermatozoa. Awal mula dari proses ini berlangsung dalam rahim, ketika sel germinal primordial berada pada tahap awal perkembangan dan terletak di antara sel-sel endoderm, sebelum mereka bergerak menuju wilayah urogenital di bagian lumbar. Selanjutnya, sel germinal ini akan mengalami periode istirahat hingga lumen tubulus seminiferus sepenuhnya terbentuk selama masa pubertas, setelah itu akan mengalami diferensiasi menjadi spermatogonium (Syauqy, 2021).

Spermatogonium terdapat dalam dua hingga tiga lapisan di luar sel epitel tubulus seminiferus dan dibedakan menjadi dua kategori, yaitu tipe A dan tipe B. Tipe A terbagi lagi menjadi dua subtipe, yaitu spermatogonium tipe Ad (gelap) dan spermatogonium tipe Ap (pucat). Tipe Ad jarang melakukan pembelahan dan tidak menunjukkan aktivitas proliferasi dalam kondisi normal. Tipe ini dianggap sebagai sel punca testis yang akan melakukan mitosis ketika jumlah spermatogonium menurun signifikan, contohnya akibat paparan radiasi. Di sisi lain, spermatogonium tipe Ap akan membelah dan bertransformasi menjadi spermatogonium tipe B. Kemudian, spermatogonium tipe B bergerak menuju lumen untuk terbentuk spermatosit primer, yang selanjutnya akan menjalani pembelahan meiosis menjadi spermatosit sekunder. Setelah itu, spermatosit sekunder akan membagi lagi secara meiosis II menjadi spermatid.

Spermatid memiliki bentuk bulat dan tidak melakukan pembelahan. Namun, sel ini akan mengalami proses perpanjangan menjadi spermatid panjang yang dikenal sebagai spermiogenesis, dan akan dirilis menjadi spermatozoa melalui proses spermiasi. Pelepasan spermatid dari epitel germinal diatur oleh sel sertoli. Setelah itu, spermatid akan bergerak menuju batas lumen tubulus seminiferus untuk menjadi spermatid matang yang akan menutup jembatan interseluler dan berpisah dari epitel germinal, sehingga berkembang menjadi spermatozoa. Spermatozoa adalah tahap sel matang dari germinal yang terdapat dalam tubulus seminiferus.



**Gambar 7.** Proses spermatogenesis pada manusia

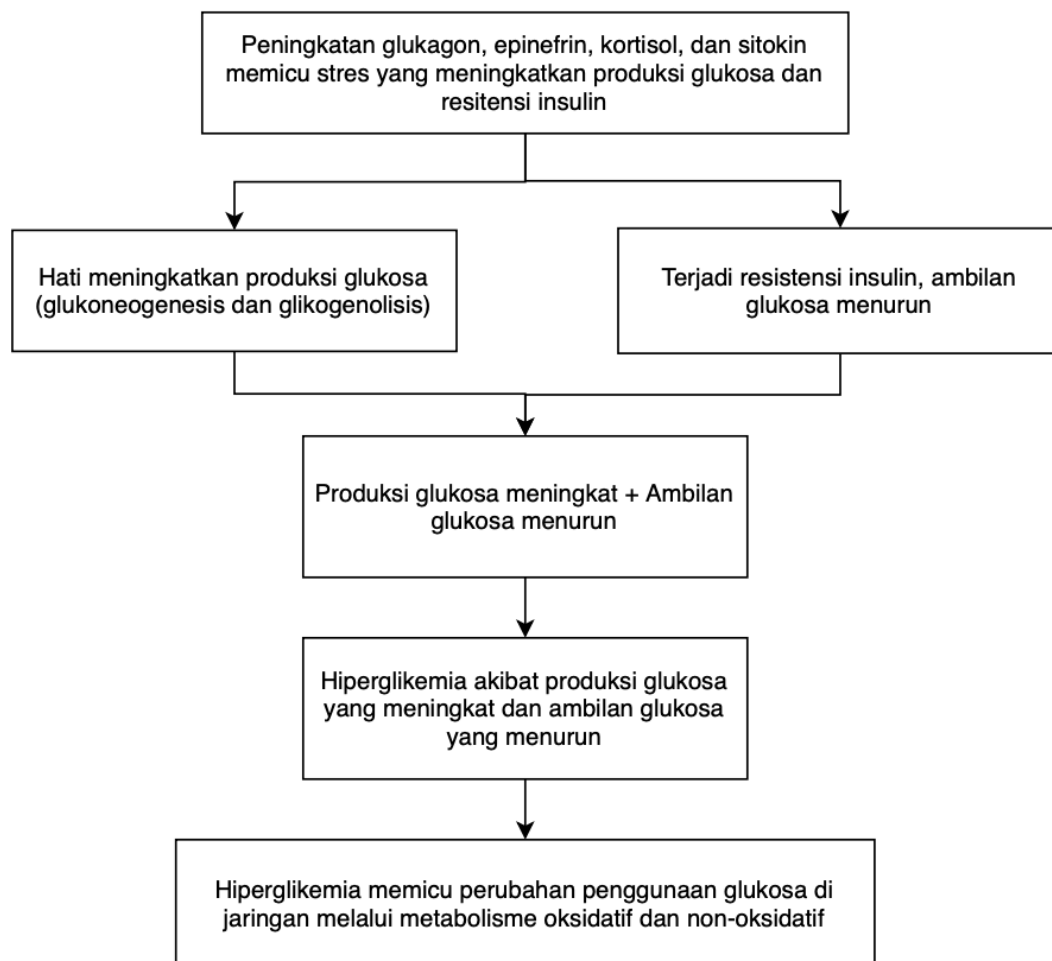
Sumber : Das, 2023

Spermatogenesis melibatkan interaksi sel-sel dan ekspresi gen yang diatur oleh hormon luteinizing (LH) dan hormon perangsang folikel (FSH). FSH mengatur

proliferasi dan pematangan sel germinal secara independen dan dalam kombinasi dengan LH. Konsentrasi testosteron intratestikular yang tinggi dapat berperan penting dalam spermatogenesis (Oduwale *et al*, 2021).

### **2.2.6 Hiperglikemia**

Hiperglikemia merupakan suatu kondisi yang berhubungan dengan ketersediaan dan efektivitas insulin dalam tubuh. Tipe 1 ditandai dengan kekurangan insulin total. Sedangkan tipe 2 melibatkan resistensi jaringan perifer tubuh terhadap efek insulin. Kedua bentuk tersebut tidak memiliki efek sinyal insulin ketika glukagon dan sinyal metabolik lainnya tersedia dalam tingkat normal atau tinggi. Resistensi insulin menyebabkan tubuh bereaksi seolah-olah tubuh kekurangan insulin, padahal insulin tersedia pada tingkat tinggi. Mirip dengan tipe 1 dalam banyak hal, bentuk ini berbeda karena hati masih mampu memproduksi glikogen, dan lipolisis terkontrol karena adanya insulin. Lipoprotein plasma meningkat seringkali diakibatkan karena gizi buruk dan obesitas. Ketoasidosis tidak berhubungan dengan tipe 2, tetapi bisa juga terjadi karena penyakit stresor metabolik lain, dan jika terjadi kegagalan pankreas, hal ini menyebabkan penurunan produksi dan sekresi insulin. Penderita tipe 2 terdahulu dapat mengalami kondisi serius yang disebut sindrom hiperglikemik hiperosmolar nonketotik. Tubuh mencoba menghilangkan kelebihan gula dengan membuangnya ke urin. Kondisi ini dapat disebabkan oleh suatu penyakit, infeksi, atau karena faktor lain (Moini, 2019).



**Gambar 8.** Proses terjadinya Hiperglikemia

Sumber : Kresnoadi, 2017

Gambar 8 di atas menjelaskan bahwa hiperglikemia terjadi melalui dua mekanisme utama, yaitu peningkatan produksi glukosa dan penurunan ambilan glukosa oleh jaringan. Pada kondisi stres metabolik, hormon kontra-regulator dan mediator inflamasi seperti glukagon, epinefrin, kortisol, dan sitokin mendorong hati meningkatkan pelepasan glukosa ke sirkulasi melalui glukoneogenesis dan glikogenolisis, sehingga kadar glukosa darah naik. Secara bersamaan, terjadi penurunan ambilan glukosa yang diperantarai insulin (GLUT4) akibat gangguan sinyal pasca-reseptor/resistensi insulin, yang juga menurunkan pembentukan glikogen otot. Walaupun masih ada jalur ambilan glukosa non-insulin (GLUT1), kapasitasnya relatif terbatas sehingga tidak

mampu mengimbangi meningkatnya produksi glukosa dan menurunnya uptake oleh jaringan. Kombinasi proses ini membuat glukosa tetap tinggi di darah dan diikuti perubahan penggunaan glukosa di jaringan melalui jalur metabolisme oksidatif maupun non-oksidatif, yang dapat mempertahankan keadaan hiperglikemia (Kresnoadi, 2017).

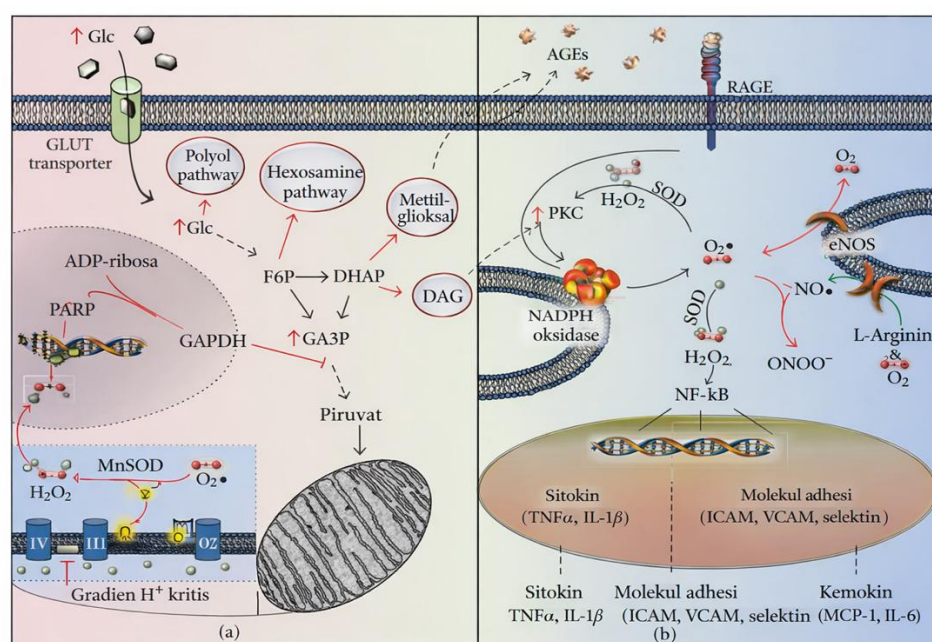
### **2.2.7 Dampak Hiperglikemia terhadap *Nitric Oxide Synthase* (NOS), *Nitric Oxide* (NO), dan Testosteron**

Dampak hiperglikemia terhadap NOS dan testosteron merupakan mekanisme yang kompleks dan melibatkan faktor vaskular, neurologis, dan endokrin (Defeudis *et al.*, 2021; Stephen, 2024). Penurunan sintesis atau bioavailabilitas eNOS dan endotel vaskular penis penderita hiperglikemia karena kerusakan stres oksidatif berpengaruh pada terjadinya disfungsi ereksi. Penelitian menunjukkan bahwa produk akhir glikasi lanjut yang diinduksi oleh hiperglikemia menyebabkan produksi sejumlah besar spesies oksigen reaktif dan spesies nitrogen reaktif, peningkatan stres oksidatif, penurunan sintesis NOS, disfungsi endotel kavernosa, dan abnormalitas relaksasi otot polos, yang menyebabkan terjadinya disfungsi ereksi. Selain itu, perubahan oksidasi protein pada corpus cavernosum tikus DM meningkat secara signifikan, terutama bermanifestasi sebagai nitrosasi residu tirosin untuk membentuk 3-nitrotyrosine, yang secara langsung menonaktifkan NO dan menginduksi apoptosis pada sel endotel.

Faktor penting lainnya adalah pembentukan spesies oksigen reaktif pada DM. Spesies oksigen reaktif dari glikosilasi non-enzimatik dan peningkatan aktivitas oksidase NADPH merusak fungsi endotel dalam jaringan ereksi dan menghancurkan NO. Hal ini menyebabkan penurunan bioavailabilitas NO dan pembentukan peroksinitrit akibat stres nitrosatif, yang sangat beracun dan merusak jaringan ereksi.

Hormon testosteron dapat berpengaruh pada ereksi berdasarkan peranannya sebagai vasodilator arteriol penis dan sinusoid kavernosa (Gianatti *et al.*, 2020;

Defeudis *et al.*, 2022) Di samping itu, testosteron sendiri berperan penting pada mekanisme regulasi metabolisme glukosa. Kadar testosteron berkorelasi positif dengan tingkat metabolisme glukosa (Leutner *et al.*, 2022). Kondisi rendahnya hormon testosteron disebut sebagai hipogonadisme. Kondisi hipogonadisme berhubungan erat dengan hiperglikemia (Kumari *et al.*, 2021; Gianatti *et al.*, 2020). Berdasarkan penelitian oleh (Kumari *et al.*, 2021), kadar hormon testosteron pada penderita hiperglikemia secara signifikan lebih rendah dari non-hiperglikemia.



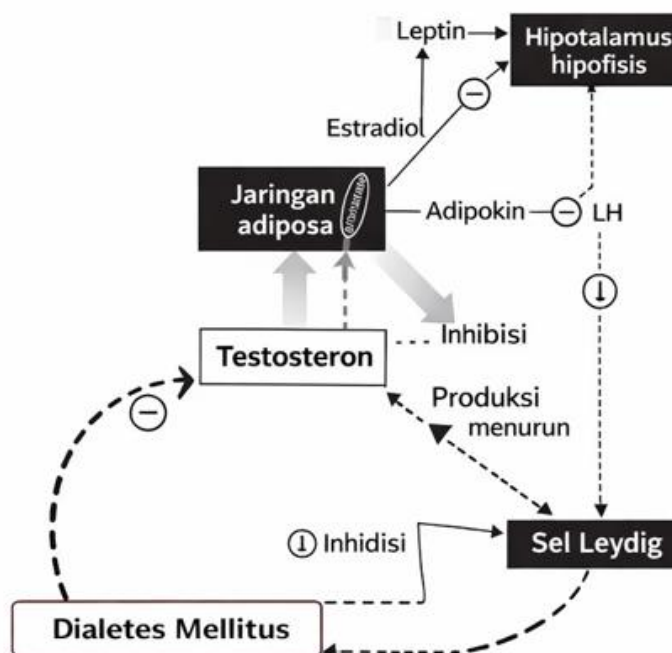
**Gambar 9.** Dampak hiperglikemia terhadap NOS dan NO

Sumber : Funk *et al.*, 2012

Dari Gambar 9 menunjukkan bahwa (a) hiperglikemia menginduksi disfungsi metabolik melalui produksi superoksida mitokondria, yang mengakibatkan aktivasi PARP dan fluks glikolitik yang berubah untuk meningkatkan diasilgliserol (DAG), produksi metilgliserol, serta aktivitas jalur heksosamin dan polioliol. Gambar (b) stres oksidatif yang diinduksi oleh hiperglikemia lebih lanjut ditingkatkan oleh produksi DAG yang berlebihan secara metabolik dan penurunan NADH + / glutation tereduksi (GSH), serta stimulasi Reseptor RAGE. Stres oksidatif mengurangi mediator pelindung (NO) dan

meningkatkan faktor transkripsi inflamasi (NF- $\kappa$ B) aktivasi yang menghasilkan ekspresi gen inflamasi dan rekrutmen leukosit (Funk, Yurdagul and Orr, 2012).

Gambar 10 menunjukkan hubungan antara hipotestosteron dengan resistensi insulin. Rendahnya kadar testosteron menstimulasi peningkatan adiposit. Jaringan adiposit mengandung kadar aromatase yang tinggi, yang kemudian menurunkan konsentrasi testosteron melalui perubahannya menjadi estradiol. Estradiol memberikan umpan balik negatif pada hipotalamus hipofisis, sehingga terjadi penurunan produksi testosteron oleh sel Leydig. Peningkatan jaringan adiposit akan meningkatkan resistensi insulin, yang secara negatif memengaruhi sel Leydig. Akibat pelepasan adipokin dari adiposit akan terjadi penghambatan pelepasan LH. Leptin, dilepaskan sebagai respon terhadap peningkatan adiposit, juga menghambat pelepasan LH melalui pengaruhnya terhadap *gonadotropin releasing hormone* (Khodamoradi *et al.*, 2022; Genchi *et al.*, 2022).



**Gambar 10.** Hubungan antara Hipotestosteron dengan Resistensi Insulin

Sumber : Khodamoradi *et al.*, 2022

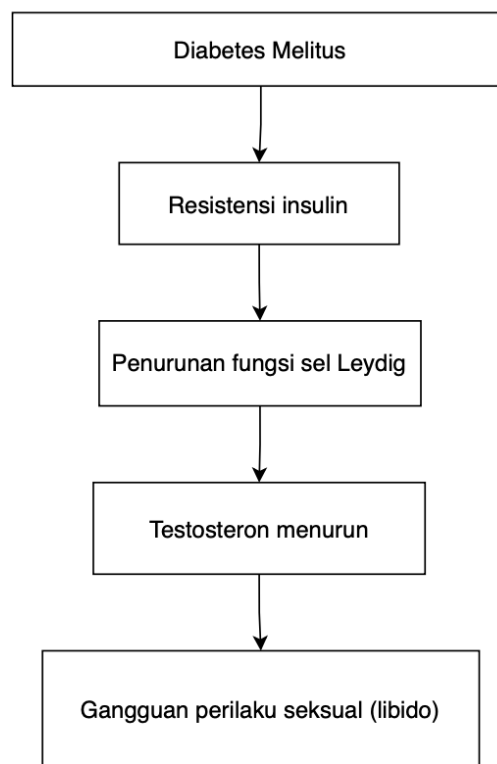
### 2.2.8 Dampak Hiperglikemia terhadap Perilaku Seksual (Libido)

Secara umum, libido menurun secara bertahap seiring bertambahnya usia. Libido sangat bervariasi dari orang ke orang dan dapat menurun sementara karena berbagai kondisi mental seperti kelelahan dan kecemasan. Penurunan libido melibatkan berkurangnya frekuensi pikiran dan fantasi seksual, minat dalam hubungan seksual, frekuensi aktivitas seksual, dan rangsangan seksual melalui penglihatan, kata-kata, atau sentuhan (Chen *et al.*, 2019). Diabetes Melitus dapat menimbulkan komplikasi gangguan aliran darah ke organ seksual dan hypogonadism berupa tidak normalnya fungsi hipofisis dan hipotalamus (Soelistijo, 2021). Komplikasi lainnya seperti makrovaskular dan mikrovaskular berupa aterosklerosis pembuluh besar, penebalan dan kerusakan membran basalis pembuluh-pembuluh kapiler sehingga terjadi gangguan mikroangiopati. Terhadap organ reproduksi laki-laki menyebabkan penebalan dinding pembuluh darah dan jaringan testis mengakibatkan terjadinya gangguan fungsi organ testis dan penebalan jaringan ikat penunjang pembuluh darah penis sehingga akan menghalangi aliran darah, sehingga terjadi gangguan ereksi (Wowor *et al.*, 2021).

Testis berfungsi mengontrol dua hal yang berkaitan, yaitu pertama biosintesis androgen oleh sel Leydig untuk menghasilkan testosteron yang berperan mengontrol libido pada pria, spermatogenesis dan faktor tropik bagi NO, kedua produksi sperma di epitel tubulus seminiferous. Regulasi fungsi testis gabungan dari berbagai mekanisme diantaranya kombinasi efek IGF-1 yang berperan meningkatkan respon sel Leydig terhadap *Luteinizing Hormone* (LH) dan *Follicle-Stimulating Hormone* (FSH). LH berperan merangsang sel Leydig menghasilkan testosteron dan membantu FSH dalam produksi sperma yang dewasa (Sherwood, 2018). Pada penderita Diabetes sering mengalami penurunan kadar FSH, LH, prolaktin dan IGF-1 pada tingkat serum dan pada binatang percobaan yang dibuat Diabetes hipofisisnya mengalami respon yang menumpul sehingga mengurangi sekresi FSH dan LH (Maresch *et al.*, 2018).

Insulin tidak hanya berperan sebagai hormon metabolik, tetapi juga ikut memodulasi fungsi reproduksi melalui regulasi poros hipotalamus–hipofisis–gonad (HPG) dan aksi langsung pada testis. Pada tingkat testis, LH tetap merupakan regulator utama steroidogenesis sel Leydig, namun berbagai *growth factor* termasuk insulin dan IGF juga berkontribusi dalam menjaga metabolisme, kelangsungan hidup, dan kapasitas steroidogenik sel Leydig melalui aktivasi jalur pensinyalan intraseluler (misalnya PI3K/AKT dan MAPK) yang dapat berinteraksi dengan jalur yang dipicu LH (Mattos *et al*, 2023). Pada tingkat pusat, faktor metabolik seperti insulin memengaruhi jaringan hipotalamus yang mengatur pulsa GnRH (termasuk sistem kisspeptin/KNDy), sehingga menentukan sekresi LH dan FSH dari hipofisis (Ruiz *et al*, 2023). Dalam kondisi resistensi insulin dan hiperglikemia kronis (misalnya diabetes), gangguan regulasi poros HPG dapat menurunkan output GnRH–LH/FSH dan disertai penurunan fungsi steroidogenesis Leydig (termasuk penekanan protein/enzim steroidogenik), yang pada akhirnya berkontribusi pada penurunan testosteron dan gangguan spermatogenesis (Huang *et al*, 2024).

Kadar testosteron bioavailable menurun akibat berkurangnya amplitudo pelepasan LH karena gangguan pada tingkat axis hipotalamik–pituitaritesticular dengan terjadinya penurunan kadar testosteron menyebabkan gangguan libido (Corona and Maggi, 2022).



**Gambar 11.** Mekanisme dampak hiperglikemia terhadap perilaku seksual

Sumber : Corona *and* Maggi, 2022

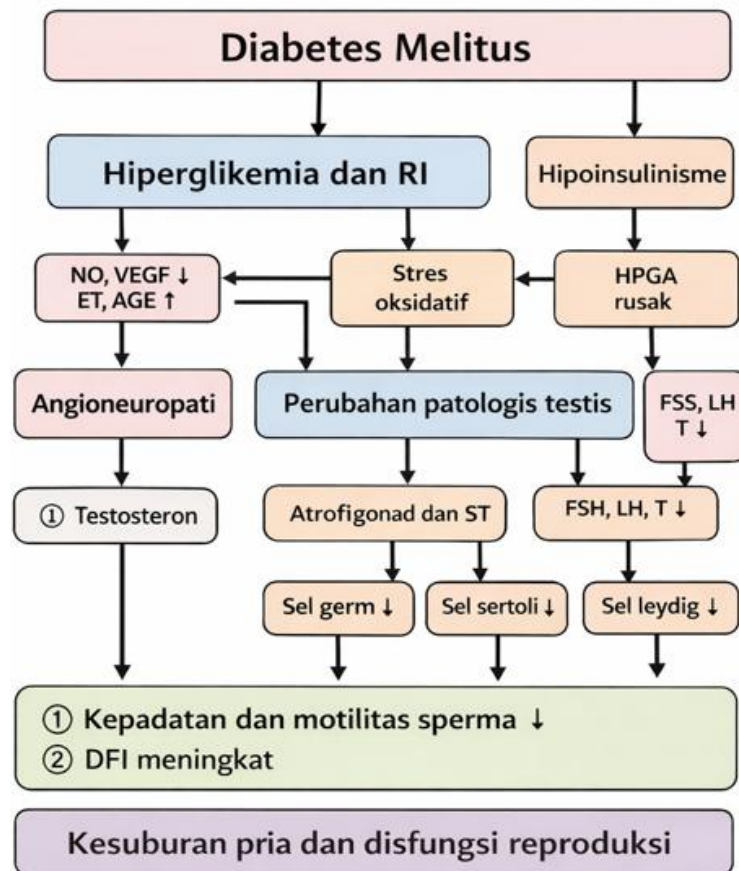
### 2.2.9 Dampak Hiperglikemia pada Spermatogenesis

Sel sperma adalah jenis sel mamalia yang paling berkembang. Proses pembentukan sperma dimulai dari pria yang mengirimkan DNA haploidnya kepada wanita melalui serangkaian mekanisme hingga terjadinya pembuahan. Sperma memiliki lapisan mitokondria di bagian tengah yang menjadi lokasi proses oksidasi. Stres oksidatif adalah keadaan yang dihasilkan dari ketidakseimbangan antara radikal bebas dan zat antioksidan. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Pieme *et al.* (2017), komplikasi dari diabetes melitus disebabkan oleh stres oksidatif. Radikal bebas dalam kondisi diabetes melitus terjadi akibat autooksidasi glukosa yang melebihi kemampuan antioksidan di dalam sel untuk menetralkannya, berakibat pada kerusakan sel (Widaryanti *et al.*, 2021).

Stres oksidatif sering kali mengganggu fungsi reproduksi pada pria. Hal ini disebabkan oleh membran sel sperma yang kaya akan asam lemak tak jenuh, yang membuatnya rentan terhadap serangan Reactive Oxygen Species (ROS). Peroksidasi lipid adalah salah satu mekanisme utama dari stres oksidatif, yang dapat berpengaruh pada kemampuan reproduksi. Di mana, serangan ROS terhadap asam lemak tak jenuh ganda di membran sel sperma memicu reaksi berantai. Proses ini mengarah pada produksi lipid peroksida dan merusak integritas membran. Akibatnya, fungsi dan kelangsungan hidup sperma serta proses spermatogenesis menjadi terpengaruh (Walke *et al*, 2023).

Pengoksidasi protein juga dapat memengaruhi fungsi reproduksi pria. Dalam konteks ini, ROS melakukan modifikasi terhadap protein di dalam sperma secara oksidatif, yang mengakibatkan perubahan struktur dan gangguan fungsi. Selain itu, kerusakan DNA adalah aspek yang paling mengkhawatirkan karena dapat menyebabkan kondisi yang lebih serius pada spermatozoa. Fragmentasi DNA yang disebabkan oleh ROS dalam sperma dapat mengurangi tingkat pembuahan dan meningkatkan risiko keguguran, yang dapat berujung pada kegagalan reproduksi. Hal ini juga berdampak negatif pada proses pembuahan dan perkembangan embrio (Walke *et al*, 2023).

ROS menyebabkan stres oksidatif, hal ini telah diketahui dapat mengurangi kadar testosteron yang berdampak pada performa enzim LDH dalam mengubah NADH menjadi NAD<sup>+</sup>, yang berperan penting dalam produksi laktat di sel sertoli, serta memengaruhi gangguan sintesis piruvat, mengakibatkan produksi laktat tidak terjadi. Di sini, laktat yang ada di sel sertoli berfungsi sebagai sumber nutrisi bagi spermatozoa selama tahap spermatogenesis (Adelati *et al*, 2016).



**Gambar 12.** Mekanisme dampak hiperglikemia terhadap fungsi reproduksi termasuk spermatogenesis dan kualitas sperma

Sumber : He *et al*, 2021

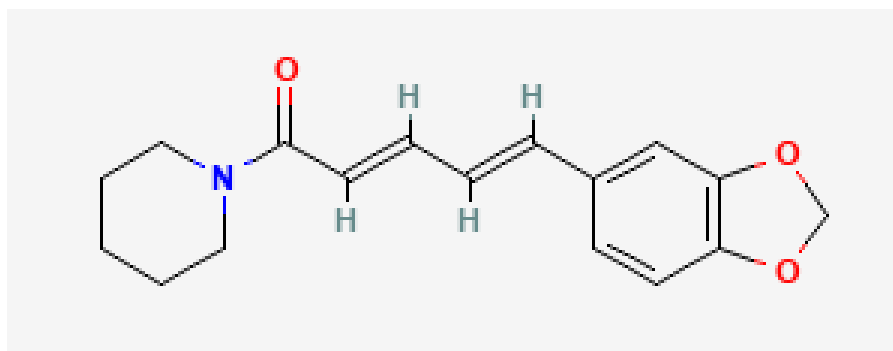
### 2.2.9.1. Efek Hiperglikemia pada sel spermatosit

Hiperglikemia yang merupakan kondisi peningkatan kadar glukosa darah secara kronis pada penderita diabetes mellitus telah terbukti memberikan dampak negatif pada fungsi reproduksi pria melalui gangguan pada spermatogenesis, termasuk pada sel-sel spermatosit. Kelebihan glukosa menyebabkan akumulasi produk glikasi lanjut, peningkatan stres oksidatif, dan disfungsi mitokondria yang merusak struktur DNA serta mengubah regulasi epigenetik dalam sel-sel testis. Stres oksidatif dan kerusakan DNA tersebut menghambat proliferasi dan diferensiasi spermatosit, yang pada gilirannya menurunkan jumlah dan kualitas

sperma yang dihasilkan. Penelitian pada model hewan telah menunjukkan bahwa hiperglikemia menurunkan jumlah spermatogonia dan spermatosit primer serta memperburuk morfologi dan motilitas spermatozoa, yang merupakan indikator penting kesuburan. Secara keseluruhan, hiperglikemia berkontribusi terhadap gangguan spermatogenesis melalui mekanisme metabolik, oksidatif, dan genetik yang kompleks, sehingga berpotensi menurunkan fertilitas pada individu pria dengan diabetes (Rong *et al.*, 2025).

### 2.2.10. Efikasi Ekstrak *Piper Nigrum L* terhadap Disfungsi Ereksi

Piperin ( $C_{17}H_{19}NO_3$ ) dan piperilin ( $C_{16}H_{17}NO_3$ ) merupakan alkaloid utama yang terdapat pada lada hitam. Piperin memberikan rasa pedas dan secara kimia memiliki nama IUPAC 1-[5-(1,3-benzodioxol-5-yl)-1-oxo-2,4-pentadienyl]piperidine dan bersifat lipofilik sehingga hanya sedikit larut dalam air serta memiliki titik leleh sekitar 128–130°C (Imran *et al.*, 2022). Karena kelarutannya lebih baik pada pelarut organik, etanol dan campuran pelarut berbasis etanol umum digunakan dalam proses ekstraksi/pemurnian piperine; hal ini menjelaskan mengapa ekstrak etanol cenderung memberikan kandungan piperine lebih tinggi dibandingkan dengan air (Wu *et al.*, 2021).

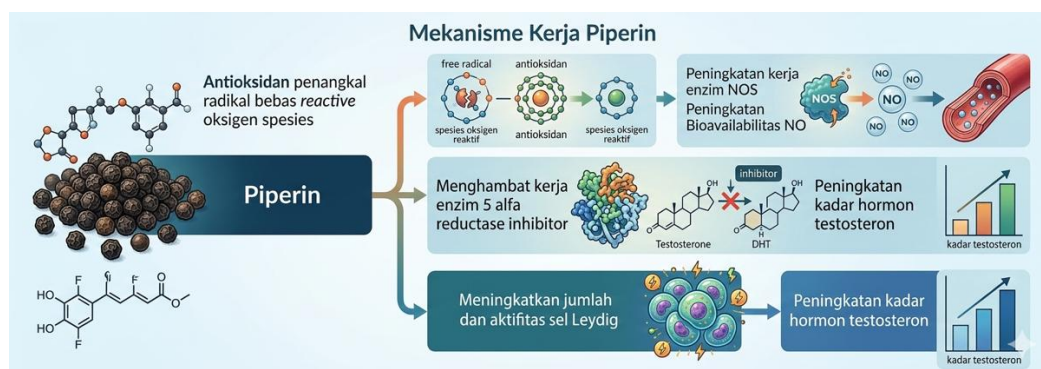


**Gambar 13.** Struktur kimia piperin dan piperilin

Sumber : NCBI,2021

Mekanisme piperine dalam mengatasi disfungsi ereksi yaitu dengan meningkatkan kadar *nitric oxide* (NO). Penelitian oleh Kumar *et al.*(2010)

menunjukkan bahwa piperine mampu meningkatkan kerja enzim NOS merestorasi plasma NO. Bioavailabilitas NO dapat dipertahankan dengan menghambat stress oksidatif, oleh karena itu senyawa dengan sifat antioksidan menonaktifkan radikal bebas dapat meningkatkan bioavailabilitas NO sehingga meningkatkan regulasi tonus pembuluh darah. Penelitian ini menunjukkan bahwa MAP pada L-NAME (pemodelan induksi hipertensi) melemah dengan pemberian piperin. Pengaplikasian dengan piperin meningkatkan plasma dan kadar NOx jaringan aorta. Temuan ini kemungkinan besar mencerminkan berkurangnya aksi vasodilator endogen NO, dimana L-NAME mungkin telah mengganggu aktivitas eNOS. Piperin juga dapat mengobati disfungsi ereksi, karena dapat meningkatkan kadar hormon testosteron. Dalam meningkatkan kadar hormon testosteron, piperin berfungsi menghambat kerja enzim 5 $\alpha$  reductase dan meningkatkan jumlah dan aktivitas sel Leydig (Chen *et al.*, 2018).



**Gambar 14.** Mekanisme kerja piperin

Sumber : Chen *et al.*, 2018

Piperilin termasuk senyawa amida lipofilik yang secara struktural memiliki kemiripan dengan piperin, yaitu tersusun dari gugus aromatik yang terhubung dengan rantai karbon tak jenuh dan gugus amida. Senyawa ini biasanya ditemukan bersama piperin dalam ekstrak buah lada hitam, meskipun jumlahnya relatif lebih sedikit dibandingkan piperin yang merupakan komponen utama dari tanaman tersebut. Keberadaan piperilin dan senyawa amida lain diduga turut berperan dalam efek biologis ekstrak lada hitam secara

keseluruhan melalui mekanisme sinergis antar senyawa bioaktif (Mgbeahuruike, 2017).

### 2.2.11 Efikasi Ekstrak *Piper nigrum L* terhadap Gangguan Libido

Piperin merupakan alkaloid utama pada lada hitam (*Piper nigrum L.*) yang dilaporkan memiliki aktivitas biologis luas, antara lain antioksidan, antiinflamasi, antikanker, antimikroba, serta berperan pada berbagai target molekuler yang terkait stres oksidatif dan inflamasi. Selain itu, piperin juga dikenal dapat memodulasi enzim metabolisme obat dan transporter membran sehingga sering dibahas sebagai senyawa yang berpotensi mendukung perbaikan berbagai gangguan metabolik dan sistemik (Tripathi *et al*, 2022).

Peran piperin yang paling sering dikaitkan dengan peningkatan efektivitas terapi adalah sebagai bioenhancer, yaitu meningkatkan ketersediaan hayati senyawa lain melalui modulasi enzim sitokrom P450 (CYP3A4) dan P-glycoprotein (P-gp) serta mekanisme yang berkontribusi pada peningkatan absorpsi intestinal. Mekanisme ini dapat berujung pada peningkatan kadar senyawa pendamping dalam sirkulasi sistemik dibandingkan tanpa piperin (Tripathi *et al*, 2022).

Dalam konteks reproduksi pria, bukti eksperimental pada hewan menunjukkan bahwa piperin dapat memengaruhi fungsi testis melalui perubahan pada sel Leydig dan jalur steroidogenesis. Pada tikus pubertas, pemberian piperin selama 30 hari meningkatkan kadar testosteron serum dan meningkatkan indikator perkembangan sel Leydig serta protein-protein steroidogenik, namun tidak meningkatkan LH dan justru dilaporkan menurunkan FSH, disertai temuan bahwa piperin pada kondisi tertentu dapat menghambat spermatogenesis. Hal ini menunjukkan bahwa efek piperin pada sistem reproduksi dapat bersifat spesifik dosis/usia/lamanya paparan dan tidak selalu searah pada semua parameter fertilitas (Chen *et al.*, 2018).

Terkait libido, studi eksperimental pada model tikus diabetes melitus yang diinduksi *Alloxan* menunjukkan bahwa ekstrak lada hitam dapat memperbaiki indikator perilaku seksual (misalnya latensi dan frekuensi penunggang)

dibandingkan kelompok tikus diabetes tanpa perlakuan, yang mengarah pada kesimpulan bahwa ekstrak lada hitam berpotensi meningkatkan libido pada kondisi gangguan metabolik tertentu (Isvari *et al*, 2025).

#### **2.2.12 Efikasi Ekstrak *Piper nigrum L* terhadap Spermatogenesis**

Ekstrak lada hitam (*Piperin nigrum L*) memiliki kandungan utama piperin yang berperan sebagai antioksidan. Piperin juga dapat meningkatkan hormon gonadotropin terutama luteinizing hormon (LH) yang akan merangsang pembentukan dari spermatozoa atau proses spermatogenesis sehingga berpengaruh terhadap jumlah dan motilitas spermatozoa (Iskandar, 2021).

#### **2.2.13 Tikus Model Simulasi Ereksi dan Libido**

Tikus sebagai organisme model sudah lama menjadi model biologi dan penyakit manusia karena kedekatan filogenetik dan kesamaan fisiologisnya dengan manusia. Selain itu, kemudahan memelihara dan membiakkan tikus di laboratorium, ketersediaan banyak strain inbrida, dan yang lebih penting, kemungkinan memanipulasi genom tikus secara tepat, telah menyebabkan meluasnya penggunaan tikus sebagai organisme model. Penggunaan sebagai organisme model terkait sistem reproduksi juga telah banyak digunakan dalam beberapa penelitian seperti oleh Piao *et al.* (2007) terkait respon ereksi pada tikus dan tikus, Ryu *et al.* (2017) terkait farmakoterapi pada keterjadian disfungsi ereksi, dan Zhao *et al.* (2022) terkait faktor patogenitas pada keterjadian disfungsi ereksi.

Untuk menilai perilaku seksual (libido) dilakukan dengan 3 parameter yaitu, (latensi percumbuan) terjadinya percumbuan ditandai dengan penjilatan bagian luar alat kelamin betina, sampai penciuman bagian mulut sampai ke leher dalam hitungan detik berupa perilaku tikus jantan dalam melakukan ciuman pada bagian mulut sampai bagian leher dan melakukan penjilatan pada bagian kelamin tikus betina, (latensi penunggang) terjadinya penunggang atau tikus jantan menaiki tubuh tikus betina dari arah belakang dalam hitungan

detik, (frekuensi penunggang) yaitu diukur dengan melihat banyaknya penunggang yang dilakukan selama pengujian 30 menit (Brooks *et al.*, 2020).

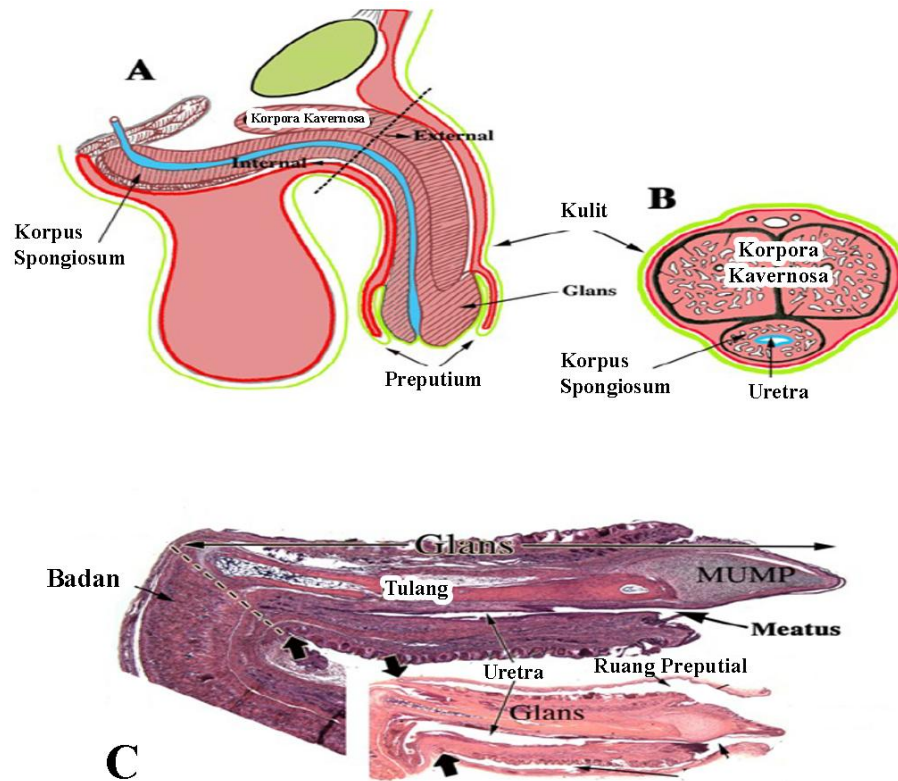
#### **2.2.14 Anatomi Penis Tikus dan Manusia**

Tikus embrionik, janin, dan neonatal telah banyak digunakan untuk mempelajari organogenesis dan diferensiasi dengan asumsi diam-diam bahwa morfogenetik dan mekanisme molekuler pada tikus sesuai dengan perkembangan manusia. Keyakinan ini adalah dipupuk oleh banyak fitur perkembangan yang dimiliki bersama oleh tikus dan manusia. Keduanya spesies memiliki, dengan beberapa pengecualian, spektrum organ yang sama dan banyak proses perkembangan yang tampak serupa jika tidak identik. Selain itu, banyak kelainan genetik pada manusia memiliki padanan langsung pada tikus yang mutan secara spontan atau dimanipulasi secara genetik (Cunha *et al.*, 2019).

Secara mendetail anatomi organ penis manusia adalah sebagai berikut. Corpora cavernosa terdiri dari dua silinder berpasangan yang berbentuk spons dalam selubung tebal tunika albuginea. Bagian proksimal berasal dari permukaan bawah rami puboischial sebagai dua struktur terpisah tetapi bergabung di bawah arcus pubis dan tetap melekat pada kelenjar. Septum di antara kedua corpora cavernosa bersifat tidak utuh pada pria tetapi bersifat utuh pada beberapa spesies, seperti anjing (Partin *et al.*, 2020).

Corpora cavernosa didukung oleh kerangka berserat yang terdiri dari tunika albuginea, septum, pilar intrakavernosa, kerangka fibrosa intrakavernosa, periarterial, dan selubung fibrosa perineural. Di dalam tunika terdapat sinusoid yang saling berhubungan lalu dipisahkan oleh trabekula otot polos yang dikelilingi oleh serat elastis, kolagen dan jaringan areolar yang longgar (Partin *et al.*, 2020).

Saraf terminal kavernosa dan arteri heliks berhubungan erat dengan arteri otot polos. Setiap corpus cavernosum merupakan konglomerasi sinusoid dengan ukuran lebih besar di tengah dan lebih kecil di tepi (Partin *et al.*, 2020).



**Gambar 15.** Anatomi Penis Manusia dan Tikus: (a) Penis manusia potongan sagital dan (b) Potongan melintang, (c) Penis tikus dewasa

Sumber : Cunha *et al.*, 2019

Dari Gambar 15 dijelaskan dapat dilihat anatomi penis manusia dan tikus. Persimpangan antara bagian dalam dan bagian luar penis tikus terjadi pada tikungan sudut kanan yang ditandai dengan garis putus-putus dan label terkait, “internal” dan “eksternal”. Forsep memegang salah satu krura bilateral. Bagian dalam berisi badan penis tikus, sedangkan bagian luar disebut kelenjar. Kelenjar pada (C) tidak terlihat karena terletak pada ruang preputial (garis putus-putus); Bagian mid-sagital hematoxylin-eosin pada penis tikus dewasa yang diwarnai dengan preputium eksternal dihilangkan. Kepala penis tikus berada di bagian proksimal kulit khatan luar (Cunha *et al.*, 2019).

### 2.2.15 Lada Hitam (*Piper nigrum* L)



**Gambar 16.** Lada hitam

Sumber : Dokumentasi pribadi

Tanaman lada hitam (*Piper nigrum* L) merupakan salah satu anggota famili Piperaceae. Lada hitam sering digunakan sebagai bumbu masakan, obat herbal, dan antioksidan. Perdagangan lada Indonesia telah mendapatkan pengakuan global di beberapa pasar hingga saat ini. Indonesia memainkan peran penting dalam pasar lada dunia, menyumbang 29% dari permintaan lada dunia dan merupakan eksportir lada terbesar kedua di dunia setelah Vietnam. Buah lada hitam terdiri dari beberapa kandungan seperti alkaloid dan minyak atsiri yang tersusun dari beberapa komponen. Lada hitam terdiri dari alkaloid seperti *piperine*, *cavicine*, dan *methyl-pyrroline*, serta minyak atsiri, lemak, pati, dan serat kasar. *Piperine* adalah alkaloid utama yang ditemukan dalam lada (Isvari *et al.*, 2025)

**Tabel 1.** Taksonomi tanaman lada hitam (Dahlan *et al.*, 2021)

Kingdom	Plantae
Divisi	Spermatophyta
Sub divisi	Angiospermae
Kelas	Dicotyledoneae
Ordo	Piperales
Famili	Piperaceae
Genus	Piper
Spesies	<i>Piper nigrum L</i>

Lada sebagian besar terdiri dari piperin, senyawa aktif utama yang termasuk dalam keluarga piridin. Sebelumnya, piperine telah digunakan sebagai bahan dalam obat batuk, formulasi anti malaria, dan anti inflamasi. Konsentrasi piperin pada lada biasanya sekitar 6%, sedangkan dalam bentuk oleoresin berkisar antara 25,74% hingga 48,32%. Alkaloid piperin yang diekstraksi dari lada memiliki sifat antibakteri, antioksidan, antiinflamasi, antikanker, ansiolitik, dan analgesik. Ekstrak etanol lada kaya akan antioksidan yaitu 74,61%. Lada mungkin efisien digunakan untuk ekstraksi etanol untuk menghambat proliferasi bakteri. Pada saat yang sama, minyak atsiri yang terdapat pada daun lada menunjukkan toksisitas yang tinggi terhadap *Coptotermes sp.* Selain itu, ia bertindak sebagai antifeedant (Kardinan *et al.*, 2018).

#### 2.2.16 Analisis Berbasis Liquid chromatography–mass spectrometry (LC–MS)

*Liquid chromatography–mass spectrometry* (LC–MS) merupakan metode yang menggunakan kromatografi cair (termasuk HPLC) sebagai langkah pemurnian dan spektrometri massa untuk mengidentifikasi dan mengukur analit. Metode yang digunakan untuk pemisahan, identifikasi, dan kuantifikasi senyawa yang tidak diketahui dan diketahui serta untuk menjelaskan struktur dan sifat kimia berbagai molekul. Metode ini sangat berguna untuk menganalisis molekul kecil dan menawarkan sensitivitas dan selektivitas yang lebih tinggi dalam analisis

jejak zat yang mengandung multikomponen. Sistem LC/MS terdiri dari sistem pemompaan HPLC, injektor, dan kolom yang digabungkan ke spektrometer massa melalui beberapa jenis antarmuka penguap evaporatif. Sistem komputer mengoordinasikan komponen-komponen sistem bersama-sama dengan memberikan kontrol HPLC untuk aliran, gradien pelarut, dan permulaan injeksi jarak jauh serta pengoperasian gradien. Selain itu, memberikan kontrol terhadap rentang pemindaian spektrometer massa dan lensa, serta mengakses dan memproses data dari detektor ion penguat (Mukherjee, 2019)

### **2.2.17 Analisis berbasis *Quantitative* PCR (qPCR)**

*Quantitative* PCR (qPCR) menawarkan kemampuan pemantauan real-time terhadap produk yang diperkuat, deteksi cepat, dan kuantisasi unit infeksius, namun menimbulkan hambatan teknis untuk miniaturisasi di *point of care* dibandingkan dengan reaksi berantai polimerase titik akhir (*point of end*) (Blumenfeld *et al.*, 2022). Salah satu perbedaan dari PCR konvensional yaitu pada DNA yang dipakai sebagai cetakan, dimana qPCR menggunakan DNA yang sudah dikomplementari dari ekstrak RNA (Hermawan *et al.*, 2024). Keuntungan utama qPCR adalah menyediakan deteksi dan kuantifikasi urutan DNA target yang cepat dan throughput tinggi dalam matriks yang berbeda. Waktu amplifikasi yang lebih rendah difasilitasi oleh amplifikasi dan visualisasi simultan dari amplicon DNA yang baru terbentuk (Kralik and Ricchi, 2017).

### **2.2.18 Analisis Berbasis *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA)**

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) adalah teknik assay yang berbasiskan plat/lempeng yang dirancang untuk mendeteksi dan kuantifikasi peptida, protein, antibodi dan hormon. Pada ELISA, antigen harus diimobilisasi ke permukaan yang solid dan kemudian ditambahkan antibodi yang berikatan dengan enzim. Deteksi dilakukan dengan menilai aktivitas enzim konjugat melalui inkubasi dengan substrat untuk memproduksi suatu produk yang terukur. Elemen yang penting dalam strategi deteksi pada ELISA adalah interaksi spesifik antigen-antibodi. Pemeriksaan ELISA umumnya dilakukan

menggunakan plat/lempeng polystyrene 96 (atau (384 sumuran) yang akan secara pasif mengikat antibodi dan protein. Reaktan dari pemeriksaan ELISA yang terimobilisasi ke dalam permukaan mikroplat membuat pemisahan dari material yang tidak berikatan menjadi lebih mudah. Kemampuan untuk mencuci material nonspesifik yang tidak berikatan membuat pemeriksaan ELISA menjadi alat pemeriksaan yang akurat untuk mengukur analit spesifik (Booster, 2020).

Prosedur umum dari pemeriksaan ELISA dimulai dengan tahap pelapisan, di mana lapisan pertama berisikan dengan antigen atau antibodi target yang diabsorpsi ke dalam plat polystyrene 96 sumuran. Tahap ini kemudian dilanjutkan dengan tahap blocking di mana semua tempat yang permukaan yang tidak berikatan akan terlapsi oleh blocking agent. Tahap selanjutnya adalah melakukan beberapa kali pencucian. Plat kemudian akan diinkubasi dengan antibodi yang terkonjugasi dengan enzim. Tahap ini kemudian dilanjutkan dengan beberapa kali proses pencucian untuk menghilangkan antibodi yang tidak berikatan. Substrat kemudian akan ditambahkan untuk memproduksi suatu sinyal kalorimetrik. Tahap akhir adalah pembacaan dari mikroplat. Assay ini menggunakan proses seprasi melalui ikatan dengan mikroplat, beberapa kali pencucian akan dilakukan pengulangan pada masing-masing tahap ELISA untuk menghilangkan material yang tidak berikatan (Booster, 2020).

## **BAB III**

### **METODE**

#### **1.1.Desain Penelitian**

Penelitian ini menggunakan metode *Posttest-only Randomized Control Group* Sebanyak 30 ekor tikus putih jantan galur Wistar (*Rattus norvegicus*) yang memenuhi kriteria inklusi diikutsertakan dalam penelitian ini. Setelah menjalani masa aklimatisasi, seluruh hewan coba dibagi secara acak (*simple randomization*) ke dalam lima kelompok, masing-masing terdiri atas enam ekor tikus. Kelompok kontrol normal (K1) hanya diberikan pakan standar tanpa induksi diabetes. Kelompok kontrol negatif (K2), kontrol positif (K3), dan dua kelompok perlakuan (P1 dan P2) diinduksi dengan *Alloxan* dosis 150 mg/kgBB untuk menimbulkan kondisi diabetes melitus. Setelah kondisi diabetes terkonfirmasi, kelompok K3 diberikan terapi pembanding berupa sildenafil 1 mg/kgBB atau kombinasi asam askorbat 1 mg/kgBB dan zinc 0,6 mg/kgBB, sedangkan kelompok P1 dan P2 masing-masing diberikan ekstrak etanol buah lada hitam (*Black Pepper*) dengan dosis 122,5 mg/kgBB dan 245 mg/kgBB. Seluruh kelompok tetap memperoleh pakan standar selama masa penelitian.

#### **1.2.Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biokimia dan Biologi molekuler Fakultas Kedokteran Universitas Lampung dan INALAB DNA Lampung sejak bulan Juli hingga Oktober 2024.

#### **1.3.Alat dan Bahan Penelitian**

##### **1.3.1. Alat Penelitian**

Alat-alat yang digunakan yaitu *cctv*, monitor, neraca elektronik, kandang tikus sebanyak 4 kandang, timbangan, tempat makan dan minum tikus, sonde

lambung, toples plastik dengan tutup, mikroskop, kalkulator, pipet tetes, *object glass*, *cover glass*, kaca arloji, cawan petri, spuit *oral* 1 cc, kapas, seperangkat alat bedah (*dissecting set*), *improved naubauer*, *handscoen* dan masker.

### 1.3.2. Bahan Penelitian

Penelitian ini menggunakan tikus putih jantan *Rattus norvegicus* galur *Sprague-Dawley* sebagai subjek uji. Bahan percobaan terdiri dari ekstrak lada hitam, pelarut etanol, seng, sekam kayu, pakan tikus, dan air minum. Tikus tersebut berusia antara 2,5 dan 3 bulan dan memiliki berat sekitar 200 gram. Penelitian ini menggunakan sampel sebanyak 30 ekor tikus putih jantan dewasa ras *Sprague-Dawley* yang dipilih secara acak. Selanjutnya tikus dikategorikan menjadi empat kelompok dengan metode Federer (Federer, 1963).

$$\begin{array}{rcl} (n-1) (t-1) & \geq & 15 \\ (n-1) (5-1) & \geq & 15 \\ 4n-4 & \geq & 15 \\ 4n & \geq & 19 \\ n & \geq & 5 \end{array}$$

Jadi, banyaknya ulangan setiap kelompok percobaan adalah 5 ekor. Namun, jumlah ini harus diolah untuk diperhitungkan kembali agar dapat mengantisipasi drop out atau hilangnya unit eksperimen, dengan rumus koreksi sampel penelitian sebagai berikut:

$$N = \frac{n}{1 - F}$$

Keterangan :

N = besar sampel koreksi.

n = besar sampel awal.

f = perkiraan proporsi *drop out* sebesar 10%.

t = besar kelompok.

$$N = \frac{5}{1 - 10\%}$$

$$N = \frac{5}{1 - 0,1}$$

$$N = \frac{5}{0,9}$$

$$N = 6$$

N = 6 (Pembulatan ke atas)

Jadi, jumlah sampel yang diperlukan untuk setiap kelompok adalah 6 ekor dan jumlah kelompok yang digunakan sebanyak 6 kelompok sehingga pada penelitian ini menggunakan 30 ekor tikus dari populasi yang ada dengan 5 ekor tikus sebagai cadangan. Kelompok perlakuan dijabarkan sebagai berikut:

1. Kelompok 1

K1 adalah kelompok tikus normal yang diberikan pakan standar (kontrol normal).

2. Kelompok 2

K2 adalah kelompok tikus diabetes, diinduksi *Alloxan* 150 mg/kgBB (i.p) dan diberikan pakan standar (kontrol negatif).

3. Kelompok 3

K3A adalah kelompok tikus diabetes yang diinduksi *Alloxan* 150 mg/kgBB (i.p) dan diberikan sildenafil 1 mg/kgBB (p.o) (kontrol positif). K3B adalah kelompok tikus diabetes yang diinduksi *Alloxan* dan diberikan vitamin C 1 mg/kgBB + Zinc 0,6 mg/kgBB (p.o) (kontrol positif).

4. Kelompok 4

P1 adalah kelompok tikus diabetes yang diberikan ekstrak lada hitam 122,5 mg/kgBB (p.o), dan diinduksi *Alloxan* 150 mg/kgBB (i.p) (kelompok perlakuan 1).

5. Kelompok 5

P2 adalah kelompok tikus diabetes yang diberikan ekstrak lada hitam 245 mg/kgBB (p.o), dan diinduksi *Alloxan* 150 mg/kgBB (i.p) (kelompok perlakuan 2).

## **1.4. Prosedur Penelitian**

Pada awal penelitian ini, dimulai dengan mengajukan proposal *ethical clearance* ke Fakultas Kedokteran Universitas Lampung untuk mendapatkan izin etik penelitian dalam penggunaan hewan coba 30 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague dawley*.

### **1.4.1. Pengadaan Hewan Uji**

Hewan uji berupa tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague-Dawley* berjumlah 30 ekor. Tikus ini didapat dari *Animal Vet* di Bogor yang bekerjasama dengan Institut Pertanian Bogor (IPB) *University*.

### **1.4.2. Pemeliharaan Hewan Uji**

Penelitian ini menggunakan tikus putih strain *Sprague-Dawley* (*Rattus norvegicus*) sebagai subjek uji. Tikus akan menjalani fase aklimatisasi selama satu minggu di kandang pemeliharaan Inalab DNA untuk membakukan kondisi hidup dan pola makannya sebelum mendapat terapi. Tikus ditempatkan di kandang pemeliharaan yang berbentuk wadah dengan penutup kawat yang dilapisi sekam kayu keras berukuran ketebalan 0,5-1 cm. Sekam tersebut diganti setiap tiga hari sekali untuk menjaga kebersihan dan menghindari infeksi mikroorganisme yang berpotensi membahayakan kelangsungan hidup hewan uji. enam ekor tikus ditempatkan bersama dalam satu kandang. Kandang diposisikan pada suhu kamar dan memanfaatkan sinar matahari yang tersebar, dengan tetap menjaga tingkat kelembapan yang terkendali di habitatnya. Menawarkan makanan dan minuman tanpa batas. Makanan hewan pengerat tersebut dibagikan dalam bentuk pelet yang dipadatkan. Dispenser air hewan pengerat ditempatkan pada kawat yang terletak di atas baskom atau wadah. Makanan dan minuman yang berlimpah disediakan dalam wadah yang berbeda dan diisi ulang setiap hari untuk menjaga kesejahteraan tikus, mencegah penyakit atau kematian (Mutiarahmi *et al.*, 2021)

### 1.4.3. Pengamatan dan Terminasi Hewan Uji

Masing-masing tikus putih pada tiap kelompok dicampur dengan tikus betina. Pada saat terjadi perkawinan dan telah terjadi ereksi, dalam waktu cepat dilakukan terminasi tikus dengan menghancurkan otak tikus. Terminasi harus dilakukan secepat-cepatnya supaya kadar NOS mRNA pada korpus cavernosum masih tinggi. Setelah tikus mati, dilakukan pembedahan dan pemotongan organ penis tikus untuk penilaian ekspresi enzim eNOS, dan pengambilan organ testis untuk mengukur kadar hormon testosteron intratesticular (Cunha *et al.*, 2019).

### 1.4.4. Pembuatan Ekstrak Lada Hitam

Proses ekstraksi bubuk lada hitam (*Piper nigrum* L.) menjadi ekstrak etanol diawali dengan pengeringan buah lada hitam yang didapatkan dari Desa Ngarip Kecamatan Ulu Belu, Tanggamus, Lampung, Indonesia. Bubuk kemudian digiling hingga menjadi bubuk halus dan diayak untuk memperoleh ukuran partikel yang seragam dengan berat 100 gram. Bubuk tersebut dimasukkan ke dalam wadah tertutup untuk dilakukan proses maserasi dengan menambahkan pelarut etanol sebanyak 300 ml lalu direndam selama 3–5 hari pada suhu ruang sambil sesekali diaduk agar senyawa aktif dapat larut secara optimal. Setelah proses perendaman selesai, campuran disaring untuk memisahkan filtrat dari ampas, dan filtrat yang diperoleh kemudian diuapkan menggunakan rotary evaporator atau water bath pada suhu sekitar 40–50°C hingga pelarut etanol menguap dan diperoleh ekstrak sebesar 10 gram (Sutyarso *et al.*, 2016).

Penentuan dosis untuk setiap perlakuan didasarkan pada penelitian sebelumnya. Penelitian tersebut menggunakan dosis pemberian sebesar 122,5mg/KgBB dan 245mg/KgBB selama 8 hari (Ayu *et al.*, 2024). Penentuan dosis untuk perlakuan ditetapkan atas rata-rata berat hewan uji yaitu sekitar 200 gram. Sehingga didapatkan dosis yang dibutuhkan pada kelompok perlakuan satu dan kelompok perlakuan dua (P1 dan P2) adalah 122,5 mg/KgBB x 0,2 Kg

(berat tikus) = 24,5 mg dibulatkan menjadi 25 mg, dan 245 mg/KgBB x 0,2 Kg (berat tikus) = 49mg (Ayu *et al.*, 2024).

#### 1.4.5. Profiling Senyawa Aktif Ekstrak Lada Hitam dengan LC-MS

Profiling dengan LC-MS dilakukan mengikuti prosedur (Liang *et al.*, 2021), sebagai berikut :

Analisis LC-MS dilakukan dengan menggunakan massa Thermo LTQ XL spektrometer dengan sistem UHPLC Dionex™ UltiMate™ 3000 yang terdiri dari Dionex™ UltiMate™ LPG-3400SD Standard Quaternary Pump, Dionex™ UltiMate™ Standard Well Plate Autosampler, dan Dionex 3000 kolom (Thermo Scientific, San Jose, CA, AS). Pemisahan dilakukan pada kolom C18 fase terbalik (ZORBAX Eclipse XDB, 250 × 3,0 mm id, 5 µm) dengan UltraLine UHPLC In-Line Filter (RESTEK, Bellefonte, PA, USA) dalam oven kolom pada suhu 25 °C. Fase gerak terdiri dari kombinasi A (0,5% asam format dalam air, v/v) dan B (asetonitril). Gradien biner menggunakan program dengan laju aliran 0,5 mL/menit sebagai berikut: 31% B, tahan selama 3 menit, tingkatkan dari 31 menjadi 55% B pada 30 menit, dari 55 menjadi 90% B pada 40 menit, tahan hingga 50 menit. Spektrometer massa dioperasikan secara positif mode ionisasi. Kondisinya ditetapkan sebagai berikut: gas selubung pada 35 (unit arbitrari), gas tambahan dan penyapu pada 15 (unit arbitrari), semprotan tegangan pada 3,5 kV, suhu kapiler pada 500 °C, kapiler tegangan pada 10 V, dan lensa tabung pada 55 V. Untuk percobaan pemindaian penuh, rentang massa adalah dari m/z 50 hingga 1000. Untuk pemindaian yang bergantung pada data percobaan, ion paling kuat dipilih untuk menawarkan produk MS2 mereka ion dengan energi tumbukan normalisasi sebesar 35%.

#### 1.4.6. Induksi *Alloxan*

Induksi *Alloxan* dilakukan pada semua kelompok tikus kecuali kelompok normal. Kadar glukosa darah diukur sebelum induksi dilakukan menjadi baseline kadar glukosa darah normal (hari ke-0). *Alloxan* dilarutkan terlebih dahulu dalam larutan NaCl fisiologis secepatnya sebelum diinduksikan.

Induksi *Alloxan* dilakukan secara intraperitoneal dengan dosis 150 mg/Kg bb dalam 1 mL (Sheriff *et al.*, 2019). Kadar glukosa darah diukur kembali setelah 72 jam (hari ke-3) untuk penetapan kondisi hiperglikemia. Pemberian pakan dan minum secara *ad libitum* tetap dilakukan selama induksi (Hasim *et al.*, 2020).

#### **1.4.7. Tingkat ekspresi eNOS mRNA di *Corpus cavernosum***

Analisis tingkat ekspresi endothelial NOS (eNOS) mRNA dari *Corpus cavernosum* dilakukan pada tikus (*Rattus norvegicus*) yang sudah dilakukan terminasi.

##### **1.4.7.1. Ekstraksi RNA total**

Ekspresi gen berhubungan erat dengan RNA, dimana ekspresi gen diregulasi oleh RNA (Statello *et al.*, 2021). Oleh karena itu, ekstraksi RNA total merupakan tahap yang krusial pada proses analisis tingkat ekspresi gen karena akan menentukan keberhasilan tahap tahap berikutnya. Ketepatan dalam proses ekstraksi akan memengaruhi hasil dan konsentrasi RNA yang dihasilkan, serta mencegah terjadinya degradasi RNA (Gandhi, O'Brien and Yadav, 2020).

Peningkatan keberhasilan ekstraksi RNA diawali dengan persiapan dan pengambilan sampel dengan tepat. Ekstraksi RNA total dilakukan dengan mengikuti protokol kit ekstraksi RNA RNEasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Jerman). Sampel diambil dari bagian *Corpus cavernosum* tikus (*Rattus norvegicus*) sebanyak  $\pm 30$  mg dengan cepat tepat saat tikus berada pada kondisi ereksi, dimana artinya eNOS sedang aktif. Pengambilan sampel saat gen tidak aktif akan mengurangi akurasi hasil, karena gen yang tidak aktif tidak dapat mengirimkan sinyal apapun kepada mRNA. *Corpus cavernosum* yang sudah berhasil diambil kemudian ditempatkan di mortar steril untuk dihaluskan secara mekanik bersama dengan nitrogen cair. Nitrogen cair dapat membantu

proses ekstraksi RNA (Cunha *et al.*, 2019) dengan membekukan sampel dengan cepat (Tian *et al.*, 2020), sehingga memudahkan penghalusan sampel (Du *et al.*, 2022). dan di sisi lain mengurangi resiko kerusakan RNA (Li *et al.*, 2019).

Tahap selanjutnya setelah sampel halus yaitu sebagai berikut :

1. Sampel dipindahkan ke mikrotube steril 2ml (RNase-free). Buffer RLT Plus ditambahkan sebanyak 600 $\mu$ l dan dihomogenisasi dengan melewati pada jarum 20-gauge yang sesuai dengan *RNase-free syringe*. Buffer RLT mengandung *guanidium thiocyanate* yang berfungsi memecah ikatan hidrogen pada sampel (Zepeda and Verdonk, 2022).
2. Lisat disentrifugasi selama 3 menit dengan kecepatan 10.000 rpm. Supernatan yang terbentuk dipindahkan ke gDNA Eliminator *spin column* yang ditempatkan pada 2 ml *collection tube* dengan cara inversi menggunakan mikropipet. Kemudian disentrifugasi kembali selama 30 detik pada 10.000 rpm, dapat diulangi sampai tidak ada cairan yang tersisa pada *flow-through*. *Column* dilepaskan, dan *flow-through* disimpan.
3. Etanol 70% untuk mempresipitasi sebanyak 350 atau 600  $\mu$ l ditambahkan ke *flow-through*, dihomogenisasi dengan cara inversi menggunakan mikropipet
4. Sampel dipindahkan ke RNeasy *spin column* yang ditempatkan pada 2 ml *collection tube* sebanyak 700 $\mu$ l, lid ditutup perlahan, dan sentrifugasi selama 15 detik pada 10.000 rpm. Apabila sampel >700 $\mu$ l, sentrifugasi diulang pada *column* yang sama. *Flow-through* dilepaskan, sedangkan *collection tube* dipakai kembali.
5. Buffer RW1 ditambahkan ke RNeasy *spin column* sebanyak 700  $\mu$ l, lid ditutup perlahan, dan sentrifugasi selama 15 detik pada 10.000 rpm untuk mencuci *spin column membrane*. Buffer RW1 mengandung *guanidium thiocyanate* dan ethanol sehingga meningkatkan inaktivasi RNase dan DNase dan tercucinya sisa-sisa

garam maupun fenol (Roy *et al.*, 2020). *Flow-through* dilepaskan, sedangkan *collection tube* dipakai kembali.

6. Buffer RPE ditambahkan ke RNeasy *spin column* sebanyak 500  $\mu$ l, lid ditutup perlahan, dan sentrifugasi selama 15 detik pada 10.000 rpm untuk mencuci *spin column membrane*. *Flow-through* dilepaskan, sedangkan *collection tube* dipakai kembali.
7. Buffer RPE ditambahkan ke RNeasy *spin column* sebanyak 500  $\mu$ l, lid ditutup perlahan, dan sentrifugasi selama 2 menit pada 10.000 rpm untuk mencuci *spin column membrane*. Sentrifugasi yang panjang dapat mengeringkan *spin column membrane*, etanol tidak diperkenankan terbawa selama elusi RNA, karena dapat mengganggu tahapan-tahapan berikutnya. RNeasy *spin column* dilepaskan dari *collection tube* dengan hati-hati agar tidak bersentuhan dengan *flow-through*.
8. Opsional : RNeasy *spin column* ditempatkan pada 2 ml *collection tube* baru, sentrifugasi pada 10.000 rpm selama 1 menit. Tahap ini dilakukan apabila terdapat kemungkinan buffer RPE yang tertinggal
9. RNeasy *spin column* ditempatkan pada 2 ml *collection tube*, *RNase-free water* ditambahkan sebanyak 30-50 $\mu$ l secara langsung ke dalam *spin column membrane*. Lid ditutup perlahan, kemudian disentrifugasi selama 1 menit pada 10.000 rpm untuk mengelusi RNA.
10. Apabila hasil RNA yang diharapkan >30 $\mu$ g, tahap 9 diulangi kembali menggunakan 30-50  $\mu$ l *RNase-free water*, atau menggunakan hasil elusi dari tahap 9. *Collection tube* sebelumnya dipakai kembali. Hasil elusi dari tahap 9 akan menghasilkan RNA 15-30% lebih sedikit dari menggunakan volume kedua *RNase-free water*, namun konsentrasi RNA akan lebih tinggi (Zepeda and Verdonk, 2022).

#### 1.4.7.2. Analisis Konsentrasi, Kemurnian, dan Integritas RNA Hasil Ekstraksi

Konsentrasi dan kemurnian RNA total dianalisis dengan menggunakan submikroliter spektrofotometer UV-Vis yaitu *nanophotometer* dari Implen Schatzbogen, Munchen, Jerman. Konsentrasi dihitung dengan satuan ng/ $\mu$ l, sedangkan kemurnian dihitung dari rasio  $A_{260}/A_{280}$  dan  $A_{260}/A_{230}$ . RNA dihitung murni dan bukan merupakan DNA ataupun terkontaminasi sisa-sisa proses ekstraksi termasuk buffer dan reagen apabila  $A_{260}/A_{280}$  dan  $A_{260}/A_{230}$  menunjukkan nilai rasio  $> 2$  (Escobar and Hunt, 2017). Rasio  $A_{260}/A_{230}$  dengan nilai  $< 2$  salah satunya mengindikasikan adanya *guanidinium thiocyanate* yang terbawa, dimana berbagai buffer terabsorbansi pada kisaran 230 nm (Implen, 2015).

Integritas RNA total dianalisis dengan elektroforesis gel Mupid-exu (Mupid, Tokyo, Jepang) menggunakan gel agarosa 1% dalam larutan MOPS 1x. RNA total divisualisasi menggunakan gel agarosa 1% dengan cara sebanyak 0,48 g gel agarosa dilarutkan dalam 40 mL buffer TAE 1x lalu dimasak hingga mendidih dan homogen yang ditandai dengan larutan menjadi bening. Setelah  $\pm 30$ - 40 menit, ditambah 2  $\mu$ L larutan *RedSafe*<sup>TM</sup> ((iNtRON, Seongnam-si, Korea Selatan) dalam keadaan tanpa cahaya dan dihomogenkan lalu larutan tersebut dituang ke dalam tray elektroforesis dan dipasangkan sisir. Setelah gel memadat, dimasukkan DNA marker sebanyak 7  $\mu$ L ke dalam sumuran paling ujung dari gel agarosa kemudian RNA total yang sudah ditambahkan larutan premix dan diinkubasi pada 65°C selama 10 menit dan 5 menit di es dimasukkan ke dalam sumuran gel agarosa lainnya. Proses elektroforesis dijalankan selama 25 menit dengan arus listrik 100 volt. Setelah migrasi selesai, pita-pita yang terbentuk pada gel diamati menggunakan sinar UV pada gel doc (Escobar and Hunt, 2017; Implen, 2015).

#### 1.4.7.3. Sintesis DNA komplementari (cDNA)

RNA hasil ekstraksi sebelumnya kemudian diubah menjadi DNA komplementari (cDNA). RNA yang diubah ini harus terbebas dari DNA, oleh karena itu sebelum dilakukan sintesis cDNA dilakukan penambahan DNase , terlebih dahulu pada RNA total (Aguila *et al.*, 2005). DNase ditambahkan pada masing-masing RNA total dengan tahapan berikut : dH<sub>2</sub>O.DEPC 0.1 % sebanyak 2,5 µl ditambahkan dengan 10µl RNA total. Kemudian ditambahkan 1 µl buffer DNase dan 0,2 µl DNase, dan diinkubasi pada suhu 25°C selama 5 menit. Selanjutnya, ditambahkan EDTA sebanyak 1µl, diinkubasi pada suhu 65°C selama 10 menit, dan dipindahkan ke es selama 5 menit.

Setelah tahap penambahan DNase selesai, kemudian dilanjutkan dengan sintesis cDNA. Hasil sintesis cDNA akan digunakan sebagai utas cetakan bagi reaksi PCR maupun *quantitative*-PCR (Kuang *et al.*, 2018). Sintesis cDNA dilakukan melalui proses transkripsi terbalik (*reverse transcription*), yakni mengonversi RNA menjadi DNA komplementari (cDNA) menggunakan enzim *reverse transcriptase* dengan bantuan primer dan dNTP sebagai bahan penyusun (Bong *et al.*, 2024; Bustin *et al.*, 2025). Tahapan sintesis cDNA ini mengikuti protokol dari iScript™ cDNA Synthesis kit (Bio-Rad, California, AS). Masing-masing reaksi menggunakan 4 µl 5x iScript *Reaction Mix*, 1µl I Script *Reverse Transcriptase*, 13 µl *Nuclease-free water*, dan 2 µl RNA total sebagai *template*. Oligo (dT) dan primer hexamer acak yang diperlukan pada sintesis sudah tersedia di dalam *Reaction Mix*. Selanjutnya, proses sintesis berjalan di alat PCR Line Gene Mini S (Bioer, Hangzhou, Tiongkok) dengan siklus termal berikut : suhu 25°C selama 5 menit, suhu 42°C selama 30 menit, suhu 85°C selama 5 menit, dan suhu 15°C selama 15 menit (Kuang *et al.*, 2018).

#### 3.4.7.4. Analisis Ekspresi Gen dengan Quantitative PCR (qPCR)

Tingkat ekspresi eNOS dianalisis dengan menggunakan *quantitative* PCR (qPCR). *Quantitative* PCR (qPCR) dijalankan dengan alat PCR

Line Gene Mini S (Bioer, Hangzhou, Tiongkok), menggunakan primer spesifik berikut :

1. eNOS: 5'-CTGCTGCCCCAGATATCTTC-3' (forward) dan  
5'-CAGGTACTGCAGTCCCTCCT-3' (reverse) (Arfian *et al.*, 2019)

Sebagai internal kontrol, digunakan gen *Beta Actin* dengan urutan primer sebagai berikut:

forward : 5'-CAACTCCCTCAAGATTGTCAGCAA-3';

reverse 5-'GGCATGGACTGTGGTCATGA-3' (Awad *et al.*, 2021).

Pereaksi PCR terdiri dari : 2 µl cDNA, 10µl RealMOD™ Green W<sub>2</sub> 2x qPCR mix (iNtRON, Seongnam-si, Korea Selatan), 0,5 µl primer forward, dan 0,5 µl primer reverse. Siklus termal untuk menjalankan qPCR ini yaitu 35 siklus dengan tahap denaturasi (94°C selama 30 detik), pelekatan primer dan *template* atau *annealing* (eNOS: 54°C: *Beta actin* 55°C selama 1 menit) dan ekstensi (72°C, 5 menit).

#### 3.4.7.5. Analisis Perbandingan Konsentrasi Gen Target dengan Gen Internal Kontrol

Perbandingan konsentrasi gen target dengan gen internal kontrol dianalisis berbasis metode Livak. Metode ini mempertimbangkan kemungkinan bahwa gen target dan internal kontrol diamplifikasi dengan efisiensi serupa mendekati 100%. Sebelum menggunakan metode Livak, hipotesis ini harus divalidasi terlebih dahulu dengan menghitung efisiensi amplifikasi gen target dan gen internal kontrol.

Rumus perhitungannya sebagai berikut:

$$(1) \Delta Ct1 = Ct (\text{Target dengan perlakuan}) - Ct (\text{Internal kontrol dengan perlakuan})$$

$$(2) \Delta Ct2 = Ct (\text{Target pada tanpa perlakuan}) - Ct (\text{Internal kontrol pada tanpa perlakuan})$$

$$(3) \Delta \Delta Ct = \Delta Ct1 - \Delta Ct2$$

Perbandingan level ekspresi :  $2^{-\Delta \Delta Ct}$

Nilai Ct (*cycle threshold*) merupakan jumlah siklus saat sinyal fluoresensi melewati ambang deteksi dan bersifat berbanding terbalik dengan jumlah target awal; semakin rendah Ct menunjukkan ekspresi relatif yang lebih tinggi. Untuk keperluan deskriptif, nilai Ct kemudian dikategorikan menjadi skor 1–5 sebagai berikut: skor 5 (15–20) tereksresi sangat tinggi; skor 4 (21–25) tereksresi tinggi; skor 3 (26–30) tereksresi sedang; skor 2 (31–35) tereksresi rendah; dan skor 1 (36–40) tereksresi sangat rendah (Bong *et al.*, 2024; Bustin *et al.*, 2025).

#### **3.4.7.6. Analisis Tingkat Ekspresi Gen dengan PCR Konvensional**

Tingkat ekspresi eNOS mRNA juga dianalisis dengan menggunakan PCR Kualitatif. PCR Kualitatif dijalankan menggunakan alat PCR Line Gene Mini S (Bioer, Hangzhou, Tiongkok) dengan primer spesifik dan internal control yang sama pada qPCR.

Pereaksi PCR disiapkan dalam volume total 20  $\mu$ L yang terdiri atas 2  $\mu$ L cDNA, 10  $\mu$ L MyTaq<sup>TM</sup> HS Red Mix (2x), 0,5  $\mu$ L primer forward, dan 0,5  $\mu$ L primer reverse, kemudian ditambahkan air bebas nuklease hingga volume akhir. MyTaq<sup>TM</sup> HS Red Mix merupakan campuran siap pakai yang telah mengandung DNA polimerase hot-start, buffer, MgCl<sub>2</sub>, dNTP, serta pewarna untuk pemuatan gel sehingga produk PCR dapat langsung dianalisis menggunakan elektroforesis agarosa. Program siklus termal dilakukan dengan aktivasi/denaturasi awal pada 95°C selama 1–3 menit, diikuti 35 siklus denaturasi 95°C selama 15–30 detik, annealing pada suhu spesifik primer (eNOS: 54°C; nNOS: 52°C; GAPDH: 55°C) selama 30–60 detik, dan ekstensi 72°C selama 30–60 detik (d disesuaikan dengan panjang amplicon), kemudian ekstensi akhir pada 72°C selama 5 menit (Khehra *et al.*, 2025; Asif *et al.*, 2021).

#### 3.4.7.7. Verifikasi Hasil Amplifikasi PCR Konvensional

Hasil amplifikasi diverifikasi melalui visualisasi oleh elektroforesis gel Mupid-exu (Mupid, Tokyo, Jepang) menggunakan gel agarosa 1,2% dengan cara sebanyak 0,48 g gel agarosa dilarutkan dalam 40 mL buffer TAE 1x lalu dimasak hingga mendidih dan homogen yang ditandai dengan larutan menjadi bening. Setelah  $\pm$  30- 40 menit, ditambah 2  $\mu$ L larutan *RedSafe*<sup>TM</sup> ((iNtRON, Seongnam-si, Korea Selatan) dalam keadaan tanpa cahaya dan dihomogenkan lalu larutan tersebut dituang ke dalam tray elektroforesis dan dipasangkan sisir. Setelah gel memadat, dimasukan DNA marker sebanyak 7  $\mu$ L ke dalam sumuran paling ujung dari gel agarosa kemudian 5  $\mu$ L DNA hasil PCR dimasukan ke dalam sumuran gel agarosa lainnya. Proses elektroforesis dijalankan selama 25 menit dengan arus listrik 100 volt. Setelah migrasi selesai, pita-pita yang terbentuk pada gel diamati menggunakan sinar UV di gel doc (Setiawan *et al.*, 2022).

#### 3.4.7.8. Verifikasi gen eNOS melalui Sekuensing

Amplikon gen eNOS yang terkonfirmasi melalui PCR konvensional dan elektroforesis kemudian dilakukan sekuensing dengan metode Sanger menggunakan jasa PT. Inti Kemika Sejahtera. Hasil sekuensing dianalisis BLAST di website NCBI untuk dikonfirmasi kemiripannya dengan sekuen gen eNOS *Rattus norvegicus* yang telah terdeposit di GenBank (Setiawan *et al.*, 2022).

#### 1.4.8. Uji Hormon Testosteron Intratestikular

Organ testis tikus dihancurkan secara mekanik menggunakan homogenizer kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 x g selama 10 menit pada suhu 40<sup>0</sup>C dan supernatan diambil dan disimpan dalam lemari es pada suhu 2-8<sup>0</sup>C sampai saat dilaksanakan pengukuran. Supernatan yang didapat merupakan sampel yang akan diukur kadar hormonnya menggunakan metode ELISA dengan prosedur sebagai berikut:

1. Preparasi Sampel

Sampel disarankan untuk dilakukan pengenceran 10 X. Pengenceran 10 X : 50  $\mu$ L sampel + 450  $\mu$ L Calibrator Diluent RD5-48.

2. Wash Buffer

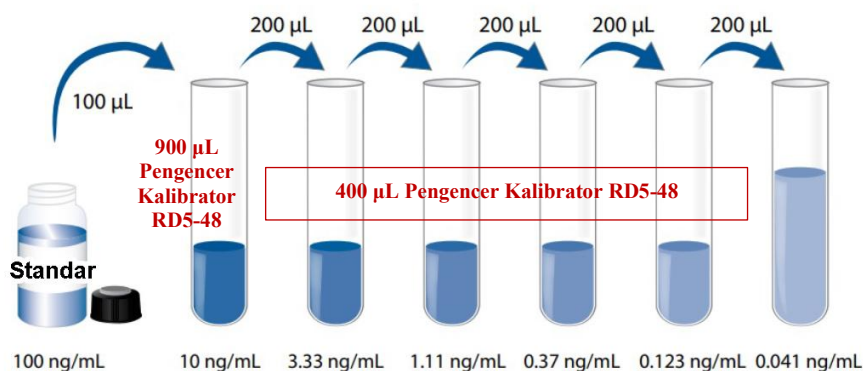
Untuk membuat 500 mL Wash Buffer: 20 mL Wash Buffer Concentrate ditambah 480 Aquabidest.

3. Substrate Solution

Color Reagents A dan B, dicampur bersama dalam volume yang sama dalam waktu 15 menit sebelum dipakai. Lindungi dari cahaya. Diperlukan 200  $\mu$ L Substrate Solution per well.

4. Testosteron Standard

Rekonstitusi standar dengan Aquabidest untuk membuat larutan stok 100 ng/mL. Campur standar untuk memastikan rekonstitusi lengkap dan didiamkan minimal 15 menit.



**Gambar 17.** Prosedur uji hormon testosteron *intratesticular* metode ELISA

Sumber : Zhao, *et al.*, 2022

Kit Elisa testosteron menggunakan kit R&D systems (nomer katalog KGE010, Minneapolis, USA), dengan assay range 0-10 ng/mL, dan sensitivitas 0,041 ng/mL seperti ditunjukkan pada Gambar 17 (Zhao, *et al.*, 2022).

#### 1.4.9. Pembuatan Preparat Histologi Testis

Pada hari ke-9 setelah pemeriksaan fungsi ereksi selesai, seluruh tikus diterminasi menggunakan metode dislokasi leher kemudian dibedah dan diambil salah satu testisnya untuk dibuat preparat mikroanatomi. Setelah tikus

dilakukan terminasi dan dilakukan pembedahan. Berikut Langkah-langkah pembuatan preparat histologi testis menurut Dina (2017):

1. Proses pelapisan dimulai dengan menandai objek kaca yang digunakan menggunakan kikir kaca pada tepiannya. Kemudian, objek tersebut direndam dalam alkohol 70% selama minimal satu malam, dikeringkan dengan tisu, dan direndam dalam larutan gelatin 0,5% selama 30-40 detik per *slide*. Setelah itu, objek kaca dikeringkan dengan posisi miring untuk memastikan gelatin merata di permukaan kaca.
2. Organ testis yang telah disimpan dalam larutan buffered formalin 10% dicuci dengan alkohol selama 2 jam, diikuti dengan pencucian bertahap menggunakan alkohol dengan konsentrasi 90%, 95%, etanol absolut (3 kali), dan xylol (3 kali), masing-masing selama 20 menit.
3. Infiltrasi dilakukan dengan menambahkan parafin sebanyak 3 kali selama 30 menit setiap kali.
4. Untuk *embedding*, bahan dan parafin dituangkan ke dalam kotak karton atau wadah yang telah disiapkan dan diatur untuk menghindari adanya udara yang terperangkap. Blok parafin disimpan semalaman pada suhu ruang, kemudian diinkubasi dalam *freezer* hingga benar-benar mengeras.
5. Pemotongan dilakukan dengan mikrotom, di mana *cutter* dipanaskan dan ditempelkan pada dasar blok parafin sehingga parafin sedikit meleleh. Holder dijepit pada mikrotom putar dan diselaraskan dengan pisau mikrotom. Pemotongan dimulai dengan mengatur ketebalan, untuk testis, potongan dibuat dengan ketebalan 5  $\mu\text{m}$ . Kemudian, pita hasil potongan diambil menggunakan kuas, direndam dalam air dingin untuk membuka lipatan, lalu dipindahkan ke air hangat untuk memilih potongan terbaik. Potongan yang terpilih diambil dengan objek kaca yang telah dilapisi, kemudian dikeringkan di atas plat panas.
6. Deparafinisasi dilakukan dengan merendam preparat dalam xylol sebanyak 2 kali selama 5 menit masing-masing.
7. Rehidrasi dilakukan dengan merendam preparat dalam larutan etanol bertahap: etanol absolut (2 kali), etanol 95%, 90%, 80%, dan 70%, masing-

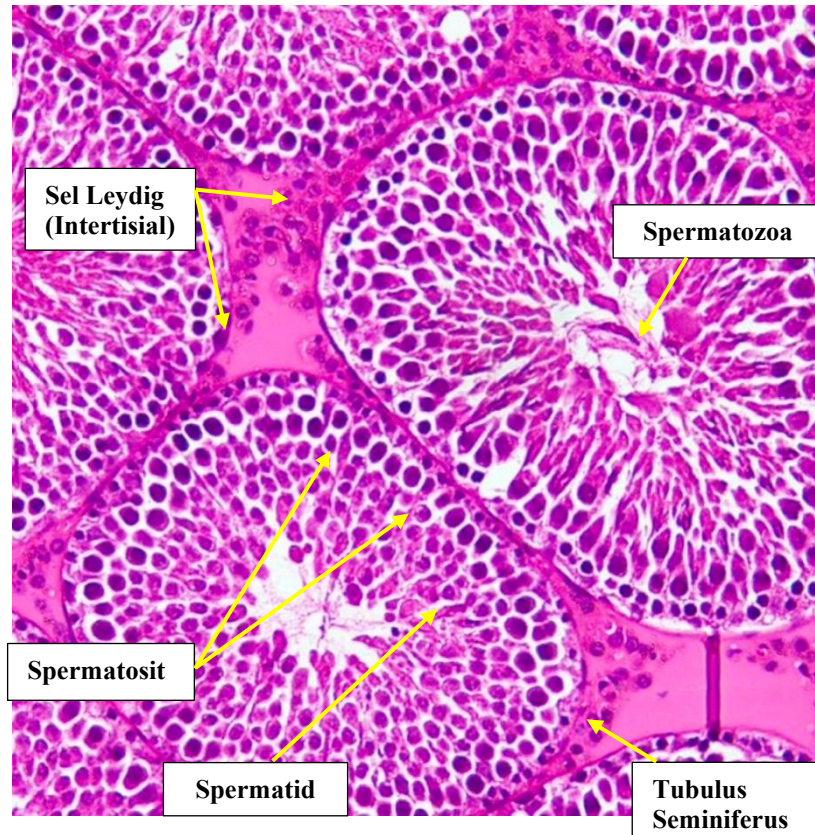
masing selama 5 menit. Setelah itu, preparat direndam dalam aquades selama 10 menit.

8. Pewarnaan dilakukan dengan meneteskan hematoxylin pada preparat selama 3 menit atau hingga warna yang diinginkan tercapai. Setelah itu, preparat dicuci dengan air mengalir selama 30 menit dan dibilas dengan aquades selama 5 menit. Selanjutnya, preparat direndam dalam pewarna eosin alkohol selama 30 menit dan dibilas kembali dengan aquades selama 5 menit.
9. Dehidrasi dilakukan dengan merendam preparat dalam etanol 80%, 90%, 95%, dan etanol absolut (2 kali), masing-masing selama 5 menit.
10. *Clearing* dilakukan dengan merendam preparat dalam larutan xylol sebanyak 2 kali selama 5 menit, kemudian dibiarkan mengering.
11. *Mounting* dilakukan dengan etilen, dan hasil akhirnya diamati menggunakan mikroskop, dipotret, dan datanya dicatat.

#### **3.4.9.1 Perhitungan Sel Leydig**

Perhitungan sel Leydig dilakukan pada pembesaran 400x dengan menghitung jumlah sel Leydig pada 5 lapang pandang menggunakan *National Institute of Health ImageJ Software* version 1.8.0.

Sel Leydig normal berada di sekitar tubulus seminiferus, berbentuk poligonal besar dengan sitoplasma eosinofilik, non-granular, dan inti bulat besar dengan nukleolus yang menonjol. Lokasi inti sebagian besar berada di bagian tengah sitoplasma. Sitoplasma diisi dengan tetesan lipid yang melimpah yang memiliki refraksi kuat di bawah mikroskop cahaya. Sel ini memiliki ciri-ciri sel yang mensekresi steroid, termasuk retikulum endoplasma yang berkembang dengan baik, banyak tetesan lipid, dan mitokondria dengan krista tubulovesikular. Sel ini juga mengandung lipofuscin, yang menunjukkan tetesan lipid yang terakumulasi dalam lisosom (Aladamat *et al*, 2022).



**Gambar 18.** Sel Leydig Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Perbesaran 100x dengan pewarnaan *Haematoxylin & Eosin*  
Sumber: Aladamat *et al.*, 2022

Sediaan testis tikus diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 400 kali (40 X 10) seperti pada Gambar 18. Jumlah sel Leydig dihitung pada 5 lapang pandang (Harahap, 2023).

#### 3.4.9.2 Perhitungan Sel Spermatosit

Perhitungan sel spermatosit dilakukan pada pembesaran 400x dengan menghitung jumlah spermatosit pada 3 lapang pandang menggunakan *National Institute of Health ImageJ Software* version 1.8.0. Menurut Mescher (2021), Sel spermatosit terletak di tubulus seminiferus dengan ciri ciri spermatosit lebih besar dibandingkan spermatogonia terutama pada tahap spermatosit primer, inti sel berbentuk bulat dengan kromatin yang tampak kasar atau bergranula karena sedang mengalami proses meiosis, posisi spermatosit berada di antara spermatogonia (dekat membran

basal) dan spermatid (lebih dekat lumen), sitoplasma tampak lebih luas tetapi tidak terlalu menonjol, dalam preparat histologi testis tikus, spermatosit primer paling banyak terlihat karena tahap ini berlangsung lebih lama dibanding spermatosit sekunder.

#### 1.4.10. Penilaian Fungsi Ereksi

Fungsi ereksi hewan percobaan dinilai melalui hasil *Total Penile Reflex* (TPR) yang mencakup jumlah frekuensi dari keadaan penis saat ereksi (E), *Long flips* (LF) (Dorsofleksi badan penis  $90^\circ$ ), dan *Quick flips* (QF) (Dorsofleksi badan penis  $<90^\circ$ ) seperti tertera pada Gambar 19. Sebelum terminasi pada hari ke-9, Setiap tikus jantan ditahan dalam posisi supinasi, kemudian preputium ditarik ke belakang glans penis dengan jari telunjuk dan ibu jari kemudian dipertahankan dalam posisi ini selama sekitar 15 menit untuk menimbulkan reflek genital kemudian frekuensi ketiga komponen (E, LF, dan QF) diamati dan dihitung. Rumus untuk menghitung TPR adalah:

$$\text{TPR} = \text{E} + \text{LF} + \text{QF}$$

Indeks ini memberikan ukuran keseluruhan ereksi dan refleks penis (Besong *et al.*, 2023).



(a)

(b)

(c)

(a) Ereksi: Glans penis kemerahan dan membesar dibagian pangkal; (b) *Long Flip*: Dorsofleksi penis dengan sudut  $90^\circ$  dari tubuh; (c) *Quick Flip*: Dorsofleksi penis dengan sudut  $<90^\circ$  dari tubuh

**Gambar 19.** Refleks genital tikus *Rattus norvegicus*.  
Sumber : Dokumentasi pribadi

#### 1.4.11. Pengamatan Perilaku Seksual (Libido)

Tikus yang telah diberikan perlakuan selama 8 hari selanjutnya dilakukan uji kawin pada hari ke 9. Pada saat tikus melakukan aktivitas percumbuan diamati dalam batasan perilaku tikus jantan melakukan penciuman pada bagian luar alat kelamin tikus betina serta tikus jantan mencium bagian mulut sampai ke leher dan aktivitas penunggangan dengan batasan perilaku tikus jantan menaiki tikus betina. Parameter libido yang diamati yaitu sebagai berikut:

- a. Latensi percumbuan, yaitu dimulai pada saat tikus jantan dan betina disatukan dalam kotak dan di beri sekat tengah, kemudian sekat di buka lalu terjadinya percumbuan ditandai dengan penjilatan bagian luar alat kelamin betina, sampai penciuman bagian mulut sampai ke leher dalam hitungan detik (Brooks *et al.*, 2020).
- b. Latensi penunggangan, yaitu dimulai pada saat tikus jantan dan betina disatukan dalam kotak dengan sekat yang sudah dibuka hingga terjadinya penunggangan atau tikus jantan menaiki tubuh tikus betina dari arah belakang dalam hitungan detik (Brooks *et al.*, 2020).
- c. Frekuensi penunggangan, yaitu diukur dengan melihat banyaknya penunggangan yang dilakukan selama pengujian 30 menit (Brooks *et al.*, 2020)

Setelah tikus jantan diberi perlakuan, masing-masing tikus jantan dimasukkan ke dalam kandang yang berisi tikus betina. Kemudian diamati respon tikus jantan yang agresif dan mulai mendekati tikus betina dan diamati perilaku percumbuan juga penunggangannya (Noer, Hasan and Fitriani, 2020).

#### 1.4.12. Pengamatan Kualitas Spermatozoa

Setelah dilakukan proses pembedahan, selanjutnya dilakukan prosedur sebagai berikut untuk penilaian analisis spermatozoa tikus (Cunha *et al.* 2019):

- a. Pengambilan sekresi kauda epididimis dengan cara memotong bagian proksimal korpus epididimis dan bagian distal vas deferens. Setelah itu, kauda epididimis dimasukkan ke dalam cawan petri yang berisi 1 ml NaCl

0,9%, kemudian bagian proksimal kauda dipotong sedikit dengan gunting lalu kauda ditekan dengan perlahan hingga cairan sekresi epididimis keluar dan tersuspensi dengan NaCl 0,9%. Suspensi spermatozoa dari cauda epididimis yang telah diperoleh dapat digunakan untuk pengamatan yang meliputi konsentrasi, motilitas dan morfologi spermatozoa.

- b. Perhitungan konsentrasi spermatozoa dilakukan dengan cara mengambil spermatozoa pada cauda epidermis. Spermatozoa yang didapat diletakkan pada cawan penguap yang berisi cairan NaCl sebanyak 250  $\mu$ L. Spermatozoa dimasukkan ke dalam bilik hitung *Neubauer* (hemasitometer) sampai kamar *Neubauer* terisi rata kemudian hitung jumlah spermatozoa pada salah satu kamar hitung *Neubauer* dan selanjutnya ditentukan pengenceran yang akan dilakukan dalam jumlah kotak yang di hitung. Kemudian diamati di bawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 40x. Hasil perhitungan dimasukkan ke dalam rumus perhitungan konsentrasi spermatozoa (spermatozoa/mL) menggunakan Improved Neubauer hemocytometer sesuai pedoman WHO Laboratory Manual edisi ke-6. Perhitungan dilakukan dengan rumus: Jumlah sperma =  $\frac{N}{n} \times \frac{1}{20} \times faktor\ pengencer$  , dengan N = jumlah sel yang terhitung dan n = jumlah kotak/grid yang dihitung (WHO, 2021).
- c. Motilitas spermatozoa dihitung dengan menempelkan kauda yang telah disayat pada *object glass* kemudian ditetaskan NaCl sebanyak 1 tetes. Campuran spermatozoa dan NaCl tadi diambil satu tetes dan ditetaskan pada *object glass* yang lain dan ditutup dengan *cover glass*. Pengamatan terhadap spermatozoa yang bergerak progresif dilakukan secara subjektif pada delapan lapang pandang yang berbeda dengan mikroskop cahaya pembesaran 400x. Motilitas spermatozoa selanjutnya diamati aktivitas gerak spermatozoa dimana spermatozoa motil akan bergerak. Spermatozoa yang motil akan bergerak ke depan dan spermatozoa yang bergerak ditempat, bergerak melingkar, bergerak mundur dan diam sebagai spermatozoa yang tidak motil, penilaian menggunakan skoring 0- 100% dengan skala 5%
- d. Morfologi spermatozoa dianalisis dengan meneteskan suspensi spermatozoa pada kaca objek, lalu membuat preparat apus yang dikeringkan di udara.

Preparat tersebut kemudian difiksasi menggunakan metanol selama 5 menit, diikuti pewarnaan dengan giemsa selama 15 menit. Setelah itu, preparat dicuci dengan akuades dan dikeringkan pada suhu ruangan sebelum diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000 kali untuk mengidentifikasi morfologi spermatozoa tikus *Rattus norvegicus*. Persentase spermatozoa dengan morfologi normal dan abnormal dihitung, dengan penilaian morfologi abnormal dilakukan pada 200 spermatozoa.

### 3.5. Definisi Operasional Variabel

Definisi operasional pada penelitian ini tercantum pada Tabel 2.

**Tabel 2.** Definisi operasional variabel penelitian

Variabel	Definisi	Alat Ukur	Cara Ukur	Hasil Ukur	Skala
Kandungan fitokimia ekstrak lada hitam	Kandungan fitokimia meliputi senyawa bioaktif seperti alkaloid, amida, flavonoid, dan asam lemak	LC-MS ( <i>Liquid Chromatography-Mass Spectrometry</i> )	Analisis LC-MS dilakukan dengan menggunakan massa Thermo LTQ XL spektrometer dengan sistem UHPLC Dionex™ UltiMate™ 3000. Pemisahan dilakukan pada kolom C18 fase terbalik (ZORBAX Eclipse XDB, 250 × 3,0 mm id, 5 µm) dengan UltraLine UHPLC In-Line Filter (RESTEK, Bellefonte, PA, USA) dalam oven kolom pada suhu 25 °C. Spektrometer massa dioperasikan secara positif mode ionisasi. kapiler tegangan pada 10 V, dan lensa tabung pada 55 V. Untuk percobaan pemindaian penuh, rentang massa adalah dari m/z 50 hingga 1000.	Senyawa yang terkandung pada ekstrak lada hitam	Numerik
Ekspresi gen <i>nitrite synthase</i> (NOS)	Konsentrasi gen NOS yang dihitung menggunakan real time PCR	Real time PCR	Ekstraksi RNA total dilakukan dengan mengikuti protokol kit ekstraksi RNA RNEasy Mini Kit, Sampel diambil dari bagian <i>Corpus cavernosum</i> tikus ( <i>Rattus norvegicus</i> ) sebanyak ± 30 mg. <i>Corpus cavernosum</i> yang sudah berhasil diambil kemudian ditempatkan di mortar steril.	Perbandingan konsentrasi NOS dibandingkan dengan kontrol internal	Numerik
Kadar hormon testosteron intratesticular	Kandungan nilai hormon testosteron yang dihitung menggunakan microplate reader ELISA	ELISA	Organ testis tikus dihancurkan secara mekanik menggunakan homogenizer kemudian disentrifugasi dan supernatan diambil dan disimpan dalam lemari es pada suhu 2-8°C sampai saat dilaksanakan pengukuran. Supernatan yang didapat merupakan sampel yang	Perbandingan nilai hormon testosteron dibandingkan dengan kontrol	Numerik

Variabel	Definisi	Alat Ukur	Cara Ukur	Hasil Ukur	Skala
Jumlah sel Leydig	Jumlah sel Leydig yang dihitung menggunakan Mikroskop	Mikroskop	akan diukur kadar hormonnya menggunakan metode ELISA. Organ testis yang telah disimpan dalam larutan buffered formalin 10% dicuci dengan alcohol kemudian dilakukan proses infiltrasi dan <i>embedding</i> diatur untuk menghindari adanya udara yang terperangkap. Pemotongan dilakukan dengan mikrotom, Potongan yang terpilih diambil dengan objek kaca. Deparanisasi dilakukan dengan merendam preparat dalam xylool dilakukan pewarnaan dengan meneteskan hematoxylin dan eosin alcohol di lanjutkan dengan <i>Mounting</i> menggunakan etilen, dan hasil akhirnya diamati menggunakan mikroskop. Sel Leydig dihitung pada 10 bidang interstisial yang tidak tumpang tindih dengan ketebalan 4-5 $\mu\text{m}$ ; dalam 5 lapang pandang. Hitungan dinormalisasi berdasarkan area menggunakan perangkat lunak National Institute of Health ImageJ versi 1.8.0 (New York, AS) (dikalibrasi ke $\mu\text{m}^2$ ) pada perbesaran 400x.	Perbandingan jumlah sel Leydig dibandingkan dengan kontrol	Numrik
Fungsi ereksi ( <i>Total Penile Refleks</i> )	Indikator fungsi ereksi pada hewan uji dilakukan melalui analisis <i>Total Penile Reflex</i> (TPR), yang mencakup total jumlah frekuensi terjadinya <i>quick flips</i> (QF), <i>long flips</i> (LF), dan keadaan penis saat ereksi (E).	Lup & Counter	Fungsi ereksi hewan percobaan dinilai melalui hasil <i>Total Penile Reflex</i> (TPR) yang mencakup jumlah frekuensi dari keadaan penis saat ereksi/ E, <i>Long flips</i> / LF (Dorsofleksi badan penis 90°), dan <i>Quick flips</i> / QF (Dorsofleksi badan penis <90°).	Perbandingan fungsi ereksi (TPR), (QF), (LF), dan (E) dibandingkan dengan kontrol	Numerik
Perilaku Seksual	Perilaku seksual dilakukan penilaian menggunakan 3 faktor yaitu, Latensi percumbuan (waktu untuk tikus melakukan percumbuan pertama), Latensi penunggangan (waktu untuk tikus melakukan penunggangan	CCTV, Monitor & Video Rekaman	Pada saat tikus melakukan aktivitas percumbuan diamati dalam batasan perilaku tikus jantan melakukan penciuman pada bagian luar alat kelamin tikus betina serta tikus jantan mencium bagian mulut sampai ke leher dan aktivitas penunggangan dengan batasan perilaku tikus jantan menaiki tikus betina.	Perbandingan dari latensi percumbuan, latensi penunggangan, dan frekuensi penunggangan dibandingkan dengan kontrol	Numerik

Variabel	Definisi	Alat Ukur	Cara Ukur	Hasil Ukur	Skala
Jumlah spermatisit	pertama), dan Frekuensi Penunggang (Banyaknya penunggang yang dilakukan dalam 30 menit). Jumlah spermatisit yang dihitung menggunakan Mikroskop	Mikroskop	Organ testis yang telah disimpan dalam larutan buffered formalin 10% dicuci dengan alcohol kemudian dilakukan proses infiltrasi dan <i>embedding</i> diatur untuk menghindari adanya udara yang terperangkap. Pemotongan dilakukan dengan mikrotom, Potongan yang terpilih diambil dengan objek kaca. Deparanisasi dilakukan dengan merendam preparat dalam xylol dilakukan pewarnaan dengan meneteskan hematoxylin dan eosin alcohol di lanjutkan dengan <i>Mounting</i> menggunakan etilen, dan hasil akhirnya diamati menggunakan mikroskop. Sel spermatisit dihitung pada tubulus seminiferous yang ada pada 3 lapang pandang. Hitungan dinormalisasi berdasarkan area menggunakan perangkat lunak National Institute of Health ImageJ versi 1.8.0 (New York, AS) (dikalibrasi ke $\mu\text{m}^2$ ) pada perbesaran 400x.	Perbandingan Jumlah spermatisit dibandingkan dengan kontrol	Numerik
Analisis Spermatozoa	Analisis Spermatozoa dilakukan dengan cara melihat spermatozoa dibawah mikroskop dan menilai beberapa faktor yaitu, Kosentrasi spermatozoa (jumlah spermatozoa per ml cairan spermatozoa), Motilitas spermatozoa (menilai karakteristik gamet jantan yang memungkinkan sperma secara aktif mencapai dan menembus gamet betina), dan Morfologi spermatozoa (bentuk	Mikroskop	Pengambilan sekresi kauda epididimis dengan cara memotong bagian proksimal korpus epididimis dan bagian distal vas deferens, Perhitungan konsentrasi spermatozoa dilakukan dengan cara mengambil spermatozoa pada cauda epididimis, Hasil perhitungan dimasukkan ke dalam rumus perhitungan jumlah sperma/ml dengan rumus Jumlah sperma = $\frac{N}{n} \times \frac{1}{20} \times \text{faktor pengencer}$ Motilitas spermatozoa dihitung dengan spermatozoa yang motil akan bergerak ke depan dan spermatozoa yang bergerak ditempat, bergerak melingkar, bergerak mundur dan diam sebagai	Perbandingan Konsentrasi spermatozoa, Motilitas spermatozoa, dan morfologi spermatozoa dibandingkan dengan kontrol	Numerik

Variabel	Definisi	Alat Ukur	Cara Ukur	Hasil Ukur	Skala
	spermatozoa baik yang normal maupun tidak normal).		spermatozoa yang tidak motil, penilaian menggunakan skoring 0- 100%.		
Ekstrak lada hitam	Buah lada hitam yang dikeringkan, digiling, dan dilarutkan dengan etanol untuk mendapatkan ekstrak lalu diberikan via sonde lambung	Sonde Lambung	Buah lada hitam ( <i>Piper nigrum</i> L.) diperoleh dari petani lada di Desa Ngari Kecamatan Ulu Belu, Tanggamus, Lampung, Indonesia. Buah lada hitam mengalami dehidrasi dan dihaluskan menjadi bubuk 100 gram. Selanjutnya digunakan etanol sebanyak 300 ml untuk mengekstrak bubuk lada hitam, kemudian dikocok sebanyak tiga kali. Setelah itu, hasil yang akan didapatkan berupa filtrat dan residu. Hasil filtrat diuapkan sehingga menghasilkan ekstrak etanol sebesar 10 gram.	Kelompok perlakuan P1, P2, diberikan ekstrak lada hitam 122,5 mg/kgBB/hari dan 245 mg/kgBB/hari secara oral dengan pelarut etanol selama 8 hari	Numerik
Induksi <i>Alloxan</i>	Induksi <i>Alloxan</i> untuk membuat tikus model hiperglikemik dengan memberikan injeksi <i>Alloxan</i> 150 mg/kgBB intraperitoneal	Spuit	<i>Alloxan</i> dilarutkan terlebih dahulu dalam larutan NaCl fisiologis secepatnya sebelum diinduksikan. Induksi <i>Alloxan</i> dilakukan secara intraperitoneal dengan dosis 150 mg/Kg bb dalam 1 mL. Kadar glukosa darah diukur kembali setelah 72 jam (hari ke-3) untuk penetapan kondisi hiperglikemia. Pemberian pakan dan minum secara ad libitum tetap dilakukan selama induksi.	Dosis (mg)	Numerik

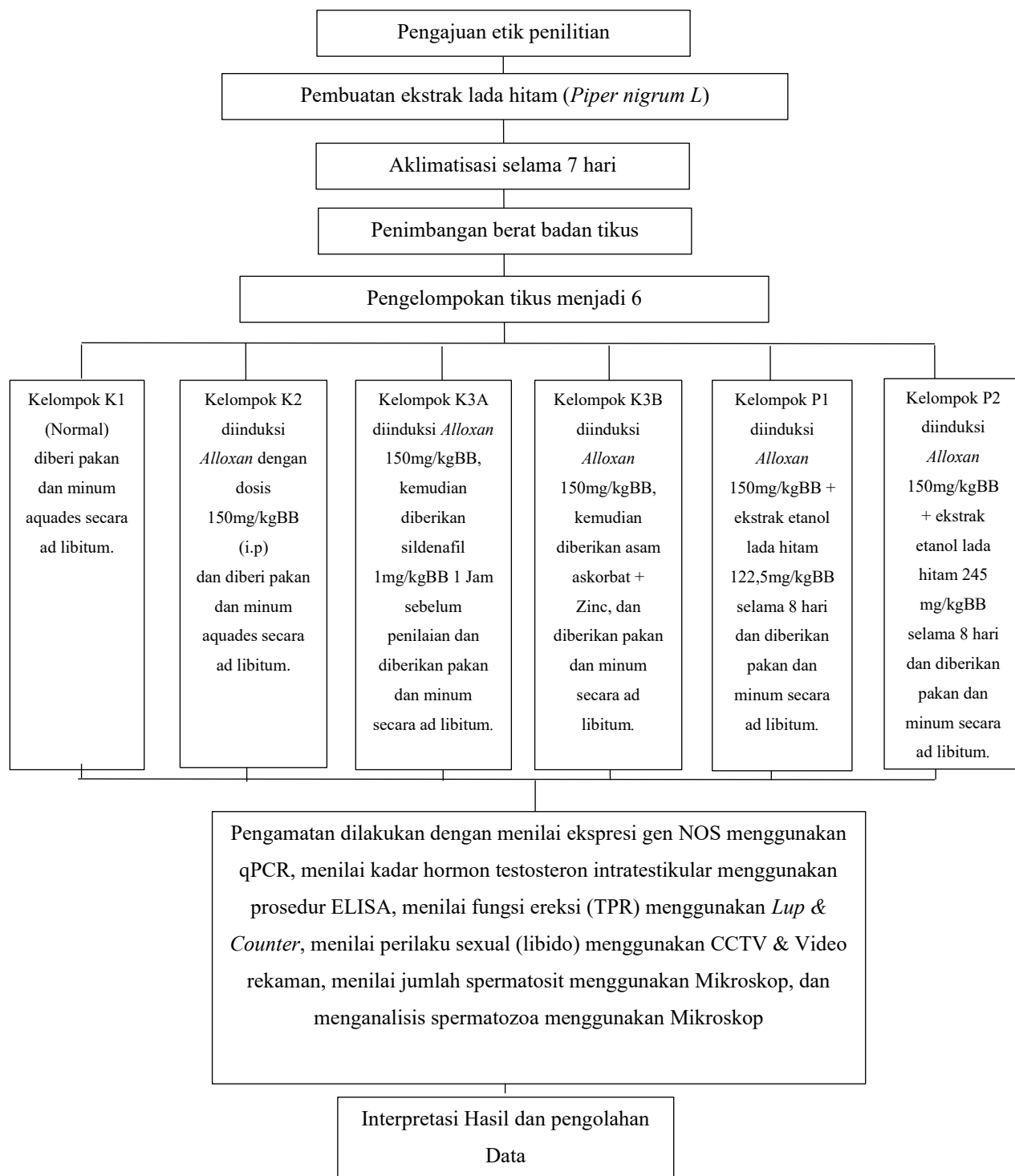
### 3.6. Analisis Statistik

Hasil ekspresi gen NOS, kadar hormon testosteron, fungsi ereksi (TPR), libido, jumlah spermatozoa, jumlah sel leydig, dan jumlah spermatosit digambarkan sebagai rata-rata dan standar deviasi. Perbedaan signifikan antar kelompok pada setiap periode observasi dan pemeriksaan diuji dengan *Oneway ANOVA* dan dilanjutkan dengan uji *post-hoc* LSD bila hasil signifikan. Analisis ini digunakan untuk menganalisis variabel independen dan dependen. Interpretasi uji statistik ini, yaitu;

1. Bila  $p < \alpha$  (0,05) maka hasil bermakna/signifikan, artinya terdapat hubungan bermakna antara variabel independen dan dependen, atau hipotesis penelitian diterima.
2. Bila  $p > \alpha$  (0,05) maka hal ini berarti sampel yang diteliti tidak mendukung adanya perbedaan yang bermakna dan tidak ada pengaruh variabel independen terhadap dependen, atau hipotesis penelitian ditolak.

### 3.7. Alur Penelitian (*Flowchart*)

Alur penelitian yang digunakan dapat dilihat pada Gambar 20 :



**Gambar 20.** Alur Penelitian

### **3.8. Etik Penelitian**

Etika penelitian ini telah diajukan untuk verifikasi oleh Komite Etik penelitian Kesehatan di Fakultas Kedokteran Universitas Lampung dengan nomor registrasi 3468/UN26.18/PP.05.02.00/2024. Proses pelaksanaan penelitian ini melibatkan prinsip 3R, yang mencakup *Replacement, Reduction, and Refinement*.

## V. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Kesimpulan

1. Terdapat 20 senyawa kimia yang terkandung dalam ekstrak lada hitam yaitu Piperonaline, Retrofractamide B, (E)-Piperolein A, (E,E)-Futoamide, Piperamine, Pinocembrine, Retrofractamide C, Piperiline, Piperin, Dehydropiperonaline, Nigramide-F, Piperolein B, Guineesine, Piperchabamide C, hentriacontan-16-ol, Pipyebine, 2,4,14-Eicosatrienoic acid isobutylamide, Pipereicosalidine, N-Isobutyl-2,4-eicosadienamide, dan 1-(9-Octadecenoyl) piperidine.
2. Pemberian ekstrak lada hitam dengan dosis 122,5 mg/KgBB dapat meningkatkan ekspresi gen *nitric oxide synthase* (NOS) pada *Corpus cavernosum* tikus jantan model hiperglikemia
3. Pemberian ekstrak lada hitam dengan dosis 245 mg/KgBB terbukti dapat meningkatkan kadar hormon testosteron intratestikular dan jumlah sel Leydig pada tikus jantan model hiperglikemia
4. Pemberian ekstrak lada hitam dengan dosis 122,5 mg/KgBB dapat meningkatkan fungsi ereksi pada tikus jantan model hiperglikemia
5. Pemberian ekstrak lada hitam dengan dosis 122,5 mg/KgBB dapat meningkatkan perilaku seksual (libido) pada tikus jantan model hiperglikemia
6. Pemberian ekstrak lada hitam dengan dosis 245 mg/KgBB terbukti dapat meningkatkan kualitas spermatozoa pada tikus jantan model hiperglikemia
7. Pemberian ekstrak lada hitam dengan dosis 122,5 mg/KgBB dapat meningkatkan jumlah sel Leydig dan Spermatisit pada tikus jantan model hiperglikemia

## 5.2 Saran

Saran yang dapat diberikan oleh peneliti adalah sebagai berikut

### 5.2.1 Saran Penelitian Selanjutnya

Disarankan bagi peneliti berikutnya yang akan mengeksplorasi mengenai efek ekstrak lada hitam:

1. Melakukan penelitian lebih lanjut secara *invivo* dan efek samping serta toksitas dari pemberian ekstrak lada hitam
2. Melakukan penelitian lebih lanjut mengenai pemberian ekstrak lada hitam pada tikus hiperglikemia dalam menekan pelepasan FSH dan LH

### 5.2.2 Saran Untuk Masyarakat

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak lada hitam berpotensi menjadi kandidat terapi komplementer berbasis herbal pada gangguan fungsi reproduksi (disfungsi ereksi dan infertilitas) yang berkaitan dengan hiperglikemia. Namun, karena penelitian ini masih dilakukan pada hewan percobaan, penggunaannya pada manusia belum dapat direkomendasikan secara langsung dan masih memerlukan penelitian lanjutan, terutama uji keamanan, toksisitas, dosis efektif, serta uji klinis.

## DAFTAR PUSTAKA

- Afdal, Atmoko, W., Brodjonegoro, S.R. (2023) 'Disfungsi Ereksi'. Dalam: Atmoko, W. & Duarsa, G.W.K. (eds.) *Panduan Tata Laksana Disfungsi Seksual Pria*. Edisi pertama. Jakarta: Ikatan Ahli Urologi Indonesia (IAUI).
- Alrizaldi, A., Aisyah, R., and Jatmiko, S., (2021) 'Pengaruh Kopi Terhadap Jumlah Spermatozoa Tikus Galur Wistar Diabetik Yang Diinduksi *Alloxan* (*The Effect of Coffee on The Quantity of Spermatozoa of Diabetic Wistar Rats Inducted By Alloxan*)', *Herb-Medicine Journal*, 4(2), pp. 11–22.
- Alves, F.S., Cruz, J.N., Ramos, I.N.F., Brandão, D.L.N., Queiroz, R.N., da Silva, G.V., da Silva, G.V., Dolabela, M.F., da Costa, M.L. & Khayat, A.S. (2023) 'Evaluation of Antimicrobial Activity and Cytotoxicity Effects of Extracts of *Piper nigrum* L. and Piperine', *Separations*, 10(1), 21. Available at: <https://doi.org/10.3390/separations10010021>
- Asefa, A., Nigussie, T., Henok, A., Mamo, Y. (2019) 'Prevalence of sexual dysfunction and related factors among diabetes mellitus patients in Southwest Ethiopia', *BMC Endocrine Disorders*, 19(1), pp. 1–8. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12902-019-0473-1>.
- Ashokkumar, K., Muthusamy, M., Dhanya, M.K., Arjun, P., Thomas, D. (2021) 'Phytochemistry and therapeutic potential of black pepper [ *Piper nigrum* ( L .)] essential oil and piperine : a review'.
- Asif, S., Khan, A., Aslam, M. and Chaudhary, S.U. (2021) 'PCR Optimization for Beginners: A Step by Step Guide', *Research in Molecular Medicine*, 9(2), pp. 81–102.
- Awad, A., Iman, E., Araby, E., Albaiomy, R., 'Evaluation of metabolic gene expression using RT-PCR in rats', *Zagazig Veterinary Journal*, 49(3): pp. 270-282.
- Ayu, G., Hadibrata, E., Eka, A., Kurniawaty, E. (2024) 'Pengaruh Pemberian Ekstrak Lada Hitam ( *Piper nigrum* L ) terhadap Libido ( Perilaku Seksual ) Model Tikus Putih Jantan ( *Rattus norvegicus* ) Diabetes Melitus The Effects Of Piper Nigrum L . ( Black Pepper Extract ) on Libido ( Sexual Behavior ) In a Male ', 14(1), pp. 1707–1712.
- Bahar, A., Elyasi, F., Moosazadeh, M., Afradi, G. (2020) 'Sexual dysfunction in men with

type II diabetes', *Caspian Journal of Internal Medicine*, 11(3), pp. 295–303. Available at: <https://doi.org/10.22088/cjim.11.3.295>.

Badan Kebijakan Pembangunan Kesehatan. Laporan Hasil Survei Kesehatan Indonesia (SKI) Tahun 2023. Jakarta: Kementerian Kesehatan Republik Indonesia; 2023.

Besong, E.E., Akhigbe, T.M., Ashonibare, P.J., Oladipo, A.A., Obimma, J.N., Hamed, M.A. *et al.* (2023) 'Zinc improves sexual performance and erectile function by preventing penile oxidative injury and upregulating circulating testosterone in lead-exposed rats', *Redox Report*, 28(1), pp. 1–11. Available at: <https://doi.org/10.1080/13510002.2023.2225675>.

Blumenfeld, A.J., Eyer, P.A., Helms, A.M., Buczkowski, G., & Vargo, E.L. (2022), 'Consistent signatures of urban adaptation in a native, urban invader ant *Tapinoma sessile*', *Molecular Ecology*, 31(18), pp. 4832 – 4850. Available at: <https://doi.org/10.1111/mec.16188>

Bong, D., Sohn, J., and Lee, S.-J.V. (2024) 'Brief guide to RT-qPCR', *Molecules and Cells*, 47(12), 100141. Available at: [doi:10.1016/j.mocell.2024.100141](https://doi.org/10.1016/j.mocell.2024.100141).

Booster Biological Technology (2020) 'ELISA Handbook: Principle, Troubleshooting, Sample Preparation and Assay Protocols'.

Brooks, D.C., Coon, J.S., Ercan, C.M., Xu, Xia., Dong, H., Levine, J.E. *et al.* (2020) 'Brain aromatase and the regulation of sexual activity in male mice', *Endocrinology (United States)*, 161(10), pp. 1–15. Available at: <https://doi.org/10.1210/endocr/bqaa137>.

Bustin, S.A., Ruijter, J.M., van den Hoff, M.J.B., Kubista, M., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Tran, N., Rödiger, S., Untergasser, A., Mueller, R., Nolan, T., Milavec, M., Burns, M.J., Huggett, J.F., Vandesompele, J. and Wittwer, C.T. (2025) 'MIQE 2.0: Revision of the Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments Guidelines', *Clinical Chemistry*, 71(6), pp. 634–651. Available at: [doi:10.1093/clinchem/hvaf043](https://doi.org/10.1093/clinchem/hvaf043).

Chen, L., Shi, G.R., Huang, D.D., Li, Y., Ma, C.C., Shi, Min. *et al.* (2019) 'Male sexual dysfunction: A review of literature on its pathological mechanisms, potential risk factors, and herbal drug intervention', *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 112(January), p. 108585. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.01.046>.

Chen, X., Ge, F., Liu, J., Bao, S., Chen, Y., Li, D. *et al.* (2018) 'Diverged effects of

piperine on testicular development: Stimulating Leydig cell development but inhibiting spermatogenesis in rats', *Frontiers in Pharmacology*, 9(MAR), pp. 1–13. Available at: <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00244>.

Cheng, Y., Yang, Z., Shi, J., Yang, J., Zhao, J., He, Y. *et al.* (2020) 'Total flavonoids of Epimedium ameliorates testicular damage in streptozotocin-induced diabetic rats by suppressing inflammation and oxidative stress', *Environ Toxicol*, 35:268–76.

Chinta, G., Coumar, M.S., Periyasamy, L. (2017) 'Reversible testicular toxicity of piperine on male albino rats', *Pharmacognosy Magazine*, 13(Suppl 3), pp. S525–S532. Available at: [https://doi.org/10.4103/pm.pm\\_405\\_16](https://doi.org/10.4103/pm.pm_405_16).

Cilio, S., Rienzo, M., Villano, G., Mirto, B.F., Giampaglia, G., Capone, F. *et al.* (2022) 'Beneficial Effects of Antioxidants in Male Infertility Management: A Narrative Review', *Oxygen*, 2(1), pp. 1–11. Available at: <https://doi.org/10.3390/oxygen2010001>.

Clayton, A.H., Kingsberg, S.A., Goldstein, I. (2018) 'Evaluation and Management of Hypoactive Sexual Desire Disorder', *Sexual Medicine*, 6(2), pp. 59–74. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.esxm.2018.01.004>.

Conn, A., Hodges, K.R. (2023) 'Sexual dysfunction in women', *MSD Manual Consumer*

Corona, G. and Maggi, M. (2022) 'The role of testosterone in male sexual function', *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 23(6), pp. 1159–1172. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11154-022-09748-3>.

Cunha, G.R., Sinclair, A., Rlicke, W.A., Robboy, S.J., Cao, M., Baskin, L.S. (2019) 'Reproductive tract biology: of mice and men', *Differentiation*, 110, pp. 49–63. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.diff.2019.07.004>.

Escobar, M.D. dan Hunt, J.L. (2017) 'A Cost-Effective RNA Extraction Technique from Animal Cells and Tissue Using Silica Columns', *Journal of Biological Methods*, 4(2), p. 1. Available at: <https://doi.org/10.14440/jbm.2017.184>.

Das, P.K., Mukherjee, J., Banerjee, D. (2023) 'Spermatogenesis and Semen' *Textbook of Veterinary Physiology*, Available at: [https://doi.org/10.1007/978-981-19-9410-4\\_20](https://doi.org/10.1007/978-981-19-9410-4_20)

Decroli, E. (2018) 'Testosteron and The Benefit For Men's Health', *Bagian Ilmu Penyakit Dalam Fak. Kedokteran Unand/ RSUP Dr. M. Djamil Padang*, 51(1), p. 51.

Available at: [http://repo.unand.ac.id/21869/1/Testosteron and the Benefit for Men](http://repo.unand.ac.id/21869/1/Testosteron%20and%20the%20Benefit%20for%20Men).

- Defeudis, G., Mazzilli, R., Tenuta, M., Rossini, G., Zamponi, V., Olana, S. *et al.* (2022) ‘Erectile Dysfunction and Diabetes: A Melting Pot of Circumstances and Treatments’, *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 38(2), pp. 1–25. Available at: <https://doi.org/10.1002/dmrr.3494>.
- Dina, M.S., Dasrul, S., Wahyuni, S., Armansyah, T. and Ismail (2017) ‘Penurunan Jumlah Sel Leydig dan Sel Sertoli Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Strain Wistar Setelah Pemberian Formalin’, *Jurnal Ilmiah Mahasiswa Veteriner*, 1(2), pp. 203–209. Available at: <http://www.jim.unsyiah.ac.id/FKH/article/view/3145>
- Dludla, P. V., Cirilli, I., Marcheggiani, F., Silvesui, S., Orlando, P., Muvhulawa, N. *et al.* (2023) ‘Bioactive Properties, Bioavailability Profiles, and Clinical Evidence of the Potential Benefits of Black Pepper (*Piper nigrum*) and Red Pepper (*Capsicum annum*) against Diverse Metabolic Complications’, *Molecules*, 28(18). Available at: <https://doi.org/10.3390/molecules28186569>.
- Du, H., Xie, H., Ma, M., Igarashi, Y., Luo, F. (2022) ‘Modified Methods Obtain High-Quality DNA and RNA from Anaerobic Activated Sludge at A Wide Range of Temperatures’, *Journal of Microbiological Methods*, 199(November 2021), p. 106532. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2022.106532>.
- Du, Z., Xu, S., Hu, S., Yang, H., Zhou, Z., Sidhu, K. *et al.* (2018) ‘Melatonin Attenuates Detrimental Effects of Diabetes on the Niche of Mouse Spermatogonial Stem Cells by Maintaining Leydig Cells’, *Cell Death and Disease*, 9(10). Available at: <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0956-4>.
- Ekaputri H., T.W., Sari, I.P. and Rizal, D.M. (2018) ‘The Effect of Ethanol Extract of *Piper nigrum* L. Fruit on Reproductive System in Adult Male Wistar Rats: A study of FSH, LH, Testosterone Level and Spermatogenic Cells’, *Indonesian Journal of Pharmacy*, 29(3), pp. 136–144. Available at: <https://doi.org/10.14499/indonesianjpharm29iss3pp136>.
- Emerald, B.S., Mohsin, S., Souza, C.D., John, A., Hasasna, H.E., Ojha, S. *et al.* (2022) ‘Diabetes Mellitus Alters the Immuno-Expression of Neuronal Nitric Oxide Synthase in the Rat Pancreas’, *International Journal of Molecular Sciences*, 23(9). Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms23094974>.
- Estefania C.I, Cahuana, G.M., Bedoya, F.J., Salguero-Aranda, C. and Tejedro, J.R. (2022) ‘The Role of Nitric Oxide in Stem Cell Biology’, *Antioxidants*, 11(3), 497. Available at: [doi:10.3390/antiox11030497](https://doi.org/10.3390/antiox11030497).

- Fani, F. *et al.* (2024) 'Piperine Mitigates Oxidative Stress, Inflammation, and Apoptosis in the Testicular Damage Induced by Cyclophosphamide in Mice', *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 38(4), e23696. Available at: doi:10.1002/jbt.23696.
- Funk, S.D., Yurdagul, A., and Orr, A.W. (2012) 'Hyperglycemia and Endothelial Dysfunction in Atherosclerosis: Lessons from Type 1 Diabetes', *International Journal of Vascular Medicine*, 2012. Available at: <https://doi.org/10.1155/2012/569654>.
- Gandhi, V., O'Brien, M.H. and Yadav, S. (2020) 'High-Quality and High-Yield RNA Extraction Method From Whole Human Saliva', *Biomarker Insights*, 15. Available at: <https://doi.org/10.1177/1177271920929705>.
- Genchi, V.A., Rossi, E., Lauriola, C., D'Oria, R., Palma, G., Borrelli, A., Caccioppoli, C., Giorgino, F., Cignarelli, A. (2022) 'Adipose Tissue Dysfunction and Obesity-Related Male Hypogonadism', *International Journal of Molecular Sciences*. 23(15), pp. 8194. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms23158194>
- Gianatti, E.J. and Grossmann, M. (2020) 'Testosterone Deficiency in Men with Type 2 Diabetes: Pathophysiology and Treatment', *Diabetic Medicine*, 37(2), pp. 174–186. Available at: <https://doi.org/10.1111/dme.13977>.
- Gorgani, L., Mohammadi, M., Najafpour, G.D., Nikzad, M. (2017) 'Piperine—The Bioactive Compound of Black Pepper: From Isolation to Medicinal Formulations', *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(1), pp. 124–140. Available at: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12246>.
- Goyal, R., Singhal, M. & Jialal, I. (2023) *Type 2 Diabetes*. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. (Updated 23 June 2023). Available at: NCBI Bookshelf (NBK513253).
- Grande, G., Barrachina, F., Soler-Ventura, A., Jodar, M., Mancini, F., Marana, R., Chiloiro, S., Pontecorvi, A., Oliva, R. & Milardi, D. (2022) 'The Role of Testosterone in Spermatogenesis: Lessons From Proteome Profiling of Human Spermatozoa in Testosterone Deficiency', *Frontiers in Endocrinology*, 13, 852661. Available at: <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.852661>.
- Gonzalez, M., Clayton, S., Wauson, E., Christian, D. and Tran, Q.-K. (2025) 'Promotion of Nitric Oxide Production: Mechanisms, Strategies, and Possibilities', *Frontiers in Physiology*, 16, 1545044. Available at: doi: 10.3389/fphys.2025.1545044.

- Gul, A., Altinay, S., Kabasakal, L., Yavuz, A., Semercioz, A., Serefoglu, E.C. (2020) 'Effect of Tadalafil on Penile Nitric Oxide Synthase and Corporal Smooth Muscle in Rats Under Dutasteride Treatment', *Aging Male*, 23(2), pp. 161–167. Available at: <https://doi.org/10.1080/13685538.2020.1739019>.
- Guo, Z., Liu, H., Zhao, D., Wang, X., Zang, Z., Wang, G. et al. (2025) 'Piperine Ameliorates Diabetic Mellitus Erectile Dysfunction by Reducing Oxidative Stress and Apoptosis Through the PI3K/AKT/NRF2 Signaling Pathway', *Food Bioscience*, 66, 106326. Available at: doi: 10.1016/j.fbio.2025.106326.
- Hajjar, T., Soleymani, F. and Vatanchian, M. (2020) 'Protective Effect of Vitamin C and Zinc as an Antioxidant Against Chemotherapy-Induced Male Reproductive Toxicity Sexual Behavior Assessment Material and Methods Animals', 13(2), pp. 138–143. Available at: <https://doi.org/10.25122/jml-2019-0107>
- Hasim, Faridah, D.H., Safithri, M., Husnawati, Setiyono, A., Manshur, H.A. (2020) 'Aktivitas Penurunan Kadar Glukosa pada Tikus yang Diinduksi *Alloxan* dari Ekstrak Air Angkak, Bekatul, dan Kombinasinya', *Warta Industri Hasil Pertanian*, 37(2), p. 172. Available at: <https://doi.org/10.32765/wartaihp.v37i2.5460>.
- He, Z., Yin, G., Quentin, Q., Zeng, Q., Duan, J. (2021) 'Diabetes Mellitus Causes Male Reproductive Dysfunction: A review of the evidence and mechanisms', *In Vivo*, 35(5), pp. 2503–2511. Available at: <https://doi.org/10.21873/INVIVO.12531>.
- Hermawan, B., Nanda, R.D., Andriya, N.N., Jakaria (2024) 'Penggunaan Metode *Quantitative Polymerase Chain Reaction* (qPCR) untuk Deteksi Fragmen DNA Babi pada Produk Olahan Daging', *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia*, 29(4), pp 527-532. Available at: 10.18343/jipi.29.4.527
- Hu, L., Wei, S., Wu, Y., Li, S., Wang, X. (2021) 'MicroRNA Regulation of the Proliferation and Apoptosis of Leydig Cells in Diabetes', *Molecular Medicine*, 27(1). Available at: <https://doi.org/10.1186/s10020-021-00370-8>.
- Huang, R., Chen, J., Guo, B., Jiang, C., Sun, W. (2024) 'Diabetes-Induced Male Infertility: Potential Mechanisms and Treatment Options', *Molecular Medicine*, 30(1). Available at: <https://doi.org/10.1186/s10020-023-00771-x>.
- Hu, T. W. E. (2017) Pengaruh Ekstrak Etanol Buah Lada Hitam (*Piper nigrum* L.) Terhadap Sistem Reproduksi Tikus Wistar Jantan Dewasa: Kajian Pada Hormon FSH, LH, Testosteron dan Sel-Sel Spermatogenik. [Tesis]. Program Pascasarjana Fakultas Kedokteran Universitas Gajah Mada Yogyakarta.

- International Diabetes Federation. (2024). *IDF Diabetes Atlas (2024 Update)*. International Diabetes Federation. Diakses dari <https://diabetesatlas.org/>
- Imran, M., Samal, M., Qadir, A., Ali, A. and Mir, S.R. (2022) 'A critical review on the extraction and pharmacotherapeutic activity of piperine', *Polim Med*, 52(1), pp. 29–34. Available at: <https://doi.org/10.17219/pim/145512>.
- Implen (2015) 'NanoPhotometer® N50-Go/C40-Go User Manual', Munich: Implen GmbH
- Iskandar, P.F. (2021) 'Efektivitas Ekstrak Lada Hitam (*Piper nigrum* L) Terhadap Jumlah dan Motilitas Spermatozoa', *Jurnal Ilmiah Kesehatan Sandi Husada*, 10(2), pp. 683–688. Available at: <https://doi.org/10.35816/jiskh.v10i2.677>.
- Isvari, G., Hadibrata, E., Yuniyanto, A.E. and Susianti (2025) 'Pengaruh Pemberian Ekstrak Lada Hitam (*Piper nigrum* L.) terhadap Libido (Perilaku Seksual) Model Tikus Putih Jantan (*Rattus norvegicus*) Diabetes Melitus', *Medula*, 14(9), pp. 1707–1712.
- Janaszak JA., Płoska, A., Wierońska, J.M., Dobrucki, L.W. and Kalinowski, L. (2023) 'Endothelial Dysfunction Due to eNOS Uncoupling: Molecular Mechanisms as Potential Therapeutic Targets', *Cellular & Molecular Biology Letters*, 28, 21. Available at: doi: 10.1186/s11658-023-00423-2.
- Jumain, Ramadhan T., Asmawati. (2019) Efek Afrodisiak Ekstrak Buah Terung Ungu (*Solanum melongena* L) Terhadap Hewan Uji Tikus Jantan (*Mus musculus*).15(1):1–19.
- Kanedi, M., Sutyarso, Busman, H., Kesuma, C.I., Yulianty, Londe, M.L. (2019) Ameliorative Effect of Plant Extracts of Suruhan (*Peperomia pellucida*) on Blood Glucose And Libido of Male Mice Injected With *Alloxan*. *European Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*. 6(2):18-21.
- Khehra, N., Padda, I.S. and Zubair, M. (2025) 'Polymerase Chain Reaction (PCR)', in *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.
- Khodamoradi, K., *et al.* (2022) The role of leptin and low testosterone in obesity. *International Journal of Impotence Research*, 34 pp. 704–713. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41443-022-00534-y>.

- Khosravi, Z., Sedaghat, R., Baluchnejadmojarad, T., Roghani, M. (2019) Diosgenin Ameliorates Testicular Damage in Streptozotocin-Diabetic Rats Through Attenuation of Apoptosis, Oxidative Stress, and Inflammation. *Int Immunopharmacol*, 70:37–46.
- Kralik, P. and Ricchi, M. (2017) ‘A Basic Guide to Real Time PCR in Microbial Diagnostics: Definitions, Parameters, and Everything’, *Frontiers in Microbiology*, 8(FEB), pp. 1–9. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00108>.
- Kresnodi, E. (2017) ‘Stress Hiperglikemia’, *Unram Medical Journal*, 2(3), pp. 51–60. Available at: <https://doi.org/10.29303/jku.v2i3.70>.
- Kuang, J., Yan, X., Genders, A.J., Granata, C., Bishop, D.J. (2018) ‘An Overview of Technical Considerations when Using Quantitative Real-Time PCR Analysis of Gene Expression in Human Exercise Research’, *PLoS ONE*, 13(5), pp. 1–27. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196438>.
- Kumari, N., Khan, A., Shaikh, U., Lobes, K., Kumar, D., Suman, F. *et al.* (2021) ‘Comparison of Testosterone Levels in Patients With and Without Type 2 Diabetes’, *Cureus*, 13(7), pp. 7–11. Available at: <https://doi.org/10.7759/cureus.16288>.
- Kusumawati, I., Mahatmaputra, S., Hadi1, R., Rohmania, Rullyansyah, S., Yusuf H. (2021) Aphrodisiac Activity of Ethanolic Extracts from the Fruits of Three Pepper Plants from Piperaceae Family. Aphrodisiac Activity of Ethanolic Extracts from the Fruits of Three Pepper Plants from Piperaceae Family. 8(1):16–21.
- Lahimer, M., Capelle, S., Lefranc, E., Bosquet, D., Kazdar, N., Ledu, A. *et al.* (2025) ‘Micronutrient–Antioxidant Therapy and Male Fertility Improvement During ART Cycles’, *Nutrients*, 17(2), 324. Available at: doi: 10.3390/nu17020324.
- Leutner, M., Matzhold, C., Bellach, L., Krenn, E.W., Winker, R., Nistler, S. *et al.* (2022) ‘Increase in Testosterone Levels is Related to A Lower Risk of Conversion of Prediabetes to Manifest Diabetes in Prediabetic Males’, *Wiener Klinische Wochenschrift*, 134(1–2), pp. 1–6. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00508-021-01903-1>.
- Li, K., Yang, X. and Wu, T. (2022) ‘The Effect of Antioxidants on Sperm Quality Parameters and Pregnancy Rates for Idiopathic Male Infertility: A Network Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials’, *Frontiers in Endocrinology*, 13, 810242. Available at: doi: 10.3389/fendo.2022.810242.

- Li, L., Lin, W., Wang, Z., Huang, R., Xia, H., Li, Z., Deng, J., Ye, T., Huang, Y. and Yang, Y. (2024) 'Hormone Regulation in Testicular Development and Function', *International Journal of Molecular Sciences*, 25(11), 5805. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms25115805>.
- Li, X., Qiu, D., Chen, S., Li, J., Lou, C., Hu, D. *et al.* (2019) 'Evaluation of RNA Degradation in Pure Culture and Field Microcystis Samples Preserved with Various Treatments', *Journal of Microbiological Methods*, 164(April). Available at: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2019.105684>.
- Liang, J., Sun, J., Chen, P., Frazier, J., Benevield, V., Zhang, M. (2021) 'Chemical Analysis and Classification of Black Pepper (*Piper nigrum* L.) Based on Their Country of Origin Using Mass Spectrometric Methods and Chemometrics', *Food Research International*, 140, p. 109877. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109877>.
- Liu, S., Cao, R., Liu, L., Lv, Y., Qi, X., Yuan, Z. *et al.* (2022) 'Correlation Between Gut Microbiota and Testosterone in Male Patients With Type 2 Diabetes Mellitus', *Frontiers in Endocrinology*, 13(March), pp. 1–12. Available at: <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.836485>.
- Ma, J., Chen, Y., Si, Y., Qian, J., Wang, C., Jin, J. *et al.* (2024) 'The Multifaceted Nature of Diabetic Erectile Dysfunction: Uncovering the Intricate Mechanisms and Treatment Strategies', *Frontiers in Endocrinology*, 15. doi:10.3389/fendo.2024.1460033.
- Maresch, C.C., Stute, D.C., Alves, M.G., Oliveira, P.F., Krester, D.M.D., Linn, T. (2018) 'Diabetes-Induced Hyperglycemia Impairs Male Reproductive Function: A Systematic Review', *Human Reproduction Update*, 24(1), pp. 86–105. Available at: <https://doi.org/10.1093/humupd/dmx033>.
- Mattos, K., Pierre, K.J. and Tremblay, J.J. (2023) 'Hormones and Signaling Pathways Involved in the Stimulation of Leydig Cell Steroidogenesis', *Endocrines*, 4(3), pp. 573–594. Available at: doi: 10.3390/endocrines4030041.
- Mazzilli, F. (2022) 'Erectile Dysfunction: Causes, Diagnosis and Treatment: An Update', *Journal of Clinical Medicine*, 11(21). Available at: <https://doi.org/10.3390/jcm11216429>.
- Mescher, A.L. (2021) 'Junqueira's Basic Histology Text and Atlas, 16<sup>th</sup> Edition'. United States of America: *The MacGraw-Hill*.

- Mgbeahuruike, E.E., *et al.* (2017) 'Bioactive compounds from *Piper* species and their biological activities: A review', *Molecules*, 22(11) pp. 1869.
- Michaelsen, M.P., Poulsen, M., Bjerregaard, A.A., Borgstrøm, M., Poulsen, L.K., Chortsen, M.B. *et al.* (2025) 'The Effect of Dietary Supplements on Male Infertility in Terms of Pregnancy, Live Birth, and Sperm Parameters: A Systematic Review and Meta-Analysis', *Nutrients*, 17(10), 1710. Available at: doi: 10.3390/nu17101710.
- Moini, J. (2019) 'Type 2 Diabetes', *Epidemiology of Diabetes*. 1st edn. Elsevier, pp. 91–114. Available at: doi: 10.1016/B978-0-12-816864-6.00007-9.
- Mukherjee, P (2019) 'High-Performance Liquid Chromatography for Analysis of Herbal Drugs', *Quality Control and Evaluation of Herbal Drugs*.
- Muslim A (2017) 'Androgen Dihydrotestosterone dan Perannya pada Sistem Reproduksi Pria', *Veterina Medika*, 10(1), pp. 119–130.
- Mutiarahmi, C.N., Hartady, T., Lesmana, R. (2021) 'Kajian Pustaka : Penggunaan Tikus Sebagai Hewan Coba di Laboratorium yang Mengacu pada Prinsip Kesejahteraan Hewan', 10(1), pp. 134–145. Available at: <https://doi.org/10.19087/imv.2020.10.1.134>.
- National Center for Biotechnology Information (NCBI) (2021) *Piperine (CID 638024)*. PubChem Compound Summary. Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Piperine>
- Naufal, F.A., Krisnamurthi, B. and Baga, L.M. (2022) 'Analisis Faktor-Faktor yang Memengaruhi Produksi Lada di Provinsi Lampung', *Forum Agribisnis*, 12(1), pp. 1–11. Available at: <https://doi.org/10.29244/fagb.12.1.1-11>.
- Talin, J.N., Hadibrata, E., Rudiyantyo, W. and Windarti, I. (2025) 'The Effect Of Giving Black Pepper Ethanol Extract (*Piper Nigrum* L) on Blood Sugar Levels and Spermatogonia Count of Diabetes Model Male White Rats (*Rattus Novergicus*) Sprague Dawley Strain', *Medula*, 14(12), pp. 2297-2310.
- Noer, S.F., Hasan, T. and Fitriani (2020) 'Uji Efek Afrodisiaka Ekstrak Etanol Rimpang Jahe Merah (*Zingiber officinale* Rosc. var. rubrum) Asal Kabupaten Maros Terhadap Tikus (*Mus musculus*) Jantan', *Jurnal Farmasi dan Bahan Alam*, 8(1).

- Oduwole, O.O., Huhtaniemi, I.T. and Misrahi, M. (2021) 'The Roles of Luteinizing Hormone, Follicle-Stimulating Hormone and Testosterone in Spermatogenesis and Folliculogenesis Revisited', *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23). Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms222312735>.
- Partin, A.W., Dmochowski, R.R., Kavoussi, L.R., Peters, C.A. and Wein, A.J. (eds.) (2020) *Campbell Walsh Wein Urology*. 12th edn. Philadelphia, PA: Elsevier.
- Raghunath, I., Koland, M. and Narayanan, A.V. (2024) 'Piperine: A possible permeation enhancer for oral protein delivery', *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 14(4). Available at: [doi:10.7324/JAPS.2024.157160](https://doi.org/10.7324/JAPS.2024.157160).
- Rong, J., Leng, X., Jiang, K., Tan, J., Dong, M. (2025) 'Systemic Impacts of Diabetes on Spermatogenesis and Intervention Strategies: Multilayered Mechanism Analysis and Cutting-Edge Therapeutic Approaches' *Reprod Biol Endocrinol*, 23(122). Available at: <https://doi.org/10.1186/s12958-025-01454-4>
- Roy, D., Tomo, S., Modi, A., Purohit, P., Sharma, P. (2020) 'Optimising Total RNA Quality and Quantity by Phenol-Chloroform Extraction Method from Human Visceral Adipose Tissue: A Standardisation Study', *MethodsX*, 7(September), p. 101113. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.mex.2020.101113>.
- Ruiz CM., Torres-Granados, C., Tena-Sempere, M. and Roa, J. (2023) 'Central and Peripheral Mechanisms Involved in the Control of GnRH Neuronal Function by Metabolic Factors', *Current Opinion in Pharmacology*, 71, 102382. Available at: [doi: 10.1016/j.coph.2023.102382](https://doi.org/10.1016/j.coph.2023.102382).
- Russo, V., Chen, R. & Armamento-Villareal, R. (2021) 'Hypogonadism, Type-2 Diabetes Mellitus, and Bone Health: A Narrative Review', *Frontiers in Endocrinology*, 11, 607240. Available at: [doi:10.3389/fendo.2020.607240](https://doi.org/10.3389/fendo.2020.607240).
- Sala, L., Prattichizzo, F. and Ceriello, A. (2019) 'The Link Between Diabetes and Atherosclerosis', *European Journal of Preventive Cardiology*, 26(2\_suppl). Available at: <https://doi.org/10.1177/2047487319878373>.
- Septiyorini, N., Purwono, S. and Rizal, D.M. (2020) 'The Effect of Black Pepper Fruits (*Piper nigrum* L.) on the Increase of Erection', in. Available at: <https://doi.org/10.2991/ahsr.k.200204.054>.
- Setiawan, A., Setiawan, F., Juliasih, N. L. G. R., Widyastuti, W., Laila, A., Setiawan, W. A., Djailani, F. M., Mulyono, M., Hendri, J., & Arai, M. (2022). 'Fungicide Activity of Culture Extract from *Kocuria palustris* 19C38A1 against *Fusarium oxysporum*'.

*Journal of Fungi*, 8(3). Available at: <https://doi.org/10.3390/jof8030280>

- Sheriff, O.L., Olayemi, O., Taofeq, A.Y., Riskat, K.E., Ojochebo, D.E., Ibukunoluwa, A.O. (2019). A New Model for *Alloxan*-Induced Diabetes Mellitus in Rats. *J Bangladesh Soc Physiol.* 14(2): 56-62
- Sherwood, L. (2018) *Human Physiology: From Cells to Systems*. 9th edn. Boston, MA: Cengage Learning.
- Soelistijo, S. (2021) 'Pedoman Pengelolaan dan Pencegahan Diabetes Melitus Tipe 2 Dewasa di Indonesia 2021', *Global Initiative for Asthma*, p. 46. Available at: [www.ginasthma.org](http://www.ginasthma.org).
- Souza, I.L.L., Ferreira, E.S., Vasconcelos, L.H.C., Cavalcante, F.A. and Silva, B.A.A. (2022) 'Erectile Dysfunction: Key Role of Cavernous Smooth Muscle Cells', *Frontiers in Pharmacology*, 13, 895044. Available at: [doi:10.3389/fphar.2022.895044](https://doi.org/10.3389/fphar.2022.895044)
- Statello, L., Guo, C.J., Chen, L.L., Huarte, M. (2021) 'Corrections Author Correction : Gene Regulation by Long Non-Coding RNAs and its Biological Functions Author Correction : Two precious lessons from the HIV-1 RT structure', 22(January), p. 41580.
- Sun, H., Saeedi, P., Karuranga, S., Pinkepank, M., Ogurtsova, K., Duncam, B.B. *et al.* (2022) 'IDF Diabetes Atlas: Global, Regional and Country-Level Diabetes Prevalence Estimates for 2021 and Projections for 2045', *Diabetes Research and Clinical Practice*, 183. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2021.109119>.
- Susetyarini, E. (2020) 'Jumlah Sel Spermiogenesis Tikus Putih yang Diberi Tanin Daun Beluntas (*Pluchea indica*) sebagai Sumber Belajar', *Seminar Nasional X Pendidikan Biologi FKIP UNS*, pp. 274–282.
- Sutyarso, Kanedi, M. and Rosa, E. (2015) 'Effects of black pepper (*Piper nigrum* Linn.) extract on sexual drive in male mice', *Research Journal of Medicinal Plant*, 9(1), pp. 42–47. Available at: <https://doi.org/10.3923/rjmp.2015.42.47>.
- Sutyarso, Muhartono and Kanedi, M. (2016) 'The Effect of Fruit Extracts of Black Pepper on the Fertility Potential of Male Albino Mice', *American Journal of Medical and Biological Research*, 4(1), pp. 1–4. doi:10.12691/ajmbr-4-1-1. Available at: <http://pubs.sciepub.com/ajmbr/4/1/1>

- Syauqy, A. (2021) 'Evaluasi Kromatin Sperma Sebagai Indikator Kualitas Sperma', *Biologi Kedokteran*, 3(4), pp. 1646–1651. Available at: <https://jpa.ub.ac.id/index.php/jpa/article/view/290/300>.
- Szpirer, C. (2020) 'Rat models of human diseases and related phenotypes: a systematic inventory of the causative genes', *J Biomed Sci* 27, pp. 84. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12929-020-00673-8>.
- Tamrakar, D., Bhatt, D.S., Sharma, V.K., Poudyal, A.K., Yadav, B.K. (2021) 'Association Between Erectile Dysfunction and Type 2 Diabetes Mellitus', *Journal of Nepal Health Research Council*, 19(2), pp. 378–383. Available at: <https://doi.org/10.33314/jnhrc.v19i2.3394>.
- Tran, T.H., Ha, L.K., Nguyen, D.C., Dao, T.P., Nhan, L.T.H. and Nguyen, D.H. *et al.* (2019) 'The Study on Extraction Process and Analysis of Components in Essential Oils of Black Pepper (*Piper nigrum* L.) Seeds Harvested in Gia Lai Province, Vietnam', *Processes*, 7(2), 56. Available at: doi:10.3390/pr7020056.
- Tian, Y., Li, D., Luo, W., Zhu, Z., Li, W., Qian, Z. *et al.* (2020) 'Rapid Freezing Using Atomized Liquid Nitrogen Spray Followed by Frozen Storage Below Glass Transition Temperature for Cordyceps Sinensis Preservation: Quality Attributes and Storage Stability', *Lwt*, 123(September 2019), p. 109066. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109066>.
- Trinil S. (2018) *Spermatologi*. Malang: Universitas Brawijaya Press (UB Press).
- Tripathi, A.K., Ray, A.K. and Mishra, S.K. (2022) 'Molecular and Pharmacological Aspects of Piperine as A Potential Molecule for Disease Prevention and Management: Evidence from Clinical Trials', *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 11, 16. Available at: doi:10.1186/s43088-022-00196-1.
- Suresh, V., Reddy, A., (2021). 'Dysregulation of Nitric Oxide Synthases During Early and Late Pathophysiological Conditions of Diabetes Mellitus Leads to Amassing of Microvascular Impedement'. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*, 20:989–1002
- Walke, G., Gaurkar, S.S., Prasad, R., Lohakare, T., Wanjari, M. (2023) 'The Impact of Oxidative Stress on Male Reproductive Function: Exploring the Role of Antioxidant Supplementation', *Cureus*, 15(7), pp. 1–13. Available at: <https://doi.org/10.7759/cureus.42583>.

- Widaryanti, B., Khikmah, N. and Sulistyani, N. (2021) 'Efek Rebusan Sereh (*Cymbopogon citratus*) Terhadap Respon Stress Oksidatif Pada Tikus Wistar Jantan (*Rattus norvegicus*) Diabetes', *Life Science*, 10(2), pp. 173–181. Available at: <https://doi.org/10.15294/lifesci.v10i2.54457>.
- World Health Organization (2021)* WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 6th edn. Geneva: World Health Organization. Available at: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240030787>.
- Wowor, A.J., Tendean, L.E.N. and Rumbajan, J.M. (2021) 'Pengaruh Diabetes Mellitus Terhadap Kejadian Disfungsi Ereksi', *Jurnal e-Biomedik*, 9(2), pp. 222–228. Available at: <https://doi.org/10.35790/ebm.v9i2.31783>.
- Wu, Y., Ma, H. and Han, Y. (2021) 'Solubility and Thermodynamic Properties of Piperine in (Acetone/Ethyl Acetate + Ethanol) at 278.15 K to 318.15 K and its Correlation with the Jouyban-Acree and CNIBS/R-K models', *The Journal of Chemical Thermodynamics*, 161, 106555. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jct.2021.106555>.
- Wulandari, S., Haskas, Y. and Abrar, E.A. (2023) 'Gambaran Disparitas Diabetes Melitus Tipe 2 Ditinjau Dari Faktor Sosiodemografi', *Jurnal Ilmiah Mahasiswa & Penelitian Keperawatan*, 3(6), pp. 263–269.
- Zepeda, B. and Verdonk, J.C. (2022) 'RNA Extraction from Plant Tissue with Homemade Acid Guanidinium Thiocyanate Phenol Chloroform (AGPC)', *Current Protocols*, 2(1), pp. 1–14. Available at: <https://doi.org/10.1002/cpz1.351>.
- Zhao, W., Sun, J., Yao, L.-Y., Hang, D., Li, Y.-Q., *et al.* (2022) 'MYPT1 Reduction is A Pathogenic Factor of Erectile Dysfunction' *Communications Biology*, 5(1). Available at: <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03716-y>.
- Zhou, R., Wu, J., Liu, B., Jiang, Y., Chen, W., Li, J., He, Q. & He, Z. (2019) 'The Roles and Mechanisms of Leydig Cells and Myoid Cells in Regulating Spermatogenesis', *Cellular and Molecular Life Sciences*, 76(14), pp. 2681–2695. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03101-9>.
- Zou, R., Zhou, Y., Lu, Y., Zhao, Y., Zhang, N., Liu, J. *et al.* (2024) 'Preparation, Pungency and Bioactivity Transduction of Piperine from Black Pepper (*Piper nigrum* L.): A Comprehensive Review', *Food Chemistry*, 456, 139980. Available at: doi: 10.1016/j.foodchem.2024.139980.