

PENILAIAN FERTILITAS SPERMATOZOA TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*) DENGAN PEMBERIAN EKSTRAK TEH HITAM (*Camellia sinensis*)

(Skripsi)

Oleh:

ISVI ALIFFIA BINGGA



**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2021**

PENILAIAN FERTILITAS SPERMATOZOA TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*) DENGAN PEMBERIAN EKSTRAK TEH HITAM (*Camellia sinensis*)

**Oleh:
Isvi Aliffia Bingga**

Skripsi

Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Memperoleh Gelar
SARJANA KEDOKTERAN

Pada

Fakultas Kedokteran
Universitas Lampung



**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2021**

ABSTRACT

SPERMATOZOA FERTILITY ASSESSMENT OF WHITE RATS (*Rattus norvegicus*) WITH BLACK TEA (*Camellia sinensis*) EXTRACT

By

ISVI ALIFFIA BINGGA

Background: Black tea is one type of tea that contains theaflavins (flavonoid compounds) it has more hydroxyl groups (OH) which function as antioxidants. Antioxidants, as well as higher superoxide radical scavenging further constants. Flavonoids have a great influence on antioxidant activity. However, excessive levels of flavonoids that previously acted as antioxidants will also form Reactive Oxygen Species (ROS). One of the problems caused by increased ROS is male infertility. Infertility is a reproductive system problem that is described by the failure to get pregnant after 12 months or more and have sexual intercourse at least 2-3 times a week regularly without using contraception. Therefore, the authors wanted to know the effect of giving black tea extract on the quantity and quality of spermatozoa in male rats.

Methods: This study used a completely randomized design with 28 male white rats divided into 4 groups. The KP group was a group of rats that were not given black tea extract. The P1 group was the group that was given a low dose of 1.25% black tea extract, and was given an additional 1 ml/100 g of body weight black tea extract for 49 days. The P2 group was the group that was given a medium dose of 2.5% black tea extract, and was given an additional 1 ml/100 g of body weight black tea extract for 49 days. The P3 group was the group that was given a high dose of 5% black tea extract, given an additional 1 ml/100 g of body weight black tea extract for 49 days. The data obtained then analyzed using One-Way ANOVA and Post Hoc-LSD tests.

Results: The results of the One-Way ANOVA test showed p-value = 0.000 ($p < 0.05$) in the observation of the number, motility, and viability of spermatozoa. The results of the Post-Hoc LSD test showed significant differences in some groups except between KP and P1 also P1 and P2 in terms of the number, motility, and viability of spermatozoa.

Conclusion: There is an effect of giving black tea extract on fertility reduction, namely the number, motility, and viability spermatozoa of male rats.

Keywords: black tea, fertility, spermatozoa.

ABSTRAK

PENILAIAN FERTILITAS SPERMATOZOA TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*) DENGAN PEMBERIAN EKSTRAK TEH HITAM (*Camellia sinensis*)

Oleh

ISVI ALIFFIA BINGGA

Latar Belakang: Teh hitam merupakan jenis teh yang mengandung theaflavin yang berfungsi sebagai antioksidan, serta tetapan lanjut penangkapan radikal superoksida lebih tinggi. Flavonoid mempunyai pengaruh terhadap aktivitas antioksidan. Namun, kadar flavonoid yang berlebih yang sebelumnya sebagai antioksidan akan ikut membentuk *Reactive Oxygen Species* (ROS). Salah satu permasalahan yang disebabkan meningkatnya ROS adalah infertilitas pada laki-laki. Infertilitas adalah suatu permasalahan sistem reproduksi yang digambarkan dengan kegagalan untuk memperoleh kehamilan setelah 12 bulan atau lebih dan melakukan hubungan seksual minimal 2-3 kali seminggu secara teratur tanpa menggunakan alat kontrasepsi. Oleh karena itu, penulis ingin mengetahui pengaruh pemberian ekstrak teh hitam terhadap kuantitas dan kualitas spermatozoa tikus jantan.

Metode: Penelitian ini menggunakan rancangan penelitian Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 28 ekor tikus putih jantan yang dibagi menjadi 4 kelompok. Kelompok KP adalah kelompok tikus yang tidak diberi ekstrak teh hitam. Kelompok P1 adalah kelompok yang diberi ekstrak teh hitam dosis rendah 1,25%, diberikan tambahan ekstrak teh hitam 1 ml/100 g berat badan selama 49 hari. Kelompok P2 adalah kelompok yang diberi ekstrak teh hitam dosis menengah 2,5%, diberikan tambahan ekstrak teh hitam 1 ml/100 g berat badan selama 49 hari. Kelompok P3 adalah kelompok yang diberi ekstrak teh hitam dosis tinggi 5%, diberikan tambahan ekstrak teh hitam 1 ml/100 g berat badan selama 49 hari. Data yang didapat kemudian dianalisis menggunakan uji One-Way ANOVA dan Post Hoc-LSD.

Hasil: Hasil uji One-Way ANOVA menunjukkan nilai $p=0,000$ ($p<0,05$) pada pengamatan jumlah, motilitas, dan viabilitas spermatozoa. Hasil uji Post-Hoc LSD menunjukkan perbedaan bermakna pada sebagian kelompok kecuali antar KP dan P1 serta P1 dan P2 pada pengamatan jumlah, motilitas, dan viabilitas spermatozoa.

Kesimpulan: Terdapat pengaruh pemberian ekstrak teh hitam terhadap penurunan fertilitas yaitu jumlah, motilitas, dan viabilitas spermatozoa tikus jantan.

Kata Kunci: teh hitam, fertilitas, spermatozoa

Judul Skripsi : **PENILAIAN FERTILITAS SPERMATOZOA
TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*) DENGAN
PEMBERIAN EKSTRAK TEH HITAM (*Camellia
sinensis*)**

Nama Mahasiswa : **Isvi Aliffia Bingga**

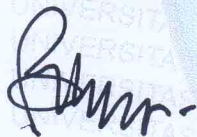
No. Pokok Mahasiswa : **1758011002**

Program Studi : **Pendidikan Dokter**

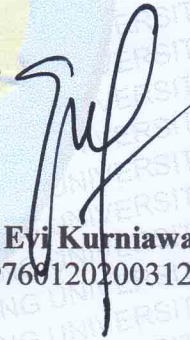
Fakultas : **Kedokteran**

MENYETUJUI

1. Komisi Pembimbing



Dr. Hendri Busman, M.Biomed
NIP. 195901011987031001



Dr. dr. Eyi Kurniawaty, M.Sc
NIP. 197601202003122001

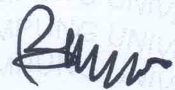
2. Dekan Fakultas Kedokteran

Prof. Dr. Dyah Wulan SRW, S.K.M., M.Kes
NIP. 19720628199702001

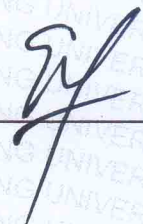


MENGESAHKAN

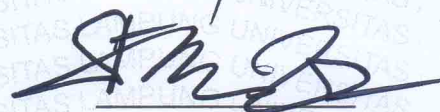
1. Tim penguji
Ketua : **Dr. Hendri Busman, M. Biomed**



Sekretaris : **Dr. dr. Evi Kurniawaty, S. Ked., M. Sc**



Penguji : **Prof. Dr. Sutyarso, M. Biomed**



2. Dekan Fakultas Kedokteran

Prof. Dr. Dyah Wulan SRW, S.K.M., M.Kes
NIP. 197206281997022001



Tanggal Lulus Ujian Skripsi : 20 Agustus 2021

LEMBAR PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan yang sebenarnya bahwa :

1. Skripsi dengan judul **“PENILAIAN FERTILITAS SPERMATOZOA TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*) DENGAN PEMBERIAN EKSTRAK TEH HITAM (*Camellia sinensis*)”** adalah hasil karya saya sendiri dan tidak melakukan penjiplakan atas karya penulis lain dengan cara yang tidak sesuai etika ilmiah yang berlaku atau disebut plagiarisme
2. Hak intelektual atas karya ilmiah ini diberikan sepenuhnya kepada Universitas Lampung

Atas pernyataan ini, apabila dikemudian hari ditemukan ketidakbenaran, saya bersedia menanggung akibat dan sanksi yang diberikan kepada saya

Bandar Lampung, 20 Agustus 2021
Surat Pernyataan



Isvi Aliffia Bingga

RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan di Kotabumi 12 Agustus 1998 sebagai anak pertama dari dua bersaudara dari pasangan Bapak Istiadani, S.H., M.M dan Ibu Sri Victoria Mega, S.Ag

Jenjang Pendidikan penulis diawali dari Taman Kanak-Kanak (TK) Kemala Bhayangkari pada tahun 2003 dan Taman Kanak-Kanak (TK) YWKA pada tahun 2004, Sekolah Dasar (SD) diselesaikan di SD Negeri 4 Kotabumi pada tahun 2010, Sekolah Menengah Pertama (SMP) diselesaikan di SMP Negeri 7 Kotabumi pada tahun 2013, dan di tahun 2016 menyelesaikan Pendidikan Sekolah Menengah Atas (SMA) di SMA Negeri 3 Kotabumi

Pada tahun 2017 penulis terdaftar sebagai mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Selama masa pendidikan penulis aktif dalam acara-acara yang diselenggarakan oleh pihak fakultas

وَوَجَدَكَ ضَالًّا فَهَدَىٰ ۖ وَوَجَدَكَ عَائِلًا فَأَغْنَىٰ ۗ

“Dan Dia mendapatimu sebagai seorang yang bingung, lalu Dia memberikan petunjuk. Dan Dia mendapatimu sebagai seorang yang kekurangan, lalu Dia memberikan kecukupan.”

(Q.S. Ad-Dhuha [93]: 7-8)

SANWACANA

Puji syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT yang telah melimpahkan segala rahmat dan karunia-Nya . Salawat serta salam semoga senantiasa tercurah kepada Rasulullah Muhammad SAW sehingga skripsi dengan judul “Penilaian Fertilitas Spermatozoa Tikus Putih (*Rattus Norvegicus*) Dengan Pemberian Ekstrak Teh Hitam (*Camellia Sinensis*)” dapat diselesaikan.

Dalam menyelesaikan skripsi ini, penulis banyak mendapat masukan, bantuan, dorongan, bimbingan, dan kritik dari berbagai pihak. Maka pada kesempatan ini dengan segala kerendahan hati penulis ingin menyampaikan rasa terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Prof. Dr. Karomani, M.Si., selaku Rektor Universitas Lampung.
2. Prof. Dr. Dyah Wulan SRW, SKM., M.Kes., selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Lampung.
3. Dr. Hendri Busman, M.Biomed selaku Pembimbing I atas ketersediaan waktunya untuk memberikan bimbingan, ilmu, arahan, bantuan, saran, nasihat serta motivasi kepada penulis dalam proses penyelesaian skripsi ini.
4. Dr. dr. Evi Kurniawaty, S.ked., M.Sc selaku Pembimbing II atas semua bimbingan, ilmu, kritik, saran, motivasi, dan kesediaannya meluangkan waktu untuk penulis dalam menyelesaikan skripsi ini.

5. Prof. Dr. Sutyarso, M.Biomed selaku Pembahas atas segala ilmu, arahan, dan saran untuk kebaikan penulisan skripsi ini.
6. Dr. dr. Jhons Fatriyadi Suwandi, S.ked., M. Kes selaku Pembimbing Akademik atas bimbingan, arahan dan motivasi selama penulis menyelesaikan Pendidikan di FK Unila.
7. Seluruh dosen dan karyawan Fakultas Kedokteran Universitas Lampung, terimakasih atas bantuan dan pengembangan wawasan ilmu pengetahuan yang telah diberikan kepada penulis.
8. Untuk yang istimewa Mama dan Papa, Istiadani, S.H.,M.M dan Sri Victoria Mega, S.Ag terima kasih sudah selalu memberikan yang terbaik, terima kasih atas segala doa, kasih sayang, dukungan, kesabaran, keikhlasan dan pengorbanan yang selama ini telah dan akan selalu diberikan kepada penulis dalam menjalani hari untuk meraih cita-cita. Semoga Mama dan Papa senantiasa diberikan kesehatan dan kebahagiaan agar dapat selalu mendampingi penulis untuk melanjutkan mimpi-mimpinya, menyelesaikan Pendidikan menjadi Dokter dan membanggakan Mama dan Papa.
9. Teruntuk adik tersayang penulis, Abiyyu Dava Bingga terima kasih atas segala bantuan dan pengertiannya selama ini. Semoga kita bisa mencapai kesuksesan.
10. Untuk luvlies sahabat-sahabat ku tersayang Arinda Rifana N, Erlicha Paramitha M, Nabila Rachmadita U, Fasya Azzahra, Zhafira Rima W. Terima kasih untuk selalu ada, terima kasih sudah saling menghibur dan menguatkan, terima kasih untuk segala bantuan dari awal hingga tahap ini, semoga kita

selalu dimudahkan untuk melanjutkan cita-cita dan menyelesaikan Pendidikan ini.

11. Untuk soul sahabat-sahabat ku tersayang Tasya, Febby, Trya, Junia dan sahabat ku Nabila AA. Terima kasih untuk segalanya karena sudah selalu ada dan penuh suka cita. Semoga kita bisa sukses di bidang kita masing-masing.
12. Teman-teman seperbimbingan 1 dan 2 dan seperbimbingan akademik. Terima kasih atas bantuan dan pengalaman selama menyelesaikan skripsi ini.
13. Teman-teman VI7REOUS, semua kelompok Tutorial dan CSL. Terima kasih atas pengalaman, kerjasama dan bantuan selama ini.
14. Terimakasih kepada seluruh pihak yang tidak bisa saya sebutkan satu persatu, orang-orang yang sudah datang dan pergi, yang sudah turut berperan dalam penulis menyelesaikan Pendidikannya.
15. Teruntuk diri saya sendiri, terimakasih sudah berjuang dan bertahan hingga saat ini. Perjalanan masih panjang terus semangat! Semoga kita bisa menebar manfaat, kebaikan, dan kebahagiaan untuk sesama. Aamiin.

Akhir kata penulis menyadari bahwa skripsi ini memiliki banyak kekurangan. Oleh karena itu penulis mengharapkan saran dan kritik yang bersifat membangun demi perbaikan skripsi ini. Penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi pembacanya.

Bandar Lampung, 20 Agustus 2021

Penulis,

Isvi Aliffia Bingga

DAFTAR ISI

DAFTAR ISI	i
DAFTAR TABEL	iv
DAFTAR GAMBAR	v
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	2
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.4 Manfaat Penelitian.....	5
1.4.1 Manfaat Untuk Peneliti.....	5
1.4.2 Manfaat Untuk Peneliti Lain	5
1.4.3 Manfaat Untuk Masyarakat	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Konsep Teori Fertilitas	6
2.1.1 Definisi Fertilitas	6
2.2 Infertilitas	7
2.2.1 Klasifikasi Infertilitas	7
2.2.2 Faktor-Faktor yang Menyebabkan Infertilitas.....	7
2.2.3 Patofisiologi Infertilitas	10
2.2.4 Manifestasi Klinis Infertilitas	11
2.3 Spermatogenesis	12
2.3.1 Definisi Spermatogenesis	12
2.3.2 Proses Spermatogenesis.....	12
2.3.3 Spermatozoa	14
2.3.4 Jumlah Spermatozoa.....	14
2.3.5 Motilitas Spermatozoa	14
2.3.6 Viabilitas Spermatozoa.....	15
2.4 Teh Hitam.....	16
2.4.1 Komponen Kimia Teh Hitam	16

2.4.2 Flavonoid	17
2.4.3 Tanin	18
2.4.4 Spesies Oksigen Reaktif (ROS)	19
2.4.4.1 Sumber Spesies Oksigen Reaktif (ROS) dan Kaitannya dengan Infertilitas	20
2.4.5 Teh Hitam dan Infertilitas	22
2.4.5.1 Proses Terjadinya Infertilitas oleh Senyawa Flavonoid	24
2.5 Kerangka Penelitian	27
2.5.1 Kerangka Teori	27
2.5.2 Kerangka Konsep	28
2.6 Hipotesis	28
BAB III METODE PENELITIAN	29
3.1 Desain Penelitian	29
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian	29
3.2.1 Tempat Penelitian	30
3.2.2 Waktu Penelitian	30
3.3 Populasi dan Sampel	30
3.3.1 Populasi Penelitian	30
3.3.2 Perkiraan Besar Sampel	30
3.3.3 Teknik Pengambilan Sampel	32
3.3.4 Kriteria Inklusi dan Eksklusi	33
3.3.4.1 Kriteria Inklusi	33
3.3.4.2 Kriteria Eksklusi	33
3.4 Variabel Penelitian	34
3.4.1 Variabel Bebas	34
3.4.2 Variabel Terikat	34
3.5 Definisi Operasional	34
3.6 Alat dan Bahan Penelitian	35
3.6.1 Alat Penelitian	35
3.6.2 Bahan Penelitian	36
3.7 Cara Kerja Identifikasi Teh Hitam	36
3.8 Pembuatan Ekstrak Teh Hitam	36
3.9 Prosedur Perlakuan Hewan Coba	37
3.9.1 Prosedur Pemeliharaan Hewan Coba	37
3.9.2 Masa Adaptasi	37
3.9.3 Pengelompokan Hewan Coba	38

3.9.4	Prosedur Pembedahan	38
3.9.5	Pengambilan dan Pengamatan Spermatozoa.....	39
3.10	Alur Penelitian.....	42
3.11	Analisis Data	43
3.12	<i>Dummy Table</i>	44
3.13	<i>Ethical Clearence</i>	44
BAB IV	HASIL DAN PEMBAHASAN.....	46
4.1	Hasil.....	46
4.1.1	Jumlah Spermatozoa.....	47
4.1.2	Motilitas Spermatozoa	49
4.1.3	Viabilitas Spermatozoa.....	51
4.2	Pembahasan	53
BAB IV	KESIMPULAN	59
5.1	Kesimpulan.....	59
5.2	Saran.....	59
DAFTAR PUSTAKA	60
LAMPIRAN	65

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Definisi Operasional.....	35
Tabel 2. <i>Dummy Table</i>	43
Tabel 3. Rerata Jumlah Spermatozoa Tikus	47
Tabel 4. Uji <i>Post-Hoc</i> LSD Jumlah Spermatozoa.....	48
Tabel 5. Rerata Motilitas Spermatozoa Tikus	49
Tabel 6. Uji <i>Post-Hoc</i> LSD Motilitas Spermatozoa.....	51
Tabel 7. Rerata Viabilitas Spermatozoa Tikus	51
Tabel 8. Uji <i>Post-Hoc</i> LSD Viabilitas Spermatozoa	53

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Kerangka Teori	27
Gambar 2. Kerangka Konsep	28

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Teh (*Camellia sinensis*) merupakan minuman yang sangat digemari di dunia termasuk pula di Indonesia, bagi hampir seluruh masyarakat Indonesia meminum teh sudah menjadi kebiasaan sehari-hari. (Anggraini, 2017). Teh (*Camellia sinensis*) bila dibandingkan dengan minuman lain juga memiliki segudang manfaat. Salah satu manfaat yang diperoleh dari minum teh adalah dapat memberikan rasa segar. Indonesia sendiri merupakan salah satu produsen teh di dunia dan memiliki banyak perkebunan teh yang tersebar di Indonesia seperti Jawa Barat, Jawa Tengah, dan Sumatera. Aroma teh yang harum serta rasa khas yang membuat minuman ini banyak digemari oleh masyarakat Indonesia. Minuman teh yang dikonsumsi masyarakat dibuat dengan cara menyeduh daun, pucuk daun, dan tangkai daun yang dikeringkan (Rossi, 2010). Berdasarkan proses pengolahannya, teh dibagi menjadi teh hijau, teh oolong, dan teh hitam. Teh hijau merupakan teh yang tidak melalui tahap fermentasi, teh oolong merupakan teh yang melalui setengah tahap fermentasi, sedangkan teh hitam merupakan teh yang melalui proses fermentasi/oksidasi enzimatis yang penuh (Anggraini, 2017).

Teh hitam merupakan teh yang mengandung theaflavin yang memiliki efek antioksidan yang lebih kuat dibandingkan dengan vitamin C, vitamin E, PG,

dan katein teh hijau karena memiliki gugus hidroksi (OH) lebih banyak yang berfungsi sebagai antiradikal bebas atau antioksidan, serta tetapan lanjut penangkapan radikal superoksida lebih tinggi (Krisna et al., 2015 ; Susanto et al., 2014). Teh hitam disebut juga teh merah oleh bangsa Cina, Jepang, dan Korea. Teh hitam merupakan jenis teh yang paling populer di kawasan Asia termasuk Indonesia. Teh hitam lebih lama mengalami oksidasi daripada teh-teh lainnya. Jenis teh ini memiliki aroma kuat dan dapat bertahan lama jika disimpan dengan baik (Rossi, 2010).

Flavonoid yang terkandung di dalam teh hitam antara lain Catechin (0,49mg/100g), Epicatechin gallat (0.64 mg/100g), Epigallocatechin (0.55 mg/100g), Epigallocatechin gallate (1,01 mg/100g), Theaflavin (0,35 mg/100g), Theaflavin-3-3'-digallate (0,43 mg/100g), Theaflavin-3'-gallate (0,41 mg/100g), Thearubigins (49, 03 mg/100g), Kaempferol (1,25 mg/100g), Myricetin (0,33 mg/100g) dan Quercetin (2,84 mg/100g). Sejumlah penelitian menunjukkan bahwa flavonoid mempunyai pengaruh yang besar terhadap aktivitas antioksidan. Antioksidan berhubungan erat dengan penumpukan spesies oksigen reaktif (ROS) (senyawa pengoksidasi turunan oksigen, seperti superoxide anion (O_2^-), hydroxyl radicals ($OH\cdot$), dan peroxy radicals (RO_2), serta hydrogen peroxide (H_2O_2)), dimana jumlah dan gugus hidroksil antioksidan akan mempengaruhi kekuatan antioksidan (Celik dan Arinc , 2010).

Salah satu permasalahan yang disebabkan karena meningkatnya ROS adalah infertilitas pada laki-laki. Diperkirakan bahwa hampir 25% dari laki-laki

infertil memiliki konsentrasi ROS yang banyak dalam cairan semen. Produksi ROS yang berlebihan menyebabkan peroksidasi asam lemak tak jenuh yang diperlukan untuk motilitas sperma dan peristiwa fusi membran, sehingga menyebabkan hilangnya motilitas sperma, merusak reaksi akrosom dan atau kemampuan fusioosit-sperma (Lobascio et al., 2015). Infertilitas merupakan salah satu permasalahan global yang mempengaruhi lebih dari 80 juta orang di dunia. Terjadi sekitar 15% pada pasangan suami- istri. Insiden infertilitas meningkat 40 tahun terakhir. Infertilitas terjadi pada laki-laki sebanyak 50% baik sebagai problem primer maupun sebagai problem kombinasi dengan pasangan wanitanya (Rahmawati, 2013). Pengertian klinis infertilitas yang digunakan WHO adalah suatu permasalahan sistem reproduksi yang digambarkan dengan kegagalan untuk memperoleh kehamilan setelah 12 bulan atau lebih dan melakukan hubungan seksual minimal 2-3 kali seminggu secara teratur tanpa menggunakan alat kontrasepsi (Oktarina et al., 2014).

Teh (*Camellia sinensis*) yang merupakan tanaman tradisional dan telah lama dikenal masyarakat sebagai bahan dasar pembuatan minuman teh juga merupakan tumbuhan obat yang mendukung pemanfaatan pengobatan tradisional. Banyak masyarakat sekarang yang cenderung memanfaatkan pengobatan tradisional atas kesadaran untuk kembali ke alam sebagai bagian dari penerapan pola hidup alami (Rossi, 2010). Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan sebelumnya menunjukkan bahwa pemberian ekstrak teh hitam sebanyak 1 ml/100 g bb pada mencit jantan dewasa secara oral menyebabkan terjadinya penurunan berat epididimis disebabkan karena terjadinya

kerusakan membran sel epididimis akibat kandungan/dosis flavonoid yang berlebih yang bertindak sebagai antioksidan membentuk *Reactive Oxygen Species* (ROS). Antioksidan dan ROS akan sama-sama merusak membran sel sehingga sel epididimis menjadi rusak dan proses metabolisme tidak berjalan sebagaimana mestinya. Akibatnya sel/organ menjadi kecil yang ditandai dengan berkurangnya berat dan menyebabkan kematian dari sel/organ. Peningkatan kadar ROS akan menghasilkan stress oksidatif akibat kadar ROS melampaui batas pertahanan antioksidan tubuh sehingga akan menyebabkan kerusakan sel, jaringan dan organ (Sikka, 2004).

1.2 Rumusan masalah

Berdasarkan uraian pada latar belakang, rumusan masalah pada penelitian ini adalah, “apakah terdapat pengaruh pemberian ekstrak teh hitam terhadap fertilitas spermatozoa tikus jantan? “.

1.3 Tujuan penelitian

Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak teh hitam terhadap kuantitas dan kualitas spermatozoa tikus jantan.

1.4 Manfaat penelitian

1.4.1 Manfaat Untuk Peneliti

Sebagai wujud pengaplikasian disiplin ilmu yang telah dipelajari sehingga dapat mengembangkan wawasan keilmuan peneliti, dan membuktikan ada

tidaknya hubungan antara pengaruh pemberian ekstrak teh hitam terhadap fertilitas spermatozoa tikus jantan.

1.4.2 Manfaat Untuk Peneliti Lain

Bagi peneliti selanjutnya, diharapkan agar dapat memberikan referensi agar dapat dikembangkan pada penelitian di masa mendatang untuk penelitian lebih lanjut tentang fokus yang serupa.

1.4.3 Manfaat Untuk Masyarakat

Untuk memberi informasi akan pengaruh pemberian ekstrak teh hitam terhadap fertilitas spermatozoa tikus jantan.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Konsep Teori Fertilitas

2.1.1. Definisi Fertilitas

Fertilitas adalah jumlah kelahiran hidup (Live birth) dari seorang wanita atau sekelompok wanita. Atau dengan kata lain fertilitas adalah kemampuan seorang wanita atau sekelompok wanita untuk memberikan keturunan yang diukur dengan bayi lahir hidup (hasil nyata). Wanita fertil adalah wanita yang pernah melahirkan bayi lahir hidup, tetapi wanita yang pernah hamil belum tentu fertil. Disamping istilah fertilitas ada juga istilah fekunditas (fecundity) sebagai petunjuk kepada kemampuan fisiologis dan biologis seorang perempuan untuk menghasilkan anak lahir hidup (Mantra, 2006). Fertilitas merupakan jumlah dari anak yang dilahirkan hidup dengan pengertian bahwa anak yang pernah dilahirkan dalam kondisi hidup menunjukkan tanda-tanda kehidupan. Jika anak pada saat dilahirkan dalam kondisi hidup kemudian meninggal pada waktu masih bayi tetap dikatakan anak lahir hidup (ALH) (Sukarno, 2010).

2.2 Infertilitas

Infertilitas adalah gangguan sistem reproduksi yang menyebabkan kegagalan untuk mencapai kehamilan klinis setelah 12 bulan atau lebih berhubungan intim secara teratur tanpa menggunakan kontrasepsi (WHO, 2004).

2.2.1 Klasifikasi Infertilitas

Menurut Saraswati (2015) infertilitas diklasifikasikan sebagai berikut:

1. Infertilitas primer: bila suatu pasangan, dimana istri belum hamil walau telah berusaha selama satu tahun atau lebih dengan hubungan seksual yang teratur dan adekuat tanpa kontrasepsi.
2. Infertilitas sekunder: bila suatu pasangan, dimana sebelumnya istri telah hamil, tapi kemudian tidak hamil lagi walau telah berusaha untuk memperoleh kehamilan satu tahun atau lebih dan pasangan tersebut telah melakukan hubungan seksual secara teratur dan adekuat tanpa kontrasepsi.

2.2.2 Faktor-Faktor yang Menyebabkan Infertilitas

A. Faktor Usia

Usia sangat berpengaruh pada kesuburan seorang wanita, seiring dengan bertambahnya usia maka kemampuan indung telur untuk menghasilkan sel telur akan mengalami penurunan. Bertambahnya usia pada pria juga menyebabkan penurunan kesuburan. Pria terus menerus memproduksi sperma sepanjang hidupnya, akan tetapi morfologi sperma mereka mulai menurun (Saraswati, 2015).

B. Faktor Frekuensi Senggama

Fertilisasi (pembuahan) atau peristiwa terjadinya pertemuan antara spermatozoa dan ovum, akan terjadi bila koitus berlangsung pada saat ovulasi. Dalam keadaan normal sel spermatozoa masih hidup selama 1-3 hari dalam organ reproduksi wanita, sedangkan ovum seorang wanita umurnya lebih pendek lagi yaitu 1x24 jam. Sehingga fertilisasi masih mungkin jika ovulasi terjadi sekitar 1-3 hari sesudah koitus berlangsung dan koitus dilakukan pada waktu tersebut kemungkinan besar bisa terjadi pembuahan (Saraswati, 2015).

C. Faktor Masalah Reproduksi

Masalah pada sistem reproduksi yang mengarah pada infertilitas sekunder, seperti pada perempuan yang melahirkan dengan operasi caesar yang dapat menyebabkan jaringan parut yang mengarah pada penyumbatan tuba (Saraswati, 2015).

D. Faktor Gaya Hidup

Wanita dengan berat badan yang berlebihan sering mengalami gangguan ovulasi, karena kelebihan berat badan dapat mempengaruhi estrogen dalam tubuh dan mengurangi kemampuan untuk hamil. Pria yang gemar mengenakan celana ketat juga dapat mengalami gangguan pada motilitas sperma (Saraswati, 2015).

E. Faktor Pre testicular

Yaitu keadaan-keadaan diluar testis dan mempengaruhi proses spermatogenesis.

1. kelainan endokrin. infertilitas pria disebabkan karena adanya

kelainan endokrin antara lain:

- a. kelainan paras hipotalamus-hipopise seperti; tidak adanya sekresi gonadotropin menyebabkan gangguan spermatogenesis
 - b. kelainan tiroid. menyebabkan gangguan metabolisme androgen.
 - c. kelainan kelenjar adrenal, Congenital adrenal hyperplasi menyebabkan gangguan spermatogenesis.
2. Kelainan kromosom. Misal penderita sindroma klinefelter, terjadi penambahan kromosom X, testis” tidak berfungsi baik, sehingga spermatogenesis tidak terjadi.
 3. Varikokel, yaitu terjadinya pemanjangan dan dilatasi serta kelokan-kelokan dari pleksus pampiriformis yang mengakibatkan terjadinya gangguan vaskularisasi testis yang akan mengganggu proses spermatogenesis (Smith, 2008).

F. Faktor Post testikular

1. Kelainan epididimis dan funikulus spermaticus, dapat berupa absennya duktus deferens, duktus deferens tidak bersambung dengan epididimis, sumbatan dan lain-lain.
2. Kelainan duktus ejakulatorius, berupa sumbatan.
3. Kelainan prostat dan vesikula seminalis, yang sering adalah peradangan, biasanya mengenai kedua organ ini, tumor prostat dan prostatektomi.
4. Kelainan penis / uretra. berupa malformasi penis, aplasia, anomali orifisium uretra (epispadia ,hipospadia). anomali preputium (fimosis), dan lain-lain (Smith, 2008).

2.2.3 Patofisiologi Infertilitas

Beberapa penyebab dari gangguan infertilitas dari wanita di antaranya gangguan stimulasi hipofisis hipotalamus yang mengakibatkan pembentukan FSH dan LH tidak adekuat sehingga terjadi gangguan dalam pembentukan folikel di ovarium. Penyebab lain yaitu radiasi dan toksik yang mengakibatkan gangguan pada ovulasi. Gangguan bentuk anatomi sistem reproduksi juga penyebab mayor dari infertilitas, di antaranya cedera tuba dan perlekatan tuba sehingga ovum tidak dapat lewat dan tidak terjadi fertilisasi dari ovum dan sperma. Kelainan bentuk uterus menyebabkan hasil konsepsi tidak berkembang normal walaupun sebelumnya terjadi fertilisasi. Abnormalitas ovarium mempengaruhi pembentukan folikel. Sedangkan pada pria abnormalitas androgen dan testosteron diawali dengan disfungsi hipotalamus dan hipofisis yang mengakibatkan kelainan status fungsional testis. Gaya hidup memberikan peran yang besar dalam mempengaruhi infertilitas di antaranya merokok, penggunaan obat-obatan dan zat adiktif yang berdampak pada abnormalitas sperma dan penurunan libido. Konsumsi alkohol mempengaruhi masalah ereksi yang mengakibatkan berkurangnya pancaran sperma. Suhu di sekitar areal testis juga mempengaruhi abnormalitas spermatogenesis (Fritz, 2011).

2.2.4 Manifestasi Klinis Infertilitas

Manifestasi klinis infertilitas pada wanita ialah terjadi kelainan sistem endokrin, Hipomenore dan amenore, diikuti dengan perkembangan seks sekunder yang tidak adekuat menunjukkan masalah pada aksis ovarium hipotalamus hipofisis atau aberasi genetik. Wanita dengan sindrom turner biasanya pendek, memiliki payudara yang tidak berkembang, dan gonatnya abnormal. Wanita infertil dapat memiliki uterus, motilitas tuba dan ujung fimbrianya dapat menurun atau hilang akibat infeksi, adhesi, atau tumor dan Traktus reproduksi internal yang abnormal. Pada pria manifestasi klinis ialah riwayat terpajan benda-benda mutan yang membahayakan reproduksi (panas, radiasi, rokok, narkotik, alkohol, infeksi), status gizi dan nutrisi terutama kekurangan protein dan vitamin tertentu. Riwayat infeksi genitorurinaria, Hipertiroidisme dan hipotiroid, Tumor hipofisis atau prolactinoma, Disfungsi ereksi berat, Ejakulasi retrograd, Hypo / epispadia, Mikropenis, Andesensus testis (testis masih dalam perut / dalam liat paha, Gangguan spermatogenesis (kelainan jumlah, bentuk dan motilitas sperma), Hernia scrotalis (hernia berat sampai ke kantong testis), Varikokel (varises pembuluh balik darah testis) dan Abnormalitas cairan semen.

2.3 Spermatogenesis

2.3.1 Definisi Spermatogenesis

Spermatogenesis merupakan proses kompleks mengenai pembentukan sperma. Spermatogonia (sel germinativum primordial) berproliferasi menjadi spermatozoa, dan proses spermatogenesis sendiri membutuhkan waktu 64 hari dan terjadi didalam testis. Setiap hari terjadi tiga tahap utama yaitu proliferasi mitotik, meiosis, dan pengemasan yang akan menghasilkan beberapa ratus juta sperma matang (Sherwood, 2012). Proses spermatogenesis terjadi selama seorang pria berada dalam masa seksual aktif, dimulainya spermatogenesis berkisar diusia 13 tahun dan mulai berkurang diusia tua. Terjadinya proses tersebut pada tubulus seminiferus yang mana distimulasi oleh hormon gonadotropin dari hipofisis anterior (Guyton dan Hall, 2014).

2.3.2 Proses Spermatogenesis

Proliferasi mitotik dimulai dengan bermitosisnya sel spermatogonia yang menghasilkan sel anak berkromosom lengkap (46 kromosom) identik dengan sel induk. Satu sel anak hasil mitosis akan tetap berada di tepi luar tubulus seminiferus sebagai spermatogonium yang tidak berdiferensiasi, dan sel anak lain bergerak ke lumen lalu mengalami pembelahan mitosis sebanyak dua kali sehingga menghasilkan 4 spermatosit primer identik (Sherwood, 2012).

Tahap awal dari spermatogenesis adalah migrasi spermatogonia primitive berkumpul di tepi membrane basal epitel yang dikenal sebagai spermatogonia tipe A. Selanjutnya spermatogonia tipe A mengalami pembelahan menjadi spermatogonia tipe B dan akan bermigrasi diantara sel- sel sertoli untuk sampai ke lumen sentral sel tubulus seminiferus lalu akan mengalami modifikasi dan perubahan ukuran menjadi lebih besar yang selanjutnya membentuk spermatosit primer yang kemudian akan mengalami meiosis sehingga membentuk dua spermatosit sekunder. Kemudian selanjutnya spermatosit sekunder akan mengalami pembelahan membentuk spermatid dan berlanjut menjadi spermatozoa (Guyton dan Hall, 2014; Sherwood, 2015).

Selama masa perubahan dari spermatosit ke spermatid, 46 kromosom akan terbagi menjadi 2 yakni sejumlah 23 kromosom berada pada spermatid pertama dan 23 kromosom sisanya berada pada spermatid yang kedua. Didalamnya terdapat kromosom seks tersebut terdiri dari kromosom X yakni membawa jenis kelamin betina dan kromosom Y membawa jenis kelamin jantan. Saat proses meiosis kromosom X akan masuk ke satu spermatid dan kromosom Y akan masuk ke spermatid lainnya lalu kemudian secara berturut turut menjadi sperma betina dan sperma jantan, Seluruh proses spermatogenesis hingga menjadi spermatozoa terjadi dalam 74 hari (Guyton dan Hall, 2014; Sherwood, 2015).

2.3.3 Spermatozoa

Spermatozoa atau sel sperma adalah hasil produksi dari testis yang terdiri dari beberapa sel germinal yang sudah matang (Dorland, 2011). Spermatozoa adalah sel sperma laki-laki yang berfungsi dalam proses fertilisasi. Sel sperma terdiri atas kepala sperma dan satu buah ekor sperma yang memungkinkan sel sperma dapat bergerak secara bebas. Pada bagian kepala, sel sperma mengandung sedikit sitoplasma dan padat akan kromosom. Seperti sel kelamin lainnya, sel sperma bersifat haploid dan mengandung setengah kromosom khas dari spesies tersebut. (Chu, 2013).

2.3.4 Jumlah Spermatozoa

Jumlah spermatozoa pada saat ejakulasi dihitung dari konsentrasi spermatozoa per mililiter (ml) semen. Nilai terendah dari jumlah sperma (WHO, 2010).

2.3.5 Motilitas Spermatozoa

Motilitas sperma adalah refleksi perkembangan normal dan kematangan spermatozoa dalam epididimis. Motilitas spermatozoa pada manusia dikatakan normal apabila pergerakan aktif di dapatkan >50%, pergerakan lemah didapatkan <30%, dan tidak bergerak didapatkan <20% (WHO, 2010). Motilitas merupakan salah satu indikator penting dalam menentukan kualitas semen dan keberhasilan fertilitas

(Zulyazaini et al., 2016). Faktor-faktor yang memengaruhi motilitas sperma adalah usia, berat badan, stres, konsumsi alkohol, pekerjaan, radiasi gelombang elektromagnetik, dan infeksi (Henkel, 2011).

2.3.6 Viabilitas Spermatozoa

Viabilitas spermatozoa adalah ukuran ketahanan hidup sperma yang dapat diperkirakan dengan menilai integritas atau keutuhan membran sel sperma (WHO, 2010). Viabilitas adalah daya hidup spermatozoa, pemeriksaan viabilitas spermatozoa dapat dijadikan indikator integritas struktur membran spermatozoa (Sukmawati et al., 2014). Viabilitas memiliki korelasi dengan motilitas yang ditentukan oleh kekuatan membran plasma spermatozoa (Azzahra et al., 2016). Persentase normal viabilitas spermatozoa adalah >58% dikatakan hidup bila spermatozoa tidak menyerap warna, sebaliknya dikatakan mati bila spermatozoa menyerap warna (Wibisono, 2010).

Persentase hidup spermatozoa ditentukan oleh membran plasma yang utuh. Membran plasma spermatozoa berfungsi untuk melindungi organel spermatozoa dan transport elektrolit untuk metabolisme spermatozoa (Salmah, 2014). Metabolisme spermatozoa dapat mempengaruhi daya hidup spermatozoa karena pada spermatozoa yang memiliki aktivitas metabolisme tinggi menghasilkan asam laktat yang tinggi yang dapat membunuh spermatozoa (Varasofiari et al., 2013).

2.4. Teh Hitam

Tanaman teh (*Camellia sinensis*) yang merupakan tanaman yang secara tradisional yang telah lama dikenal masyarakat sebagai tanaman bahan dasar pembuatan minuman teh. Teh merupakan tanaman daerah tropis dan subtropis yang secara ilmiah dikenal dengan *Camellia sinensis*. Teh dapat tumbuh baik pada ketinggian antara 200-2000 meter di atas permukaan laut, dengan suhu cuaca antara 14-25 derajat celcius.

Berdasarkan proses pengolahannya, teh dibedakan menjadi tiga jenis, yaitu teh fermentasi (teh hitam), teh semi fermentasi (teh oolong), dan teh tanpa fermentasi (teh hijau). Teh hitam adalah jenis teh yang dibuat melalui proses pelayuan, penggilingan, oksimatis dan pengeringan. Teh hitam memiliki kandungan kafein yang lebih tinggi dibandingkan teh hijau (Rohdiana, 2015).

2.4.1 Komponen Kimia Teh Hitam

Teh hitam (*Camellia sinensis* O. K var *assamica* (mest.) merupakan salah satu minuman yang banyak dikonsumsi oleh masyarakat. Jenis teh ini dibuat melalui fermentasi oleh enzim polifenol oksidase yang dapat mengoksidasi enzimatis katekin dalam daun segar, sehingga memberi ciri khas teh hitam yaitu berwarna dan berasa tajam (Tuminah, 2004). Theaflavin dan thearubigin merupakan hasil oksidasi katekin akibat proses oksimatis pada pengolahan teh hitam. Polifenol utama dalam teh hitam adalah tanin dan flavonoid. Senyawa tersebut memiliki banyak gugus hidroksi (OH) yang dapat berfungsi sebagai antiradikal bebas atau antioksidan. Tanin dalam teh sebagian

besar tersusun atas katekin, epikatekin, epikatekin galat, epigalo katekin, epigalo katekin galat dan, galokatekin (Hartoyo, 2003). Sedangkan flavonoid dalam teh hitam terutama berupa flavonol yaitu quercetin, kempferol dan myricetin (Kartiko, 2003)

2.4.2 Flavonoid

Flavonoid adalah metabolit sekunder dari polifenol, ditemukan secara luas pada tanaman serta makanan dan memiliki berbagai efek bioaktif termasuk antivirus, anti-inflamasi (Qinghu Wang dkk, 2016), kardioprotektif, anti- diabetes, anti kanker, (M.M. Marzouk, 2016) anti penuaan, antioksidan dan lain-lain (Vanessa dkk, 2014). flavonoid dalam teh hitam terutama berupa flavonol yaitu quercetin, kempferol dan myricetin (Kartiko, 2003 : 24).

Flavonoid merupakan salah satu senyawa polifenol yang mempunyai sifat antioksidan. Antioksidan merupakan senyawa kimia yang dapat menyumbangkan satu atau lebih elektron kepada radikal bebas, sehingga radikal bebas tersebut dapat diredam dan tidak merusak sel tubuh (Sayuti dan Yenrina, 2015).

Flavonoid yang terkandung di dalam teh hitam antara lain Catechin (0,49 mg/100 g), Epicatechin gallat (0.64 mg/100g), Epigallocatechin (0.55 mg/100g), Epigallocatechin gallate (1,01 mg/100g), Theaflavin (0,35 mg/100g), Theaflavin-3-digallate (0,43 mg/100g), Theaflavin-gallate (0,41 mg/100g), Thearubigins (49, 03 mg/100g), Kaempferol

(1,25 mg/100g), Myricetin (0,33 mg/100g) dan Quercetin (2,84 mg/100g) (US Agriculture Department, 2003).

2.4.3 Tanin

Tanin di dalam teh merupakan senyawa aktif metabolit sekunder yang memiliki beberapa khasiat. Dari beberapa khasiat tersebut, tanin berada pada komponen bioaktif yaitu polifenol yang secara optimal terkandung di dalam daun teh yang murni. Tanin dalam teh hitam sebagian besar tersusun atas katekin, epikatekin, epikatekin galat, epigalo katekin, epigalo katekin galat dan, galokatekin (Hartoyo, 2003).

Daun teh yang murni tersebut mengandung senyawa tanin sekitar 5 - 15%. Pada penelitian sebelumnya mengenai karakterisasi konsentrasi tanin pada teh hitam menggunakan spektrofotometer UV-VIS, menggunakan sampel teh hitam sebanyak 5 gram, dimasukkan ke dalam wadah maserasi, kemudian ditambahkan pelarut 200 ml etanol 70% dan diaduk. Setelah itu wadah maserasi disimpan selama 18 jam. Kemudian diuapkan menggunakan rotari evaporator sampai diperoleh ekstrak cair. Selanjutnya dari ekstrak cair tersebut menghasilkan 25 mg kemudian dilarutkan kedalam aquades sebanyak 25 ml dan diaduk. Setelah itu dipipet 1 ml sampel teh yang sudah diekstrak kemudian dimasukkan kedalam labu yang berukuran 10 ml dan ditambahkan 7,5 ml aquabidestilata, setelah itu ditambahkan 0,5 ml pereaksi folin denis dan didiamkan selama 3 menit setelah itu ditambahkan 1 ml larutan

Na₂CO₃ jenuh dan diinkubasi selama 15 menit di dalam ruangan. Setelah itu diukur menggunakan Spektrofotometer untuk menentukan nilai absorbansi pada panjang gelombang daerah sinar tampak (400 – 800 nm). Hasil penelitian menunjukkan umlah konsentrasi tanin jika dikonversi ke dalam (mg) maka menjadi 3,155 mg pada teh hitam. Jumlah tanin ini sudah memenuhi syarat sebagai bahan pangan dan bermanfaat untuk kesehatan karena tanin maksimal dalam bahan makanan yang telah ditetapkan oleh Acceptable Daily Intake (ADI) adalah 560 mg/ kg berat badan per hari (Novita, 2018).

2.4.4 Spesies Oksigen Reaktif (ROS)

Proses spermatogenesis dapat terganggu akibat paparan radikal bebas yang dapat merusak membran sel, sehingga dapat terjadi gangguan morfologi sel sperma. Paparan spesies oksigen reaktif (ROS) secara terus menerus dapat menyebabkan disfungsi seluler, apoptosis dan nekrosis (Brittenham, 2011). Jaringan testis adalah salah satu jaringan yang sensitif baik terhadap radikal bebas ataupun ROS. Radikal bebas yang berikatan pada membran sel testis (spermatogonium, sel Sertoli dan sel Leydig) akan menyebabkan terjadinya peroksidasi lemak dan berbagai mekanisme lainnya yang dapat memicu terjadinya apoptosis ataupun nekrosis dari sel-sel tersebut (Wagner et al., 2018).

ROS dengan konsentrasi yang tinggi dapat memicu kerusakan oksidatif asam lemak tak jenuh ganda dalam membran plasma sperma dan ini kemudian memulai peroksidasi lipid cascade. Ketika peroksidasi lipid

terjadi, peroksida lipid menumpuk di permukaan sperma dan ini mengurangi fluiditas membran fosfolipid sperma yang menyebabkan kerja flagella sperma kurang efektif, sehingga mengurangi motilitas. Pengeluaran ROS yang berlebih dari mitokondria di midpiece juga dapat merusak sumber daya mitokondria untuk motilitas sperma sehingga menyebabkan penurunan motilitas. Oleh karena itu stres oksidatif memiliki kemampuan untuk menghasilkan infertilitas dengan mengganggu transit sperma yang melalui saluran reproduksi wanita. Selanjutnya, kerusakan membran akrosom akan mengurangi aktivitas acrosin dan menghambat kapasitas sperma menyatu dengan oosit, akibatnya menyebabkan kapasitas fertilisasi yang jelek (Tunc, 2010).

2.4.4.1 Sumber Spesies Oksigen Reaktif (ROS) dan Kaitannya dengan Infertilitas

Stres oksidatif berhubungan dengan ketidakseimbangan molekul oksidan dalam sel. Spesies oksigen reaktif mengacu pada molekul turunan oksigen yang sangat reaktif karena elektron bebas atau radikal. Kelompok molekul ini, yang memiliki waktu paruh nanodetik, termasuk superoksida (O_2^-), hidrogen peroksida (H_2O_2), radikal proksi ($ROO\cdot$), atau hidroksil ($OH\cdot$). Kurang umum tetapi juga ada dalam sperma sel adalah spesies nitrogen reaktif (RNS), yang meliputi oksida nitrat (NO), dinitrogen trioksida (N_2O_3), dan peroxinitrite ($ONOO^-$). Adanya stres oksidatif yang mempengaruhi fungsi sperma telah banyak dilaporkan, pada beberapa penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa hidrogen peroksida

memberikan dampak yang merugikan pada sperma (Bui *et al*, 2018). Pada spesies jantan, spesies oksigen reaktif dapat diproduksi baik endogen atau eksogen.

a. Sumber ROS Endogen

Spermatozoon merupakan sumber ROS karena aktivitas metaboliknya, dan sel sperma yang belum matang lainnya yang ada di dalam air semen juga merupakan sumber radikal bebas. Ketidakseimbangan dari ROS memiliki efek mengganggu. ROS dengan jumlah yang rendah diperlukan sel sperma untuk melakukan fungsi alami. Misalnya nitrat oksida dan hidrogen peroksida adalah senyawa yang diperlukan untuk mencapai kapasitas, serta memungkinkan reaksi akrosom, yang dikendalikan oleh ROS. Hiperaktivasi sperma atau interaksinya dengan oosit dimediasi pula oleh ROS, ROS berperan dalam kemampuan fertilisasi. Metabolisme sperma adalah sumber utama ROS. (Arami, 2020).

b. Sumber ROS Eksogen

Sumber ROS eksogen yang pertama adalah varikokel, varikokel merupakan dilatasi pleksus pampiniformis dari korda spermatika yang dianggap sebagai penyebab paling umum dari infertilitas pria. Insiden varikokel pada populasi umum adalah sekitar 15%, dan berbagai penelitian telah menunjukkan bahwa insiden di antara pria tidak subur adalah sekitar 35-44%, angka-angka ini meningkat hingga 45-81% dalam kasus infertilitas sekunder (Jensen *et al*, 2017). Penyebab selanjutnya adalah respon imun terhadap infeksi yang menyebabkan

peradangan jaringan sehingga mendorong infiltrasi leukosit. Leukosit merupakan sumber penting dari stres oksidatif, dan telah dijelaskan bahwa leukosit tunggal menghasilkan 1000 kali lebih banyak ROS daripada satu spermatozoa, melalui peningkatan produksi NADPH (O'Flaherty, 2020)

Penyebab umum lainnya adalah alkohol, tembakau, dan obat-obatan terlarang yang berkontribusi menyebabkan efek negatif yang serius pada organisme. Mengenai alkohol, penelitian pada tikus menyimpulkan hal itu terus berlanjut asupan alkohol menyebabkan penurunan konsentrasi glutathione testis berkurang, penurunan aktivitas testis superoksida dismutase, peningkatan konsentrasi malondialdehid testis, dan peningkatan dalam kerusakan DNA sperma. Selain itu, tingkat kesuburan tikus jantan yang mengonsumsi alkohol juga ditunjukkan menjadi lebih rendah daripada kelompok kontrol (Akang *et al*, 2017).

2.4.5 Teh Hitam dan Infertilisasi

Pada teh hitam memiliki kandungan Polifenol yang merupakan suatu kelompok antioksidan yang secara alami terdapat dalam teh dan katekin termasuk salah satu antioksidan golongan flavonoid dalam teh (Daniells, 2008). Teh hitam yang mengalami proses fermentasi memiliki aktivitas antioksidan yang sangat rendah. Kandungan polifenol pada teh hitam hanya 3-10%. Sejumlah penelitian menunjukkan bahwa flavonoid mempunyai pengaruh yang besar terhadap aktivitas antioksidan.

Antioksidan berhubungan erat dengan penumpukan spesies oksigen reaktif (ROS) (senyawa pengoksidasi turunan oksigen, seperti superoxide anion (O_2^-), hydroxyl radicals ($OH\cdot$), dan peroxy radicals (RO_2), serta hydrogen peroxide (H_2O_2), dimana jumlah dan gugus hidroksil antioksidan akan mempengaruhi kekuatan antioksidan. Dari penelitian diketahui bahwa aktivitas antioksidan flavonoid secara *in vitro* sedikit sekali (Lotito & Frei, 2006).

Produksi ROS yang rendah di dalam tubuh akan merangsang atau mendukung fungsi utama sperma, seperti kapasitas, reaksi akrosom, fusi sperma dengan oosit (Lamirande *et al*, 1997). Akan tetapi produksi ROS yang tidak terkontrol dan tidak seimbang jumlah antioksidan dengan ROS menyebabkan stress oksidasi. Stress oksidasi menyebabkan melemahnya fungsi sperma, menginduksi kerusakan sperma, merusak DNA, membran dan protein (Azis *et al*, 2004).

Pada penelitian yang dilakukan pada mencit *Mus Musculus* dengan pemberian ekstrak teh hitam mengakibatkan terjadinya penurunan berat epididimis disebabkan karena terjadinya kerusakan membran sel epididimis akibat kandungan dan dosis flavonoid yang berlebih yang bertindak sebagai antioksidan membentuk *Reactive Oxygen Species* (ROS) Antioksidan dan ROS akan sama-sama merusak membran sel sehingga sel epididimis menjadi rusak dan proses metabolisme tidak berjalan sebagaimana mestinya. Akibatnya sel tau organ menjadi kecil yang

ditandai dengan berkurangnya berat dan menyebabkan kematian dari sel atau organ (Delfita, 2014).

2.4.5.1 Proses Terjadinya Infertilitas oleh Senyawa Flavonoid

Signifikansi flavonoid dalam plasma dan jaringan terlalu rendah untuk berfungsi sebagai antioksidan sehingga flavonoid memiliki peranan yang lebih dominan sebagai molekul pemberi sinyal melalui kemampuannya berinteraksi dengan protein kinase, termasuk *mitogen-activated protein kinase* (MAPK), yang bersifat menghambat pertumbuhan sel dan diferensiasi sel. Hal ini mengakibatkan protein kinase menjadi target molekular *chemoprevention* oleh flavonoid. Flavonoid mengaktifkan efek *chemoprevention* dengan bertindak sebagai regulator melalui stress oksidatif diinduksi protein kinase dibandingkan sebagai antioksidan, hal ini yang menyebabkan terjadinya peningkatan ROS pada pemberian ekstrak teh hitam (Brunetti *et al*, 2013).

ROS biasanya diproduksi dalam jumlah yang normal pada proses respirasi. Produksi ROS pada semen berasal dari spermatozoa dan infiltrasi leukosit. Spermatozoa dan plasma semen memiliki mekanisme anti oksidatif sendiri yang berperan dalam melindungi kerusakan seluler yang diinduksi oleh ROS. GSH adalah jenis thiol nonprotein yang berperan dalam mengatur proses pertahanan antioksidan (Sharma *et al*, 2001). Kondisi yang mengganggu jumlah dari GSH adalah perubahan metabolisme seluler. GSH memiliki peran dalam decondensasi nucleus sperma dan pembentukan spindle mikrotubulus. Induksi flavonoid dapat mengganggu produksi GSH

yang menyebabkan oksidasi glutathione dan peroksidase lipid. Dalam penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa terjadi penurunan berat testis tikus yang diberi perlakuan dengan ekstrak teh hitam, hal ini disebabkan oleh ukuran tubulus yang berkurang, penangkapan spermatogenik dan penghambatan biosintesis steroid oleh sel Leydig (Chaki *et al*, 2005).

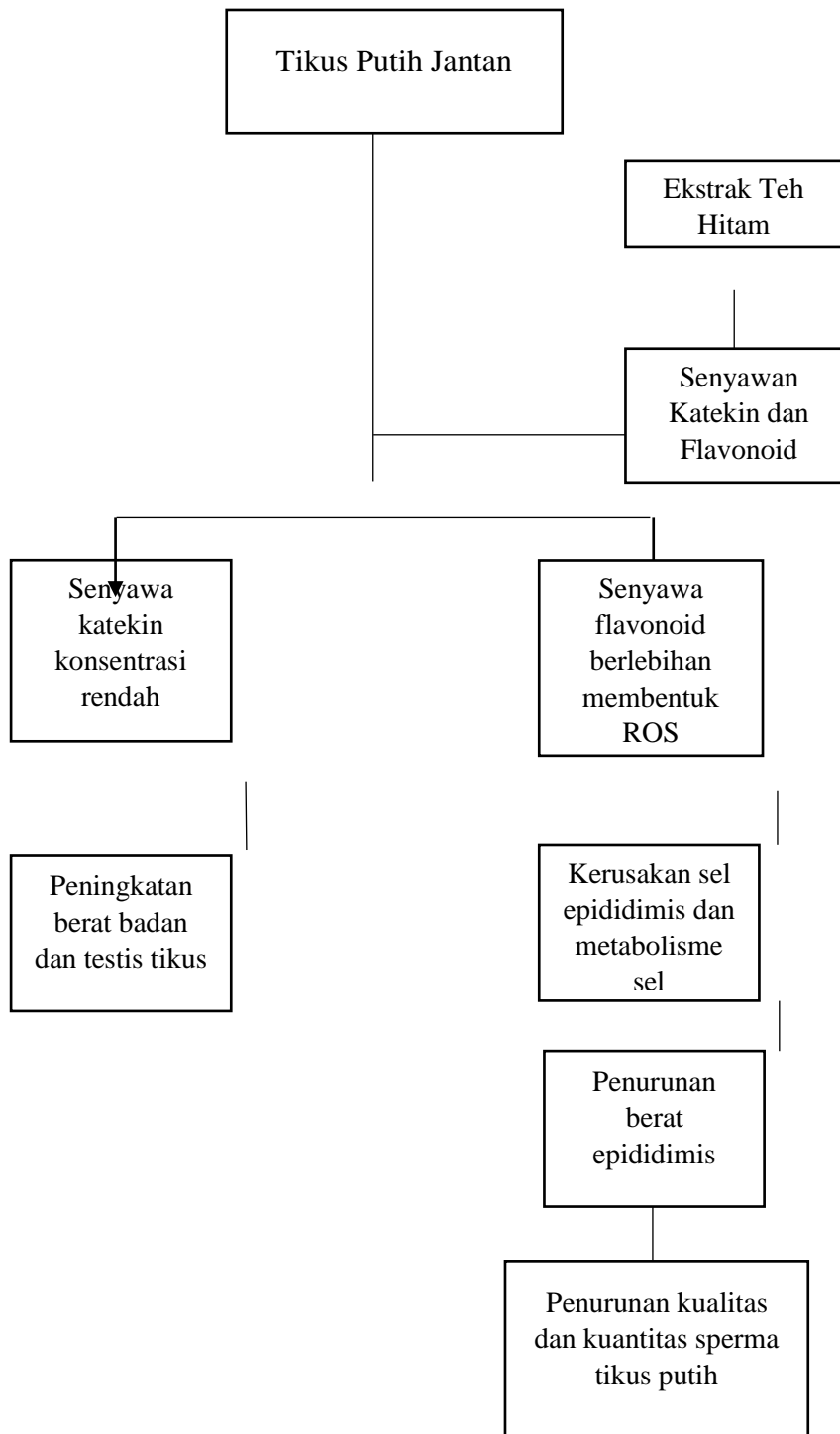
Dalam sistem reproduksi manusia, produksi ROS berlebihan yang melebihi nilai kritis dapat menghancurkan strategi pertahanan antioksidan dari spermatozoa dan plasma semen sehingga akan menyebabkan stress oksidatif. Peningkatan peroksidasi lipid ini akan mengakibatkan imobilisasi sperma, berkurangnya akrosom reaksi, fluiditas membran, kerusakan DNA dan juga menyebabkan untai DNA tunggal dan ganda putus (Gill, 2001). Nilai yang tinggi dari ROS juga akan mengganggu mitokondria bagian dalam dan luar membran menghasilkan pelepasan sitokrom-C, protein yang mengaktifkan Caspases dan menginduksi apoptosis. Stres oksidatif pada testis merupakan salah satu faktor utama yang menyebabkan apoptosis sel germinal (Emiko *et al*, 2002).

Apoptosis yang diinduksi ROS di testis diamati terutama dengan spermatosit dan spermatogonia. Perbedaan kerentanan sel dapat dijelaskan oleh perbedaannya aktivitas antioksidan dan enzim terkait. Dari penelitian sebelumnya dapat disimpulkan bahwa atrofi testis, penurunan berat testis dan diameter tikus yang dilakukan pemberian ekstrak teh hitam adalah karena peningkatan apoptosis sel germinal, yang mungkin saja terjadi

karena peningkatan stres oksidatif baik karena peningkatan radikal bebas atau karena penurunan pertahanan antioksidan (Mari *et al*, 2001).

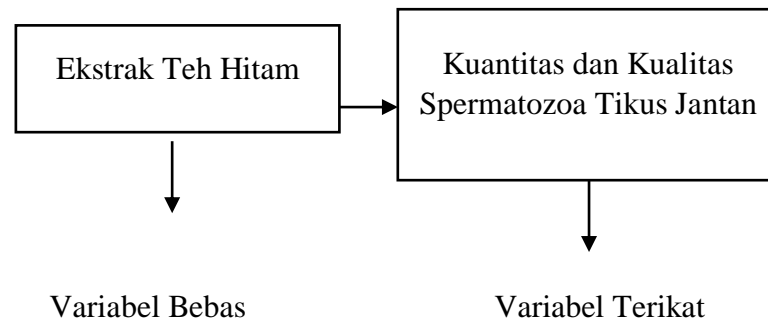
2.5 Kerangka Penelitian

2.5.1 Kerangka Teori



Gambar 1. Kerangka Teori

2.5.2 Kerangka Konsep



Gambar 2. Kerangka Konsep

2.6 Hipotesis

Adapun hipotesis dari penelitian ini adalah:

H_0 = Tidak adanya pengaruh antara ekstrak teh hitam terhadap kuantitas dan kualitas spermatozoa.

H_1 = Adanya pengaruh antara ekstrak teh hitam terhadap kuantitas dan kualitas spermatozoa.

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian eksperimental dengan menggunakan rancangan penelitian rancangan acak lengkap (RAL) dengan satu faktor (perbedaan konsentrasi ekstrak teh hitam). Teknik pengambilan sampel menggunakan metode *Simple Random Sampling*. Pengambilan data hanya dilakukan pada saat akhir penelitian dengan melibatkan kelompok subjek yang diberi perlakuan eksperimental (kelompok eksperimen). Penelitian ini merupakan penelitian komparatif yang bertujuan untuk melihat perbedaan kuantitas dan kualitas spermatozoa tikus pada setiap kelompok dengan periode pemberian ekstrak teh hitam yang berbeda. Sampel berjumlah 28 ekor tikus putih jantan. Sampel tersebut dibagi menjadi 4 kelompok dengan 7 ekor tikus di setiap kelompoknya.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

3.2.1 Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan selama 49 hari. Adaptasi dan perlakuan hewan coba dilaksanakan di *Animal House* Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Ekstrak teh hitam dibuat di Laboratorium Kimia Organik Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

(FMIPA) Universitas Lampung. Pembedahan dan pengamatan spermatozoa tikus dilakukan di Laboratorium Biokimia, Fisiologi dan Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Universitas Lampung.

3.2.2 Waktu Penelitian

Penelitian akan dilaksanakan pada bulan Mei 2021 sampai dengan Juli 2021.

3.3 Populasi dan Sampel

3.3.1 Populasi Penelitian

Populasi penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) dewasa jantan galur *Sprague dawley*, berusia 10-16 minggu dengan berat 150-200 gram.

3.3.2 Perkiraan Besar Sampel

Jumlah sampel dalam penelitian ini ditentukan dengan menggunakan rumus Frederer sesuai dengan jenis penelitian yang dilakukan, yaitu penelitian eksperimental.

Rumus Frederer dalam penentuan besar sampel untuk uji eksperimental yakni:

$$(n-1)(t-1) \geq 15$$

Keterangan:

t = jumlah kelompok perlakuan

n = jumlah sampel tiap kelompok

Penelitian ini menggunakan 4 kelompok, maka besar sampel yang dibutuhkan untuk tiap kelompok adalah:

$$(n-1) (t-1) \geq 15$$

$$(n-1) (4-1) \geq 15$$

$$(n-1) 3 \geq 15$$

$$3n-3 \geq 15$$

$$3n \geq 18$$

$$n \geq 6$$

Jadi, sampel yang digunakan pada setiap kelompok percobaan sebanyak 6 ekor dan jumlah kelompok yang digunakan adalah 4 kelompok sehingga penelitian ini menggunakan 24 ekor tikus putih jantan.

Untuk mengantisipasi adanya kriteria eksklusi dan *drop out* maka dilakukan koreksi dengan menambahkan sampel dengan rumus:

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

Keterangan:

N = besar sampel koreksi

n = besar sampel awal

f = perkiraan proporsi *drop out* sebesar 10%

(Federer, W. 1963).

Berdasarkan rumus diatas, maka jumlah sampel koreksi yang ditambahkan pada penelitian ini yaitu:

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

$$N = \frac{6}{1 - 10\%}$$

$$N = \frac{6}{1 - 0,1}$$

$$N = \frac{6}{0,9}$$

$$N = 6,66$$

$$N = 7 \text{ (pembulatan)}$$

Berdasarkan perhitungan sampel diatas, akan diberikan penambahan 1 ekor tikus per-kelompok untuk menghindari *drop out*. Sehingga jumlah sampel yang digunakan adalah sebanyak 28 ekor tikus jantan.

3.3.3 Teknik Pengambilan Sampel

Penempatan tikus pada tiap kelompok perlakuan pada penelitian ini menggunakan metode acak (*Simple Random Sampling*). *Simple Random Sampling* adalah pengambilan anggota sampel dari populasi yang dilakukan secara acak tanpa memperhatikan strata yang ada dalam populasi itu (Sugiyono, 2017)

3.3.4 Kriteria Inklusi dan Eksklusi

3.3.4.1 Kriteria Inklusi

Kriteria Inklusi adalah ciri-ciri yang perlu dipenuhi oleh setiap anggota populasi untuk diambil sebagai sampel (Notoatmodjo, 2012).

Kriteria inklusi dari populasi penelitian ini adalah sebagai berikut:

- A. Tikus putih (*Rattus norvegicus*).
- B. Jenis kelamin jantan.
- C. Sehat (gerak aktif, rambut tidak kusam, rontok, botak).
- D. Memiliki berat badan 150-200 gram
- E. Berusia 2-3 bulan.

3.3.4.2 Kriteria Eksklusi

Kriteria eksklusi adalah ciri-ciri anggota populasi yang tidak dapat diambil sebagai sampel (Notoatmodjo, 2012).

Kriteria eksklusi dari populasi penelitian ini adalah sebagai berikut:

- A. Tikus mati sebelum mendapat perlakuan.
- B. Terdapat penurunan badan lebih dari 10% setelah masa adaptasi di laboratorium.
- C. Sakit (penampakan rambut kusam, rontok atau botak, aktivitas dan gerakan kurang atau tidak aktif, serta keluarnya eksudat yang tidak normal dari mata, mulut, anus, serta genital).

D. Jenis kelamin betina.

3.4 Variabel Penelitian

3.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas atau variabel independen pada penelitian ini adalah kadar pemberian ekstrak teh hitam pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan.

3.4.2 Variabel Terikat

Pada penelitian ini yang termasuk ke dalam variabel terikat atau variabel dependen adalah kuantitas dan kualitas spermatozoa tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan.

3.5 Definisi Operasional

Definisi operasional penelitian bertujuan memberikan penjelasan secara mudah dan tepat dengan memperlihatkan variabel-variabel yang termasuk di dalam penelitian ini. Sehingga diberikan konsep definisi operasional sesuai dengan penelitian yang dilakukan sebagai berikut:

Tabel 1. Definisi Operasional

Variabel	Definisi	Alat Ukur	Cara Ukur	Hasil Ukur	Skala
Pemberian ekstrak teh hitam.	Ekstrak teh hitam dari daun teh yang telah dikeringkan kemudian ekstrak diambil menggunakan metode sokletasi dengan suatu cairan pengekstraksi (alkohol 70%).	Sonde lambung	Dosis yang digunakan adalah sebesar 1,25%, 2,5%, dan 5% dengan tambahan ekstrak teh hitam 1 ml/100 g berat badan selama 49 hari. Konsentrasi diukur menggunakan gelas ukur.	Ekstrak teh hitam (ml)	Numerik
Jumlah spermatozoa	Konsentrasi atau banyaknya spermatozoa	Mikroskop, bilik hitung <i>improved Naubauer</i>	Sperma dihitung pada bilik hitung <i>improved Naubauer</i> (hemositometer) dengan mikroskop perbesaran 400x. Jumlah sperma dihitung dengan rumus: $\text{Jumlah sel/ml} = \frac{\text{Jumlah spermatozoa (n)}}{x 10^4 \times \text{pengenceran}}$	Jumlah sel/ml	Numerik
Motilitas spermatozoa	Banyaknya sperma yang bergerak	Mikroskop	Membandingkan seluruh sperma yang diamati dengan sperma yang bergerak progresif pada mikroskop perbesaran 400x. Dihitung dengan rumus: $\frac{A}{A+B} \times 100\%$	Presentase motilitas spermatozoa (%)	Numerik
Viabilitas spermatozoa	Daya tahan hidup spermatozoa.	Mikroskop	Meneteskan satu tetes cairan semen pada gelas objek lalu ditambahkan satu tetes larutan eosin, diamati dengan mikroskop perbesaran 400x.	Presentase viabilitas spermatozoa (%)	Numerik

3.6 Alat dan Bahan Penelitian

3.6.1 Alat Penelitian

1. Kandang tikus
2. Tempat makan dan minum tikus
3. Neraca analitik dengan tingkat ketelitian 0,01 gram
4. Papan bedah
5. Gelas objek dan gelas penutup
6. Mikroskop
7. Spuit oral 1 cc
8. Jarum
9. *Forceps*
10. *Handscoen*

3.6.2 Bahan Penelitian

1. Hewan percobaan berupa tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan.
2. Pelet dan air minum sebagai makanan dan minuman hewan percobaan.
3. Akuades
4. Ethanol
5. Esktrak teh hitam
6. Larutan NaCl fisiologis (100 mg jar/2ml).
7. Alkohol 70%

3.7 Cara Kerja Identifikasi Teh Hitam

Teh hitam dalam penelitian ini akan dibeli sebanyak 1000 gram dari salah

satu supermarket di Bandar Lampung lalu diidentifikasi teh nya untuk memastikan bahwa teh yang dibeli yaitu jenis teh hitam.

3.8 Pembuatan Ekstrak Teh Hitam

Daun teh hitam yang telah di keringkan kemudian dilakukan pengambilan ekstrak, pengambilan daun teh hitam adalah daun teh yang telah dikeringkan kemudian menggunakan metode sokletasi dengan suatu cairan pengekstraksi (alkohol 70%).

3.9 Prosedur Perlakuan Hewan Coba

3.9.1 Prosedur Pemilihan Hewan Coba

Tikus putih dipilih yaitu tikus putih jantan dewasa galur *Sprague-Dawle* dengan berat sekitar berusia 150-200 gram dan berusia 10-16 minggu.

3.9.2 Masa Adaptasi

Hewan uji yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan dewasa galur *Sprague-Dawle* umur 10-16 minggu dengan berat 150-200 gram dan sehat. Dasar kandang dilapisi dengan serbuk kayu setebal 0,5-1 cm dan diganti setiap hari untuk mencegah infeksi yang dapat terjadi akibat kotoran tikus tersebut. Cahaya, suhu, dan kelembaban ruangan dibiarkan berada dalam kisaran alamiah. Kandang ditempatkan dalam suhu kamar dan menggunakan cahaya matahari tidak langsung. Makanan hewan percobaan diberikan berupa pelet ayam. Makanan dan minuman

diberikan secukupnya dalam wadah terpisah dan diganti setiap hari. Setiap tikus diberi perlakuan sekali sehari sesuai dengan kelompok yang sudah ditetapkan.

3.9.3 Pengelompokan Hewan Coba

Pembagian kelompok berdasarkan perlakuan yang diberikan adalah sebagai berikut:

- A.** Kelompok kontrol: tikus jantan tidak diberikan ekstrak teh hitam.
- B.** Kelompok perlakuan 1 (P1): tikus jantan dengan pemberian ekstrak teh hitam dosis rendah 1,25%, diberikan tambahan ekstrak teh hitam 1 ml/100 g berat badan selama 49 hari.
- C.** Kelompok perlakuan 2 (P2): tikus jantan dengan pemberian ekstrak teh hitam dosis menengah 2,5%, diberikan tambahan ekstrak teh hitam 1 ml/100 g berat badan selama 49 hari.
- D.** Kelompok perlakuan 3 (P3): tikus jantan dengan pemberian ekstrak teh hitam dosis tinggi 5%, diberikan tambahan ekstrak teh hitam 1 ml/100 g berat badan selama 49 hari.

3.9.4 Prosedur Pembedahan

Tikus dinarkosis atau dieutanasi dengan ketamine pada hari ke-49 percobaan. Nekropsi dilakukan dengan laparotomi.

Adapun metode nekropsi hewan uji coba laboratorium yaitu:

- A.** Hewan telah dieutanasi.

- B. Hewan diletakkan pada papan nekropsi dengan posisi rebah dorsal (perut menghadap ke atas) dan posisi kepala hewan menjauhi operator.
- C. Permukaan tubuh hewan dibasahi dengan air atau etanol supaya bulu hewan tidak rontok.
- D. Selanjutnya, setelah proses pembedahan telah selesai, akan dilakukan pengambilan, penimbangan dan pengukuran epididimis memakai pinset. Lalu, agar pemisahan epididimis dan lemak lebih mudah, epididimis tikus diletakkan pada gelas ukur yang berisi NaCl.

3.9.5 Pengambilan dan Pengamatan Spermatozoa

Pengambilan spermatozoa dilakukan dengan memakai sekresi dari kauda epididimis tikus dengan cara memotong pada bagian distal vas deferens dan bagian proksimal epididimis. Kauda epididimis selanjutnya dimasukkan ke cawan petri yang berisi 1 ml NaCl 0,9% dan dipotong-potong menggunakan gunting kecil hingga halus. Potongan tersebut kemudian diaduk dengan gelas pengaduk sehingga didapatkan suspensi spermatozoa yang homogen. Suspensi spermatozoa dari cauda epididimis yang telah diperoleh dapat digunakan untuk pengamatan yang meliputi jumlah, motilitas dan viabilitas spermatozoa.

A. Jumlah Spermatozoa

Penghitungan jumlah spermatozoa dilakukan dengan menggunakan bilik hitung *improved Neubauer* (hemositometer). Sebelumnya,

suspensi spermatozoa diambil sebanyak 10 µl dan diletakkan pada bilik hitung, lalu ditutup dengan *cover glass*. Penilaian menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x. Jumlah spermatozoa yang didapat kemudian dimasukkan ke dalam rumus berikut (Bijanti *et al.*, 2002; Soehadi & Arsyad, 1982; Wirawan ddk., 1988 dalam Anggraini *et al.*, 2019).

$$\text{Jumlah sel/ml} = \text{Jumlah spermatozoa (n)} \times 10^4 \times \text{Pengenceran}$$

B. Motilitas Spermatozoa

Penghitungan motilitas spermatozoa diawali dengan mengambil suspensi spermatozoa sebanyak 10-15 µl. Selanjutnya suspensi tersebut diletakkan pada *object glass* dan ditutup dengan menggunakan *cover glass*. Penilaian dilakukan dengan menggunakan mikroskop pembesaran 400x. Motilitas dinilai berdasarkan kategori spermatozoa yang bergerak dan tidak bergerak. Penghitungan persentase motilitas spermatozoa menggunakan rumus sebagai berikut (Anggraini *et al.*, 2019).

$$\text{Persentase motilitas spermatozoa} = \frac{A}{A + B} \times 100\%$$

Keterangan :

A : Bergerak

B : Tidak bergerak

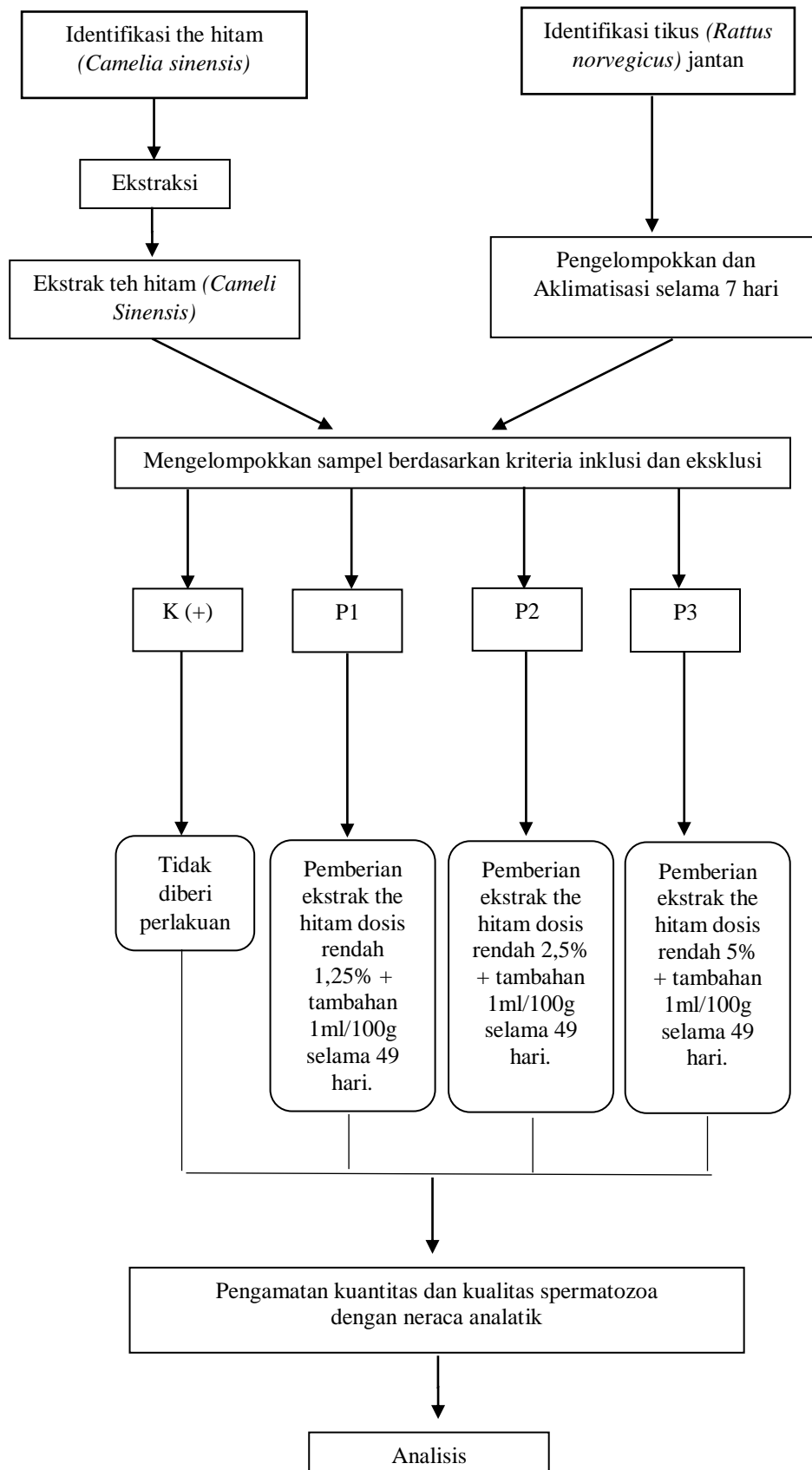
c. Viabilitas spermatozoa

Perhitungan daya tahan hidup (viabilitas) sperma dalam menit dilakukan dengan cara meneteskan satu tetes semen tikus pada gelas objek dan ditambahkan satu tetes larutan eosin negrosin. Setelah itu, dilakukan hapusan dan ditutup dengan kaca penutup untuk kemudian diamati dengan menggunakan mikroskop perbesaran 400x.

Diamati kurang lebih 200 spermatozoa dan dihitung spermatozoa yang hidup, yaitu spermatozoa yang tidak menyerap warna dan spermatozoa yang mati, yaitu spermatozoa yang menyerap warna. warna) kemudian dihitung persentasenya. Spermatozoa hidup memiliki kepala spermatozoa yang berwarna putih sedangkan spermatozoa mati diketahui dengan melihat kepala spermatozoa berwarna ungu atau merah setelah diwarnai dengan eosin. Hal ini disebabkan oleh membran kepala spermatozoa yang telah mati mengalami kerusakan sehingga permeabel terhadap pewarna eosin (WHO, 2010).

$$\% \text{ Viabilitas Spermatozoa} = \frac{\text{jumlah sperma yang hidup}}{\text{jumlah sperma yang diamati}} \times 100\%$$

3.10 Alur Penelitian



3.11 Analisis Data

Kelompok penelitian terdiri dari empat kelompok yaitu satu kelompok perlakuan dan tiga kelompok kontrol. Pada tiap kelompok, data yang terkumpul dianalisis menggunakan *software* komputer. Analisis statistik pada penelitian ini menggunakan analisis bivariat. Analisis bivariat dilakukan untuk menilai tingkat perbedaan antara variabel independen dan dependen. Data hasil penelitian akan diuji dengan menggunakan uji normalitas data Shapiro-Wilk dikarenakan jumlah sampel ≤ 50 . Data akan diuji homogenitas dengan uji homogenitas Levene. Distribusi data normal dan homogen, maka digunakan uji parametrik *One Way Anova*. Batas derajat kemaknaan pada uji *One Way Anova* $p \leq 0,05$ (hipotesis dianggap bermakna). Jika uji *One way-Anova* atau menghasilkan nilai p kurang dari 0,05, maka dilanjutkan dengan melakukan analisis Post-Hoc LSD dan jika pada Kruskal Wallis p didapat lebih dari 0,05, maka dilanjutkan dengan Mann-Whitney untuk melihat perbedaan antar kelompok.

3.12 Dummy Table

Tabel 2. Dummy Table

Kelompok	Jumlah	Motilitas	Viabilitas
	Spermatozoa	Spermatozoa	Spermatozoa
KP			
P1			
P2			
P3			

3.13 *Ethical Clearance*

Ethical clearance penelitian ini telah diajukan ke Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Lampung dengan nomor surat 1513/UN26.18/PP.05.02.00/2021. Penelitian ini menerapkan prinsip 3R data protokol penelitian, yaitu *replacement*, *reduction* dan *refinement*. *Replacement* (menggantikan), ialah keperluan untuk membuktikan suatu hipotesis, bila diperlukan penggunaan hewan coba maka menggunakan hewan yang paling rendah tingkatannya dan tidak dapat digantikan oleh makhluk hidup lain seperti sel atau biakan jaringan. *Reduction* yang dilakukan pada penelitian ini adalah memanfaatkan hewan dalam penelitian sesedikit mungkin, tetapi tetap mendapatkan hasil yang optimal. *Refinement* pada penelitian ini dilakukan dengan memperlakukan hewan percobaan secara manusiawi, memelihara hewan dengan baik, tidak menyakiti hewan, serta meminimalisasi perlakuan yang menyakitkan sehingga menjamin kesejahteraan hewan coba sampai akhir penelitian (Sajuthi, 2012). Jumlah minimum sampel dihitung menggunakan rumus Frederer yaitu $(n-1)(t-1) > 15$, dengan n adalah jumlah hewan yang diperlukan dan t adalah jumlah kelompok perlakuan. Hewan percobaan dipelihara dalam *Animal House* Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Hewan ditempatkan dalam kandang plastik $40 \times 20 \times 20 \text{ cm}^3$ dengan pemberian makan dan minum secara teratur setiap hari.

BAB V

KESIMPULAN

5.1 Kesimpulan

1. Pemberian ekstrak teh hitam dengan dosis rendah yaitu 1,25% memiliki perbedaan tidak bermakna terhadap kelompok kontrol baik pada jumlah spermatozoa, motilitas spermatozoa, maupun viabilitas spermatozoa.
2. Pemberian ekstrak teh hitam dengan dosisi sedang yaitu 2,5% dan dosisi tinggi yaitu 5% memiliki perbedaan bermakna terhadap kelompok KP baik pada jumlah, motilitas, maupun viabilitas spermatozoa.
3. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, maka dapat disimpulkan bahwa terdapat pengaruh pemberian ekstrak the hitam terhadap penurunan fertilitas yaitu jumlah, motilitas, dan viabilitas spermatozoa tikus jantan.

5.2 Saran

Peneliti selanjutnya disarankan melakukan penelitian dengan menggunakan bahan aktif pada ekstrak teh hitam secara spesifik yaitu flavonoid dan tannin sehingga dapat mengetahui efek yang disebabkan dari tiap bahan aktif yang terkandung.

DAFTAR PUSTAKA

- Anggraini T. 2017. Proses dan Manfaat Teh. Padang : Erka.
- Anggraini D, Sutyarso, Kanedi M, Busman H. 2019. Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Jahe Merah (*Zingiber Officinale* Roxb Var *Rubrum*) Terhadap Kuantitas Dan Kualitas Spermatozoa Mencit Jantan (*Mus Musculus* L.) Yang Diinduksi Paraquat Diklorida. *Jurnal Biologi Eksperimen Dan Keanekaragaman Hayati*. 5 (2):47-54.
- Akang, E.N.; Oremosu, A.A.; Osinubi, A.A.; James, A.B.; Biose, I.J.; Dike, S.I.; Idoko, K.M. Alcohol-induced male infertility: Is sperm DNA fragmentation a causative? *J. Exp. Clin. Anat.* 2017, 16, 53.
- Aziz N, Saleh RA, Sharma RK, Lewis-Jones I, Esfandiari N, Thomas AJ Jr, Agarwal A. 2003. Novel association between sperm reactive oxygen species production, sperm morphological defects, and the sperm deformity index.
- Azzahra, F.Y., E.T. Setiatin dan D. Samsudewa. 2016. Evaluasi Motilitas dan Pesentase Hidup Semen Segar Sapi PO Kebumen Pejantan Muda. Fakultas Peternakan dan Pertanian Universitas Diponegoro. Semarang. *Jurnal Sains Peternakan Indonesia*. (2):99-107.
- Bui, A.D.; Sharma, R.; Henkel, R.; Agarwal, A. Reactive oxygen species impact on sperm DNA and its role in male infertility. *Andrologia* 2018, 50, e13012.
- Brittenham GM. 2011. Iron-Chelating Therapy for Transfusional Iron Overload. *N Engl J Med*.
- Brunetti C, Di Ferdinando M, Fini A, Pollastri S, Tattini M. 2013. Flavonoids as antioxidants and developmental regulators: relative significance in plants and humans. *International journal of molecular sciences*. 14(2): 3540–3555.

- Chaki, S.P., Misro, M.M., Ghosh, D. 2005. Apoptosis and cell removal in the cryptorchid rat testis. **10**: 395–405.
- Chu, D.S , and Shakes D.C. 2013, “Spermatogenesis”. *Adv. Exp. Med. Biol.* 757:171-203.
- Daniells S. 2008. Green tea catechins go nano: study. <http://www.ritc.or.id>.
- De Lamirande E, Jiang H, Zini A, Kodman H dan Gagnon C. 1997. Reactive Oxygen Species and Sperm Physiology. *Review of Reproduction*. Vol 2 : 48-54.
- Delfita R. 2014 . Potensi Antifertilitas Ekstrak Teh Hitam Pada Mencit (*Mus Musculus L.*) Jantan. *Jurnal Sainstek*. 6 (2):181-188.
- Dewanti E, Viviandhari D, Lonica N, Isnarningtyas SM. 2020. Efek Antifertilitas dari Ekstrak Daun Pepaya (*Carica papaya L.*) pada Tikus Putih Jantan Galur Sprague Dawley. *Jurnal Jamu Indonesia* 5(1): 14
- Dorland WA, Newman .2010. *Kamus Kedokteran Dorland*. Jakarta: EGC.
- Emiko, Kasahara, Eisuke, F. Sato, Mami, Miyoshi, Rysei, Konaka, Keiichi, Hiramoto, Junzo, Sasaki, Masaaki, Tokuda, Yoshihisa, Nakanos and Masayasu, Inoue. 2002. Role of oxidative stress in germ cell apoptosis induced by di 2-ethylhexyl phthalate. *Biochem. J.* 365:849-856.
- Fritz MA, Speroff L. Amenorrhea. 2011. In: Fritz MA, Speroff L, editors. *Clinical gynecologic endocrinology and infertility*, eight edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- GiI-Guzman E, Ollero M, Lopez MC, Sharma RK, Alvarez JG, Thomas AJ. 2001 Differential production of reactive oxygen species by subjects of human spermatozoa at different stages of maturation, *Hum. Reprod.* 16, 1922-1930.
- Handayani, M., Gofur, A., & Maslikah, S. I. (2014). Potensi Daun Pulutan sebagai Bahan Antifertilitas Manusia.
- Handayani M, Gofur A, dan Maslikah S.I. 2014. Potensi Daun Pulutan sebagai Bahan Antifertilitas Manusia. Malang: Universitas Negeri Malang
- Hestiantoro, A. 2013. *Konsensus Penanganan Infertilitas*. Jakarta. www.pogi.or.id
- Henkel RR .2011. Leukocytes and oxidative stres: dilemma for sperm function and male fertility. *Asian J Androl*, 13: 43-52.

- Jensen, C.F.S.; Ostergren, P.; Dupree, J.M.; Ohl, D.A.; Sønksen, J.; Fode, M. Varicocele and male infertility. *Nat. Rev. Urol.* 2017, 14, 523–533
- Julia, D., & Nita, S. (2019). Pengaruh Ekstrak Bunga Kembang Sepatu (*Hibiscus Rosa-Sinensis* Linn.) Terhadap Jumlah, Motilitas, Morfologi, Vabilitas Spermatozoa Tikus Jantan (*Rattus Norvegicus*). *Biomedical Journal of Indonesia*, 5(1), 34-42.
- Kesuma S dan Rina Y. 2015. *Antioksidan Alami dan Sintetik*. Padang: Andalas Press University.
- Khokhar, S. & S.G.M. Magnusodottir. 2002. Total Phenol, Catechin, and Caffein Content of Tea Commonly Consumed in The United Kingdom. *J. Agric. Food Chem.* 50:565-570.
- Krisna PA, Ratnawati R, Norahmawati E. 2015. Pengaruh theaflavin teh hitam (*Camellia sinensis*) Gambung, Jawa Barat terhadap ketebalan dinding aorta tikus wistar (*Rattus norvegicus*) yang diberi diet atherogenik. *Majalah Kesehatan FKUB.* 2(2): 62–69.
- Kourosh-Arabi, Masoumeh, Hosseini, Nasrin, Mohsenzadegan, Monireh, Komaki, Alireza and Joghataei, Mohammad Taghi. "Neurophysiologic implications of neuronal nitric oxide synthase" *Reviews in the Neurosciences*, vol. 31, no. 6, 2020, pp. 617-636.
- Lobascio AM, Felici MD, Anibaldi M, Greco P, Minasi MG, Greco E .2015. Involvement of seminal leukocytes, reactive oxygen species, and sperm mitochondrial membrane potential in the DNA damage of the human spermatozoa. *Andrology*.
- Mari M, Wu D, Nieto N, Cederbaum AI. 2001. CYP2E1-Dependent toxicity and upregulation of antioxidant genes, *J. Biomed. Sci.* 8(1): 52-55
- Marzouk, M.M. 2016. Flavonoid Constituents And Cytotoxic Activity Of *Erucaria Hispanica* (L.) Druce Growing Wild In Egypt. *Arabian Journal Of Chemistry*, 9, 411–415.
- Notoatmodjo,S. 2012. *Metodologi Penelitian Kesehatan*. Jakarta: Rineka Cipta.
- O'Flaherty, Cristian. 2020. Reactive Oxygen Species and Male Fertility. *Antioxidants*. 9. 287. 10.3390/antiox9040287.
- Oktarina A, Abadi A, Bachsin, R. 2014. Faktor-faktor yang Memengaruhi Infertilitas pada Wanita di Klinik Fertilitas Endokrinologi Reproduksi. *MKS*, 46(4), pp. 295-300.

- Prairohardjo S dan Wiknjosastro H. 2011. Ilmu Kandungan. Jakarta: Bina Pustaka Sarwono Prawirohardjo.
- Purba IH. 2011. Kecemasan Pasangan Usia Subur Terhadap Infertilitas Sekunder di Dusun XI Desa Pasar Melintang Kecamatan Lubuk Pakam Tahun 2010. (KTI). Medan: Universitas Sumatera Utara.
- Qinghu, W., Jinmei, J., Nayintai, D., Narenchaoketu, H., Jingjing, H., Baiyinmuqier, B. 2016. Anti- Inflammatory Effects, Nuclear Magnetic Resonance Identification And High- Performance Liquid Chromatography Isolation Of The Total flavonoids From *Artemisia Frigida*, *Journal Of Food And Drug Analysis*, 24, 385-391
- Rahmawati, I. 2013. Pengaruh Nikotin Terhadap Jumlah Sel Leydig Pada Mencit (*Mus musculus*). *J.K.G Unej*, 10(2), pp. 82-85.
- Rohdiana, D. 2015. Teh: Proses, Karakteristik dan Komponen Fungsionalnya. *Food Review Indonesia*. Vol. 10 (1): 34-37
- Rossi, A. 2010. *1001 teh – Dari asal usul, Tradisi, Khasiat hingga Racikan teh*, edisi 1. Yogyakarta: Andi Best Book
- Sajuthi D. 2012. Prinsip-Prinsip Kesejahteraan Hewan (*Animal Welfare*) di dalam Penelitian Biomedis. Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor.
- Saragih CF. 2014. Analisa Faktor-Faktor Penyebab Infertilitas di RS Jejaring Departemen Obgin FK USU Periode Januari 2012-Desember 2013 .Medan: Universitas Sumatera Utara.
- Saraswati A. 2015. Infertility. *J Majority*. 4(5):5-9.
- Sharangi A.B. 2009. Medicinal and therapeutic potentialities of tea (*Camellia sinensis L.*) – A review. *Food Research International Journal*, 42 : 529–535.
- Sharma R, Pasqualotto FF, Nelson DR, Thomas AJ Jr, Agarwal A. 2001 Relationship between seminal white blood cell counts and oxidative stress in men treated at an infertility clinic. *J. Androl*. 22:575-583.
- Smith's, Tanagho EA, McAninch JW. 2008. *Urinary Stone disease:in General Urology*. USA;The McGraw-Hill.
- Sugiyono. (2017). *Metode Penelitian Kuantitatif, Kualitatif, dan R&D*. Bandung : Alfabeta, CV.
- Sukmawati, E., R.I. Arifiantini dan B. Purwantara. 2014. Daya Tahan Spermatozoa Terhadap Proses Pembekuan pada Berbagai Jenis Sapi

- Pejantan Unggul. Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor. *JITV*, 19(3):168-175.
- Susanto H, Indra MR, Karyono S. 2014. Pengaruh sari seduh teh hitam (*Camellia Sinensis*) terhadap ekspresi IGF-1, ERK1/2 dan PPAR pada jalur MAPK (mitogen activated protein kinase) jaringan lemak visceral tikus wistar dengan diet tinggi lemak. *Jurnal Exp. Life Sci.*2(2):2087–2852.
- Tremallen, K. 2008. Oxidative Stress and Male Infertility a Clinical Perspective. *Human Reprod.*Vol 14: 243- 258.
- Tunc, O., 2010. “ Investigation of the Role of Oxidative Stress in Male Infertility
- US Agreeculture. 2003. Flavonoid composition of tea: Comparison of Black and Green teas.
- Vanessa, M. Munhoza, R. L., José R.P., João, A.C., Zequic, E., Leite, M., Gisely, C., Lopesa, J.P., Melloa. (2014). Extraction Of Flavonoids From *Tagetes Patula*: Process Optimization And Screening For Biological Activity. *Rev Bras Farmacogn*, 24, 576-583.
- Varasofiari, L.N., E.T. Setiatin, dan Sutopo. 2013. Evaluasi Kualitas Semen Segar sapi Jawa Brebes Berdasarkan Lama Waktu Penyimpanan. Fakultas Peternakan dan Pertanian Universitas Diponegoro. Semarang. *Animal Agriculture*, 2(1):201- 208.
- Wagner, H., Cheng, J.W., Ko, E.Y., 2018. Role of reactive oxygen species in male infertility: An updated review of literature. *Arab J. Urol.* 16, 35–43.
- Willem O, Ian C, Silke D, Gamal S, Paul D. 2008. Human Reproduction. J of Infertility and the Provision of infertility medical Services in developing countries. 14(6): 605-621.
- World Health Organization. 2004. Infecundity, infertility, and childlessness in developing countries. DHS Comparative Reports Calverton, Maryland, USA :ORC Macro and The World Health Organization.
- World Health Organization. 2010. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, 5th ed. Switzerland: WHO Press.