

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK METANOL DAN N-HEKSANA
LADA HITAM (*Piper nigrum* L) DIKOMBINASIKAN DENGAN
ZINK (Zn) TERHADAP VIABILITAS DAN MORFOLOGI
SPERMATOZOA TIKUS PUTIH JANTAN
(*Rattus norvegicus*) YANG DIINDUKSI
GENTAMISIN**

(SKRIPSI)

Oleh
HASRI AGHIA SALSABILA
1818011088



**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2022**

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK METANOL DAN N-HEKSANA
LADA HITAM (*Piper nigrum* L) DIKOMBINASIKAN DENGAN
ZINK (Zn) TERHADAP VIABILITAS DAN MORFOLOGI
SPERMATOZOA TIKUS PUTIH JANTAN
(*Rattus norvegicus*) YANG DIINDUKSI
GENTAMISIN**

Oleh

HASRI AGH Nia SALSABILA

Skripsi

**Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Memperoleh Gelar
SARJANA KEDOKTERAN**

Pada

**Fakultas Kedokteran
Universitas Lampung**



**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2022**

Judul Skripsi : **PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK METANOL DAN N-HEKSANA LADA HITAM (*Piper nigrum* L.) DIKOMBINASIKAN DENGAN ZINK (Zn) TERHADAP VIABILITAS DAN MORFOLOGI SPERMATOZOA TIKUS PUTIH JANTAN (*Rattus norvegicus*) YANG DIINDUKSI GENTAMISIN**

Nama Mahasiswa : **Hasri Aghnia Salsabila**

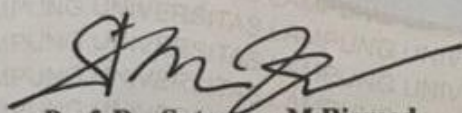
No. Pokok Mahasiswa : **1818011088**

Program Studi : **PENDIDIKAN DOKTER**

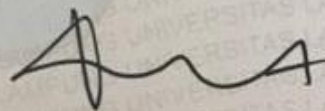
Fakultas : **KEDOKTERAN**

MENYETUJUI

1. Komisi Pembimbing



Prof. Dr. Sutjarso, M.Biomed
NIP. 195704241987031001



dr. Dewi Nur Fiana, Sp. KFR, AIFO-K
NIP. 198302212010122002

2. Dekan Fakultas Kedokteran

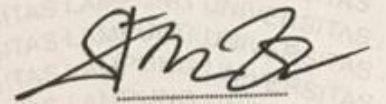


Prof. Dr. Dyah Wulan Sumekar RW, S.K.M, M.Kes
NIP. 197206281997022001

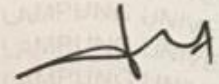
MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

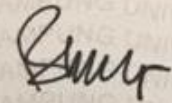
Ketua : **Prof. Dr. Sutyarso, M.Biomed.**



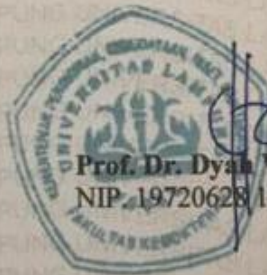
Sekretaris : **dr. Dewi Nur Fiana, Sp. KFR, AIFO-K.**



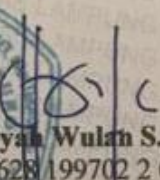
Penguji
Bukan Pembimbing : **Dr. Hendri Busman, M.Biomed**



2. Dekan Fakultas Kedokteran



Prof. Dr. Dyan Wulan S. R. W., S.K.M., M.Kes.
NIP. 19720628199702 2 001



Tanggal Lulus Ujian Skripsi : 23 Mei 2022

LEMBAR PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan dengan sebenarnya bahwa :

1. Skripsi dengan judul **“PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK METANOL DAN N-HEKSANA LADA HITAM (*Piper nigrum* L.) DIKOMBINASIKAN DENGAN ZINK (Zn) TERHADAP VIABILITAS DAN MORFOLOGI SPERMATOZOA TIKUS PUTIH JANTAN (*Rattus norvegicus*) YANG DIINDUKSI GENTAMISIN”** adalah hasil karya saya sendiri dan tidak melakukan penjiplakan atau pengutipan atas karya penulis lain dengan cara tidak sesuai 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, 7 Juni 2022

Pembuat Pernyataan



Hasri Aghnia Salsabila

RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan di Bogor pada tanggal 23 November 2000, sebagai anak ketiga dari 4 bersaudara dari Bapak Harto, S.E., dan Ibu Sri Fatonah.

Pendidikan Taman Kanak-kanak (TK) diselesaikan di TK Khalifah, Cileungsi, Bogor pada tahun 2006, Sekolah Dasar (SD) diselesaikan di SD Muhammadiyah 02, Cileungsi, Bogor pada tahun 2012, Sekolah Menengah Pertama (SMP) diselesaikan di SMP Negeri 1 Cileungsi, Bogor pada tahun 2015, dan Sekolah Menengah Atas (SMA) diselesaikan di SMA Negeri 1 Cileungsi, Bogor pada tahun 2018. Selama menjadi pelajar, penulis mengikuti ekstrakurikuler tari, paskibra, Palang Merah Remaja (PMR), *English club*, Karya Ilmiah Remaja (KIR), dan Rohani Islam (Rohis).

Penulis terdaftar sebagai mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Lampung pada tahun 2018 melalui jalur Seleksi Bersama Masuk Perguruan Tinggi (SBMPTN). Selama menjadi mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Lampung, penulis mengikuti organisasi *Lampung University Medical Research* (Lunar) FK Unila (2018-2021).

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

“...Dan barang siapa yang bertakwa kepada Allah, niscaya Allah menjadikan kemudahan baginya dalam urusannya.”

-Q.S At-Talaq : 4-

**Sebuah persembahan sederhana untuk Mamah, Ayah,
Mas Indo, Mas Fiqa dan Adik Lian.**

Segala rasa syukur bagi Allah SWT, Tuhan semesta alam yang telah memberikan nikmat, hidayah, kasih sayang-Nya, serta kedua orang tua, keluarga besar dan sahabat yang telah mendukung, memberikan doa, dan motivasi selama ini.

Alhamdulillah jaza kumullahu khoiro, Terima kasih banyak, atas doa dan dukungannya selama ini. Alhamdulillah jaza kumullahu khoiro, Terima kasih banyak atas semua pengorbanan yang telah dilakukan yang tak dapat dibalas satu persatu.

SANWACANA

Assalamualaikum Warahmatullahi Wabarakatuh,

Alhamdulillah rabbil'alamin. Segala puji bagi Allah SWT, Tuhan semesta alam yang telah memberikan segala nikmat, petunjuk dan kasih sayang sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.

Skripsi penulis dengan judul “Pengaruh Pemberian Ekstrak Metanol dan N-Heksana Lada Hitam (*Piper nigrum* L) dan Zink (Zn) terhadap Viabilitas dan Morfologi Spermatozoa Tikus Putih Jantan (*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi Gentamisin” ini merupakan salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran di Fakultas Kedokteran Universitas Lampung.

Dalam menyelesaikan skripsi ini, penulis mendapat banyak saran, bimbingan, dukungan dan doa dari berbagai pihak. Maka dalam kesempatan ini penulis ingin menyampaikan rasa terima kasih kepada :

1. Allah SWT yang selalu memberikan rahmat, nikmat dan kasih saying-Nya kepada penulis;
2. Prof. Dr. Karomani, M.Si., selaku Rektor Universitas Lampung;
3. Dr. Dyah Wulan Sumekar RW, S.K.M., M. Kes., selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Lampung;

4. Prof. Dr. Sutyarso, M. Biomed., selaku Pembimbing I atas kesediannya dalam memberikan bimbingan, ilmu, kritik, saran, nasehat, motivasi, dan bantuan bagi penulis untuk menyelesaikan skripsi ini;
5. dr. Dewi Nur Fiana, Sp. KFR, AIFO-K, selaku Pembimbing II atas kesediannya dalam memberikan bimbingan, ilmu, kritik, saran, nasehat, motivasi, dan bantuan bagi penulis untuk menyelesaikan skripsi ini;
6. Dr. Hendri Busman, M.Biomed, selaku Pembahas atas kesediannya dalam memberikan bimbingan, ilmu, kritik, saran, nasehat, motivasi, dan bantuan bagi penulis untuk menyelesaikan skripsi ini;
7. Ibu Selvi Rahmawati, S. Si., M.Sc., selaku Pembimbing Akademik penulis atas kesediannya dalam memberikan saran, nasehat, motivasi, dan bantuan bagi penulis dalam bidang akademik;
8. Orang tua tercinta dan tersayang, Mamah dan Ayah yang telah membesarkan penulis, selalu mendoakan, membimbing, mendukung, memberikan yang terbaik, dan selalu sabar menantikan keberhasilan penulis;
9. Abang tercinta, Mas Gresindo Awwalul Baktiharto, Mas Fiqa Albahri Kostiharto, Kakak Tercinta Naimatul Jannah, Adik tercinta, Brililian Wira Melatihasri, dan keponakan tersayang Muhammad Grena Prawira yang selalu membuat semangat dalam menggapai cita-cita, selalu memberikan dukungan, motivasi, dan rela saling membantu selama pembuatan skripsi ini;
10. Keluarga besar tercinta yang selalu memberikan dukungan, motivasi dan semangat;
11. Sahabat tersayang Dinda, Kak Eca, Fina, Dany, Debora yang sejak menempuh pendidikan sebagai pelajar hingga sekarang selalu ada untuk membantu, mendukung, mendoakan, dan kebersamai dalam suka dan duka;
12. Sahabat Sukses Dunia Akhirat, Ghina dan Pica yang sejak awal kuliah selalu ada untuk membantu, mendukung, mendoakan, dan kebersamai dalam suka dan duka;

13. Sahabat satu-satunya dari SMA sampai kuliah, Betsheba (Mbet) yang selalu bersama, mendukung, membantu, dan memotivasi penulis;
 14. Sahabat Pantai, Sinta dan Hafid yang selalu bersama dalam suka dan duka;
 15. Teman seperjuangan skripsi, Puji Fauziyyah Iskandar yang selalu membantu, memberikan dukungan, dan bekerja sama sejak semester tiga untuk menyelesaikan skripsi ini;
 16. Teman seperjuangan penelitian, Shelvia Athala yang selalu membantu dan saling bekerja sama dalam proses penelitian skripsi ini;
 17. Teman pertama di FK, Nikma, Afta, Dwi, Citra, Cindy dan teman-teman lainnya yang sudah kebersamai penulis selama proses perkuliahan;
 18. Teman Club Belajar Tisa, Balqis, Ghoni, Ipeh, Bella, Mezza, dan Ilu yang selalu membantu penulis dalam proses perkuliahan;
 19. Teman satu bimbingan Salnis, Ayu, Afina, dan Aka yang selalu kebersamai dalam proses bimbingan;
 20. Keluarga besar Lunar FK Unila yang telah memberikan pengalaman, pelajaran, dan rasa kebersamaan berorganisasi;
 21. Teman sejawat di PPM Baitusshodiq, Mas Dokter Fakhri, Mas Danang, Anggit, dan Fragil;
 22. Keluarga besar Pondok Pesantren Mahasiswa Baitusshodiq, terutama Mila, Abia, Galuh, Ajeng, Faza, Lala, Mas Falah, Dika, Soleh, Farid, Ari, dan Rian;
 23. Keluarga besar FK Unila terutama teman sejawat tercinta FIBRINOGEN FK Unila 2018, atas kebersamaannya selama ini, Staff dan karyawan (Khususnya Bu Nuriah dan Pak Bukhori), serta adik-adik angkatan 2019, 2020, 2021, atas kebersamaan dalam semangat satu kedokteran;
- Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi pembacanya.

Bandarlampung, 7 Juni 2022

Penulis



Hasri Aghnia Salsabila

ABSTRAK

PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK METANOL DAN N-HEKSANA LADA HITAM (*Piper nigrum* L) DIKOMBINASIKAN DENGAN ZINK (Zn) TERHADAP VIABILITAS DAN MORFOLOGI SPERMATOZOA TIKUS PUTIH JANTAN (*Rattus norvegicus*) YANG DIINDUKSI GENTAMISIN

Oleh

HASRI AGHNI SALSABILA

Latar Belakang : Menurut WHO, sekitar 50-80 juta pasangan mengalami infertilitas di dunia. Di Indonesia, dari sekitar 67 juta pasangan usia subur, 10-15% mengalami infertilitas. Menurut Riskesdas tahun 2013 tingkat prevalensi infertilitas adalah 15-25% dari semua pasangan. Salah satu penyebab infertilitas adalah konsumsi obat-obatan yang mempunyai efek toksik terhadap testis. Antibiotik gentamisin diduga memiliki efek toksik terhadap testis dengan menginduksi *oxidative stress*. Lada hitam memiliki kandungan piperin yang berfungsi sebagai antioksidan. Zink merupakan elemen yang berfungsi dalam menyeimbangkan proses spermatogenesis. Pemberian ekstrak lada hitam dan zink diduga dapat bermanfaat dalam pencegahan infertilitas yang disebabkan oleh gentamisin.

Metode : Penelitian ini menggunakan metode eksperimental dengan rancangan penelitian yang digunakan adalah *Post Test Only Control Group Design*. Teknik pengambilan sampel dengan menggunakan *simple random sampling* dan dengan menggunakan rumus Frederer didapatkan sampel penelitian sebanyak 28. Subjek penelitian adalah tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague Dawley*, berusia 2,5-3 bulan dengan berat \pm 200 gram. Variabel bebas penelitian ini adalah pemberian ekstrak metanol dan n-heksana lada hitam, pemberian zink, dan induksi gentamisin. Variabel terikat pada penelitian ini adalah viabilitas spermatozoa dan morfologi spermatozoa.

Hasil : Penelitian menunjukkan bahwa ada pengaruh pemberian ekstrak metanol lada hitam dan zink terhadap kenaikan persentase viabilitas spermatozoa (62,91%) tikus putih jantan yang diinduksi gentamisin dengan nilai p 0,000 ($<0,05$). Pada pemberian ekstrak metanol lada hitam dan zink juga berpengaruh terhadap kenaikan persentase morfologi spermatozoa normal (68,5%) tikus putih jantan yang diinduksi gentamisin dengan nilai p 0,000 ($<0,05$). Pemberian ekstrak n-heksana lada hitam dan zink berpengaruh terhadap kenaikan persentase viabilitas spermatozoa (62,91%) tikus putih jantan yang diinduksi gentamisin dengan nilai p 0,000 ($<0,05$). Pada pemberian ekstrak n-heksana lada hitam dan zink juga berpengaruh terhadap kenaikan persentase morfologi spermatozoa normal (68,25%) tikus putih jantan yang diinduksi gentamisin dengan nilai p 0,000 ($<0,05$).

Kesimpulan : Ada pengaruh pemberian campuran ekstrak metanol dan n-heksana lada hitam dan zink pada kelompok tikus yang diinduksi gentamisin. Hal ini terlihat dari kenaikan rerata persentase viabilitas spermatozoa dan persentase morfologi spermatozoa normal.

Kata Kunci : Infertilitas, Lada Hitam, Zink, Gentamisin, Viabilitas Spermatozoa, Morfologi Spermatozoa.

ABSTRACT

THE EFFECT OF METHANOL AND N-HEXANE EXTRACT OF BLACK PEPPER (*Piper nigrum* L) COMBINED WITH ZINC (Zn) ON VIABILITY AND MORPHOLOGY OF MALE WHITE RATS SPERMATOZOA (*Rattus norvegicus*) INDUCED BY GENTAMICIN

By

HASRI AGHNI SALSABILA

Background : According to WHO, around 50-80 million couples had infertility in the world. In Indonesia, from about 67 million couples of childbearing age, 10-15% had infertility. According to the Riskesdas (2013), the prevalence rate of infertility is 15-25% for all couples. One of the causes of infertility is the consumption of drugs that have a toxic effect on the testes. The antibiotic gentamicin is thought to have a toxic effect on the testes by inducing oxidative stress. Black pepper contains piperine which functions as an antioxidant. Zinc is an element that functions in balancing the process of spermatogenesis. The administration of black pepper extract and zinc is thought to be useful in preventing infertility caused by gentamicin.

Method : This study uses an experimental method with the research design used is Post Test Only Control Group Design. The sampling technique was using simple random sampling and using Freederer's formula, 28 research samples were obtained. The research subjects were male white rats (*Rattus norvegicus*) Sprague Dawley strain, 2.5-3 months old and weighing \pm 200 grams. The independent variables of this study were the administration of methanol extract and n-hexane black pepper, zinc administration, and gentamicin induction. The dependent variables in this study were spermatozoa viability and spermatozoa morphology.

Results: The study showed that there was an effect of giving methanol extract of black pepper and zinc to the increase in the percentage of spermatozoa viability (62.91%) of male white rats induced by gentamicin with p value 0.000 (<0.05). The administration of black pepper methanol extract and zinc also affected the increase in the percentage of normal spermatozoa morphology (68.5%) in male white rats induced by gentamicin with p value 0.000 (<0.05). The administration of n-hexane extract of black pepper and zinc affected the increase in the percentage of spermatozoa viability (62.91%) of male white rats induced by gentamicin with p value 0.000 (<0.05). The administration of n-hexane extract of black pepper and zinc also affected the increase in the percentage of normal spermatozoa morphology (68.25%) in male white rats induced by gentamicin with p value 0.000 (<0.05).

Conclusion : There is an effect of giving a mixture of methanol extract and n-hexane black pepper and zinc to the group of rats induced by gentamicin. This can be seen from the increase in the average percentage of spermatozoa viability and the percentage of normal spermatozoa morphology.

Keywords : Infertility, Black Pepper, Zinc, Gentamicin, Spermatozoa Viability, Spermatozoa Morphology.

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR ISI	i
DAFTAR TABEL	iv
DAFTAR GAMBAR	v
DAFTAR LAMPIRAN	vi
BAB 1 PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.4 Manfaat Penelitian.....	5
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Lada Hitam (<i>Piper nigrum</i> L).....	6
2.1.1 Klasifikasi Tanaman Lada Hitam.....	6
2.1.2 Kandungan Piperin dalam Lada Hitam.....	8
2.1.3 Mekanisme Piperin sebagai Antioksidan.....	9
4.2 Zink.....	10
2.3 Anatomi Testis.....	11
2.4 Fisiologi.....	12
2.4.1 Spermatogenesis.....	12
2.4.2 Spermiogenesis.....	15

2.4.3 Pengaruh Hormon dalam Spermatogenesis	16
2.4.4 Viabilitas Spermatozoa	18
2.4.5 Morfologi Spermatozoa	19
2.5 Infertilitas.....	21
2.5.1 Definisi.....	21
2.5.2 Etiologi.....	22
2.5.3 Diagnosis.....	23
2.6 Pengaruh Gentamisin terhadap Radikal Bebas	24
2.7 Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>) Galur Sprague Dawley	26
2.8 Kerangka Teori	28
2.9 Kerangka Konsep.....	29
2.10 Hipotesis	29

BAB 3 METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Desain Penelitian	31
3.2 Waktu dan Tempat Penelitian.....	31
3.2.1 Waktu Penelitian	31
3.2.2 Tempat Penelitian	31
3.3 Subyek Penelitian	32
3.3.1 Populasi.....	32
3.3.2 Sampel.....	32
3.3.3 Kelompok Perlakuan.....	33
3.4 Kriteria Inklusi dan Eksklusi	34
3.5 Identifikasi Variabel dan Definisi Operasional	34
3.5.1 Variabel Penelitian.....	34
3.5.2 Definisi Operasional Variabel Penelitian.....	34
3.6 Alat dan Bahan Penelitian	37
3.6.1 Alat Penelitian.....	37

3.6.2 Bahan Penelitian	37
3.7 Prosedur Penelitian	38
3.7.1 Pengadaan Hewan Uji.....	38
3.7.2 Pemeliharaan Hewan Uji	38
3.7.3 Pembuatan Ekstrak Lada Hitam.....	38
3.7.4 Pengadaan Zink.....	39
3.7.5 Induksi Gentamisin	40
3.7.6 Pembedahan	41
3.7.7 Pengambilan dan Pengamatan Spermatozoa.....	41
3.8 Analisis Data.....	44
3.9 Alur Penelitian Data	45
3.10 <i>Dummy Table</i>	46
3.11 Etik Penelitian.....	46
 BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN	
5.1 Kesimpulan	47
5.2 Saran	48
DAFTAR PUSTAKA.....	67
LAMPIRAN	

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1 Struktur Normal Spermatozoa pada Manusia.....	20
2. Batas Bawah Pemeriksaan Analisis Sperma	24
3. Definisi Operasional.....	35
4. Dummy Table.....	46
5. Hasil Perhitungan (%), Rata-rata, dan Standar Deviasi Viabilitas Spermatozoa	48
6. Hasil Uji Normalitas Data Viabilitas Spermatozoa tikus pada tiap kelompok.....	49
7. Hasil Uji One-Way ANNOVA Viabilitas Spermatozoa	50
8. Hasil Uji Post Hoc LSD Viabilitas Spermatozoa	50
9. Hasil Perhitungan (%), Rata-rata dan Standar Deviasi Morfologi Spermatozoa	51
10. Hasil Uji Normalitas Data Morfologi Spermatozoa tikus pada tiap kelompok.....	52
11. Hasil Uji One-Way ANNOVA Morfologi Spermatozoa	53
12. Hasil Uji Post Hoc LSD Morfologi Spermatozoa	54

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Tanaman Buah Lada Hitam	6
2. Struktur Piperin.....	8
3. Anatomi Testis Manusia	12
4. Spermatogenesis pada Manusia	14
5. Pengaturan Hormon pada Reproduksi Pria.....	17
6. Struktur Sperma Manusia	19
7. Morfologi Sperma Manusia.....	20
8. Struktur gentamisin.....	25
9. Rattus norvegicus galur Sprague Dawley	26
10. Kerangka Teori	28
11. Kerangka Konsep.....	29
12. Viabilitas Spermatozoa	42
13. Abnormalitas Morfologi Spermatozoa	43
14. Alur Penelitian	45
15. Morfologi Spermatozoa	55

DAFTAR LAMPIRAN

- Lampiran 1 Proses Penelitian
- Lampiran 2 Surat Persetujuan Etik
- Lampiran 3 Surat Disposisi Peminjaman Laboratorium Fisiologi,
Biokimia, dan Biomolekuler Fakultas Kedokteran Universitas
Lampung
- Lampiran 4 Surat Disposisi Peminjaman Laboratorium Histologi dan
Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas
Lampung
- Lampiran 5 Surat Disposisi Peminjaman Animal House Fakultas
Kedokteran Universitas Lampung
- Lampiran 6 Surat Keterangan Hewan Uji Penelitian
- Lampiran 7 Hasil Analisis Data Viabilitas Spermatozoa
- Lampiran 8 Hasil Analisis Data Morfologi Spermatozoa

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Infertilitas menjadi suatu masalah penting bagi setiap orang. Prevalensi kejadian infertilitas antara negara maju dan berkembang memiliki perbedaan. Pada negara berkembang kejadian infertilitas lebih tinggi dikarenakan dalam melakukan diagnosis dan penatalaksanaannya terdapat keterbatasan sumber daya. Angka kejadian infertilitas pada negara Indonesia diperkirakan $\pm 10\%$ (Ridhoila, 2017). Infertilitas pada pria bisa terjadi karena terganggunya proses spermatogenesis. Proses spermatogenesis dipengaruhi beberapa faktor yaitu, faktor internal dan faktor eksternal (Dina, 2017). Taher *et al* (2015) pada penelitiannya menyatakan terdapat 30-40% kasus infertilitas pria yang tidak ditemukan penyebabnya atau dinamakan infertilitas idiopatik. Beberapa faktor yang menyebabkan infertilitas idiopatik, seperti *reactive oxygen species* (ROS), gangguan endokrin akibat polusi lingkungan, atau gangguan epigenetik dan genetik. Pemakaian obat-obatan juga memicu terjadinya kelainan atau penyebab terjadinya infertilitas (Angulo C, 2011). Beberapa jenis antibiotik yang terbukti dapat menyebabkan infertilitas adalah golongan aminoglikosida seperti gentamisin dan neomisin (Krause *et al.*, 2016)

Gentamisin adalah sebuah antibiotik aminoglikosida yang umumnya bekerja pada bakteri gram negatif. Gentamisin dalam penggunaannya sering digunakan pada pasien infeksi saluran kemih yang khususnya telah didiagnosis pielonefritis atau prostatitis (IAUI, 2015). Angka kejadian infeksi saluran kemih di Indonesia menurut data Departemen Kesehatan Republik Indonesia

menunjukkan bahwa pasien infeksi saluran kemih berjumlah 90-100 kasus per 100.000 penduduk per tahun atau sekitar 180.000 kasus baru per tahun di Indonesia (Depkes RI, 2014). Dalam beberapa penelitian mengatakan bahwa gentamisin dapat menginduksi sebuah *oxidative stress* status di testis dengan menaikkan radikal bebas dan lemak peroksidase. Jumlah dan motilitas spermatozoa menurun dan abnormalitas morfologi spermatozoa meningkat pada pemberian gentamisin (Zahedi, 2012). Hal ini mendorong manusia untuk menemukan pengobatan infertilitas akibat konsumsi gentamisin, salah satunya menggunakan obat herbal atau tradisional.

Indonesia merupakan negara yang memiliki banyak rempah-rempah. Sesuai dengan sejarah, Indonesia dijajah karena rempah-rempah yang begitu melimpah. Lada hitam merupakan salah satu jenis rempah-rempah yang tumbuh di Indonesia khususnya Provinsi Lampung. Pengobatan tradisional yang mengedepankan bahan-bahan alami dapat menggunakan lada hitam sebagai bahan baku utamanya. Lada disebut juga merica (*Piper nigrum* L.) berasal dari famili Piperaceae (Vasavirama dan Upender, 2014). Lada hitam mengandung minyak atsiri dan alkaloid dengan komponen dipenten, entoksilen, limonen, felandren, dan kariopilen. Kandungan lada hitam yang adalah pati (36-37%); alkaloid piperin (5,3-9,2%); lemak (6,5-7,5%); minyak atsiri (1,2-3,5%); kavisin (sampai 1%) dan metil-pirolin; dan serat kasar ($\pm 14\%$) (Hikmawanti, 2016).

Lada hitam juga mengandung beberapa bahan aktif seperti *phenolic acids* *phenolic amides*, flavonoid yang berfungsi sebagai antioksidan serta diketahui juga mengandung senyawa aktif piperin (Meghwal, 2012). Senyawa piperin yang terdapat pada lada hitam memiliki beberapa manfaat, antara lain sebagai antimalaria, menurunkan berat badan, antiinflamasi, menurunkan demam, menetralkan racun bisa ular, membantu meningkatkan penyerapan vitamin tertentu, dan antiepilepsi (Hikmawanti, 2016). Penelitian milik Vijayakumar (2004) dengan menggunakan tikus obesitas memperlihatkan adanya penurunan stress oksidatif pada sel dengan pemberian dosis piperin yang sedikit. Pada

penelitian yang dilakukan oleh Sutyarso (2016) menunjukkan hasil yang sesuai pula. Penelitian ini menggunakan 25 mg dosis lada hitam dalam waktu 90 hari dengan perbandingan pelarut etanol dan air yang diberikan pada tikus jantan albino didapatkan hasil adanya peningkatan pada morfologi spermatozoa tikus. Berdasarkan hal tersebut perlu diteliti lebih lanjut kandungan senyawa piperin yang memiliki efek antioksidan pada tubuh. Proses ekstraksi akan menghasilkan metabolisme sekunder. Ekstraksi menggunakan dua jenis pelarut dengan perbedaan tingkat kepolaran, yaitu pelarut n-heksana (nonpolar) dan pelarut metanol (polar). Perbedaan pemakaian jenis pelarut ini akan mempengaruhi hasil kandungan senyawa bioaktif yang diperoleh dari proses ekstraksi (Huliselan, 2015).

Seng (Zn) adalah salah satu elemen terbanyak yang dibutuhkan oleh tubuh. Seperti yang diketahui bahwa beberapa elemen seperti seng, magnesium, tembaga, dan kalsium berpengaruh pada fertilitas laki-laki yang sangat penting untuk menyeimbangkan proses spermatogenesis, maturasi sperma, metabolisme DNA, dan perbaikan serta ekspresi gen (Kasperczyk, 2014). Pada penelitian yang dilakukan oleh Payaran K, Wantouw B, dan Tendeon L (2014) didapatkan hasil adanya peningkatan normal morfologi dari sel sperma setelah diberikan seng selama 32 hari. Pemberian zink ini bertujuan untuk mengkombinasikan efek pencegahan infertilitas dari ekstrak lada hitam dengan berbagai manfaat yang dapat diberikan oleh zink.

Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Dyah Gaby dan Thalita Badzlina pada tahun 2013 menyebutkan bahwa pemberian ekstrak lada hitam dan zink meningkatkan jumlah, motilitas, serta morfologi normal spermatozoa. Dalam penelitian tersebut, pelarut yang digunakan dalam proses ekstraksi lada hitam adalah etanol. Akan tetapi, belum ada penelitian yang lebih lanjut untuk mengetahui efek ekstrak metanol dan n-heksana buah lada hitam (*Piper nigrum* L.) terhadap morfologi dan viabilitas spermatozoa tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*). Berdasarkan latar belakang tersebut, maka perlu dilakukan penelitian ini untuk mengetahui efek ekstrak metanol dan n-heksana buah lada

hitam (*Piper nigrum* L.) terhadap viabilitas dan morfologi normal spermatozoa tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*).

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian di atas didapatkan beberapa permasalahan yaitu:

1. Apakah ada pengaruh pemberian ekstrak metanol lada hitam (*Piper nigrum* L) dikombinasikan dengan zink (Zn) terhadap viabilitas spermatozoa tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi gentamisin.
2. Apakah ada pengaruh pemberian ekstrak metanol lada hitam (*Piper nigrum* L) dikombinasikan dengan zink (Zn) terhadap morfologi spermatozoa tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi gentamisin.
3. Apakah ada pengaruh pemberian ekstrak n-heksana lada hitam (*Piper nigrum* L) dikombinasikan dengan zink (Zn) terhadap viabilitas spermatozoa tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi gentamisin.
4. Apakah ada pengaruh pemberian ekstrak n-heksana lada hitam (*Piper nigrum* L) dikombinasikan dengan zink (Zn) terhadap morfologi spermatozoa tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi gentamisin.

1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui:

1. Pengaruh pemberian ekstrak metanol lada hitam (*Piper nigrum* L) dikombinasikan dengan zink (Zn) terhadap viabilitas spermatozoa tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi gentamisin.
2. Pengaruh pemberian ekstrak metanol lada hitam (*Piper nigrum* L) dikombinasikan dengan zink (Zn) terhadap morfologi spermatozoa tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi gentamisin.

3. Pengaruh pemberian ekstrak n-heksana lada hitam (*Piper nigrum* L) dikombinasikan dengan zink (Zn) terhadap viabilitas spermatozoa tikus putih jantan (*Rattus novergicus*) yang diinduksi gentamisin.
4. Pengaruh pemberian ekstrak n-heksana lada hitam (*Piper nigrum* L) dikombinasikan dengan zink (Zn) terhadap morfologi spermatozoa tikus putih jantan (*Rattus novergicus*) yang diinduksi gentamisin.

1.4 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberi manfaat:

- a. Bagi peneliti, menambah ilmu pengetahuan di ilmu Biologi Medik mengenai pengaruh pemberian ekstrak metanol dan n-heksana lada hitam (*Piper nigrum* L) dikombinasikan dengan zink terhadap viabilitas dan morfologi spermatozoa tikus putih jantan (*Rattus novergicus*) yang diinduksi gentamisin.
- b. Bagi institusi/masyarakat
 1. Sebagai bahan kepustakaan dalam lingkungan Fakultas kedokteran Universitas Lampung.
 2. Sebagai sumber informasi agar masyarakat mengetahui manfaat dari rempah-rempah di Indonesia.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Lada Hitam (*Piper nigrum* L)

2.1.1 Klasifikasi Tanaman Lada Hitam



Gambar 1. Tanaman Buah Lada Hitam (Vasavirama, 2014)

Tanaman lada hitam memiliki klasifikasi sebagai berikut :

Kingdom : Plantae

Divisio : Spermatophyta

Subdivisio : Angiospermae

Kelas : Dicotyledonae

Ordo : Piperales

Genus : Piper

Family : Piperaceae

Species : *Piper nigrum* Linn

(Tjitrosoepomo, 2007)

Tanaman buah lada hitam menurut Tjitrosoepomo (2007) adalah tanaman beruas-ruas, pokok batang berkayu, dan tumbuh merambat tiang panjat atau menjalar diatas permukaan tanah. Buah lada hitam biasa digunakan sebagai rempah-rempah oleh masyarakat Indonesia. Menurut Dirjen Perkebunan (2011), produksi lada hitam di Indonesia berada di peringkat keempat pada tahun 2011. Ekspor hasil perkebunan lada hitam menempati nomor enam setelah kakao, kelapa, karet, kelapa sawit, dan kopi.

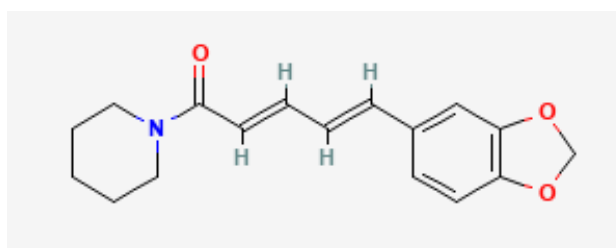
Provinsi Lampung merupakan salah satu provinsi yang menjadi wilayah utama penghasil lada di Indonesia. Luas areal perkebunan lada di Provinsi Lampung pada tahun 2017 adalah 46.181 ha dengan produksi lada sendiri sebesar 15.056 ton. Angka tersebut menempatkan Provinsi Lampung pada urutan kedua setelah Provinsi Bangka Belitung sebagai provinsi penghasil lada terbesar di Indonesia. Data tersebut tetap menunjukkan produktivitas lada di Provinsi Lampung pada tahun 2017 cukup rendah, yakni sebesar 0,33 ton/ha dan hanya menempati urutan ke-sembilan dari sepuluh provinsi penghasil lada di Indonesia (Direktorat Jenderal Perkebunan, 2017).

Lada hitam memiliki kandungan yang sangat bermanfaat baik digunakan dalam memasak maupun obat tradisional. Penelitian menunjukkan bahwa lada hitam memiliki senyawa alkaloid yang disebut piperin dan senyawa kimia analog piperin lainnya. Piperin ditemukan pertama kali oleh Hans Christian pada tahun 1819 dengan

mengekstraksi buah lada hitam. Selain dari piperin, lada hitam juga mengandung (11-14%) protein, (47-53%) serat, dan (10-13,5%) pati. Lada hitam juga sumber dari kalium, kalsium, mangan, zat besi, dan sedikit vitamin K dan vitamin C. Ravindran dan Peter memaparkan bahwa ada 4 struktur isomer dari piperin yaitu isopiperin (cis-trans isomer), piperin (trans-trans isomer), isochavicin (trans-cis isomer), dan chavicin (cis-cis isomer). Penelitian lebih lanjut memaparkan bahwa adanya alkaloid lain yaitu piperanin, piperettin, piperylin A, piperolein B, dan pipericin (Hammouti, *et. al.*, 2019).

2.1.2 Kandungan Piperin dalam Lada Hitam

Piperin merupakan alkaloid yang ditemukan pada tanaman kelompok piridin dari keluarga piperaceae, seperti Piper longum (Cabai jawa) dan Piper nigrum (Lada hitam). Piperin merupakan stereoisomer trans 1-piperoylpiperidine. Isomer itu juga dikenal sebagai (E, E) -1- piperoylpiperidine dan (E, E) -1- [5- (1, 3-benzodioxol-5-yl) -1-oxo-2, 4-pentdienyl] peridine (Gorgani, 2017)



Gambar 2. Struktur Piperin (NCBI, 2021)

Dalam pengobatan di China dan India, lada hitam biasa digunakan untuk megobati rasa sakit, penenang, flu, nyeri otot, dan demam. Lada hitam juga biasa ditambahkan dalam teh untuk mengobati migrain, serak, dan masalah pencernaan. Dalam penelitian terbaru piperin menunjukkan hasil yang baik sebagai antikanker, antioksidan, *hepatoprotective*, imun modulator, antiinflamasi, antimikroba, dan antiulserasi. Piperin juga memiliki efek

biotransformatif dan dapat meningkatkan bioavailabilitas beberapa macam obat seperti rifampicin, sulfadiazine, tetrasiklin, dan fenitoin dengan meningkatkan absorpsi, menurunkan metabolisme obat, atau dengan mengkombinasikan kedua cara tersebut (Gorgani, 2017).

Meskipun piperin memiliki sifat terapeutik yang sangat baik, piperin hanya larut sedikit dalam air yaitu 40 mg/L pada suhu 18⁰ C. Larutnya piperin dalam air yang rendah menjadi suatu faktor mengapa piperin belum digunakan secara luas. Selain itu, penggunaan piperin pada konsentrasi tinggi dapat menjadi racun bagi sistem saraf pusat dan sistem reproduksi. Namun, penggunaan nanoteknologi sudah menjadi kemajuan terkini untuk mengatasi tingkat kelarutan dalam air yang rendah pada piperin sehingga hal ini diharapkan menjadi solusi agar piperin bisa digunakan secara luas (Gorgani, 2017).

2.1.3 Mekanisme Piperin sebagai Antioksidan

Paparan radiasi, polutan lingkungan, *tissue injury*, infeksi dan autoimun dapat menyebabkan produksi radikal bebas. Radikal bebas dapat menyebabkan kerusakan yang dapat diatasi dengan meningkatkan konsentrasi antioksidan dalam jaringan. (Gorgani, 2017).

Antioksidan disebut sebagai senyawa yang dapat menghambat serta mencegah proses reaksi oksidasi oleh radikal bebas pada lipid yang memiliki konsentrasi lebih rendah daripada substrat yang akan dioksidasi. Antioksidan diperlukan dan berfungsi untuk mencegah stres oksidatif. Stres oksidatif didefinisikan dengan adanya ketidakseimbangan jumlah radikal bebas yang terdapat dalam tubuh dengan jumlah antioksidan didalam tubuh. Radikal bebas diartikan sebagai senyawa yang mengandung satu atau lebih elektron tidak berpasangan dalam orbitalnya yang memiliki sifat sangat reaktif dan

mampu melakukan proses oksidasi molekul di sekitarnya seperti protein, DNA, lipid, dan karbohidrat. Antioksidan bersifat sangat mudah dioksidasi, sehingga radikal bebas akan mengoksidasi antioksidan dan melindungi molekul lain dalam sel dari kerusakan akibat oksidasi oleh radikal bebas atau oksigen reaktif (Werdhasari, 2014).

Piperin pada penelitian secara *in vitro* menunjukkan pengaruh positif sebagai proteksi untuk melawan kerusakan oksidatif akibat pengaruh radikal bebas, oksigen reaktif, dan penghambatan peroksidasi lemak. Piperin memiliki aktivitas antioksidan dan dapat mengurangi zat reaktif asam thiobarbituric dan mempertahankan kadar superoksida dismutase, katalase, glutathione-S-transferase, dan glutathione, hal ini dapat mengurangi stress oksidatif yang diinduksi diet tinggi lemak dalam sel (Gorgani, 2017).

4.2 Zink

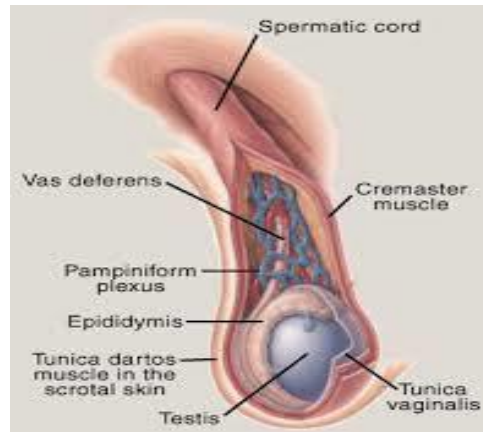
Kelenjar aksesori seksual mensekresi air mani yang mengandung beberapa elemen yang melindungi spermatozoa pada saat ejakulasi. Elemen tersebut terdiri dari protein, enzim (asam fosfatase, alanin transaminase, alkali fosfatase, aspartate transaminase), lipid, unsur makro [sodium (Na^+), kalium (K^+), kalsium (Ca^{2+}), magnesium (Mg^{2+}), fosfat (P), dan klorida (Cl)], dan unsur mikro [tembaga (Cu), besi (Fe), dan seng (Zn)] (Fallah, 2018).

Zn adalah unsur mikro yang berlimpah di dalam tubuh dan dapat ditemukan pada kacang-kacangan, polong-polongan, makanan laut, difortifikasi sereal, jamur cremeni, yogurt rendah lemak, dan protein hewani. Beberapa laporan penelitian menunjukkan mengkonsumsi makanan diatas dapat meningkatkan perkembangbiakkan sel germinal, nutrisi Zn yang buruk dapat menurunkan kualitas sperma, dan menyebabkan idiopatik infertilitas pada pria (Fallah, 2018).

Konsentrasi Zn yang tinggi dalam air mani memiliki peran dalam fungsi sperma, seperti faktor antiinflamasi, efek pada fleksibilitas lipid, dan stabilisasi membran sperma. Pada reproduksi pria, Zn tidak hanya terlibat pada perkembangan anatomis dan fungsi normal organ reproduksi pria, tetapi juga meningkatkan spermatogenesis dengan berpartisipasi aktif dalam pematangan spermatozoa dan perkembangbiakkan sel germinal. Zn juga berperan dalam produksi dan sekresi testosteron dari sel Leydig. Kekurangan Zn dari tubuh atau rendahnya konsentrasi Zn dalam darah sangat mempengaruhi spermatogenesis, karena kekurangan Zn menyebabkan disfungsi gonad, penurunan berat testis, dan penyusutan tubulus seminiferous (Kumar, 2016).

2.3 Anatomi Testis

Testis adalah sepasang gonad laki-laki yang berbentuk ovoid yang menghasilkan sel-sel germinal laki-laki (sperma) dan hormon laki-laki (testosteron). Testis juga berbentuk pipih dengan ketebalan $\pm 2,5$ cm, yang tergantung dalam scrotum oleh funiculus spermaticus, dengan testis kiri biasanya tergantung lebih ke inferior daripada testis kanan (Moore, 2013). Rerata testis memiliki ukuran $4 \times 3 \times 2,5$ cm, dengan berat ± 32 gram. Testis dilapisi oleh tunika vaginalis pars parietalis, tunika vaginalis pars visceralis, tunika albuginea dan tunika vaskulosa. Testis mempunyai lobulus yang dipisahkan oleh septum testis yang terbentuk dari penebalan tunika albuginea. Setiap lobus pada testis terdiri dari tubulus seminiferus dan interstitial testis (Adelati, 2016).



Gambar 3. Anatomi Testis Manusia (Adelati, 2016)

Inervasi pada testis yaitu arteria testicularis yang berasal dari aspek anterolateral aorta abdominalis tepat di sebelah inferior arteria renalis. Arteri testicularis berjalan retroperitoneal dalam arah oblik yang melewati ureter dan bagian inferior arteria iliaca externa untuk mencapai anulus inguinalis profundus. Arteri memasuki canalis inguinalis melalui anulus profundus, berjalan melalui canalis, keluar melalui anulus inguinalis superficialis, dan masuk ke funiculus spermaticus untuk memperdarahi testis (Moore, 2013).

Sedangkan vena-vena yang keluar dari testis dan epididymis membentuk plexus pampiniformis, suatu jejaring 8-12 vena yang terletak di anterior ductus deferens dan mengelilingi arteria testicularis dalam funiculus spermaticus. Plexus pampiniformis adalah bagian sistem pengatur suhu testis yang membantu mempertahankan kelenjar tersebut pada temperatur konstan. Vena-vena pada setiap plexus pampiniformis bertemu di superior, membentuk vena testicularis dextra yang masuk vena cava inferior dan vena testicularis sinistra yang masuk vena renalis sinistra (Moore, 2013).

2.4 Fisiologi

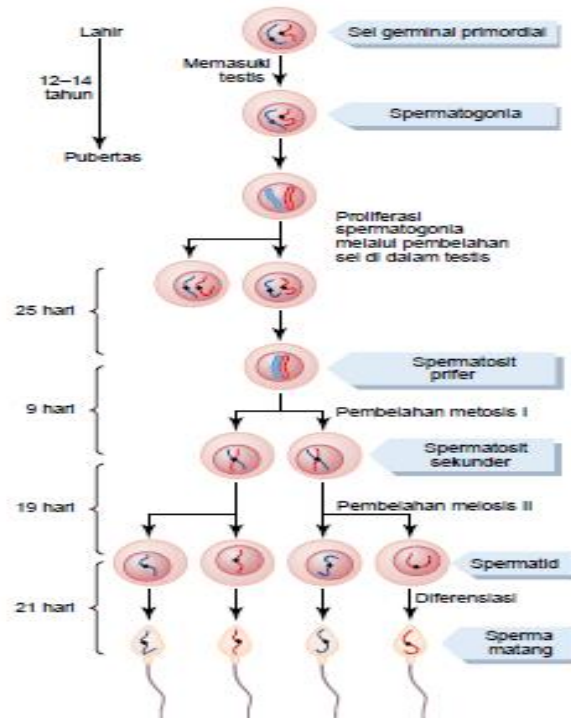
2.4.1 Spermatogenesis

Spermatogenesis dapat didefinisikan sebagai proses pembelahan sel germinal untuk memproduksi spermatozoa yang terjadi di dalam epitelium tubulus seminiferus dengan melalui fase perubahan dari

spermatogonia dengan 46 kromosom (diploid) mengalami proliferasi, lalu berdiferensiasi menjadi spermatozoa yang sangat khusus serta dapat bergerak. Masing – masing spermatozoa mengandung komponen haploid 23 kromosom yang terdistribusi secara acak (Sherwood, 2015). Spermatogenesis terjadi selama masa seksual aktif, pada manusia dimulai rerata pada umur 13 tahun dan terus berlanjut hampir di seluruh sisa kehidupan dan akan menurun produksinya pada usia tua (Guyton, 2012).

Proses spermatogenesis pada manusia memiliki beberapa tahapan, yaitu tahap proliferasi mitosis, tahap meiosis, dan tahap pematangan sperma atau spermiogenesis. Pada awalnya, spermatogonia primitif memiliki 46 kromosom yang identik atau mirip dengan sel induknya, lalu berkumpul di tepi membran basal epitel germinativum untuk mempertahankan sel germinativum yang disebut sebagai spermatogonia tipe A. Spermatogonia tersebut membelah menjadi sel yang lebih berdiferensiasi yaitu spermatogonia tipe B. Pada tahap ini spermatogonia tipe B bermigrasi atau berpindah ke arah tengah biasa disebut sentral lumen di antara sel-sel sertoli untuk menghasilkan spermatozoa. Dalam waktu kurang lebih 24 hari setiap spermatogonium yang telah melewati lapisan pertahanan masuk ke dalam lapisan sel sertoli akan dimodifikasi untuk membentuk spermatosit primer dengan 46 kromosom. Pada fase atau tahap mitosis terakhir, sebelum tahap pembelahan meiosis pertama, spermatosit primer masuk ke fase istirahat untuk persiapan. Pada akhir hari ke-24, tahap pembelahan meiosis pertama dimulai. Tahap tersebut membuat setiap spermatosit primer terbagi dua menjadi spermatosit sekunder dengan jumlah masing-masing spermatosit sekunder haploid 23 kromosom. Setelah meiosis kedua terjadi proses ini memproduksi empat spermatid yang masing – masing spermatidnya memiliki 23 kromosom tunggal tidak identic dengan induknya. Setelah fase atau tahap meiosis telah selesai,

tidak akan ada pembelahan sel lagi. Proses pembentukan spermatozoa ini membutuhkan waktu dengan rerata 64-75 hari (Adelati, 2016).



Gambar 4. Spermatogenesis pada Manusia (Guyton, 2014)

Spermatogenesis pada mencit dan tikus dibagi menjadi tiga jenis spermatogonia yaitu spermatogonia A, spermatogonia intermedia dan spermatogonia B. Spermatogonia tipe A memiliki dua macam sel, yang pertama adalah sel gelap (*dark cell*) tidak aktif membelah dan bersifat stem sel (sel-sel persediaan dalam waktu panjang). Lalu, sel pucat (*pale cell*) merupakan jenis spermatogonium A yang aktif membelah dan berasal dari sel gelap. Spermatogonium tipe B berasal dari tipe A yang membelah dan meninggalkan kemampuannya untuk membelah secara mitosis, kemudian menyelesaikan proses spermatogenesis. Sedangkan, spermatogonia intermedia merupakan bentuk peralihan antara spermatogonia A dan spermatogonia B (Akbar, 2010).

Waktu yang dibutuhkan untuk satu siklus spermatogenesis pada tikus adalah 48 hari. Pada potongan melintang tubulus seminiferus testis tikus tipe asosiasi sel dibagi dalam 14 tahap. Setiap asosiasi sel terdiri dari sekumpulan sel spermatogenik yang tersusun teratur. Dimulai dari spermatogonia, spermatosit, dan spermatid. Tahapan spermatogenesis tersusun dari susunan spermatogonia A, spermatogonia intermedia, spermatogonia B, spermatosit primer dalam berbagai tahapan profase (leptoten, zigoten, pakiten, diploten, dan diakinase) dan spermatid (França, 1998).

Produksi spermatozoa pada tikus per testis adalah $35,4 \times 10^6/\text{mL}$ setiap harinya dan pada manusia yakni sebesar $45,5 \times 10^6/\text{mL}$. Tubulus seminiferus tikus lebih tebal dari pada manusia yakni $347 \pm 5 \mu\text{m}$ pada tikus dan $262 \pm 9 \mu\text{m}$ pada manusia, tetapi pembatas tubulus pada tikus lebih jauh tipis dibanding manusia yaitu $1,4 \pm 1 \mu\text{m}$ dan pada manusia $15,9 \pm 3,4 \mu\text{m}$. Epitel seminiferus tikus mengandung 40% lebih sel spermatogenik dari volumenya, dua kali lebih banyak dari epitel seminiferus manusia. Spermatozoa pada tikus lebih panjang dibandingkan dengan spesies mamalia lainnya, termasuk manusia dan hewan lainnya dan biasanya panjangnya sekitar 150-2000 μm . Kepala sperma pada tikus berbentuk kail hal ini sama seperti hewan pengerat lainnya (Maula, 2014).

2.4.2 Spermiogenesis

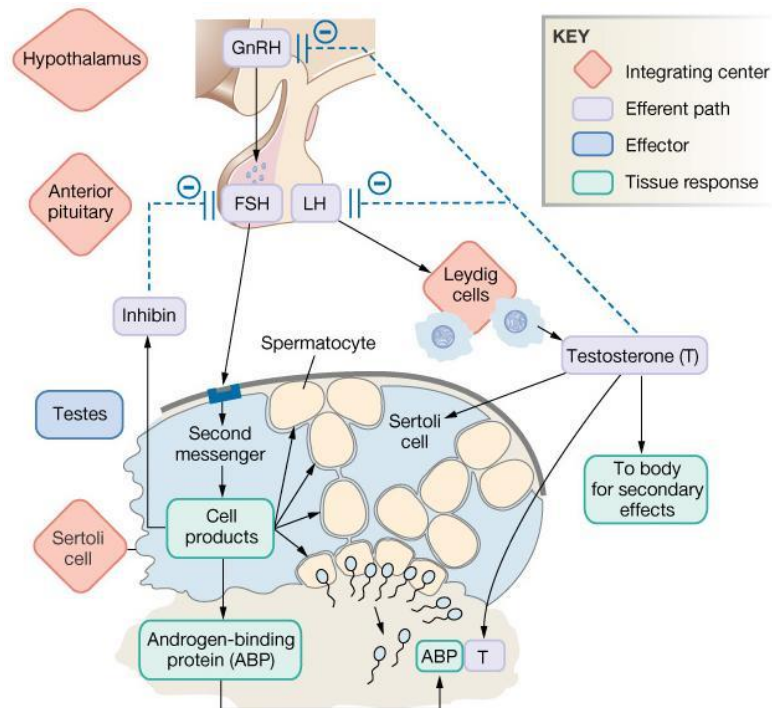
Spermiogenesis merupakan proses pematangan sperma. Dalam spermiogenesis, terjadi transformasi spermatid hasil dari spermatogenesis menjadi spermatozoa. Pada proses spermiogenesis ini tidak ada pembelahan sel yang berlangsung (Mescher, 2016). Selama proses ini spermatid yang berbentuk *spheris* akan memanjang dan ramping. Akrosom akan terbentuk di atas nucleus, flagellum akan berkembang dan mitokondria berkembang biak. Setelah itu, cairan akan

disekresikan oleh sel-sel penyokong untuk mendorong sperma di sepanjang jalan menuju saluran testis (Tortora, 2012).

Spermatozoa memiliki empat bagian antara lain kepala, akrosom, bagian tengah, dan ekor. Kepala spermatozoa terdiri dari nukleus, yang mengandung informasi genetik sperma (Sherwood, 2015). Di bagian luar, dua pertiga anterior kepala terdapat selubung tebal yang disebut akrosom yang terutama dibentuk oleh aparatus golgi. Selubung ini mengandung sejumlah enzim yang serupa dengan enzim yang ditemukan pada lisosom, meliputi hialuronidase (mencerna filamen proteoglikan jaringan) dan enzim proteolitik yang sangat kuat (mencerna protein). Enzim ini berperan penting sehingga memungkinkan sperma bisa memasuki ovum dan membuahnya (Guyton, 2014).

2.4.3 Pengaruh Hormon dalam Spermatogenesis

Pengaturan fungsi seksual pria diawali oleh sekresi gonadotropin releasing hormone (GnRH) dari hipotalamus. Sekresi GnRH akan merangsang sel gonadotrop di hipofisis anterior untuk mensekresi Luteinizing hormone (LH) dan Folicle Stimulating Hormone (FSH). Waktu paruh GnRH sangat pendek (<10 menit) dan akan di degradasi oleh kelenjar hipofisis. Sekresi GnRH oleh hipotalamus diikuti dengan level LH yang memuncak (peak level). Sekresi GnRH secara terus menerus atau dengan frekuensi yang tinggi justru akan menghambat sekresi gonadotropin dan mengganggu fungsi testis (Setiawan, 2014).



Gambar 5. Pengaturan Hormon pada Reproduksi Pria (Sherwood, 2015)

Hormon LH dan FSH akan mengikuti aliran darah menuju testis. Testis memiliki dua bangunan penting, yaitu tubulus seminiferus dan sel Leydig yang terletak diantara tubulus seminiferus. Pada membran basalis tubulus seminiferus terdapat Sel Sertoli (Setiawan, 2014).

Sel Leydig merupakan penghasil hormon testosteron pada pria. Hormon testosteron pada masa janin dibutuhkan tubuh untuk differensiasi duktus Wolfii yang akan menjadi epididimis, duktus efferent, duktus defferen dan vesikula seminalis. Pada masa dewasa hormon testosteron penting untuk proses spermatogenesis. Melalui proses biokimiawi, hormon testosteron akan diubah menjadi hormon estrogen yang bersama hormon testosteron dibutuhkan untuk proses spermatogenesis (Setiawan, 2014).

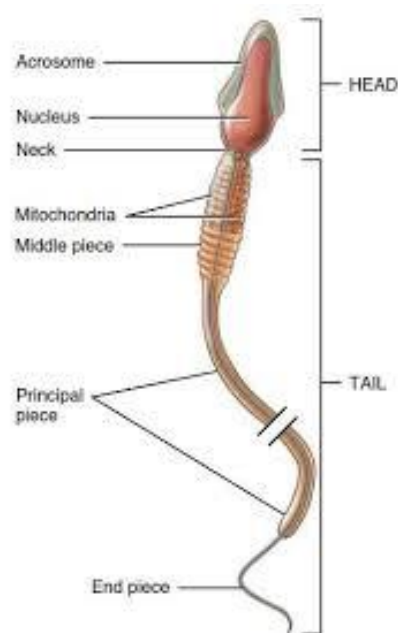
FSH yang disekresikan oleh hipofisis anterior akan berikatan dengan reseptor spesifik FSH di sel Sertoli. Enzim aromatase merupakan hasil sekresi sel Sertoli yang dibutuhkan oleh testis untuk katalisis testosteron menjadi estrogen. Sel Sertoli juga mensintesis Androgen binding protein (ABP) yang akan berikatan dengan testosteron. Testosteron perlu berikatan dengan ABP untuk memasuki tubulus seminiferus untuk memulai proses spermatogenesis (Setiawan, 2016).

2.4.4 Viabilitas Spermatozoa

Salah satu faktor yang dijadikan indikator terhadap mutu dan kualitas semen adalah tinggi rendahnya presentase hidup atau viabilitas spermatozoa (Simbolon, 2013). Viabilitas merupakan daya hidup spermatozoa yang dijadikan sebagai indikator kualitas spermatozoa (Sukmawati, *et. al*, 2014). Viabilitas sperma harus dinilai jika persentase sperma motil progresif rendah sekitar 30 – 40%. Tingkat normal seorang pria dikatakan subur akan menghasilkan sekitar 58%-60% sperma hidup. Pemeriksaan viabilitas sperma penting untuk menentukan apakah spermatozoa non motil tersebut hidup atau mati. Metode yang dilakukan biasanya dengan cara pengecualian memasuki non vital (mati) sel karena membran plasma yang rusak, metode pewarnaan yang umum digunakan adalah eosin-nigrosin. Pada pewarnaan ini, sperma yang tidak layak memiliki kepala warna merah atau merah gelap dan sperma layak memiliki kepala putih atau merah muda yang samar, sebagai acuan sel-sel yang layak tidak akan muncul bernoda dan sebaliknya sel non layak akan mengambil noda. Viabilitas sperma dan kemampuan fertilisasi sperma memiliki korelasi positif dalam keberhasilan reproduksi (Silva, 2006). Sperma yang viabel diharapkan mampu melakukan fertilisasi dengan baik sehingga tujuan reproduksi dapat tercapai yakni memperoleh kehamilan (Lailatussaadah, 2014).

2.4.5 Morfologi Spermatozoa

Spermatozoa terdiri atas kepala, akrosom, bagian tengah, dan ekor. Sperma memiliki panjang sekitar 60 mikrometer dan mengandung beberapa struktur yang digunakan untuk menjangkau dan menembus oosit sekunder. Kepala sperma memiliki nukleus yang mengandung informasi genetik sperma. Nukleus terdiri atas sel berinti padat dengan hanya sedikit sitoplasma dan lapisan membran sel di sekitar permukaannya. Di bagian luar, dua pertiga anterior kepala terdapat selubung tebal yang disebut akrosom. Akrosom mengandung enzim hialuronidase yang dapat mencerna filamen proteoglikan dari jaringan dan dapat mencerna protein sehingga dapat digunakan sebagai “borenzimatik” untuk menembus ovum (Tortora, 2012).



Gambar 6. Struktur Sperma Manusia (Tortora, 2014)

Tabel 1 Struktur Normal Spermatozoa pada Manusia

Kepala	Berbentuk oval, ukuran 5 x 3 μm , panjang kepala >5 μm dimasukkan dalam bentuk makro, rasio panjang dan lebar kepala 1,50 : 1,75. Kepala spermatozoa berisi inti yang didalamnya terdapat material genetik, haploid yang berisi kantong dengan enzim hidrolitik. Akrosom meliputi sekitar 40-70% dari luas Kepala, berbatas tegas.
Leher	Terdiri dari susunan lipid, kalium, kalsium, besi, Cu, fosfat, sulfhidril, disulfida, dan kolesterol. Leher memiliki panjang 1 – 2 μm termasuk basis flagelum, cekungan inti, keping penghubung dengan sentriol proksimal dan distal.
Ekor	Panjang ekor 9 sampai 10 kali panjang kepala, bentuk lurus memanjang dari kepala atau membentuk alur gelombang. Ekor dapat dibagi menjadi 3 bagian, yaitu middle piece yang berdekatan dengan leher, panjang 10 μm mengelilingi sepasang tubulus central. Principal piece yaitu bagian utama dengan panjang 40 – 45 μm , merupakan bagian yang terpanjang dengan serabut fibrus. End piece yaitu bagian terminal dengan panjang sekitar 2 - 5 μm , pada bagian ujung sudah tidak ada lagi serabut fibrus dan susunannya seperti silia biasa.

(Robicahyadi, 2018)



Gambar 7. Morfologi Sperma Manusia (Robicahyadi, 2016)

Bentuk sperma abnormal menurut Robicahyadi (2018) :

1. Makro : Ukuran kepala sperma lebih besar dibandingkan ukuran kepala sperma normal.
2. Mikro : Ukuran kepala sperma lebih kecil dibandingkan ukuran kepala sperma normal.
3. Taper : Sperma kurus, lebar kepalanya setengah dari kepala normal dan batas akrosomnya tidak jelas.
4. Piri : Tidak jelas terlihat adanya kepala, hanya tampak midpiece dan ekor.
5. Amorf : Bentuk kepala sperma ganjil, batas akrosomnya tidak jelas.
6. Round : Bentuk kepala sperma seperti lingkaran, tidak terdapat akrosom.
7. Cytoplasmic droplet : Menempel pada kepala dan warna lebih cerah.
8. Ekor abnormal : Ekornya pendek atau spiral dan permukaan tidak halus atau ganda.

2.5 Infertilitas

2.5.1 Definisi

Infertilitas terbagi menjadi dua, yaitu infertilitas primer dan sekunder. Infertilitas primer merupakan sebuah permasalahan pada sistem reproduksi yang digambarkan dengan kegagalan untuk memperoleh kehamilan setelah 12 bulan atau lebih melakukan hubungan seksual secara teratur tanpa menggunakan alat kontrasepsi. Infertilitas sekunder diartikan sebagai ketidakmampuan untuk memiliki anak atau mempertahankan kehamilannya (HIFERI, 2013). Ketika jumlah sperma dalam setiap mililiter turun kurang dari 20 juta, orang tersebut sepertinya hampir mengalami infertilitas (Guyton, 2012).

2.5.2 Etiologi

Infertilitas dapat terjadi pada pria dan wanita. Faktor infertilitas pria diidentifikasi bersama dengan kelainan pemeriksaan cairan semen (Ikatan Ahli Urologi Indonesia, 2015).

Ada dua faktor yang mempengaruhi kesehatan reproduksi yaitu: faktor endogen, meliputi tahap seluler, jaringan dan organ. Yang kedua adalah faktor eksogen, meliputi lingkungan dan pola hidup (*lifestyle*). Masalah kesehatan pria yang paling sering dijumpai adalah kelainan pada sistem reproduksi, disfungsi seksual, infertilitas, penyakit sistemik dan kesehatan mental. Kelainan pada sistem reproduksi adalah tidak tumbuh normalnya korteks dan kelenjar asesorisnya serta pembesaran prostat. Disfungsi seksual dapat berupa gangguan libido, ereksi, ejakulasi dan orgasme. Infertilitas dapat berupa abnormalitas volume semen, kualitas dan kuantitas sperma (Ferial, 2012). Infertilitas pria berkaitan dengan kelainan yang terdapat pada fase- fase yaitu, pre testikuler (kelainan pada rangsangan proses spermatogenesis), testikuler (kelainan dalam proses spermatogenesis), dan pasca testikuler (kelainan pada proses transportasi sperma hingga terjadi fertilisasi) (Purnomo, 2016).

Pada penelitian Taher *et al* (2015), terdapat 30-40% kasus infertilitas pria yang tidak ditemukan penyebabnya (infertilitas idiopatik). Saat proses anamnesis hingga pemeriksaan tidak ada riwayat penyakit yang mempengaruhi fertilitas, tidak ditemukan kelainan pada pemeriksaan fisik, serta pemeriksaan laboratorium endokrin, genetik, dan biokimia. Infertilitas pria idiopatik ini dianggap terjadi akibat beberapa faktor, seperti gangguan endokrin akibat polusi lingkungan, *reactive oxygen species* (ROS), atau gangguan genetik dan epigenetik.

Faktor lain yang menyebabkan infertilitas pria adalah gaya hidup (konsumsi alkohol, merokok, kafein, berat badan, stres, olahraga, obat-obatan), serta pekerjaan (HIFERI, 2013). Selain itu infeksi, radiasi, nutrisi, spesies oksigen reaktif (ROS), estrogen, logam berat, suhu skrotum, antibodi sperma. Beberapa antibiotik memiliki efek merugikan pada spermatogenesis, parameter sperma dan kesuburan. Efek ini telah dilaporkan berupa antibiotik nitrofurantoin, sulfasalazin, derivat tetrasiklin, kelompok penisilin, ampisilin, aminoglikosida (gentamisin dan neomisin) (Khaki, 2015).

2.5.3 Diagnosis

Infertilitas pada pria dapat didiagnosis dengan metode analisis semen. Anamnesis dan pemeriksaan fisik pada pasien juga memiliki nilai yang sama pentingnya dengan analisis semen (EAU, 2015). Anamnesis pada kasus infertilitas meliputi pertanyaan : (1) Riwayat medis dan riwayat operasi sebelumnya, (2) Riwayat penggunaan obat-obatan dan alergi, (3) Gaya hidup dan riwayat gangguan sistemik, (4) Riwayat penggunaan alat kontrasepsi, dan (5) Riwayat infeksi sebelumnya, misalnya penyakit menular seksual dan infeksi saluran nafas (HIFERI, 2013).

Tabel 2. Batas Bawah Pemeriksaan Analisis Sperma

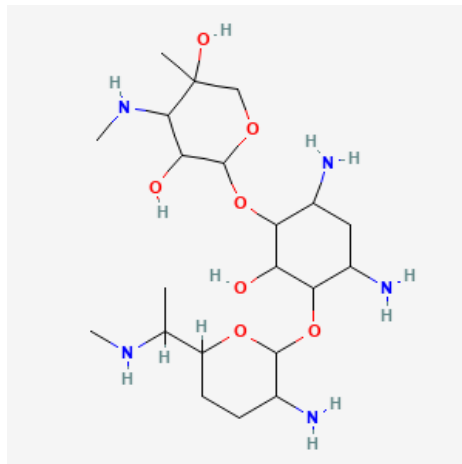
Parameter	Batas Bawah
Volume semen (mL)	1,5 (1,4-1,7)
Jumlah sperma total (10^6 per ejakulat)	39 (33-46)
Konsentrasi sperma (10^6 per mL)	15 (12-16)
Motilitas total (<i>progressive + non-progressive</i> , %)	40 (38-42)
Motilitas progresif (<i>progressive</i> , %)	32 (31-34)
Viabilitas (spermatozoa yang hidup, %)	58 (55-63)
Morfologi sperma (bentuk normal, %)	4 (3,0-4,0)
<i>Konsensus Lainnya</i>	
pH	> 7,2
Leukosit peroksidase positif (10^6 per mL)	< 1,0
<i>Pemeriksaan optional</i>	
Tes <i>mixed antiglobulin reaction</i> (spermatozoa motil dengan partikel ikatan, %)	< 50
Tes immunobead (spermatozoa motil dengan <i>bound beads</i> , %)	< 50
Zink seminal (μmol /ejakulat)	> 2,4
Fruktosa seminal (μmol /ejakulat)	> 13
Glukosidase netral seminal (μmol /ejakulat)	> 20

(Ikatan Ahli Urologi Indonesia, 2015)

2.6 Pengaruh Gentamisin terhadap Radikal Bebas

Gentamisin merupakan antibiotik golongan aminoglikosida yang didapat dari isolasi *Micromonas purpurea*. Gentamisin efektif terhadap bakteri gram positif dan gram negatif. Pada infeksi berat akibat bakteri gram negatif seperti sepsis dan pneumonia gentamisin sering digunakan. Infeksi berat ini khususnya karena bakteri *P. Aeruginosa*, *Enterobacter sp*, *Serratia marcesens*, *Proteus sp*, *Acinobacter sp*, dan *Klebsiella sp*. Gentamisin biasa digunakan bersamaan dengan antibiotik lini kedua untuk penanganan infeksi saluran kemih bagian luar dan infeksi *staphylococcus* (Katzung, 2017).

Gentamisin biasanya diberikan melalui cairan infus secara intravena (IV) selama 30-60 menit dengan dosis 5-6 mg/kg dapat dibagi menjadi 3 dosis pemberian atau dosis tunggal per hari. Batas konsentrasi gentamisin dalam plasma adalah $<2\mu\text{g/ml}$ agar tidak timbul efek toksik (Katzung, 2015).



Gambar 8. Struktur gentamisin (NCBI, 2021)

Menurut penelitian Khaki, (2015) pada antibiotik golongan aminoglikosida, gentamisin dapat menginduksi stres oksidatif pada saluran reproduksi pria yang menyebabkan kerusakan spermatogenesis. Pemberian dosis 3 dan 5 mg/kg dapat menyebabkan penurunan berat vesikula seminalis dan penurunan jumlah sperma. Sedangkan pada dosis tinggi akan terjadi kelainan sperma, penurunan motilitas sperma, produksi spermatozoa abnormal dan perubahan struktur misalnya, (atrofi tubulus, epitel seminiferus mengelupas, penyusutan celah epitel dan tubulus). Gentamisin juga meningkatkan pembentukan radikal bebas dan peroksidasi lipid dengan cara menurunkan kadar enzim antioksidan. Kerusakan oksidatif yang dipicu oleh radikal bebas terhadap spermatozoa dapat meningkatkan tingkat infertilitas pada pria (Fetouh, 2014). Pada penelitian El-Maddawi (2014), penggunaan dosis gentamisin 20 mg/kgbb dan 80 mg/kgbb dalam waktu eksperimen 10 dan 56 hari, dapat menginduksi keabnormalitasan fertilitas secara signifikan dengan menurunnya berat testis, epididimis, kelenjar aksesoris, jumlah hormon testosteron, konsentrasi sel sperma dan motilitas. Gentamisin dapat menginduksi kelainan reproduksi akibat efek toksik langsung pada testis yang diinduksi oleh stres oksidatif. Oleh karena, spermatozoa memiliki asam lemak tak jenuh yang tinggi dalam plasma sehingga sangat rentan terhadap konsentrasi ROS yang berlebihan.

Stres oksidatif merupakan ketidakseimbangan antara sistem prooksidan dengan antioksidan akibat radikal bebas atau menurunnya konsentrasi antioksidan atau keduanya. Stres oksidatif terjadi karena adanya akumulasi dari jumlah spesies oksigen reaktif (ROS) yang berlebihan, dimana sumber ROS di dalam plasma seminal dapat berasal dari endogen maupun eksogen. ROS endogen berasal dari leukosit (netrofil, makrofag), tipe sel lain dibawah kondisi patologis, spermatozoa yang imatur, dan spermatozoa abnormal (Kalpana, 2015). Sedangkan, sumber ROS eksogen berasal dari kebiasaan mengkonsumsi alkohol, merokok, dan faktor lingkungan lain seperti mengosumsi obat antibakteri, radiasi, toksin, polutan (Gadallah, 2018).

2.7 Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Galur Sprague Dawley



Gambar 9. *Rattus norvegicus* galur *Sprague Dawley* (Akbar, 2010)

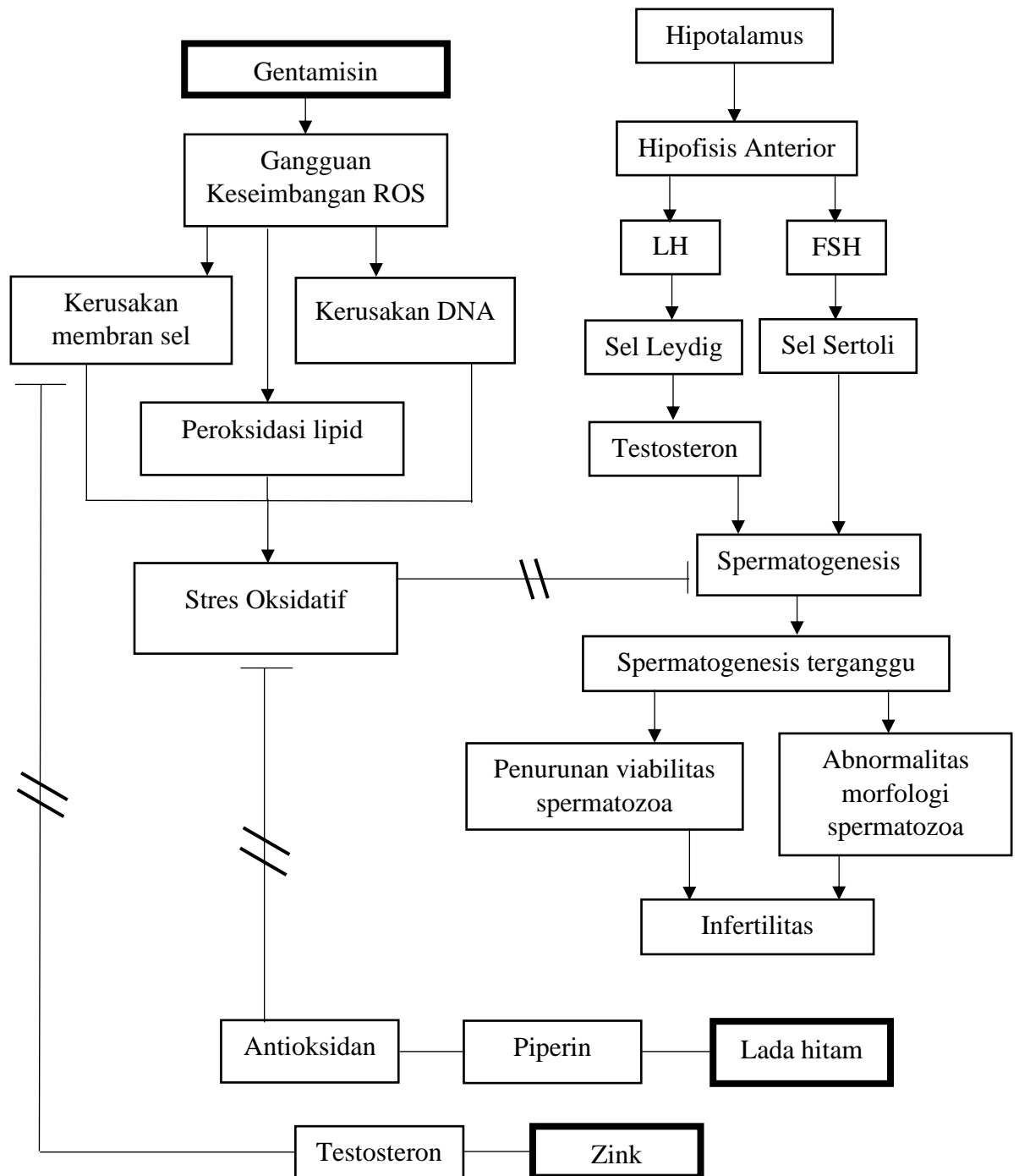
Tikus putih (*Rattus norvegicus*) memiliki beberapa jenis galur, antara lain (1) *Wistar*, (2) *Sprague Dawley*, (3) *Long Evans*, dan (4) *Holdzman* (Maula IF, 2014). Tikus putih galur *Sprague dawley* memiliki ciri-ciri bertubuh panjang dengan kepala lebih sempit. Telinga tikus tebal dan pendek dengan rambut halus, dan mata berwarna merah. Ciri yang paling terlihat adalah ekornya yang panjang (lebih panjang dibandingkan tubuh). Berat badan tikus putih jantan pada umur dua belas minggu mencapai 240 gram sedangkan betinanya mencapai 200 gram. Tikus memiliki lama hidup berkisar antara 4–5 tahun. Tikus ini memiliki keunggulan sebagai hewan percobaan karena dapat berkembang biak dengan cepat, jenis hewan ini berukuran kecil sehingga

pemeliharaannya relatif mudah, relatif sehat dan cocok untuk berbagai macam penelitian (Akbar, 2010).

Adapun taksonomi tikus penelitian ini sebagai berikut:

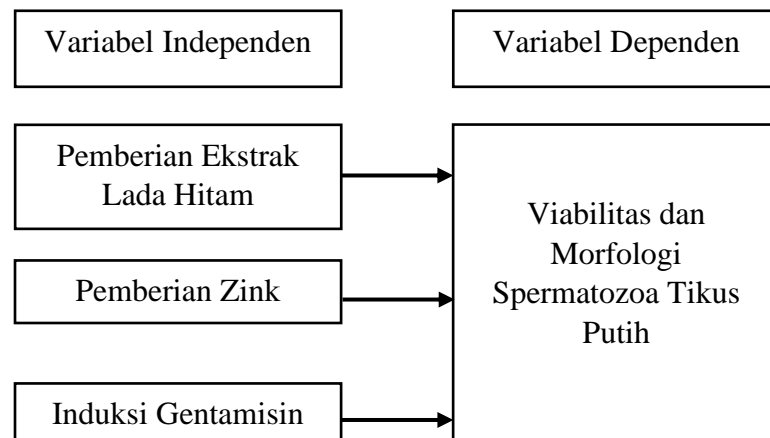
Kingdom : Animal
Filum : Chordata
Subfilum : Vertebrata (Craniata)
Kelas : Mamalia
Subkelas : Theria
Infrakelas : Eutharia
Ordo : Rodentia
Subordo : Myomorpha
Superfamili : Muroidea
Famili : Muridae
Subfamili : Murinae
Genus : Rattus
Spesies : Rattus norvegicus
(Akbar,2010)

2.8 Kerangka Teori



Gambar 10. Kerangka Teori (Sherwood, 2015 ; Zahedi, 2012 ; Fetouh, 2014 ; Gorgani, 2017 ; Kumar, 2016)

2.9 Kerangka Konsep



Gambar 11. Kerangka Konsep

2.10 Hipotesis

1. H₀

- a. Tidak terdapat efek ekstrak metanol lada hitam dikombinasikan dengan zink terhadap viabilitas spermatozoa tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague dawley* yang diinduksi gentamisin.
- b. Tidak terdapat efek ekstrak metanol lada hitam dikombinasikan dengan zink terhadap morfologi spermatozoa tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague dawley* yang diinduksi gentamisin.
- c. Tidak terdapat efek ekstrak n-heksana lada hitam dikombinasikan dengan zink terhadap viabilitas spermatozoa tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague dawley* yang diinduksi gentamisin.
- d. Tidak terdapat efek ekstrak n-heksana lada hitam dikombinasikan dengan zink terhadap morfologi spermatozoa tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague dawley* yang diinduksi gentamisin.

2. Ha

- a. Terdapat efek ekstrak metanol lada hitam dikombinasikan dengan zink terhadap viabilitas spermatozoa tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague dawley* yang diinduksi gentamisin.
- b. Terdapat efek ekstrak metanol lada hitam dikombinasikan dengan zink terhadap morfologi spermatozoa tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague dawley* yang diinduksi gentamisin.
- c. Terdapat efek ekstrak n-heksana lada hitam dikombinasikan dengan zink terhadap viabilitas spermatozoa tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague dawley* yang diinduksi gentamisin.
- d. Terdapat efek ekstrak n-heksana lada hitam dikombinasikan dengan zink terhadap morfologi spermatozoa tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague dawley* yang diinduksi gentamisin.

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Desain Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental laboratorium. Desain penelitian menggunakan rancangan acak lengkap dengan *post test only control group design*. Dalam penelitian ini dilakukan randomisasi, artinya sebelum diberikan perlakuan semua kelompok kontrol dan eksperimen dianggap sama sehingga pengelompokan kelompok kontrol dan eksperimen dilakukan secara acak. Pengambilan data dilakukan pada akhir penelitian setelah selesai diberi perlakuan dengan membandingkan kelompok eksperimen dengan kelompok kontrol.

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

3.2.1 Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan pada bulan Oktober – November tahun 2021.

3.2.2 Tempat Penelitian

Penelitian ini telah dilaksanakan di *Animal House*, Laboratorium Biokimia, Fisiologi dan Biologi Molekuler Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, dan Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung.

3.3 Subyek Penelitian

3.3.1 Populasi

Populasi penelitian yang digunakan adalah tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague dawley*, berumur 2,5-3 bulan dan berat ± 200 gram.

3.3.2 Sampel

Dalam penelitian ini sampel yang digunakan sebanyak 28 tikus putih dewasa jantan galur *sprague dawley* yang dipilih secara randomisasi atau acak. Kemudian, tikus-tikus itu dibagi dalam 4 kelompok dengan menggunakan rumus Frederer 1967.

Rumus

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

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

$$3n-3 \geq 15$$

$$3n \geq 18$$

$$n \geq 6$$

Jadi, banyaknya ulangan setiap kelompok percobaan adalah 6 ekor. Namun, jumlah ini harus diolah untuk diperhitungkan kembali agar dapat mengantisipasi drop out atau hilangnya unit eksperimen, dengan rumusan sebagai berikut :

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

Keterangan :

N = besar sampel koreksi.

n = besar sampel awal.

f = perkiraan proporsi *drop out* sebesar 10%

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

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

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

$$N = 7$$

N = 7 (Pembulatan ke atas)

Jadi, jumlah sampel yang diperlukan untuk setiap kelompok adalah 7 ekor dan jumlah kelompok yang digunakan sebanyak 4 kelompok sehingga pada penelitian ini menggunakan 28 ekor tikus dari populasi yang ada dengan 4 ekor tikus sebagai cadangan.

3.3.3 Kelompok Perlakuan

1. Kelompok 1

Kelompok tikus yang tidak diinduksi gentamisin dan tanpa pemberian ekstrak lada hitam dan zink (Kontrol 1).

2. Kelompok 2

Kelompok tikus yang diinduksi gentamisin 20 mg/kgBB (i.p) selama 10 hari dan tanpa pemberian ekstrak lada hitam dan zink (Kontrol 2).

3. Kelompok 3

Kelompok tikus yang diberikan ekstrak lada hitam 122,5 mg/KgBB dengan pelarut metanol, zink 3,2 mg/KgBB, dan diinduksi gentamisin 20 mg/kgBB (i.p) selama 10 hari (Kelompok Perlakuan 1).

4. Kelompok 4

Kelompok tikus yang diberikan ekstrak lada hitam 122,5 mg/KgBB dengan pelarut n-heksana, zink 3,2 mg/KgBB, dan diinduksi gentamisin 20 mg/kgBB (i.p) selama 10 hari (Kelompok Perlakuan 2).

3.4 Kriteria Inklusi dan Eksklusi

1. Kriteria Inklusi

- a. Tikus sehat (bergerak aktif, rambut tidak kusam, rontok, dan botak).
- b. Berat tikus \pm 200 gram.
- c. Berjenis kelamin jantan.
- d. Berusia sekitar 2,5-3 bulan.

2. Kriteria Eksklusi

- a. Terdapat penurunan berat badan $>10\%$ setelah masa adaptasi (1 minggu) di laboratorium.
- b. Mati selama masa perlakuan.

3.5 Identifikasi Variabel dan Definisi Operasional

3.5.1 Variabel Penelitian

1. Variabel bebas (*Independent Variabel*)
 - a. Ekstrak lada hitam
 - b. Zink
 - c. Gentamisin
2. Variabel terikat (*Dependent Variabel*)
 - a. Viabilitas spermatozoa.
 - b. Morfologi spermatozoa

3.5.2 Definisi Operasional Variabel Penelitian

Untuk memudahkan penjelasan dan memperlihatkan variabel-variabel yang terlibat dalam penelitian ini, maka diberikan definisi operasional sebagai berikut :

Tabel 3. Definisi Operasional

Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala Ukur	Cara Ukur
Ekstrak lada hitam	Lada hitam dibuat menjadi ekstrak dengan zat pelarut metanol dan n-heksana. Lalu, di evaporasi sehingga menjadi serbuk. Setelah itu, dicampur dengan aquades 160 ml dan 400 ml, diberikan kepada tikus selama 10 hari.	Sonde Lambung	Kelompok perlakuan P1 : diberikan larutan ekstrak lada hitam metanol yaitu 1 ml/ekor/hari selama 10 hari P2 : diberikan larutan ekstrak n-heksana lada hitam 1 ml/ekor/hari selama 10 hari	Nominal	Ekstrak lada hitam yang sudah dilarutkan dengan aquades dimasukkan kedalam sonde lambung sebanyak 1 ml.
Zink	Unsur zink adalah semacam mikro mineral yang terdapat di dalam tubuh. Unsur ini sangat diperlukan untuk menjaga dan memperbaiki metabolisme dalam tubuh. Zink merupakan bagian dari berbagai jenis enzim dan bagian dari hormon insulin.	Sonde Lambung	Kelompok perlakuan P1, P2 diberikan ZnSO ₄ sebesar 0,64 mg/ml/ekor/hari selama 10 hari.	Numerik (Rasio)	Zink yang sudah dilarutkan bersamaan dengan ekstrak lada hitam akan diberikan bersamaan dengan 1 ml ekstrak lada hitam.
Induksi gentamisin	Induksi gentamisin dengan dosis 20 mg/kgBB/hari (i.p) selama 10 hari (El-Maddawi, 2014).	Sput	Gentamisin dengan dosis (mg)	Numerik (Rasio)	Besar pemberian 4 mg dengan sediaan gentamisin 40 mg/ml dihasilkan hasil

pemberian sebesar 0,1 ml. Gentamisin dalam ampul akan diinjeksikan dengan menggunakan spuit 1 cc sebesar 0,1 ml.

Viabilitas spermatozoa	Kemampuan spermatozoa untuk dapat terus bertahan hidup selama beberapa waktu setelah dikeluarkan dari saluran reproduksi jantan	Mikroskop	Persentase viabilitas spermatozoa dibandingkan dengan total spermatozoa yang diamati	Numerik (Rasio)	Menghitung banyaknya spermatozoa yang masih hidup (tidak berwarna) dan spermatozoa yang mati (berwarna merah muda).
Morfologi spermatozoa	Morfologi spermatozoa adalah bentuk spermatozoa baik normal maupun abnormal, abnormalitas dapat terjadi pada (kepala, midpiece atau ekor)	Mikroskop	Morfologi spermatozoa yang diamati dibandingkan dengan spermatozoa yang normal	Numerik (Rasio)	Menghitung banyak spermatozoa yang normal baik kepala, leher, dan ekornya dengan menggunakan mikroskop dan <i>handcounter</i> .

3.6 Alat dan Bahan Penelitian

3.6.1 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan diantaranya :

1. Neraca elektronik
2. Kandang tikus
3. Timbangan
4. *Handcounter*
5. Tempat makan dan minum tikus
6. Sonde lambung
7. Cawan petri
8. Toples plastik yang mempunyai tutup
9. *Object* dan *cover glass*
10. Alat bedah (bak paraffin, gunting, pinset, jarum, gelas arloji)
11. *Spuut* 1 cc dengan jarum ukuran 26
12. Alat-alat dalam pengamatan mikroskop cahaya
13. *Handscoen* dan masker
14. Gelas ukur

3.6.2 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan diantaranya :

1. Tikus galur *Sprague dawley*
2. Ekstrak lada hitam
3. Pelarut metanol
4. Pelarut n-heksana
5. Zink
6. Sekam
7. Gentamisin
8. Pakan tikus
9. Air minum
10. Bahan-bahan untuk pengamatan mikroskop
11. NaCl 0,9%
12. Zat untuk pewarnaan (Giemsa, Eosin 0,5%)

3.7 Prosedur Penelitian

3.7.1 Pengadaan Hewan Uji

Hewan uji berupa tikus putih galur *sprague dawley* berjumlah 28 ekor diperoleh dari Institut Pertanian Bogor University.

3.7.2 Pemeliharaan Hewan Uji

Hewan uji tikus putih galur *sprague dawley* akan menjalani masa adaptasi selama 1 minggu di kandang pemeliharaan untuk menyeragamkan cara hidup dan makanannya sebelum diberi perlakuan. Tikus ditempatkan di kandang pemeliharaan dengan tutup terbuat dari kawat dan dialasi oleh sekam kayu setebal 0,5-1 cm dan diganti setiap tiga hari untuk mencegah terjadinya infeksi. Dalam 1 kelompok, 4 ekor tikus ditempatkan dalam 1 kandang. Suhu dijaga pada suhu 25°C, lingkungan kandang dijaga agar tidak lembab dan diberikan pencahayaan yang cukup. Pemberian makanan dan minuman melalui *ad libitum*. Makanan tikus diberikan berupa pelet. Pemberian makanan dan minuman diberikan secukupnya dengan wadah terpisah dan diganti setiap hari untuk menjaga kesehatan tikus agar tidak sakit atau mati.

3.7.3 Pembuatan Ekstrak Lada Hitam

Buah lada hitam (*Piper nigrum* Linn.) diperoleh dari petani lada di daerah Tanggamus, Lampung, Indonesia. Buah lada hitam dikeringkan dan ditumbuk halus sampai menjadi serbuk sebanyak 100 gram. Lalu, serbuk lada hitam diekstraksi dengan metode maserasi bertingkat menggunakan pelarut n-heksana sebesar 300 ml yang dilakukan pengocokan sebanyak 3 kali. Setelah itu, hasil yang akan didapatkan berupa filtrat dan residu. Hasil filtrat diuapkan sehingga menghasilkan ekstrak heksana sebesar 4 gram. Sedangkan hasil residu dilakukan pengocokan sebanyak 3 kali dengan menggunakan pelarut metanol 300 ml. Hasil yang didapatkan setelah pengocokan dengan menggunakan

metanol berupa filtrat dan residu. Hasil filtrat diuapkan kembali sehingga mendapatkan ekstrak metanol sebesar 10 gram.

Penentuan dosis untuk setiap perlakuan didasarkan pada penelitian yang dilakukan oleh Dyah Gaby dan Thalita Badzlina pada tahun 2013. Penelitian tersebut menggunakan dosis pemberian sebesar 122,5mg/KgBB selama 8 hari. 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 $122,5 \text{ mg/KgBB} \times 0,2 \text{ Kg (berat tikus)} = 24,5 \text{ mg}$ dibulatkan menjadi 25 mg.

Pada penelitian ini larutan ekstrak lada hitam yang diberikan per harinya pada satu ekor mencit adalah 1 ml. Oleh karena itu, ekstrak lada hitam yang didapat dari pelarut n-heksana sebesar 4 gram dilarutkan terlebih dahulu dalam aquades 160 ml. Sedangkan pada ekstrak lada hitam dengan pelarut metanol sebesar 10 mg dilarutkan dalam aquades 400 ml. Setelah dilakukan perhitungan kebutuhan larutan selama 10 hari pada kelompok perlakuan satu dan dua (P1 dan P2), hasil yang didapatkan adalah 70 ml aquades pada setiap kelompoknya.

3.7.4 Pengadaan Zink

Penyediaan Zn didapatkan dari ZnSO₄ Kristal sebesar 360 mg. Hal ini disesuaikan dengan penelitian milik Jing Ma (2020), yang mendapatkan hasil positif terhadap jumlah, motilitas, hormon testosteron serta kelainan pada struktur testis. Penelitian Jing Ma memberikan dosis efektif zink sebesar 3,2 mg/KgBB. Dengan hal ini didapatkan perlunya 0,64 mg zink pada setiap ekor mencit per harinya. Pada kelompok perlakuan satu dengan menggunakan larutan air sebanyak 160 ml dibutuhkan 110 mg ZnSO₄ kristal yang dihaluskan

lalu dicampur bersamaan dengan ekstrak lada hitam. Pada kelompok perlakuan dua dengan menggunakan larutan air 400 ml dibutuhkan 250 mg ZnSO₄ kristal yang dihaluskan lalu dicampur bersamaan dengan ekstrak lada hitam. Lalu, pemberian larutan zink pada mencit dilakukan dengan sonde lambung sebanyak 1 ml/hari selama 10 hari pada kelompok perlakuan satu dan dua (P1 dan P2).

3.7.5 Induksi Gentamisin

Dosis gentamisin pada tikus yang telah terbukti dapat menyebabkan penurunan berat vesikula seminalis, produksi spermatozoa abnormal, penurunan jumlah dan motilitas sperma yaitu 20 mg/kgBB selama 10 hari (El-Maddawi, 2014). Gentamisin diinjeksikan dengan menggunakan spuit 1 cc dosis 20 mg/kgBB (i.p) selama 10 hari. Sediaan gentamisin yang tersedia adalah sediaan injeksi vial 40 mg/ml. Sehingga dengan dilakukannya perhitungan konversi kebutuhan tikus yaitu 4 mg/hari/ekor didapatkan hasil pada setiap satu ekor tikus per harinya diberikan 0,1 ml injeksi intra peritoneal. Sedangkan, pada kelompok kontrol hanya diberikan pakan dan minum.

Teknik konvensional untuk memberikan suntikan intra-peritoneal umumnya terdiri dari empat langkah: (1) memegang ekor tikus, (2) menggenggam tengkuk leher, (3) mengangkatnya untuk memperlihatkan daerah perutnya, dan (4) menusuk rongga peritoneum dan menyuntikkan zat dengan jarum suntik. Kelemahan dari teknik konvensional ini adalah hal itu menyebabkan respon stres pada tikus. Teknik ini secara lengkap dijelaskan dengan menggunakan tangan kiri untuk mencubit tengkuk tikus di antara ibu jari dan jari pertama dan mengamankan ekornya dengan menekannya ke telapak tangan menggunakan jari ketiga dan keempat. Dengan menggunakan pegangan ini, pegang tikus lurus dan membalikkannya ke posisi terlentang. Menggunakan tangan kanan, injeksi kuadran kiri bawah perut sedalam 5 mm dengan jarum ukuran 26 dan 0,5 inci sejajar

dengan tulang punggung dan pada sudut 45° ke dinding perut (Baek, 2015).

3.7.6 Pembedahan

- a. Setelah 10 hari perlakuan, masing-masing hewan coba diterminasi dengan cara menggunakan larutan eter lalu dilakukan *cervical dislocation*. Kemudian, mempersiapkan alat bedah (bak paraffin, gunting, pinset, jarum, gelas arloji) yang digunakan.
- b. Pengambilan, penimbangan dan pengukuran testis setelah selesai proses pembedahan, dilakukan pengambilan bagian testis dengan menggunakan pinset. Kemudian, testis tikus diletakkan pada gelas ukur berisi NaCl agar dapat dengan mudah memisahkan testis dengan lemak. Lalu, testis dipisahkan dengan epididimis.

3.7.7 Pengambilan dan Pengamatan Spermatozoa

Setelah dilakukan proses pembedahan, selanjutnya dilakukan prosedur sebagai berikut :

- 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 viabilitas dan morfologi spermatozoa.
- b. Lalu untuk menilai viabilitas sperma dilakukan pemeriksaan sperma melalui pewarnaan supravital untuk menentukan jumlah sperma yang masih hidup. Dengan cara, satu tetes suspensi sperma diteteskan pada kaca objek, kemudian dicampur dengan satu tetes larutan eosin 0,5% dan ditutup

dengan kaca penutup. Lalu, diamati dengan mikroskop pembesaran 400 kali dalam 5 lapang pandang untuk memperoleh 200 spermatozoa. Sperma yang masih hidup tidak berwarna sedangkan sperma mati pada bagian kepalanya berwarna merah (pink). Selanjutnya spermatozoa yang hidup (tidak berwarna).



Gambar 12. Viabilitas Spermatozoa (A) Hidup (tidak berwarna) dan (B) Mati (berwarna) (Susilawati, 2011)

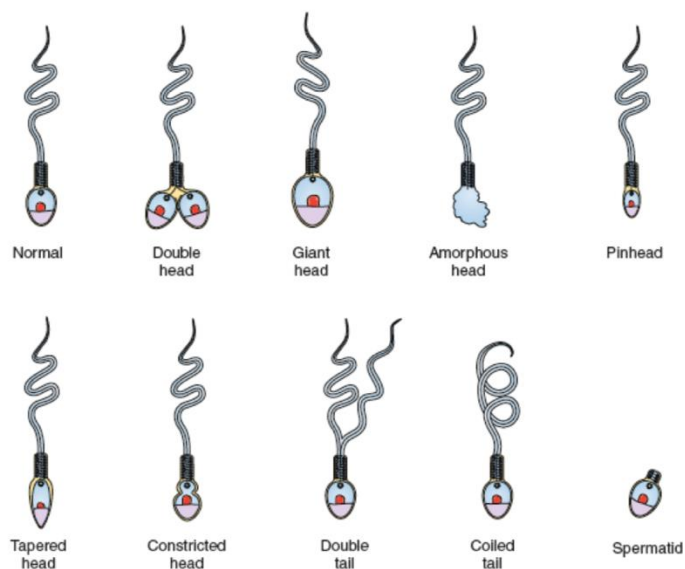
Lalu dilakukan perhitungan spermatozoa yang masih hidup dan yang sudah mati. Nilai dinyatakan dalam persen dengan rumus sebagai berikut.

Persentase viabilitas spermatozoa (Susilawati, 2011):

$$= \frac{\text{Jumlah spermatozoa hidup}}{\text{Jumlah spermatozoa hidup dan mati (200)}} \times 100\%$$

- c. Lalu untuk morfologi spermatozoa dengan cara suspensi spermatozoa diteteskan diatas gelas objek, kemudian dibuat preparat apus dan dikeringkan di udara. Fiksasi preparat apus dilakukan dengan metanol selama 5 menit. Pewarnaan dilakukan dengan giemsa selama 15 menit. Preparat dicuci dengan akuades dan dikeringkan pada suhu orang, kemudian diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 1000 kali untuk mengetahui morfologi spermatozoa tikus *rattus norvegicus*. Presentase morfologi spermatozoa normal dan abnormal kemudian dihitung.

Morfologi spermatozoa normal memiliki ciri dengan bentuk kepala seperti kait pancing dan ekor panjang lurus. Sebaliknya morfologi spermatozoa abnormal memiliki bentuk kepala tidak beraturan, berbentuk seperti pisang, atau terlalu bengkok dan ekor tidak lurus bahkan tidak berekor, atau hanya terdapat ekor tanpa kepala.



Gambar 13. Abnormalitas Morfologi Spermatozoa (Strasinger, 2016)

Perhitungan morfologi spermatozoa abnormal dapat diketahui dengan menghitung 200 spermatozoa. Dengan rumus sebagai berikut.

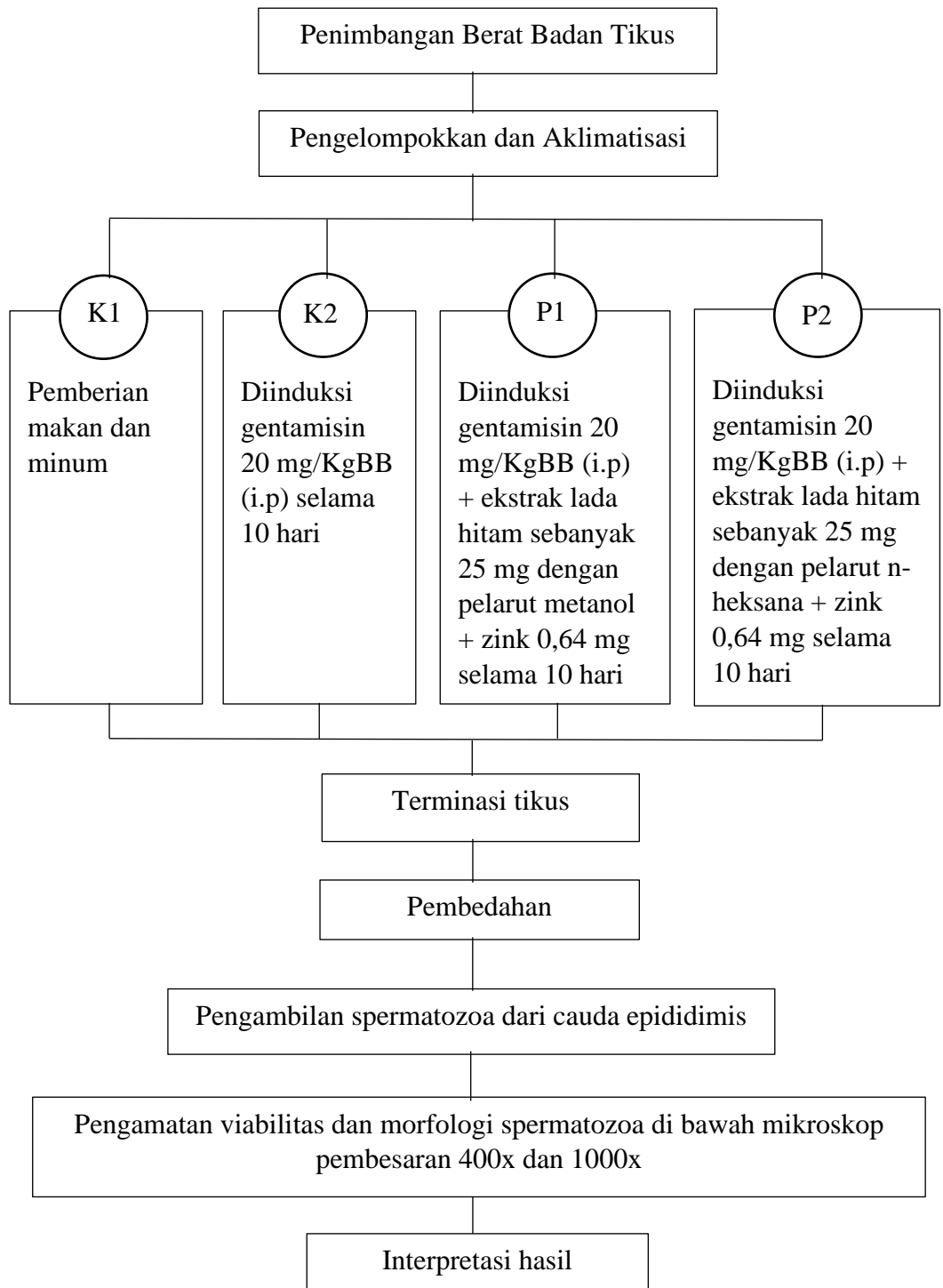
Persentase morfologi spermatozoa (Susilawati, 2011) :

$$= \frac{\text{Jumlah morfologi normal}}{\text{Jumlah morfologi normal + abnormal}} \times 100\%$$

3.8 Analisis Data

Analisis statistik yang digunakan untuk mengolah data diperoleh dari analisis bivariat. Analisis bivariat adalah sebuah analisis untuk mengetahui hubungan antara variabel bebas dan variabel terikat. Data hasil penelitian dilakukan uji normalitas *Shapiro-Wilk* (jumlah sampel ≤ 50) untuk mengetahui kenormalan distribusi data. Jika data terdistribusi normal digunakan uji parametrik. Sedangkan, jika data tidak terdistribusi normal digunakan uji non parametrik. Kemudian, dilakukan uji homogenitas data, yaitu uji *Levene* untuk mengetahui varians data. Data yang terdistribusi normal dan varians data homogen dilakukan uji parametrik *One Way Anova*. Jika hasil uji bermakna menunjukkan data signifikan ($p < 0,05$) dilanjutkan dengan melakukan analisis *Post Hoc LSD* untuk melihat perbedaan antar kelompok perlakuan.

3.9 Alur Penelitian Data



Gambar 14. Alur Penelitian

3.10 Dummy Table

Tabel 4. Dummy Table

Kelompok Perlakuan	Viabilitas Spermatozoa	Morfologi Spermatozoa
Kelompok Kontrol Satu (K1)		
	1	
	2	
	3	
	4	
	5	
	6	
Kelompok Kontrol Dua (K2)		
	1	
	2	
	3	
	4	
	5	
	6	
Kelompok Perlakuan Satu (P1)		
	1	
	2	
	3	
	4	
	5	
	6	
Kelompok Perlakuan Dua (P2)		
	1	
	2	
	3	
	4	
	5	
	6	

3.11 Etik Penelitian

Etika penelitian (*Ethical clearance*) pada penelitian ini telah mendapat persetujuan etik dari Komite Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Lampung dengan nomor 2634/UN26.18/PP.05.02.00/2021 pada tanggal 29 Oktober 2021.

BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Dari penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan sebagai berikut :

1. Ada pengaruh pemberian kombinasi ekstrak metanol lada hitam dan zink terhadap peningkatan persentase viabilitas spermatozoa tikus putih yang diinduksi gentamisin, namun jika dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif pemberian ekstrak metanol lada hitam dan zink tidak berpengaruh terlihat dari nilai *p value* antara dua kelompok tersebut adalah 0,068.
2. Ada pengaruh pemberian kombinasi ekstrak n-heksana lada hitam dan zink terhadap peningkatan persentase viabilitas spermatozoa tikus putih yang diinduksi gentamisin, namun jika dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif pemberian ekstrak n-heksana lada hitam dan zink tidak berpengaruh terlihat dari nilai *p value* antara dua kelompok tersebut adalah 0,068.
3. Ada pengaruh pemberian kombinasi ekstrak metanol lada hitam dan zink terhadap peningkatan persentase morfologi spermatozoa normal tikus putih yang diinduksi gentamisin terlihat dari nilai *p value* antara dua kelompok tersebut adalah 0,000.
4. Adanya pengaruh pemberian kombinasi ekstrak n-heksana lada hitam dan zink terhadap peningkatan persentase morfologi spermatozoa normal tikus putih yang diinduksi gentamisin terlihat dari nilai *p value* antara dua kelompok tersebut adalah 0,000.

5.2 Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan waktu perlakuan yang disesuaikan dengan lamanya proses spermatogenesis tikus putih (48 hari).
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai efek toksisitas pemberian ekstrak lada hitam dan zink.

DAFTAR PUSTAKA

- Adelati S, Juniarto AZ, Miranti IP. 2016. Histopatologi spermatogenesis testis tikus wistar diabetes melitus [disertasi]. Semarang : Universitas Diponegoro.
- Akbar B. 2010. Tumbuhan dengan kandungan senyawa aktif yang berpotensi sebagai bahan antifertilitas. Jakarta: Adabia Press.
- Angulo C, Maldonado R, Pulgar E, Mancilla H, *et. al.* 2011. Vitamin C and oxidative stress in the seminiferous epithelium. *Biol Res.* 44 (2) : 169-180.
- Baek JM, *et. al.* 2015. Evaluation of a novel technique for intraperitoneal injections in mice. *Lab Anim.* 44 : 440-444.
- Depkes RI. 2014. Survei demografi dan kesehatan Indonesia. Jakarta : Depkes RI.
- Dina MS, Dasrul D. 2017. Penurunan jumlah sel leydig dan sel sertoli tikus Putih (*Rattus norvegicus*) strain wistar setelah pemberian formalin (decrease on the number of leydig and sertoli cells in rts (*Rattus norvegicus*) wistar strain after formaldehyde administration). *Jurnal ilmiah mahasiswa veteriner.* 1(2).
- Direktorat Jenderal Perkebunan. 2011. Statistik perkebunan indonesia, lada. Direktorat Jenderal Perkebunan : Kementerian Pertanian.

- Direktorat Jenderal Perkebunan. 2017. Statistik perkebunan indonesia: lada 2015-2017. Jakarta : Direktorat Jenderal Perkebunan-Kementrian Pertanian.
- EAU. 2015. Guidelines on Male Infertility. Netherlands: European Association of Urology.
- El-Maddawy Z. 2014. Modulation of gentamisin-induced testicular and brain damage in rats. *Global Journal of Pharmacology*. 8(3) : 284-293.
- EMA. 2001. Gentamicin summary report. [Diakses pada tanggal 15 Maret 2022]. Tersedia dari <https://www.ema.europa.eu>
- Fallah A, Mohammad-Hasani A, Colagar AH. 2018. Zinc is an essential element for male fertility: a review of Zn roles in men's health, germination, sperm quality, and fertilization. *Journal of reproduction & infertility*. 19(2) : 69–81.
- Fasinu PS, Bouic PJ, Rosenkranz B. 2012. An overview of the evidence and mechanisms of herb-drug interactions. *Frontiers in Pharmacology*. 69(3) : 1-19.
- Ferrial EW. 2012. Kajian infertilitas pria dan usaha penanganannya. Jurusan Biologi FMIPA UNHAS; Makassar. Indonesia. Indonesia : SNSMAIP III.
- Fetouh FA, Azab AES. 2014. Ameliorating effects of curcumin and propolis against the reproductive toxicity of gentamicin in adult male guinea pigs : quantitative analysis and morphological study. *American Journal of Life Science*. 2(3) : 138-149.
- França RL, Ogawa T, Mary R. Avarbock, Ralph L. Brinster, Russell LD. 1998. Germ cell genotype controls cell cycle during spermatogenesis in the rat. *Biology of Reproduction*. 59(6) : 1371–1377.

- Ghadallah K. 2018. Role of antioxidants in the treatment of male infertility. *Surgical Medicine Open Access Journal*. 1(2) : 1-10.
- Goodman LS, Gilman A. 2012. Dasar farmakologi terapi, edisi 10, Editor Joel G, Hardman, Lee E L, Konsultan Editor Alfred Goodman Gilman, Diterjemahkan oleh Tim Alih Bahasa Sekolah Farmasi ITB. Jakarta: EGC.
- Gorgani L, Mohammadi M, Najafpour GD, Nikzad M. 2017. Piperine the Bioactive compound of black pepper: from isolation to medicinal formulations. *Comprehensive reviews in food science and food safety*. 16 : 124-140.
- Guyton AC, Hall JE. 2014. Buku Ajar Fisiologi Kedokteran. Edisi 12. Jakarta : EGC.
- Hammouti B, *et. al.* 2019. Black pepper, the “king of spices”: Chemical composition to applications. *Arab J Chem Environ Res*. 6 : 12-56.
- HIFERI, PERFITRI, IAUI, POGI. 2013. Konsensus Penanganan Infertilitas. Jakarta: Himpunan Endokrinologi Reproduksi dan Fertilitas Indonesia, Perhimpunan Fertilitas In Vitro Indonesia, Ikatan Ahli Urologi Indonesia, Perkumpulan Obstetri dan Ginekologi Indonesia.
- Hikmawanti NPE, Hariyanti CA, VP V. 2016. Kandungan piperin dalam ekstrak buah lada hitam dan buah lada putih (*Piper nigrum* L.) yang diekstraksi dengan variasi konsentrasi etanol menggunakan metode klt densitometri. *Media Farmasi*. 13(2) : 173-185.
- Huliselan YM, Runtuwene MRJ, Wewengkang DS. 2015. Aktivitas antioksidan ekstrak etanol, etil asetat, dan n-heksan dari daun sesewanua (*cleredendron squamatatum* vahl.). *Pharmacon*. 4 (3) : 155-163.

- Ikatan Ahli Urologi Indonesia. 2015. Panduan penanganan infertilitas pria (Guidelines on male infertility). Edisi ke-2. Jakarta : Ikatan Ahli Urologi Indonesia.
- Jing Ma, Ruiyu Han, Yuanlong Li, Tong Cui, Shushong Wang. 2020. The mechanism of zinc sulfate in improving fertility in obese rats analyzed by sperm proteomic analysis. *Hindawi Biomed Research Internasional*
- Kalpana T, Lakshmi S, Kumar N. 2015. Upshot of gentamicin and role of antioxidant on spermatogenesis of albino rats. *Sch Acad J Biosci.* 3(10) : 833-837.
- Kasperczyk A, Dobrakowski M, Czuba ZP, Kapka-Skrzypczak L, Kasperczyk S. 2016. Influence of iron on sperm motility and selected oxidative stress parameters in fertile males - a pilot study. *Ann Agric Environ Med.* 23(2):292-296. doi:10.5604/12321966.1203893.
- Katzung BG, Trevor AJ. 2015. *Basic & clinical pharmacology*, 13th edition. EGC: Jakarta.
- Kesuma, DG. 2013. Pengaruh pemberian ekstrak lada hitam (*Piper nigrum* L.) dan Seng (Zn) terhadap motilitas jumlah dan morfologi spermatozoa tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan strain wistar [Skripsi]. Bandar Lampung : Universitas Lampung.
- Khaki A. 2015. Assessment on the adverse effects of aminoglycosides and flouroquinolone on sperm parameters and male reproductive tissue: A Systematic Review. *Iran J Reprod Med.* 13(3) : 125–134.
- Krause KM, Serio AW, Kane TR, Connolly LE. 2016. Aminoglycosides: an overview. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 6 (6) : a027029.

- Kumar N, Kant SA. 2016. Role of zinc in male infertility: review of literature. *Indian Journal of Obstetrics and Gynecology Research*. 3 :167-171.
- Lailatussadah. 2014. Hubungan antara fragmentasi DNA sperma dan viabilitas sperma pada kasus infertilitas pria [skripsi]. Yogyakarta : Universitas Gadjah Mada.
- Marchetti F, Aardema MJ, Beevers C, *et. al.* 2018. Simulation of mouse and rat spermatogenesis to inform genotoxicity testing using OECD test guideline 488. *Mutat Res Gen Tox*. 832-833 : 19-28.
- Maula IF. 2014. Uji antifertilitas ekstrak N-heksana biji jarak pagar (*Jatropha curcas* L.) pada tikus putih jantan (*Rattus novergicus*) galur Sprague dawley secara *in vivo* [skripsi]. Malang : Universitas UIN Syarif Hidayatullah.
- Meghwal, M. dan T. K. Goswami. 2012. Nutritional Constituent of Black Pepper as Medicinal Molecules: A Review. *Open Access Scientific Reports*. 2 (1) : 1-5.
- Meistrich ML. 1989. Evaluation of reproductive toxicity by testicular sperm head counts. *Journal of the American College of Toxicology*. 8 (3) : 551-567.
- Merrels KJ, Blewett H, Jamieson JA, Taylor CG, Suh M. 2009. Relationship between abnormal sperm morphology induced by dietary zinc deficiency and lipid composition in testes of growing rats. *British Journal of Nutrition*. 102 : 226-232.
- Mescher AL. 2016. *Histologi dasar*, Edisi ke-12. Jakarta: EGC.
- Mohan S, Foley PL. 2019 Everything you need to know about satisfying IACUC protocol requirements. *ILAR Journal*. 60 (1) : 50–57.

Moore K, Dalley A. 2013. Anatomi Berorientasi Klinis. Dialihbahasakan oleh Hartanto H. Jakarta: Penerbit Erlangga.

National Center for Biotechnology Information : Open Chemistry Database. 2021. Gentamicin. Compound Summary for CID 3467. [Diakses 13 September 2021]. Tersedia dari : <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Gentamicin>.

National Center for Biotechnology Information : Open Chemistry Database. 2021. Piperine. Compound Summary for CID 638024. [Diakses 13 September 2021]. Tersedia dari : <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Piperine>.

Pamungkas FA. 2012. Spermatozoa dari kauda epididimis : kriopreservasi dan pemanfaatan untuk inseminasi buatan dan fertilisasi in vitro. Wartazoa. 22 (4) : 178-186.

Payaran KO, Wantouw B, Tendean L. 2014. Pengaruh pemberian Zink terhadap kualitas spermatozoa pada mencit jantan (*Mus musculus* L). Jurnal e-Biomedik. 2(2).

Purnomo BB. 2015. Dasar-dasar urologi. Jakarta: CV Sagung Seto.

Ridhoila I, Yusrawati AA. 2017. Perbandingan kualitas spermatozoa pada analisis semen pria dari pasangan infertile dengan riwayat merokok dan tidak merokok. Jurnal Kesehatan Andalas. 6(2) : 159-264.

Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas). 2013. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Kementerian RI tahun 2013.

- Robicahyadi A. 2018. Gambaran morfologi spermatozoa pada pengecatan giemsa dan hematoksilin eosin [disertasi]. Semarang : Universitas Muhammadiyah Semarang.
- Sair M, Imran S, Shad MN, Azeem M, Soomro T. 2019. Effect of zinc on spermatogenesis. *EAS J Pharm Pharmacol*. 1(6) : 145-148.
- Sayoeti, TB. 2013 Pengaruh pemberian campuran ekstrak lada hitam (*Piper nigrum* L.) dan Seng (Zn) terhadap jumlah spermatisit primer dan spermatid tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan strain wistar [Skripsi]. Bandar Lampung : Universitas Lampung.
- Setiawan FE, Winarni TI, Pawitra I. 2014. Pengaruh paparan obat nyamuk terhadap gambaran histopatologi sel leydig tikus Sprague dawley [disertasi]. Semarang : Universitas Dipenogoro.
- Sherwood L. 2015. Fisiologi manusia dari sel ke sistem. Edisi ke-6. Jakarta: EGC.
- Silva PFN, Gadella BM. 2006. Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology*. 65:958-978.
- Simbolon IS, Lubis TM, Adam M. 2013. Presentase spermatozoa hidup pada tikuswistar dan Sprague dawley. *Jurnal Medika Veterinaria*. 7 (2) : 79-83
- Strasinger, S.K. dan Di Lorenzo, M.S. 2016. Urinalisis dan Cairan Tubuh. Jakarta: EGC.
- Sukmawati E, Arifiantini RI, Purwantara B. 2014. Daya tahan spermatozoa terhadap proses pembekuan pada berbagai jenis pejantan unggul fakultas kedokteran hewan, institut pertanian bogor. *JITV*. 19(3):168-175.
- Susilawati, T. 2011. *Spermatology*. Universitas Brawijaya (UB) : Press. Malang.

- Sutyarso, Muhartono, Kanedi M. 2016. The effect of fruit extracts of black pepper on the fertility potential of male albino rats. *American Journal of Medical and Biological Research*. 4(1):1-4.
- Sutyarso, Muhartono, Susianti, Busman H, Kanedi M. 2016. Testicular function of rats treated with water extract of red ginger (*Zingiber officinale* var. *rubrum*) combined with zinc. 4(3) : 157-162.
- Tjitrosoepomo G. 2007. Taksonomi tumbuhan spermatophyta. Yogyakarta : Universitas Gajah Mada Press.
- Tortora GJ, Derrickson B. 2012. Principle of anatomy and physiology, 13th edition. United States America : John Willey and Sons Inc.
- Trnovec T, Bezek S. 1978. Pharmacokinetics of gentamicin administered intratracheally to rats. *Antimicrobial, agents, and chemotherapy*. 14 : 3.
- Vasavirama K, Upender M. 2014. Piperine : a valuable alkaloid from piper species. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 6(4) : 34-38.
- Vijayakumar RS, Surya D, Nalini N. 2004. Antioxidant efficacy of black pepper (*Piper nigrum* L.) and piperine in rats with high fat diet induced oxidative stress. *Redox Report*. 9(2) : 105-110.
- Werdhasari A. 2014. Peran antioksidan bagi kesehatan. *Jurnal Biotek Medisiana Indonesia*. 3 : 59-68.
- Wood MJ, Farrell W. 1976. Comparison of urinary excretion of tobramycin and gentamicin in adults. *J Infect Dis*. 134 : 133-6.

Zahedi A, Fathiazad F, Khaki A, Ahmadnejad B. 2012. Protective effect of ginger on gentamisin-induced apoptosis in testis of rats. *Advanced pharmaceutical bulletin*