

**ANALISIS PERUBAHAN JUMLAH, MOTILITAS, DAN VIABILITAS
SPERMATOZOA MENCIT (*Mus musculus* L.) YANG DIINDUKSI
D-GALAKTOSA SETELAH PEMBERIAN
TINTA CUMI-CUMI (*Loligo* sp.)**

(Skripsi)

Dewi Restika Ayu Safitri

1917021040



**PROGRAM STUDI BIOLOGI
JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
2023**

ABSTRAK

ANALISIS PERUBAHAN JUMLAH, MOTILITAS, DAN VIABILITAS SPERMATOZOA MENCIT (*Mus musculus* L.) YANG DIINDUKSI D-GALAKTOSA SETELAH PEMBERIAN TINTA CUMI-CUMI (*Loligo* sp.)

Oleh

Dewi Restika Ayu Safitri

Proses penuaan (*aging process*) merupakan salah satu penyakit degeneratif yang dapat menyebabkan terjadinya infertilitas pada makhluk hidup. Kandungan senyawa bioaktif yang terdapat pada tinta cumi-cumi (*Loligo* sp.) dipercaya memiliki kemampuan untuk mencegah terjadinya infertilitas yang disebabkan oleh proses penuaan. Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian tinta cumi-cumi dalam memperlambat proses penuaan menggunakan parameter spermatozoa, yaitu jumlah, motilitas, dan viabilitas spermatozoa mencit (*Mus musculus* L.) yang diinduksi D-Galaktosa. Penelitian ini dilaksanakan pada Desember 2022 – Maret 2023 menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang dibagi menjadi empat kelompok, yaitu kontrol (hanya diberi makan dan minum tanpa mendapat perlakuan apapun), kontrol negatif (diinduksi D-Galaktosa sebanyak 150 mg/kgBB), perlakuan 1 (diinduksi D-Galaktosa sebanyak 150 mg/kgBB, diberi makan dan minum berupa *pellet* dan air, serta diberi tinta cumi-cumi sebanyak 40 mL/kgBB selama 35 hari), dan perlakuan 2 (diinduksi D-Galaktosa sebanyak 150 mg/kgBB, diberi makan dan minum berupa *pellet* dan air, serta diberi tinta cumi-cumi sebanyak 100 mL/kgBB selama 35 hari). Hasil penelitian dianalisis menggunakan *One Way ANOVA* pada taraf 5% dan dilanjutkan menggunakan uji BNT (Beda Nyata Terkecil) untuk melihat perbedaannya secara signifikan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa jumlah, motilitas, dan viabilitas spermatozoa mencit menurun setelah diinduksi D-Galaktosa dan mengalami peningkatan setelah diberi tinta cumi-cumi dengan hasil terbaik ditunjukkan oleh dosis 100 mL/kgBB.

Kata Kunci : Cumi-cumi (*Loligo* sp.), D-Galaktosa, Infertilitas, Mencit (*Mus musculus* L.), dan Penuaan.

**ANALISIS PERUBAHAN JUMLAH, MOTILITAS, DAN VIABILITAS
SPERMATOZOA MENCIT (*Mus musculus* L.) YANG DIINDUKSI
D-GALAKTOSA SETELAH PEMBERIAN
TINTA CUMI-CUMI (*Loligo* sp.)**

Oleh

Dewi Restika Ayu Safitri

(Skripsi)

Sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Sains (S.Si.)

Pada

**Jurusan Biologi
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam**



**PROGRAM STUDI BIOLOGI
JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
2023**

Judul Skripsi : **ANALISIS PERUBAHAN JUMLAH, MOTILITAS, DAN VIABILITAS SPERMATOZOA MENCIT (*Mus musculus* L.) YANG DIINDUKSI D-GALAKTOSA SETELAH PEMBERIAN TINTA CUMI-CUMI (*Loligo* sp.)**

Nama Mahasiswa : **Dewi Restika Ayu Safitri**

NPM : 1917021040

Jurusan : Biologi

Program Studi : Biologi

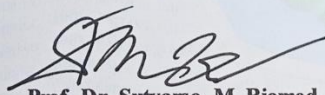
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

MENYETUJUI

1. Komisi Pembimbing

Pembimbing 1

Pembimbing 2



Prof. Dr. Sutyarso, M. Biomed.

NIP. 195704241987031001



Prof. Dr. Hendri Busman, M. Biomed.

NIP. 195901011987031001

2. Ketua Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



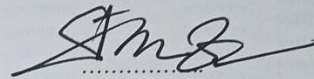
Dr. Jami Master, M.Si.

NIP. 198301312008121001

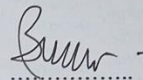
MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

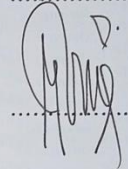
Ketua : Prof. Dr. Sutyarso, M. Biomed.



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



Penguji Utama : Dr. Nuning Nurcahyani, M.Sc.



Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

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

NIP. 197110012005011002

Tanggal Lulus Ujian Skripsi: 25 Mei 2023

SURAT PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

SURAT PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Dewi Restika Ayu Safitri

NPM : 1917021040

menyatakan bahwa karya tulis ilmiah yang berjudul "**Analisis Perubahan Jumlah, Motilitas, dan Viabilitas Spermatozoa Mencit (*Mus musculus L.*) yang Diinduksi D-Galaktosa Setelah Pemberian Tinta Cumi-cumi (*Loligo sp.*)**" merupakan hasil karya saya sendiri yang saya kerjakan berdasarkan pengetahuan yang saya dapatkan selama masa perkuliahan atau dengan kata lain bukan hasil plagiarisme terhadap karya orang lain.

Demikian pernyataan ini saya buat, apabila dikemudian hari terjadi hal-hal yang mengindikasikan adanya kecurangan, maka saya siap bertanggungjawab.

Bandar Lampung, Juni 2023

Yang menyatakan



5000
METEKA
TEMBAK
B5AKX36696669

Dewi Restika Ayu Safitri

NPM. 1917021040

RIWAYAT HIDUP



Penulis merupakan anak ketiga dari empat bersaudara dari pasangan Bapak Risman dan Ibu Rumianah. Penulis dilahirkan di Kota Bandarlampung, Provinsi Lampung pada 11 Desember 2000. Penulis menempuh pendidikan pertamanya di SDN 4 Padang Cermin pada tahun 2007 - 2013, kemudian melanjutkan pendidikan ke jenjang sekolah menengah pertama di SMPN 14 Pesawaran pada tahun 2013 – 2016. Setelah menyelesaikan pendidikan di tingkat sekolah menengah pertama, penulis kemudian melanjutkan pendidikan ke SMAN 1 Padang Cermin pada tahun 2016 – 2019 dan fokus pada program MIPA. Selama berada di tingkat sekolah menengah atas, penulis sangat aktif mengikuti organisasi intra-sekolah, yaitu Palang Merah Remaja (PMR) SMAN 1 Padang Cermin pada tahun 2016 – 2018, dimana pada Desember 2017 – Desember 2018 penulis diberi kepercayaan untuk menjadi Bendahara Umum. Selain itu, penulis juga aktif mengikuti berbagai jenis perlombaan, diantaranya Lomba Lintas Alam tingkat Sumatera Bagian Selatan oleh Poltapala Politeknik Negeri Lampung tahun 2017, Parade Cinta Tanah Air (PCTA) tingkat Provinsi Lampung tahun 2017, Lomba Debat Bahasa Indonesia (LDBI) tingkat Provinsi Lampung tahun 2017 dan 2018, Olimpiade Sains Nasional (OSN) tahun 2018, GARDA FAIR Polinela se-Sumbagsel tahun 2018, LCT *Chemistry Expo* tingkat Provinsi Lampung oleh Jurusan Kimia Universitas Lampung tahun 2018, LCC Sejarah Dinas Sosial Provinsi Lampung tahun 2018, dan GSL PMR IX tingkat Provinsi Lampung tahun 2018. Penulis juga dinobatkan sebagai Siswa Terbaik I dalam upacara kelulusan SMAN 1 Padang Cermin pada April 2019.

Setelah dinyatakan lulus sebagai siswa menengah atas, penulis memutuskan untuk melanjutkan pendidikan ke tingkat perguruan tinggi dan berhasil dinyatakan lulus pada program studi S1 Biologi Universitas Lampung melalui jalur Seleksi Bersama Masuk Perguruan Tinggi Negeri (SBMPTN) pada tahun 2019. Selama menjadi mahasiswa, penulis aktif dalam berbagai kegiatan dan lomba yang diselenggarakan oleh pihak internal maupun eksternal kampus. Beberapa kegiatan kemahasiswaan yang penulis pernah tekuni adalah Himpunan Mahasiswa Biologi (HIMBIO) FMIPA Universitas Lampung sebagai anggota bidang Sains dan Teknologi (SAINTEK) pada tahun 2020 – 2021 dan DPM-U Universitas Lampung tahun 2020 sebagai staff ahli bidang Kajian. Penulis juga berpartisipasi dalam penyelenggaraan *event* tahunan Himpunan Mahasiswa Biologi (HIMBIO) Universitas Lampung, yaitu Pekan Konservasi Sumber Daya Alam (PKSDA) XXV sebagai anggota divisi Olimpiade Biologi Konservasi serta menjadi panitia seminar penyelenggara pelatihan persiapan TOEFL yang diselenggarakan oleh *Biology English Club* (BEC) pada tahun 2021. Adapun beberapa kegiatan eksternal kampus yang pernah penulis ikuti adalah menjadi peserta Jambore Nasional yang diselenggarakan oleh Indonesia Bersih Bebas Sampah secara virtual pada tahun 2020, peserta Pekan Raya Nasional Mahasiswa diselenggarakan oleh ID Next Leader pada tahun 2020, *Mental Health Promoter* bagi Lingkar Psikologi dalam perayaan Hari Kesehatan Mental Dunia tahun 2020, *volunteer* pada *Departement of Empowerment Scholars Official* tahun 2022, dan menjadi *Ambassador* bagi *International Global Network* pada tahun 2022. Penulis juga pernah dipercaya menjadi asisten praktikum mata kuliah Praktikum Ekologi di Jurusan Biologi Universitas Lampung pada Agustus – Desember 2022.

Pada Januari – Februari 2020, penulis melaksanakan Praktik Kerja Lapangan (PKL) di Balai Pelatihan Pertanian Lampung (BPPL) dengan judul penelitian berupa **“Penerapan *Plant Growth Promoting Fungi* (PGPF) Menggunakan *Trichoderma* sp. Pada Pertumbuhan Tanaman Jagung Manis Varietas Baruna (*Zea mays* L. var. *saccharatta*) di Balai Pelatihan Pertanian Lampung”** dan berhasil mempresentasikan hasil penelitian penulis pada 4th *International Conference on Mathematics and Sciences* (ICMSc) 2022 yang

diselenggarakan oleh Universitas Mulawarman. Penulis juga telah melaksanakan Kuliah Kerja Nyata (KKN) di Desa Sidorejo, Kecamatan Sumberejo, Kabupaten Tanggamus pada Juni – Agustus 2022.

PERSEMBAHAN

Bismillahiromanirohim. Allahuma sholli ala sayyidina Muhammad, wa'ala ali sayyidina Muhammad.

Dengan mengucapkan rasa syukur yang tak terhingga atas karunia dan rahmat Allah Yang Maha Kuasa, kupersembahkan skripsiku yang kukerjakan dengan sepenuh hati ini kepada:

Kedua orangtuaku,

Bapak Risman dan Ibu Rumianah,

yang cinta, kasih, dan sayangnya tak terhingga serta tak kenal lelah memberikan motivasi dan dukungan sehingga skripsi ini selesai dengan tepat waktu.

Diri sendiri,

Dewi Restika Ayu Safitri,

seorang anak dengan mimpi tak terhingga yang telah bertahan dalam menjalani proses hidup, termasuk selama meraih pendidikan.

Dosen-dosen pembimbing dan pembahasku,

Prof. Dr. Sutyarso, M. Biomed., Prof. Dr. Hendri Busman, M. Biomed., dan

Dr. Nuning Nurcahyani, M.Sc.,

yang dengan sepenuh hati memberikan dorongan dan semangat serta membantu rangkaian proses penelitian hingga penyelesaian penulisan skripsi ini.

MOTTO

“As long as you have Allah, you have no reason to lose hope or give up”

“Dia memberikan hikmah kepada siapa yang Dia kehendaki. Barang siapa diberi hikmah, sesungguhnya dia telah diberi kebaikan yang banyak. Dan tidak ada yang dapat mengambil pelajaran, kecuali orang-orang yang mempunyai akal sehat”

~ QS. Al-Baqarah (2): 269 ~

“Finding yourself after many years is a treasure like no other”

~ TREASURE ~

“Somebody may not have a friend and somebody may not have love. Everyone lives in a different situation. It's depending on how you accept it, you have your own story”

~ G-Dragon of BIGBANG ~

“One of the greatest joys in life is the feeling of using your skills to the limit, to do something important for others, your community, discipline, institution, country, or even the human family and our fragile planet”

~ Sally Kornblunth, MIT President ~

SANWACANA

Bismillahirrahmanirrohim.

Alhamdulillah rabbil alamin, washolatu wassalamu 'ala asrofil ambiya'i wal mursalin wa 'ala alihi wasohbihi Rasulillahi ajma'in.

Puji dan syukur senantiasa penulis haturkan kepada Allah SWT atas ridha, rahmat, dan karunia-Nya, sehingga penulis mampu menyelesaikan proses penulisan skripsi ini dengan baik.

Skripsi ini mungkin masih memiliki banyak kekurangan, namun penulis sangat bersyukur atas dukungan, bimbingan, bantuan, kritik dan saran dari berbagai pihak sehingga penulis mampu menyelesaikan proses pembuatan skripsi ini. Oleh karena itu, penulis ingin mengucapkan banyak terimakasih kepada :

1. Kedua orang tua penulis, Bapak Risman dan Ibu Rumianah yang senantiasa mencurahkan cinta, kasih, dan sayang yang tak terbalaskan, memberikan dukungan dalam bentuk ucapan dan do'a, memotivasi penulis dengan nasihat-nasihat terbaik, dan memenuhi segala kebutuhan anak-anaknya dengan penuh semangat dan pantang menyerah.
2. Kakak-kakakku (Mega Riyani dan Evita Indrayani), kakak iparku (Yusuf Supriyadi), adikku (Listina Damayanti), dan keponakan-keponakanku (Safwana Ananda Yusuf dan Najma Ramadhania Yusuf) yang selalu mendengarkan keluh kesah penulis, menghibur di masa-masa sulit, dan mendukung segala keputusan penulis.
3. Bapak Prof. Dr. Sutyarso, M. Biomed. selaku Pembimbing 1 yang telah membimbing dan memberikan ilmu-ilmu terbaik, memberikan semangat

dan motivasi, serta memberikan kritik dan saran yang membangun selama perkuliahan, penelitian, maupun masa-masa penyusunan skripsi.

4. Bapak Prof. Dr. Hendri Busman, M. Biomed. selaku Pembimbing 2 yang telah memberikan banyak ilmu dan motivasi, serta membimbing dengan penuh kesabaran hingga terselesaikannya penelitian maupun proses penyusunan skripsi.
5. Ibu Dr. Nuning Nurcahyani, M.Sc. selaku Pembahas yang telah memberikan pengarahan, motivasi, serta kritik dan saran terbaik selama masa penelitian dan penyusunan skripsi.
6. Bapak Dr. Gregorius Nugroho Susanto, M.Sc. selaku Dosen Pembimbing Akademik yang selalu mengarahkan dalam menentukan keputusan-keputusan terbaik selama masa perkuliahan.
7. Ibu Prof. Dr. Ir. Lusmeilia Afriani, D.E.A.IPM. selaku Rektor Universitas Lampung periode 2023-2027.
8. Bapak Dr. Eng. Heri Satria, S.Si., M.Si. selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) Universitas Lampung.
9. Bapak Dr. Jani Master, S.Si., M.Si. selaku Ketua Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) Universitas Lampung.
10. Ibu Dr. Kusuma Handayani, M.Si. selaku Ketua Program Studi Biologi Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) Universitas Lampung.
11. Bapak Ali Bakri, S. P. selaku Pranata Laboratorium Pendidikan (PLP) yang selalu membantu proses penelitian dan memberikan dukungan serta semangat hingga skripsi ini terselesaikan.
12. Seluruh dosen dan staf Jurusan Biologi FMIPA Universitas Lampung yang telah banyak membantu dan memberikan ilmu-ilmu bermanfaat selama masa perkuliahan.
13. Sahabat-sahabat masa kecilku yang hingga kini masih terus bersama, Asima Nanda Nauli Lumban Tobing dan Selly Tyurma yang selalu menghibur dan memberikan banyak dukungan hingga proses penyelesaian skripsi ini.
14. Sahabat-sahabat kuliahku, *Geprek Buddies* (Budro Gerung, Wahyu Indah Silvi Budyanti, Rahel Azzahra, dan Listina Damayanti) yang selalu menjadi

tempat terbaik dalam bertukar gagasan dan berdiskusi mengenai topik-topik terkini.

15. Teman-teman tim penelitian cumi-cumi, Ayu Fikri Damayanti dan Salsabila Balqis yang selalu saling membantu dan senantiasa memberi semangat selama melaksanakan penelitian hingga terselesaikannya skripsi ini.
16. Teman-teman kuliahku yang tidak pernah lelah memotivasi, memberi semangat dan saling membantu selama masa perkuliahan dan penelitian, Viki Ramadan, Dinda Shafa Tiarrannisa, Mala Irma Pramita, Nurul Apriani Adinda, Jensa Yuswantoro, Muhammad Ilyas, Bunga Saqinah, Ireniza Pradevi Mulya, Delsya Pratiwi Pubianty, Husna Fadhila, Fersiana Riska Devilia, Kika Monica, dan Chintya Bella Laureta.
17. Seluruh teman-teman angkatan (S1 Biologi dan S1 Biologi Terapan 2019) yang telah berjuang bersama hingga akhir.
18. Artis favoritku, TREASURE dan BTS yang selalu menghibur dan memotivasi melalui karya-karyanya.

Juni 2022

Penulis

Dewi Restika Ayu Safitri

DAFTAR ISI

	Halaman
ABSTRAK	i
SURAT PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI	v
RIWAYAT HIDUP	vi
PERSEMBAHAN	ix
MOTTO	x
SANWACANA	xi
DAFTAR ISI	xiv
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR TABEL	xviii
I. PENDAHULUAN	
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Tujuan	4
1.3. Manfaat	4
1.4. Kerangka Pikir	5
1.5. Hipotesis.....	6
II. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1. Cumi-cumi (<i>Loligo</i> sp.).....	7
2.1.1. Taksonomi.....	7
2.1.2. Morfologi.....	8
2.1.3. Kandungan Tinta.....	9
2.2. Mencit (<i>Mus musculus</i> L.).....	11
2.2.1. Taksonomi.....	11
2.2.2. Morfologi.....	12
2.2.3. Sistem Reproduksi	12

2.3. Penuaan (<i>Aging</i>).....	15
2.3.1. Pengertian Penuaan.....	15
2.3.2. Stress Oksidatif, Radikal Bebas, dan Antioksidan.....	19
2.3.3. <i>Anti-aging</i>	24
2.3.4. D-Galaktosa.....	25
III. METODE PENELITIAN.....	
3.1. Waktu dan Tempat.....	27
3.2. Alat dan Bahan.....	27
3.3. Prosedur Kerja.....	28
3.3.1. Persiapan Kandang dan Hewan Uji.....	28
3.3.2. Proses Pengambilan Tinta Cumi-cumi.....	29
3.3.3. Pemberian Perlakuan.....	29
3.3.4. Rancangan Penelitian.....	30
3.3.5. Parameter Penelitian.....	32
3.3.6. Pembuatan Larutan.....	32
3.3.7. Pengambilan Data.....	33
3.3.8. Analisis Data.....	35
3.3.9. Diagram Alir Penelitian.....	35
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	
4.1. Hasil.....	37
4.1.1. Jumlah Spermatozoa.....	37
4.1.2. Motilitas Spermatozoa.....	38
4.1.3. Viabilitas Spermatozoa.....	39
4.2. Pembahasan.....	41
4.2.1. Jumlah Spermatozoa.....	41
4.2.2. Motilitas Spermatozoa.....	45
4.2.3. Viabilitas Spermatozoa.....	49
V. KESIMPULAN DAN SARAN.....	
5.1. Kesimpulan.....	52
5.2. Saran.....	52
DAFTAR PUSTAKA.....	54

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Cumi-cumi (<i>Loligo sp.</i>).....	8
Gambar 2. Morfologi Cumi-cumi.....	9
Gambar 3. Mencit (<i>Mus musculus L.</i>)	12
Gambar 4. Sistem Reproduksi Mencit Jantan	13
Gambar 5. Rangkaian Proses Spermatogenesis.....	15
Gambar 6. Hubungan antara Dosis <i>Inducer</i> dan Hasil (<i>Endpoint</i>) Stress Oksidatif.....	21

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Kandungan Senyawa Kimia Tinta Cumi-cumi.....	11
Tabel 2. Aktivitas Antioksidan Berdasarkan Nilai IC ₅₀	22
Tabel 3. Skema Rancangan Penelitian	31

I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Penuaan merupakan fenomena yang pasti akan dialami oleh setiap makhluk hidup, termasuk manusia. Penuaan (*aging*) diartikan sebagai hilangnya kemampuan sel-sel tubuh dalam meregenerasi sel-sel yang telah rusak sehingga mengakibatkan penurunan fungsi sensorik, motorik, dan lokomosi tubuh (Riska dan Ninik, 2022). Penuaan dapat terjadi secara internal maupun eksternal. Secara internal, penuaan disebabkan oleh penurunan daya tahan tubuh, stress, dan perubahan hormonal di dalam tubuh, sedangkan radiasi sinar matahari, polusi, dan radikal bebas merupakan faktor-faktor yang dapat mengakibatkan terjadinya penuaan secara eksternal (Swastika dkk., 2013). Namun menurut Jin (2010), teori stress oksidatif yang dicetuskan oleh Denham Harman merupakan teori yang paling konsisten dalam menjelaskan terjadinya proses penuaan pada makhluk hidup.

Stress oksidatif merupakan kondisi dimana jumlah radikal bebas di dalam tubuh lebih banyak dibandingkan dengan antioksidan, sehingga menyebabkan kerusakan fisiologis yang dapat memicu terjadinya berbagai macam penyakit degeneratif, termasuk penuaan (Parwata, 2016), sedangkan radikal bebas diartikan sebagai molekul-molekul yang sifatnya tidak stabil karena elektron pada kulit terluarnya tidak memiliki pasangan, sehingga memiliki kecenderungan untuk merebut elektron molekul lain guna mencapai kestabilan (Khaira, 2010). Dalam mencegah terjadinya stress oksidatif, tubuh membutuhkan antioksidan untuk menetralkan tingkat toksisitas radikal bebas. Antioksidan merupakan salah satu bentuk senyawa

pertahanan biologis yang terdapat di dalam tubuh makhluk hidup guna menghadapi peningkatan jumlah radikal bebas dan menetralkan tingkat toksisitasnya dalam menghancurkan sel-sel tubuh. Rahmi (2017) menjelaskan bahwa antioksidan merupakan senyawa-senyawa yang mampu menetralkan tingkat toksisitas radikal bebas dengan cara mendonorkan elektron yang dimilikinya tanpa kehilangan kestabilannya sehingga radikal bebas memiliki pasangan elektron dan tidak akan mengganggu rangkaian proses biokimia di dalam tubuh. Rangkaian proses metabolisme yang lancar dan tidak mengalami gangguan akan mengurangi intensitas penyakit degeneratif, termasuk penuaan. Sehingga, peningkatan jumlah antioksidan di dalam tubuh akan menurunkan tingkat stress oksidatif dan proses penuaan sel-sel tubuh dapat diperlambat.

Proses penambahan usia yang dialami oleh makhluk hidup, dapat menyebabkan berbagai macam penurunan fungsi-fungsi tubuh, termasuk penurunan fungsi reproduksi (Halvaei *et al.*, 2020). Sulistyoningrum (2017).menyatakan bahwa infertilitas merupakan salah satu akibat dari terjadinya penurunan fungsi reproduksi. Infertilitas terjadi akibat perubahan atrofi testikular dan fungsinya dalam melakukan spermatogenesis dan memproduksi hormon testosteron. Hal tersebut dijelaskan pula oleh Sutyarso *et al.* (2016) yang menyatakan bahwa proses penuaan dapat terjadi pada seluruh organ tubuh makhluk hidup, termasuk sistem reproduksi dan dapat menyebabkan terjadinya infertilitas. Selain itu, Dewi dkk. (2022) juga menyatakan bahwa umur memberikan pengaruh signifikan dalam menentukan keberhasilan pasangan dalam memperoleh kehamilan dimana pria berumur >35 memiliki kemungkinan mengalami infertilitas lebih tinggi dibandingkan pria berumur 20-35 tahun. Infertilitas atau yang lebih dikenal sebagai kemandulan merupakan ketidakmampuan pasangan dalam memperoleh keturunan meskipun aktif melakukan hubungan seksual tanpa menggunakan alat kontrasepsi apapun. Menurut Ferial (2016), abnormalitas volume cairan semen, serta terjadinya penurunan pada aspek kualitas dan

kuantitas sperma merupakan masalah yang paling umum ditemukan pada pria yang mengalami infertilitas.

Perairan laut merupakan salah satu ekosistem dengan kekayaan alam kemelimpahan di dalamnya memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai terapi alternatif terhadap berbagai macam penyakit. Kolsi *et al.* (2017) menjabarkan bahwa kandungan senyawa bioaktif yang terdapat pada flora dan fauna laut memiliki potensi untuk dikembangkan pada bidang kesehatan terutama dalam mengobati berbagai macam penyakit, termasuk memperlambat proses penuaan. Tak heran jika upaya pencarian terhadap senyawa-senyawa tersebut mendapatkan perhatian dan dukungan yang besar dalam kurun waktu 10 tahun terakhir. Cumi-cumi (*Loligo sp.*) merupakan salah satu dari sekian banyak kekayaan ekosistem laut dengan potensi menjanjikan baik dari segi ekonomi, kesehatan, maupun farmasi. Menurut Jeyasanta and Patterson (2020), kandungan flavonoid dalam tinta cumi-cumi memiliki potensi untuk mendonorkan hidrogen, memadamkan singlet oksigen, dan mereduksi senyawa-senyawa radikal bebas, sedangkan kandungan alkaloid misalnya atropin dan quinin berperan dalam mengikat dan menetralisasi proses peroksidasi lipid sehingga aktivitas enzim antioksidan akan mengalami peningkatan. Tingginya kandungan berbagai macam senyawa aktif tersebut memiliki kapasitas untuk dikembangkan sebagai solusi permasalahan penyakit degeneratif, termasuk pada proses penuaan sistem reproduksi yang kini marak diperbincangkan.

Kendati memiliki kemungkinan untuk dikembangkan menjadi produk-produk *anti-aging*, senyawa-senyawa tersebut tetap harus dikaji secara intensif terlebih dahulu sebelum diproduksi dan didistribusikan secara massal. Guna mendukung proses pengkajian tersebut, diperlukan kondisi yang dapat digunakan untuk merepresentasikan terjadinya proses penuaan pada makhluk hidup. Sulistyoningrum (2017) menjelaskan bahwa D-Galaktosa merupakan senyawa kimia golongan monosakarida yang telah banyak digunakan untuk mendemostrasikan proses penuaan dengan cara

meningkatkan jumlah radikal bebas sehingga hewan uji mengalami stress oksidatif. Akibatnya, hewan uji yang mengalami stress oksidatif akan mengalami penuaan sel lebih cepat dibandingkan dengan umur biologisnya (penuaan dini). Hal ini sesuai dengan Ahangarpour *et al.* (2014) yang menyatakan bahwa D-Galaktosa merupakan gula pereduksi golongan aldosa yang mampu merepresentasikan terjadinya penuaan secara normal dengan cara menekan jumlah enzim antioksidan di dalam tubuh. Oleh sebab itu, penelitian ini dilakukan guna membuktikan kemampuan yang dimiliki oleh tinta cumi-cumi (*Loligo sp.*) sebagai *anti-aging* atau anti penuaan dengan parameter spermatozoa, yaitu jumlah, motilitas dan viabilitas spermatozoa mencit yang diinduksi dengan D-Galaktosa.

1.2. Tujuan

Tujuan dilakukannya penelitian ini adalah sebagai berikut.

1. Untuk mengetahui pengaruh pemberian tinta cumi-cumi (*Loligo sp.*) terhadap jumlah spermatozoa mencit (*Mus musculus L.*) yang diinduksi D-Galaktosa.
2. Untuk mengetahui pengaruh pemberian tinta cumi-cumi (*Loligo sp.*) terhadap motilitas spermatozoa mencit (*Mus musculus L.*) yang diinduksi D-Galaktosa.
3. Untuk mengetahui pengaruh pemberian tinta cumi-cumi (*Loligo sp.*) terhadap viabilitas spermatozoa mencit (*Mus musculus L.*) yang diinduksi D-Galaktosa.

1.3. Manfaat

Manfaat yang diberikan oleh penelitian ini adalah sebagai berikut.

1. Memberikan informasi kepada masyarakat mengenai potensi tinta cumi-cumi (*Loligo sp.*) dalam mencegah infertilitas yang disebabkan oleh penuaan (*aging*).

2. Memberikan informasi mengenai dosis yang tepat untuk digunakan dalam penelitian lanjutan mengenai efektivitas tinta cumi-cumi (*Loligo* sp.) dalam mencegah infertilitas yang disebabkan oleh penuaan (*aging*).
3. Memberikan keterbaruan riset mengenai efektivitas tinta cumi-cumi (*Loligo* sp.) dalam mencegah infertilitas yang disebabkan oleh penuaan (*aging*).

1.4. Kerangka Pikir

Penuaan merupakan proses hilangnya kemampuan sel-sel tubuh dalam memproduksi sel-sel baru untuk menggantikan sel-sel yang telah mati akibat perubahan usia biologis maupun peristiwa stress oksidatif pada tubuh. Kerusakan sel-sel tubuh yang terjadi akibat peristiwa stress oksidatif dapat terjadi secara menyeluruh, termasuk dalam sistem reproduksi. Proses penuaan yang terjadi dapat mengakibatkan penurunan produktivitas reproduksi pada pria maupun wanita. Pada pria, proses penuaan mengakibatkan keabnormalan produksi spermazoa, terutama dalam hal konsentrasi, jumlah, viabilitas, motilitas, dan morfologi spermatozoa, serta perubahan hormonal. Oleh sebab itu, dibutuhkan tindakan penanganan guna mencegah timbulnya akibat yang lebih kompleks, yaitu infertilitas.

Kandungan berbagai macam senyawa bioaktif, seperti protein, melanin, polisakarida, asam sinamat, flavonoid, dan alkaloid pada tinta cumi-cumi (*Loligo* sp.) dipercaya mampu mencegah toksisitas senyawa radikal bebas dengan cara meningkatkan jumlah antioksidan di dalam tubuh. Guna membuktikan kemampuan yang dimiliki tinta cumi-cumi tersebut, digunakanlah senyawa D-Galaktosa sebagai faktor penuaan (*aging*) pada hewan uji. Mencit yang berumur 3-4 bulan dipercepat proses penuaannya dengan cara diinjeksikan D-Galaktosa ke dalam tubuhnya dalam dosis tertentu, kemudian tinta cumi-cumi diberikan sebagai *anti-aging* terhadap mencit jantan yang “dipaksa” mengalami proses penuaan lebih cepat

tersebut. Mencit yang telah diinjeksi menggunakan D-Galaktosa dan diberikan perlakuan kemudian dibedah dan diamati jumlah, motilitas, dan viabilitas spermatozoa yang dihasilkan selama satu siklus spermatogenesis. Hasil pengamatan kemudian dibandingkan untuk melihat ada atau tidaknya perbedaan setelah pemberian tinta cumi-cumi sebagai *anti-aging* dalam mempertahankan kualitas dan kuantitas spermatozoa pada saat proses penuaan terjadi.

1.5. Hipotesis

Hipotesis yang diajukan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut.

1. Tinta cumi-cumi (*Loligo* sp.) dapat meningkatkan jumlah spermatozoa mencit (*Mus musculus* L.) yang diinduksi D-Galaktosa.
2. Tinta cumi-cumi (*Loligo* sp.) dapat meningkatkan motilitas spermatozoa mencit (*Mus musculus* L.) yang diinduksi D-Galaktosa.
3. Tinta cumi-cumi (*Loligo* sp.) dapat meningkatkan viabilitas spermatozoa mencit (*Mus musculus* L.) yang diinduksi D-Galaktosa.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Cumi-Cumi (*Loligo sp.*)

Secara Biologi, cumi-cumi merupakan anggota kelas Cephalopoda. Kata Cephalopoda sendiri berasal dari Bahasa Yunani, yaitu *cephal* yang artinya kepala dan *podos* yang artinya kaki. Kelas Cephalopoda terdiri dari tiga sub-kelas, yaitu Nautiloidea, Ammonoidea, dan Coleoidea. Cumi-cumi termasuk ke dalam subkelas Coleoidea dari ordo Teuthoidea. Ordo Teuthoidea merupakan kelompok hewan dengan tubuh memanjang yang pada bagian kepalanya terdapat delapan buah kaki dan dua buah tentakel serta memiliki lembaran tipis transparan di dalam tubuhnya (Baskoro dkk., 2011).

2.1.1. Taksonomi

Taksonomi cumi-cumi (*Loligo sp.*) menurut Lamarck (1798) dalam *Intergrated Taxonomic Information System* (ITIS) (2022) disajikan sebagai berikut.

<i>Kingdom</i>	: Animalia
<i>Phylum</i>	: Mollusca
<i>Class</i>	: Cephalopoda
<i>Order</i>	: Teuthoidea
<i>Family</i>	: Loligoniidae
<i>Genus</i>	: <i>Loligo</i>
<i>Species</i>	: <i>Loligo sp.</i>

Cumi-cumi secara lebih jelas dapat dilihat pada **Gambar 1**.

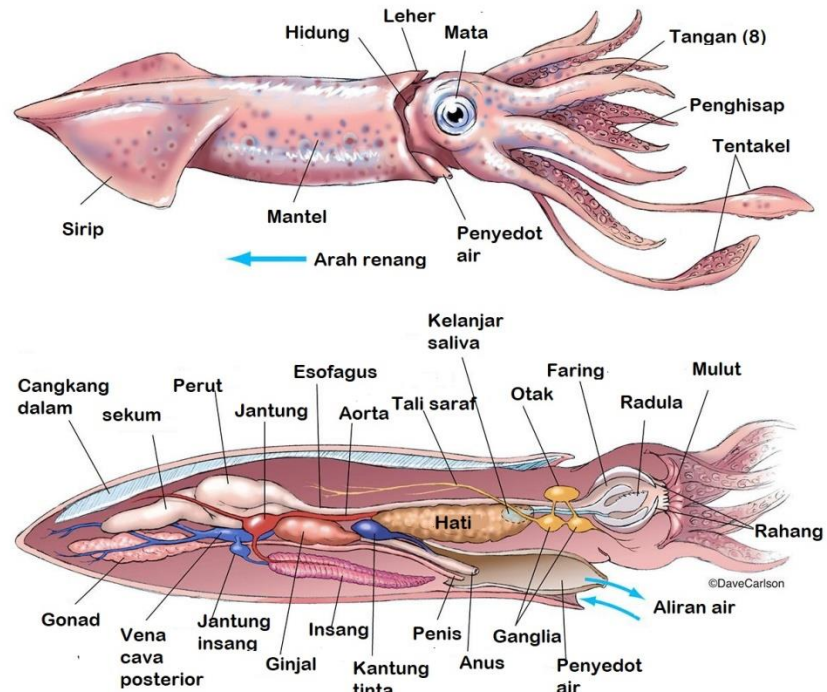


Gambar 1. Cumi-cumi (*Loligo* sp.) (Dokumentasi Pribadi, 2023)

2.1.2. Morfologi

Cumi-cumi (*squid*), sotong (*cuttlefish*), dan gurita (*octopus*) memiliki morfologi yang hampir mirip, mengingat ketiganya sama-sama berasal dari kelas Cephalopoda. Meskipun morfologinya hampir mirip, namun tetap terdapat perbedaan pada ketiganya. Tubuh cumi-cumi berbentuk seperti kerucut dengan ujung tumpul yang dibungkus mantel transparan dengan panjang antara 200-400 mm. Namun terkadang ditemukan cumi-cumi dengan ukuran mantel mencapai 937 mm. Bagian sisi kanan dan kiri tubuhnya terdapat sirip berbentuk belah ketupat yang digunakan untuk membantu pergerakannya. Pada bagian kepalanya terdapat sepasang mata dengan ukuran cukup besar yang ditutupi oleh *aquiferouspore*. Selain itu, cumi-cumi juga memiliki sepuluh buah lengan yang masing-masing dilengkapi dengan penghisap. Dua diantara lengan-lengan tersebut memiliki ukuran yang lebih panjang dan disebut sebagai tentakel. Lengan cumi-cumi memiliki fungsi yang berbeda-beda. Lengan ketiga dan keempat atau tentakel digunakan untuk menangkap mangsa, oleh sebab itu lengan-lengan ini dilengkapi dengan *tentacular club* atau duri-duri hisap. Sedangkan lengan kiri keempat digunakan untuk memasukkan spermatofores ke dalam tubuh betina, sehingga lengan

ini dilengkapi dengan *hectocotylus* (Wulandari, 2018). Morfologi cumi-cumi secara lengkap dapat dilihat pada **Gambar 2**.



Gambar 2. Morfologi Cumi-cumi (Carlson, 1996)

2.1.3. Kandungan Tinta

Tinta cumi-cumi merupakan hasil sekresi berwarna hitam yang dihasilkan oleh kantung tinta yang terdapat di bagian tubuh cumi-cumi. Cumi-cumi biasanya menggunakan tintanya untuk pertahanan diri dari serangan predator. Menurut Derby (2014), tinta cumi-cumi merupakan senyawa yang mengandung melanin. Selain itu, tinta cumi-cumi juga memiliki kantung berbentuk corong yang menghasilkan lendir. Melanin merupakan senyawa biopolimer kompleks non-protein yang dihasilkan oleh asam amino. Melanin memiliki dua bentuk, yaitu eumelanin dan pheomelanin. Pheomelanin merupakan senyawa turunan sistein yang berwarna merah hingga oranye dan terbentuk dari *benzothiazine* dan

benzothiazole, sedangkan eumelanin dikenal sebagai senyawa turunan tirosin yang berwarna coklat tua dan dibentuk dari 5,6-*dihidroxyindole* dan 5,6-*dihidroxyindole-2-carboxylic acid*. Melanin dalam bentuk eumelanin merupakan senyawa yang ditemukan pada kebanyakan tinta cephalopoda, termasuk cumi-cumi.

Selain melanin, tinta cumi-cumi juga mengandung senyawa-senyawa biokatif lain yang fungsinya tak kalah penting dalam berbagai bidang. Penelitian yang dilakukan oleh Jeyasanta and Patterson (2020) menunjukkan bahwa kandungan yang terdapat pada tinta cumi-cumi adalah karbohidrat, protein, asam amino, fenol, flavonoid, tanin, steroid, terpenoid, alkaloid, glikosida, dan saponin. Jeyasanta and Patterson juga menjelaskan bahwa flavonoid, alkaloid, dan saponin merupakan senyawa yang berperan dalam menurunkan kadar radikal bebas dengan cara memproduksi antioksidan, mengikat radikal bebas, mendonorkan elektron, dan menurunkan kadar oksidasi peroksidase. Penelitian Affandi *et al.* (2019) menunjukkan bahwa tinta cumi-cumi juga mengandung senyawa lain yang fungsinya tak kalah penting dan memiliki potensi untuk dikembangkan dalam bidang kesehatan, misalnya sebagai antioksidan, aktibakteri, antikanker, antifungi, dan lain sebagainya. Terdapat 3 senyawa utama dalam tinta cumi-cumi, yaitu *betaline* ($C_5H_{11}NO_2$), asam sinamat ($C_9H_8O_2$), dan *choline* ($C_5H_{14}NO$). Menurut Adjoumani *et al.* (2017) dan Hassan *et al.* (2019), *betaline*, asam sinamat, dan *choline* yang terkandung dalam tinta cumi-cumi memiliki kandungan antioksidan alami yang dapat meningkatkan kapasitas dan kemampuan antioksidan dalam mengikat radikal bebas di dalam tubuh, menghambat pembentukan senyawa *Reactive Oxygen Species* (ROS) lain, dan menurunkan potensi terjadinya kerusakan oksidasi. Berdasarkan jumlah kandungan yang dimiliki, Vincentius dan Bare (2022) menyatakan

bahwa senyawa-senyawa utama yang dimiliki oleh tinta cumi-cumi dapat dilihat pada **Tabel 1**.

Tabel 1. Kandungan Senyawa Kimia Tinta Cumi-cumi
(Vincentius dan Bare, 2022)

No.	Kandungan Tinta Cumi-Cumi
1.	Melanin
2.	Asam Sinamat
3.	<i>5,6-Dihydroxyndole-2-Carboic Acid</i> (DHICA)
4.	<i>5,6-Dihydroxyndole</i> (DHI)
5.	<i>2-Carboxyl Indole</i>
6.	Choline
7.	Betaine

2.2. Mencit (*Mus musculus* L.)

2.2.1. Taksonomi

Taksonomi mencit (*Mus musculus* L.) menurut Linnaeus (1758) menurut *Intergrated Taxonomic Information System* (ITIS) (2022) disajikan sebagai berikut.

<i>Kingdom</i>	: Animalia
<i>Phylum</i>	: Chordata
<i>Class</i>	: Mamalia
<i>Order</i>	: Rodentia
<i>Family</i>	: Muridae
<i>Genus</i>	: <i>Mus</i>
<i>Species</i>	: <i>Mus musculus</i> L.

Mencit secara lebih jelas dapat dilihat pada **Gambar 3**.



Gambar 3. Mencit (*Mus musculus* L.) (Dokumentasi Pribadi, 2023)

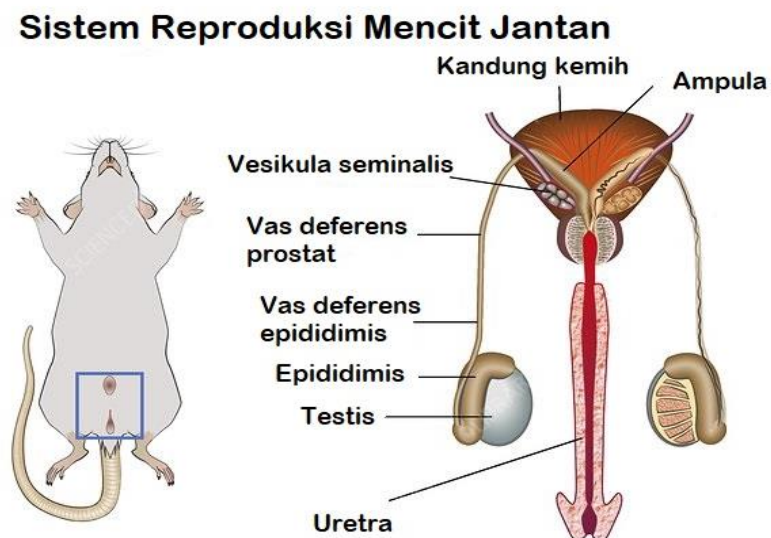
2.2.2. Morfologi

Mencit merupakan hewan uji yang bentuknya seperti silinder ramping dengan moncong berbentuk kerucut, seluruh tubuhnya tertutupi oleh rambut halus berwarna putih, terkecuali bagian ekor, kaki, dan moncongnya, serta memiliki sepasang mata berwarna merah. Mencit juga memiliki lima buah jari-jari bercakar pada masing-masing kakinya, dan susunan giginya berbentuk pahat. Pada saat baru dilahirkan, mencit memiliki berat lahir antara 0,5 hingga 1,5 gram. Namun setelah beranjak dewasa, berat badannya cenderung bervariasi. Mencit betina memiliki berat badan antara 25-40 gram, sedangkan mencit jantan memiliki berat badan antara 20-40 gram (Nugroho, 2018).

2.2.3. Sistem Reproduksi

Sistem reproduksi mencit jantan terdiri dari beberapa organ, yaitu testis dan salurannya, yaitu *ductus deferens*, *ductus ejakulatorius*, dan kelenjar aksesori, epididimis, uretra, dan penis. Organ-organ tersebut memiliki fungsi yang berbeda-beda dalam sistem reproduksi (Nugroho, 2018). Epididimis merupakan organ yang

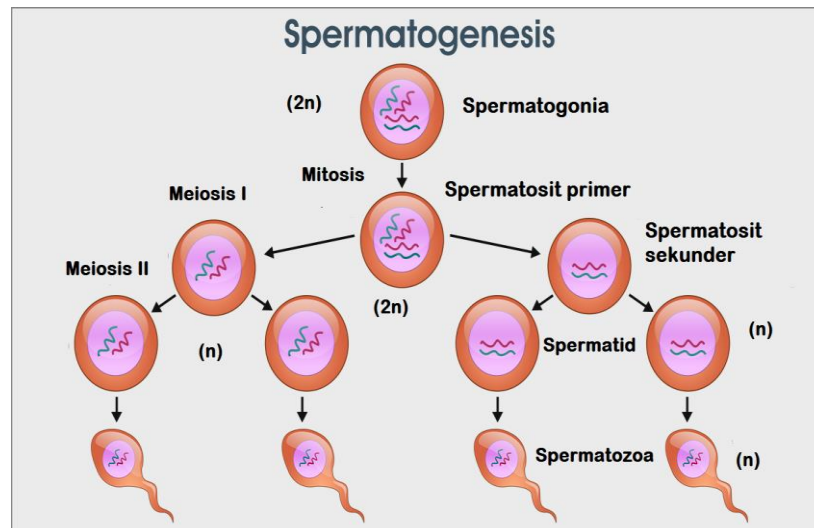
bentuk bulat dan memanjang, serta menempel pada testis. Organ ini terdiri dari tiga bagian, yaitu kepala (*caput*), badan (*corpus*), dan ekor (*cauda*). Epididimis memiliki beberapa fungsi, diantaranya adalah sebagai tempat pematangan, penyimpanan, dan penyaluran spermatozoa (Busman, 2020). Spermatozoa yang telah matang kemudian akan disalurkan ke *vas deferens*, lalu dibawa menuju *ductus ejakulatorius*, dan berakhir di uretra. Proses pengeluaran spermatozoa akan dilakukan oleh penis ketika kopulasi terjadi (Nugroho, 2018). Selain itu, terdapat beberapa organ tambahan yang fungsinya menghasilkan zat-zat tertentu guna membantu kehidupan spermatozoa, diantaranya kelenjar vesikularis, kelenjar prostat, dan kelenjar bulbourethralis (Busman, 2020). Sistem reproduksi mencit jantan dapat dilihat secara lengkap pada **Gambar 4**.



Gambar 4. Sistem Reproduksi Mencit Jantan (Science Photo Library, 2022)

Spermatogenesis merupakan salah satu peristiwa yang tidak terlepas dari sistem reproduksi. Spermatogenesis diartikan sebagai rangkaian proses pembentukan sperma pada individu jantan yang

terjadi di bagian tubulus seminiferus. Terdapat empat tahapan dalam satu siklus spermatogenesis, yaitu proliferasi, pertumbuhan, pematangan sel, dan spermiogenesis. Satu siklus spermatogenesis membutuhkan empat kali daur epitel seminiferus atau ± 35 hari. Proses spermatogenesis diawali dengan terjadinya proses pembelahan sel spermatogonium secara mitosis sebanyak 5 kali, sehingga sel spermatogonia tipe A terbentuk pada mitosis ke-3, lalu berubah menjadi spermatogonia intermediet dan mengalami perubahan lagi menjadi spermatogonia tipe B pada mitosis ke-5. Sel spermatogonia tipe B kemudian berubah menjadi sel spermatosit primer dan akan mengalami meiosis. Pada tahap ini, pembelahan secara meiosis akan terjadi sebanyak 2 kali, yaitu meiosis I dan II. Setelah melewati tahap meiosis I, maka spermatosit primer akan berubah menjadi spermatosit sekunder yang terdiri dari dua buah anakan yang masing-masing berisi satu set kromosom tunggal. Spermatosit sekunder kemudian mengalami meiosis II dan menghasilkan empat spermatid yang mengandung satu set kromosom tunggal. Rangkaian proses ini kemudian masuk ke tahap spermiogenesis yang ditandai dengan terjadinya perubahan pada inti sel dan sitoplasma spermatid, sehingga terbentuklah spermatozoa (Nugroho, 2018). Menurut Busman (2020), spermatozoa terdiri dari tiga bagian utama, yaitu kepala, akrosom, dan ekor. Kepala spermatozoa memiliki bentuk seperti oval dan mengandung *Deoxyribose Nucleic Acid* (DNA) kompleks yang berasal dari *protamine sperma*, inti spermatozoa dilindungi oleh membran tipis yang mengandung berbagai jenis enzim yang dapat digunakan untuk membantu proses fertilisasi, sedangkan ekor spermatozoa memiliki inti yang disebut aksonema dan bertanggungjawab terhadap segala jenis pergerakan spermatozoa. Rangkaian proses terjadinya spermatogenesis secara jelas dapat dilihat pada **Gambar 5**.



Gambar 5. Rangkaian Proses Spermatogenesis (Biology Wise, 2022)

2.3. Penuaan (*Aging*)

2.3.1. Pengertian Penuaan

Proses penuaan (*aging process*) merupakan menurunnya kemampuan tubuh dalam menjalankan fungsi-fungsi sensorik, motorik, kognitif, dan lokomosi yang disebabkan oleh hilangnya kemampuan sel-sel tubuh dalam meregenerasi atau memperbaiki sel-sel yang telah rusak (Riska dan Ninik, 2022). Sedangkan menurut Fatmawati dan Imron (2017), penuaan merupakan proses degenerasi sel-sel tubuh yang terjadi secara alami dan mengakibatkan terjadinya penurunan produktivitas kehidupan makhluk hidup, termasuk manusia. Waktu terjadinya penuaan tidak dapat dipastikan karena proses penuaan dapat berjalan secara normal, lebih cepat, bahkan lebih lambat. Akibatnya, satu individu tidak akan memiliki kondisi tubuh yang sama dengan individu lainnya ketika proses penuaan terjadi. Pernyataan ini sejalan dengan Sgarbieri and Pacheco (2017) yang menjelaskan bahwa proses penuaan dapat dibedakan menjadi tiga, yaitu bertahap, cepat, dan tidak menentu (tidak cepat maupun lambat), dimana

setiap individu akan mengalami proses penuaan dalam waktu yang berbeda dan tingkatan sel-sel yang mengalami degenerasi pun berbeda. Penuaan yang terjadi disebut sebagai penuaan dini, sedangkan penuaan yang lebih lambat disebut sebagai awet muda.

Secara umum, terdapat tiga ciri yang menandai proses penuaan pada kehidupan makhluk hidup, yaitu terjadinya kemunduran kualitas sel-sel tubuh yang dapat dilihat secara kasat mata, munculnya berbagai macam upaya untuk memperlambat proses penuaan, dan tingginya upaya dalam meningkatkan rentang hidup sehat. Secara molekuler, terdapat sembilan tanda yang menunjukkan terjadinya proses penuaan pada makhluk hidup, yaitu:

- a. Kualitas fenotip makhluk hidup mengalami kemunduran, misalnya kulit yang awalnya kenyal menjadi kehilangan elastisitasnya, kulit menjadi kering dan timbul garis-garis kerutan, serta munculnya flek hitam pada kulit.
- b. Menurunnya integritas dan stabilitas *Deoxyribose Nucleic Acid* (DNA) akibat kerusakan sel yang terakumulasi.
- c. Terjadinya deregulasi dalam hal penginderaan nutrisi.
- d. Perubahan epigenetik terjadi secara signifikan.
- e. Telomerase mengalami penipisan akibat replikasi secara berulang selama sel tersebut hidup.
- f. Terganggunya kinerja sistem komunikasi interseluler.
- g. Keseimbangan protein di dalam tubuh mengalami gangguan.
- h. Rusaknya fungsi mitokondrial sehingga menyebabkan peningkatan kadar radikal bebas di dalam tubuh.
- i. *Stem cells* mengalami kelelahan sehingga tidak mampu mempertahankan fungsinya dalam proses regenerasi sel-sel yang telah mati (López-Otín *et al.*, 2013).

Proses penuaan dapat terjadi pada seluruh sel makhluk hidup meskipun dalam waktu yang tidak bersamaan. Pada sistem reproduksi pria atau individu jantan, penuaan dapat diamati berdasarkan beberapa parameter berikut.

- a. Parameter biokimia sistem reproduksi, yaitu hormon yang dihasilkan oleh gonad dan kelenjar hipofisis.
- b. Parameter spermatozoa yang meliputi konsentrasi, jumlah, morfologi, motilitas, dan viabilitas spermatozoa yang dihasilkan.
- c. Kadar *malondialdehyde* (MDA) di dalam tubuh.
- d. Kadar penanda terjadinya stress oksidatif, yaitu *Superoxide Dismutase* (SOD) di dalam tubuh.
- e. Peroksidasi lipid yang berasal dari jaringan tubuh.
- f. Perubahan morfometrik tubuh, termasuk volume cairan tubuh, ukuran tubuh, dan berat badan.
- g. Perubahan histologi organ dan sistem organ (Sulistyoningrum, 2017).

Segala bentuk penurunan yang dialami oleh sistem reproduksi pasca mengalami penuaan dapat menyebabkan terjadinya berbagai macam masalah klinis, termasuk infertilitas atau kemandulan. Saraswati (2015) menyebutkan bahwa infertilitas dibedakan menjadi dua macam, yaitu infertilitas primer dan infertilitas sekunder. Infertilitas primer terjadi pada wanita yang telah menikah dan belum pernah mengalami kehamilan meskipun aktif melakukan hubungan seksual secara teratur tanpa menggunakan alat kontrasepsi dalam kurun waktu ≤ 1 tahun. Sedangkan infertilitas sekunder biasanya terjadi pada wanita yang telah menikah dan sebelumnya pernah hamil, namun tidak mengalami kehamilan lagi dalam kurun waktu ≥ 1 tahun meskipun telah aktif melakukan hubungan seksual secara teratur tanpa menggunakan alat kontrasepsi.

Saraswati (2015) menyebutkan bahwa pria maupun wanita diketahui sama-sama menyumbang 40% masalah terhadap terjadinya peristiwa ketidaksuburan dalam kehidupan pernikahan. Meskipun demikian, penelitian yang dilakukan oleh Agarwal *et al.* (2015) menunjukkan bahwa 15% dari 48,5 juta pasangan yang ada di seluruh dunia mengalami infertilitas dan pria bertanggungjawab atas 50% dari total kasus tersebut secara keseluruhan. Selain itu, Agarwal *et al.* (2015) juga menyatakan bahwa 8-12% dari 15% pasangan yang mengalami infertilitas di Eropa Tengah dan Eropa Timur adalah pria. Terdapat beberapa hal yang dapat menyebabkan infertilitas, yaitu kelainan urogenital akibat cacat lahir, infeksi saluran urogenital, peningkatan suhu pada skrotum, kerusakan sistem endokrin, penurunan sistem imun, dan kelainan genetik (HIFERI, 2013). Selain itu, infertilitas juga dapat terjadi akibat penurunan kualitas dan kuantitas spermatozoa yang disebabkan oleh proses penambahan usia. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Beguería *et al.* (2014) yang menunjukkan bahwa penambahan usia secara signifikan mempengaruhi proses reproduksi pria yang ditandai dengan menurunnya volume cairan semen sebanyak 0,22 mL setiap 5 tahun. Selain itu, presentase spermatozoa motil juga mengalami penurunan yang cukup besar, yaitu sebanyak 1,2% dalam kurun waktu yang sama. Pada aspek jumlah spermatozoa yang mampu diproduksi, Pino *et al.* (2020) melaporkan bahwa pria berumur 41-50 tahun mengalami penurunan jumlah spermatozoa sebanyak 2,92 kali lebih besar, sedangkan pria dengan umur di atas 50 tahun mengalami penurunan jumlah spermatozoa sebanyak 6,15 kali lebih besar jika keduanya dibandingkan dengan pria berumur 21-30 tahun. Sedangkan pada aspek morfologi, Haris *et al.* (2011) menyatakan bahwa 0,2-0,9% spermatozoa yang dihasilkan oleh pria memiliki morfologi yang abnormal selama proses penambahan usia. Jika

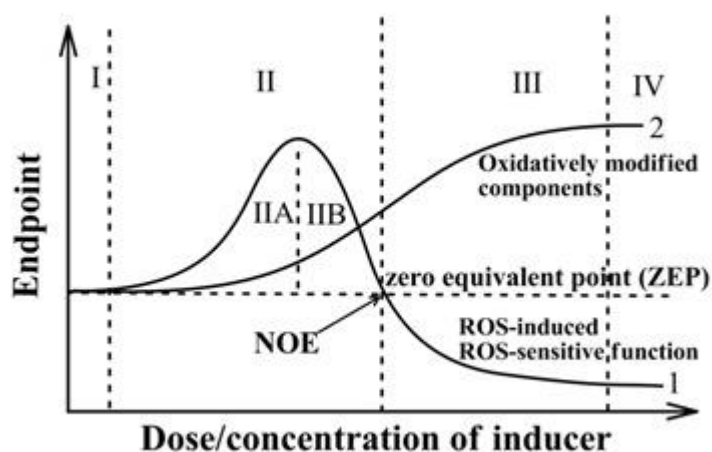
tidak mendapatkan penanganan yang tepat, maka probabilitas terjadinya infertilitas akan semakin tinggi akibat banyaknya spermatozoa yang memiliki morfologi tidak normal (teratozoospermia), penurunan persentase motilitas spermatozoa (asthenospermia), rendahnya konsentrasi sperma (oligozoospermia) sehingga akan mengakibatkan penurunan jumlah spermatozoa, atau bahkan kombinasi dari segala bentuk kondisi penurunan yang terjadi pada parameter sperma (oligoasthenoteratozoospermia) (WHO, 2010 dalam Ahmadi *et al.*, 2016).

2.3.2. Stress Oksidatif, Radikal Bebas, dan Antioksidan

Jin (2010) menjelaskan bahwa para ahli Biologi secara umum meyakini bahwa terdapat dua teori modern yang menjelaskan terjadinya peristiwa penuaan pada makhluk hidup, yaitu “*The Programmed Theory*” dan “*The Damage of Error Theory*”. *The Programmed Theory* terdiri dari *immunological theory*, *endocrine theory*, dan *programmed theory*. Sedangkan *The Damage of Error Theory* terdiri dari *somatic DNA theory*, *free radical theory*, *rate of living theory*, *wear and tear theory*, dan *cross-linking theory*. Dari sekian banyak teori penuaan yang beredar, teori stress oksidatif dianggap sebagai teori yang paling relevan dalam menyebabkan penuaan pada makhluk hidup. Parwata (2016) menjelaskan bahwa stress oksidatif merupakan suatu kondisi yang terbentuk ketika jumlah antioksidan lebih sedikit dibandingkan dengan jumlah radikal bebas. Pada saat kondisi ini terjadi, sel dan jaringan misalnya ligamen periodontal akan mengalami kerusakan secara intens sebagai akibat dari reaksi oksidasi sel-sel normal, berupa pengeluaran sitokin proinflamasi misalnya interleukin-6 yang memicu pengeluaran *Polymorphonuclear* (PMN).

Radikal bebas adalah sekumpulan senyawa atau molekul yang pada bagian kulit terluarnya tidak memiliki pasangan elektron sehingga keberadaannya akan mengganggu dan merusak proses biokimia di dalam tubuh. Radikal bebas dihasilkan dari aktivitas enzimatik yang terjadi di dalam membran plasma, retikulum endoplasma, mitokondria, sitosol dan peroksisom selama proses metabolisme berlangsung. Beberapa proses biokimia di dalam tubuh yang mampu menghasilkan radikal bebas adalah pembentukan asam urat oleh enzim xantin oksidase dan perubahan *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Hydrogen* (NADPH) menjadi *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate* (NADP) oleh *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Hydrogen* (NADPH) oksidase. Selain itu, paparan asap rokok, radiasi sinar matahari, penggunaan zat-zat kimia, polusi udara, dan infeksi virus dan bakteri juga mampu meningkatkan jumlah radikal bebas di dalam tubuh (Parwata, 2016). Radikal bebas memiliki bentuk yang beragam, namun yang paling banyak ditemukan di dalam tubuh manusia adalah oksigen dan turunannya atau *Reactive Oxygen Species* (ROS). Superoksida ($^{\bullet}\text{O}_2$), peroksil (ROO^{\bullet}), singlet oksigen ($^1\text{O}_2$), oksida nitrit (NO^{\bullet}), hidroksil ($^{\bullet}\text{OH}$), hidrogen peroksida (H_2O_2), asam hipoklorit (HOCl), dan peroksinitrit (ONOO^{\bullet}) merupakan berbagai bentuk dari *Reactive Oxygen* yang terdapat di dalam tubuh (Parwata, 2016). Phaniendra *et al.* (2015) menyatakan bahwa *Reactive Oxygen Species* (ROS) dibedakan menjadi dua, yaitu endogen dan eksogen. *Reactive Oxygen Species* (ROS) endogen diproduksi oleh sel-sel normal di dalam tubuh, misalnya melalui mitokondria, retikulum endoplasma, dan peroksisom. Sedangkan *Reactive Oxygen Species* (ROS) eksogen diproduksi oleh sel-sel yang terpapar oleh polutan dari luar tubuh, misalnya melalui radiasi, polusi, dan penggunaan bahan-bahan kimia.

Tingginya tingkat radikal bebas yang diproduksi maupun diserap akan menentukan seberapa besar tingkat stress oksidatif yang dialami oleh tubuh. Lushchak (2014) menyatakan bahwa tingkatan stress oksidatif dapat didemonstrasikan berdasarkan hubungan yang terbentuk antara dosis *inducer* dan hasil (*endpoint*) yang dapat diukur. Tingkatan stress oksidatif dibedakan menjadi empat, yaitu *Basal Intensity Oxidative Stress* (BOS), *Low Intensity Oxidative Stress* (LOS), *Intermediate Intensity Oxidative Stress* (IOS), dan *High Intensity Oxidative Stress* (HOS). Empat tingkatan stress oksidatif tersebut dapat dilihat pada **Gambar 6**.



Gambar 6. Hubungan antara Dosis *Inducer* dan Hasil (*Endpoint*) Stress Oksidatif (Lushchak, 2014).

Antioksidan merupakan sekumpulan senyawa yang memiliki kemampuan untuk menetralkan kadar toksisitas radikal bebas di dalam tubuh, sehingga jika jumlahnya lebih banyak dibandingkan radikal bebas, maka proses biokimia di dalam tubuh tidak akan terganggu. Sama seperti radikal bebas, antioksidan juga dihasilkan secara endogen dan eksogen. Secara endogen, tubuh makhluk hidup mampu memproduksi antioksidan, misalnya enzim superoksida dismutase (SOD), enzim katalase (CAT), dan *glutathione peroksidase* (GPx). Sedangkan secara eksogen, antioksidan dapat dihasilkan dari produk-produk pangan yang mengandung antioksidan buatan bahkan antioksidan alami dari

hewan dan tumbuhan, misalnya *butyl hidroksi toluene* (BHT), hidroksi quinon (TBHQ), vitamin, dan senyawa-senyawa fenolik (Parwata, 2016). Superoksida Dismutase (SOD) merupakan antioksidan bersifat enzimatik yang mengnaung Cu dan bertugas menguraikan anion superoksida menjadi hidrogen peroksida dan oksigen, sedangkan enzim katalase (CAT) merupakan antioksidan enzimatik yang mengandung banyak Fe serta bertugas mengkatalisasi hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen. Sementara *Glutathione Peroksidase* (GPx) merupakan antioksidan enzimatik yang disusun atas Se dan berfungsi untuk menguraikan *Glutathione* (GSH) dan hidrogen peroksida menjadi *Glutathione Disulfida* (GSSH) dan Hidrogen Oksida (HO) serta menurunkan kadar lipid peroksidase di membran (Zulaikhah, 2017). Molyneux (2004) menjelaskan bahwa aktivitas antioksidan di dalam suatu ekstrak atau senyawa dapat diprediksi, salah satunya adalah menggunakan *Inhibition Concentration 50%* atau IC_{50} , yaitu konsentrasi larutan yang dibutuhkan oleh sampel suatu senyawa dalam menghambat setidaknya 50% radikal bebas *2,2-Diphenyl-1-1-Picrylhydrazyl* (DPPH). Lima tingkatan aktivitas antioksidan di dalam suatu senyawa disajikan pada **Tabel 2**.

Tabel 2. Aktivitas Antioksidan Berdasarkan Nilai IC_{50}
(Molyneux, 2004)

No.	Nilai IC_{50}	Sifat Antioksidan
1.	<50 $\mu\text{g/mL}$	Sangat kuat
2.	50 – 100 $\mu\text{g/mL}$	Kuat
3.	101 – 150 $\mu\text{g/mL}$	Sedang
4.	151 – 200 $\mu\text{g/mL}$	Lemah
5.	>200 $\mu\text{g/mL}$	Sangat lemah

Antioksidan dibedakan menjadi tiga jenis, yaitu berdasarkan ukurannya, kelarutannya di dalam lemak dan air, dan aktivitasnya. Berdasarkan aktivitasnya, antioksidan dibedakan menjadi dua, yaitu antioksidan enzimatik dan antioksidan non-enzimatik. Di dalam tubuh, antioksidan enzimatik bekerja dengan cara mengubah senyawa-senyawa oksidatif menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2) dan kemudian direduksi lagi menjadi air (H_2O) sehingga aktivitas radikal bebas akan rusak dan terputus. Contoh senyawa antioksidan enzimatik adalah enzim katalase, peroksidase, *Superoxide Dismutase* (SOD), dan glukosa-6-posfat-dehidrogenase. Sedangkan antioksidan non-enzimatik bekerja dengan cara menghentikan reaksi rantai radikal bebas. Contoh dari antioksidan jenis ini adalah vitamin C, vitamin E, karotenoid, lutein, dan polifenol (Nimse and Pal, 2015).

Berdasarkan kelarutannya di dalam lemak dan air, antioksidan dibedakan menjadi antioksidan larut dalam air dan antioksidan larut dalam lemak. Antioksidan larut dalam air cenderung ditemukan pada bagian sitosol atau matriks sitoplasmik, contohnya vitamin C. Sedangkan antioksidan larut dalam lemak banyak ditemukan pada membran sel, contohnya vitamin E. Sedangkan berdasarkan ukurannya, antioksidan dibedakan menjadi antioksidan molekul besar dan antioksidan molekul kecil. Antioksidan molekul besar bekerja dengan cara mencegah penyerangan yang dilakukan oleh radikal bebas terhadap protein esensial di dalam tubuh. Contoh antioksidan ini adalah enzim dan albumin. Sedangkan antioksidan molekul kecil bekerja dengan cara menetralkan *Reactive Oxygen Species* (ROS) dan membawanya pergi. Contoh antioksidan jenis ini adalah karotenoid, dan vitamin C (Nimse and Pal, 2015). Selain itu, aktivitas antioksidan

2.3.3. *Anti-Aging*

Anti-aging merupakan senyawa yang diproduksi dengan tujuan untuk menghambat proses kerusakan sel-sel tubuh yang diakibatkan oleh proses penuaan (*aging process*) (Sari, 2021). Proses pembuatan *anti-aging* dapat dilakukan menggunakan senyawa-senyawa mengandung antioksidan yang dihasilkan oleh hewan maupun tumbuhan, misalnya vitamin C, vitamin E, turunan asam sinamat, kuomarin, tokoferol, asam organik polifungsional dan senyawa-senyawa fenolik dan polifenolik seperti flavonoid. Selain dapat dijadikan sebagai antioksidan tambahan, senyawa-senyawa ini juga dapat digunakan untuk meningkatkan *Superoxide Dismutase* (SOD), *Glutathione Peroksidase* (GPx) dan enzim katalase (CAT) pada tubuh (Parwata, 2016). Beberapa penelitian menunjukkan bahwa kandungan senyawa-senyawa antioksidan yang tinggi pada tinta cumi-cumi diyakini mampu dimanfaatkan dalam proses pembuatan *anti-aging*. Nadarajah *et al.* (2017) menyatakan bahwa senyawa antioksidan yang terkandung di dalam tinta cumi-cumi dapat digunakan untuk melindungi kerusakan sel dari radikal bebas, sehingga tinta cumi-cumi memiliki potensi untuk dijadikan *anti-aging*, pengobatan jantung, dan berbagai penyakit yang menyerang sistem imunitas tubuh.

Penelitian yang dilakukan oleh Chen *et al.* (2020) berhasil membuktikan bahwa polisakarida yang terkandung dalam tinta cumi-cumi mampu menurunkan tingkat stress oksidatif yang disebabkan oleh senyawa hidrogen peroksidase (H_2O_2) dengan cara menekan jumlah radikal bebas di dalam tubuh, serta meningkatkan kadar Superoksida Dismutase (SOD) dan *Glutathione Peroksidase* (GSH-Px). Penelitian serupa yang dilakukan oleh Jeyasanta and Patterson (2020) menunjukkan bahwa tinta cumi-cumi mengandung senyawa antioksidan dan enzim katalase dalam jumlah yang tinggi sehingga dapat membantu proses perlindungan

pada sel-sel tubuh dari kerusakan yang diakibatkan oleh hidrogen peroksidase (H_2O_2) dan molekul-molekul radikal bebas lainnya. Sedangkan penelitian yang dilakukan oleh Gajendra *et al.* (2020) menunjukkan selama tinta cumi-cumi mengandung L-dopa dan dopamin yang terdiri dari gugus-gugus hidroksi, maka proses pendonoran oksigen dan hidrogen dapat terjadi sehingga stress oksidatif dapat dicegah. Senyawa-senyawa tersebut dapat ditemukan pada *Loligo vulgaris*, *Loligo formosana*, dan *Loligo duvauceli*. Selain itu, kandungan senyawa β -karoten yang terdapat di dalam melanin tinta cumi-cumi juga dapat menjadi inhibitor alami pada proses oksidasi asam linolenik. Zaharah and Rabeta (2018) menyatakan bahwa tinta cumi-cumi dapat kehilangan senyawa-senyawa antioksidan yang dikandungnya apabila terjadi kesalahan ketika melakukan ekstraksi. Proses ekstraksi tinta cumi-cumi menggunakan air menunjukkan aktivitas antioksidan yang lebih tinggi dibandingkan dengan etanol dan heksana. Berdasarkan beberapa penelitian tersebut dapat disimpulkan bahwa pengobatan yang fokus pada proses penurunan kadar radikal bebas di dalam tubuh akan menurunkan kemungkinan terjadinya stress oksidatif, sehingga kerusakan sel-sel tubuh dapat dicegah, termasuk kerusakan pada sistem reproduksi. Keberhasilan dalam mencegah terjadinya kerusakan pada sel-sel reproduksi akan memberikan peluang dalam keberhasilan pasangan dalam memperoleh kehamilan. Dengan demikian, angka infertilitas yang disebabkan oleh penuaan memiliki kemungkinan untuk mengalami penurunan.

2.3.4. D-Galaktosa

D-Galaktosa merupakan gula pereduksi golongan aldohexosa yang menyusun susu dalam bentuk oligosakarida. Senyawa ini diproduksi oleh berbagai macam bakteri, hewan, maupun tumbuhan dan memiliki fungsi yang sangat beragam di dalam

tubuh makhluk hidup. Meskipun demikian, jumlah D-Galaktosa yang melebihi batas dapat memicu berbagai macam penyakit degeneratif (Coelho *et al.*, 2015). Shwe *et al.* (2018) dalam Situmorang (2021) menyatakan bahwa kadar normal D-Galaktosa di dalam tubuh adalah 10 mg/dL. Jika jumlahnya melewati jumlah ini, maka stress oksidatif akan terjadi.

Pada bidang kesehatan, D-Galaktosa telah banyak digunakan dalam kegiatan penelitian yang fokus pada proses penuaan (*aging process*) karena kemampuannya dalam menginterpretasikan proses penuaan yang hampir sama dengan penuaan secara alami pada manusia. Dalam mendemonstrasikan proses penuaan, senyawa ini bekerja dengan cara menstimulasi produksi senyawa-senyawa radikal bebas dan mengganggu proses metabolisme karbohidrat. Akibatnya tubuh mengalami stress oksidatif dan terjadi kerusakan oksidasi berlebih sehingga penuaan terjadi lebih cepat (Mohammadi *et al.*, 2018). Berbagai penelitian menggunakan D-Galaktosa telah digunakan untuk mendemonstrasikan terjadinya proses penuaan pada makhluk hidup. Terdapat lima pertimbangan yang digunakan dalam penggunaan D-Galaktosa sebagai agen penuaan, yaitu:

1. Keanekaragaman dosis D-Galaktosa yang digunakan, yakni 50 -1.250 mg/kg.
2. Lama waktu pemberian perlakuan, yakni 14-90 hari.
3. Jenis kelamin hewan uji yang digunakan.
4. Variasi umur hewan uji yang digunakan, yakni 1 – 15 bulan.
5. Strain hewan uji yang digunakan, misalnya Kunming, ICR, Swiss albino, dan lain sebagainya (Hao *et al.*, 2014).

III. METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada Desember 2022 – Maret 2023 di Unit Hewan Percobaan Jurusan Biologi Universitas Lampung sebagai tempat pemeliharaan hewan uji, penginduksian D-Galaktosa, dan pemberian perlakuan terhadap hewan uji. Proses pembedahan hewan uji setelah pemberian perlakuan, dan pengamatan terhadap jumlah, motilitas, dan viabilitas spermatozoa mencit yang telah diinduksi D-Galaktosa dan diberi perlakuan dilakukan di Laboratorium Zoologi Jurusan Biologi Universitas Lampung.

3.2. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam kegiatan penelitian ini adalah 24 unit kandang mencit beserta penutupnya untuk tempat tinggal mencit, wadah pakan mencit untuk tempat makanan bagi mencit, botol air minum mencit untuk tempat penyimpanan air minum mencit, rak untuk tempat meletakkan kandang mencit, timbangan untuk menimbang berat badan mencit, seperangkat alat bedah untuk membedah hewan uji, hemositometer untuk menghitung jumlah spermatozoa mencit, jarum suntik (*sprit syringe*) 1 mL untuk menginduksi D-Galaktosa ke dalam tubuh mencit, mikroskop untuk melakukan pengamatan terhadap parameter penelitian, sonde oral untuk memberikan perlakuan berupa tinta cumi-cumi pada mencit, gelas objek dan kaca penutup untuk membantu proses pengamatan, gelas ukur untuk membantu proses pengukuran cairan yang digunakan dalam penelitian, pipet

tetes untuk membantu proses pengambilan cairan, neraca analitik untuk menimbang bahan yang digunakan dalam penelitian, dan kamera untuk dokumentasi penelitian.

Bahan yang digunakan dalam kegiatan penelitian ini adalah hewan uji berupa mencit jantan (*Mus musculus* L.) sebanyak 24 ekor dengan berat sekitar 30-40 gram yang berasal dari Peternakan NP Reptil Way Halim Kota Bandar Lampung Provinsi Lampung, *pellet* untuk pakan mencit selama penelitian berlangsung, air untuk minum mencit, sekam padi untuk alas pada kandang mencit, D-Galaktosa untuk meningkatkan *aging* mencit, alkohol untuk sterilisasi alat penunjang penelitian, kloroform untuk membius hewan uji, tinta cumi-cumi (*Loligo* sp.) sebagai *anti-aging*, akuades dan aquabides untuk melarutkan senyawa-senyawa yang diperlukan selama penelitian, eosin-Y 0,05% untuk membantu proses pengamatan viabilitas spermatozoa, dan NaCl 0,9% untuk membantu proses pengamatan jumlah dan motilitas spermatozoa.

3.3. Prosedur Kerja

3.3.1. Persiapan Kandang dan Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit jantan (*Mus musculus* L.) berumur 8-12 minggu sebanyak 24 ekor. Proses persiapan kandang dan hewan uji dimulai dengan membersihkan 24 unit kandang beserta penutupnya, lalu dikeringkan dan diberi alas sekam padi. Kandang mencit juga dilengkapi dengan tempat makanan dan botol air minum mencit. Setelah itu, sebanyak 24 ekor mencit jantan dengan berat 30-40 gram dipersiapkan dan diaklimatisasi selama satu minggu agar mampu beradaptasi dengan tempat tinggal barunya dan proses pemberian perlakuan tidak terpengaruh dengan lingkungan. Selama proses aklimatisasi berlangsung, mencit diberi makan *pellet* dan air

minum setiap hari. Setelah aklimatisasi dilaksanakan, mencit kemudian akan memasuki tahap pemberian perlakuan yang dimulai dengan disuntikkan senyawa D-Galaktosa sesuai dengan dosis yang telah ditentukan secara intraperitoneal.

3.3.2. Proses Pengambilan Tinta Cumi-Cumi

Tinta cumi-cumi yang digunakan sebagai perlakuan didapatkan dari Pasar Ikan Gudang Lelang Provinsi Lampung. Sebanyak 6 kg cumi-cumi diambil kantung tintanya dengan cara membelah bagian mantelnya menggunakan gunting. Kantung tinta kemudian dipecahkan dan tintanya dimasukkan ke dalam botol kaca. Tinta cumi-cumi yang telah didapatkan kemudian disimpan di dalam *freezer* untuk menjaga kesegarannya hingga proses pemberian dilakukan. Proses pemberian perlakuan dilakukan dengan cara mencekikkan tinta cumi-cumi secara oral pada kelompok perlakuan.

3.3.3. Pemberian Perlakuan

Mencit jantan yang akan digunakan dalam penelitian ditimbang terlebih dahulu, kemudian dibagi menjadi 4 kelompok yang masing-masing terdiri dari 6 ekor mencit. Berikut empat kelompok yang digunakan dalam penelitian ini.

1. Kelompok kontrol : mencit jantan hanya diberi makan dan minum tanpa mendapat perlakuan apapun.
2. Kelompok kontrol negatif : mencit jantan diinduksi dengan D-Galaktosa sebanyak 150 mg/kgBB secara intraperitoneal, kemudian diberi makan dan minum tanpa diberi perlakuan apapun.

3. Kelompok perlakuan 1: mencit jantan diinduksi dengan D-Galaktosa sebanyak 150 mg/kgBB secara intraperitoneal, kemudian diberi makan dan minum serta mendapatkan perlakuan berupa pemberian tinta cumi-cumi dengan cara dicekok (secara oral) sebanyak 40 mL/kgBB.
4. Kelompok perlakuan 2: mencit jantan diinduksi dengan D-Galaktosa sebanyak 150 mg/kgBB secara intraperitoneal, kemudian diberi makan dan minum secara normal serta diberikan perlakuan berupa tinta cumi-cumi secara oral sebanyak 100 mL/kgBB.

Penggunaan dosis D-Galaktosa 150 mg/kgBB didasarkan pada penelitian yang telah dilakukan oleh Bintang dkk. (2019). Hal ini juga sesuai dengan Sulistyoningrum (2017) yang menjelaskan bahwa dosis yang tepat untuk menurunkan parameter spermatozoa adalah 100-200 mg/kgBB yang dilarutkan dalam 1-5 mL akuades. Sedangkan dosis tinta cumi-cumi yang dipakai dalam penelitian ini terdiri dari dua jenis, yaitu 40 mL/kgBB (rendah) dan 100 mL/kgBB (tinggi). Proses pemberian perlakuan dilakukan setiap hari pada pukul 09.00 – 10.00 WIB selama 35 hari. Lama waktu perlakuan didasarkan pada lama waktu satu siklus pembentukan spermatozoa pada mencit. Setelah 35 hari, mencit dibedah kemudian diamati jumlah, motilitas, dan viabilitas spermatozoanya dan dibandingkan dengan mencit dari kelompok kontrol.

3.3.4. Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian yang bersifat eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Sebanyak 24 ekor kelompok mencit jantan yang berasal dari Peternakan NP Reptil Kecamatan Way Halim Provinsi Lampung dibagi menjadi 4 kelompok dimana masing-masing kelompok terdiri dari 6 ekor

mencit jantan. Penentuan jumlah pengulangan yang akan digunakan dilakukan menggunakan rumus Federer (1963), yaitu $(t-1)(n-1) \geq 15$, dimana t menyatakan jumlah perlakuan dan n menyatakan jumlah ulangan. Sehingga jumlah ulangan yang dibutuhkan untuk penelitian ini disajikan sebagai berikut.

$$\begin{aligned} (t-1)(n-1) &\geq 15 \\ (4-1)(n-1) &\geq 15 \\ 3n-3 &\geq 15 \\ 3n &\geq 18 \\ n &\geq 6 \end{aligned}$$

Mencit jantan dari empat kelompok tersebut kemudian diacak untuk menghindari bias. Hasil pengacakan tersebut disajikan pada **Tabel 3**.

Tabel 3. Skema Rancangan Penelitian

P2U2	P2U6	K-U2	KU3
KU5	P1U5	P1U4	P2U3
K-U3	KU2	P1U1	KU6
KU4	P2U4	K-U4	K-U5
P1U3	K-U6	P2U5	P2U1
P1U6	P1U2	KU1	K-U1

Keterangan:

K = Kontrol

K- = Kontrol negatif (-)

P1 = Perlakuan dengan dosis sebanyak 40 mL/KgBB

P2 = Perlakuan dengan dosis sebanyak 100 mL/KgBB

U = Ulangan

1,2,3, dst. = Ulangan ke-...

3.3.5. Parameter Penelitian

Terdapat tiga parameter yang digunakan dalam penelitian ini, yaitu jumlah (juta/mL), motilitas (%), dan viabilitas (%) spermatozoa. Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 40 x 10 dimana parameter jumlah spermatozoa diamati dengan cara mengencerkan spermatozoa lalu dihitung jumlahnya, parameter motilitas diamati dengan cara menghitung jumlah spermatozoa yang bergerak dalam suspensi, dan parameter viabilitas diamati dengan cara menghitung jumlah spermatozoa yang tidak terwarnai dalam suspensi.

3.3.6. Pembuatan Larutan

Terdapat dua jenis larutan yang akan digunakan dalam penelitian ini, yaitu eosin 0,05% dan NaCl 0,9%. Kedua larutan ini digunakan untuk membantu proses pengamatan motilitas dan viabilitas spermatozoa mencit jantan. Cara pengenceran kedua larutan tersebut disajikan sebagai berikut.

1. Larutan Eosin 0,05%

Pembuatan larutan eosin 0,05% dilakukan dengan cara melarutkan 0,05 gram eosin-Y ke dalam 100 mL aquades.

2. Larutan NaCl 0,9%

Larutan NaCl 0,9% dibuat dengan mencampurkan 0,9 gram NaCl dan aquabides sebanyak 100 mL (WHO, 2010).

3.3.7. Pengambilan Data

Proses pengambilan data terhadap tiga parameter yang diuji dalam penelitian ini dilakukan dengan cara sebagai berikut.

1. Jumlah Spermatozoa

Sudarti dkk. (2019) menjelaskan bahwa untuk menghitung jumlah spermatozoa, maka langkah yang harus dilakukan adalah mengencerkan suspensi spermatozoa dalam larutan NaCl 0,9% sebanyak 20x. Setelah dilakukan pengenceran, satu tetes suspensi diteteskan ke atas kaca objek dan ditutup menggunakan kaca penutup. Suspensi kemudian diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 40 x 10. Menurut Diartha dkk. (2016), perhitungan spermatozoa untuk pengenceran sebanyak 20x adalah $10.000 \times 20 = 200.000/\text{mL}$, sehingga jumlah spermatozoa yang berhasil diamati kemudian dikalikan dengan 200.000/mL.

2. Motilitas Spermatozoa

Motilitas spermatozoa dihitung dari sampel yang berasal dari epididimis mencit bagian *cauda*. Epididimis diletakkan di atas kaca arloji yang telah berisi larutan NaCl 0,9% sebanyak 2 mL kemudian dicacah menjadi bagian-bagian kecil, dipelurut, dan diaduk hingga tercampur secara merata. Sebanyak satu tetes suspensi spermatozoa yang telah didapatkan dalam larutan NaCl 0,9% kemudian diteteskan di atas gelas objek dan ditutup menggunakan kaca penutup. Suspensi kemudian diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 40 x 10. Persentase spermatozoa yang motil atau spermatozoa yang bergerak ditentukan dengan cara membagi spermatozoa yang bergerak dengan jumlah seluruh spermatozoa yang diamati. Berdasarkan penelitian Salman *et al.* (2016), persentase motilitas spermatozoa yang diamati dihitung menggunakan rumus berikut.

$$\text{Persentase Motilitas Spermatozoa (\%)} = \frac{a}{a+b} \times 100\%$$

Keterangan:

a = Spermatozoa yang bergerak

b = Spermatozoa yang tidak bergerak

3. Viabilitas Spermatozoa

Viabilitas spermatozoa mencit dihitung dengan cara meneteskan satu tetes suspensi spermatozoa yang telah diencerkan menggunakan NaCl 0,9% kemudian ditambahkan satu tetes larutan eosin 0,05% ke atas kaca objek lalu ditutup menggunakan kaca penutup. Kaca objek kemudian dikeringkan hingga membentuk preparat berbentuk apusan. Pengamatan kemudian dilakukan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 40 x 10. Kepala spermatozoa yang hidup tidak akan berwarna karena tidak mampu menyerap larutan eosin, sedangkan kepala spermatozoa yang mati akan berwarna karena mampu menyerap larutan eosin akibat adanya kerusakan membran (Manehat dkk., 2021). Persentase viabilitas atau kemampuan hidup spermatozoa kemudian ditentukan menggunakan rumus berikut (Pubiandara dkk., 2016).

$$\text{Persentase Viabilitas Spermatozoa (\%)} = \frac{a}{a+b} \times 100\%$$

Keterangan:

a = Jumlah spermatozoa yang tidak terwarnai

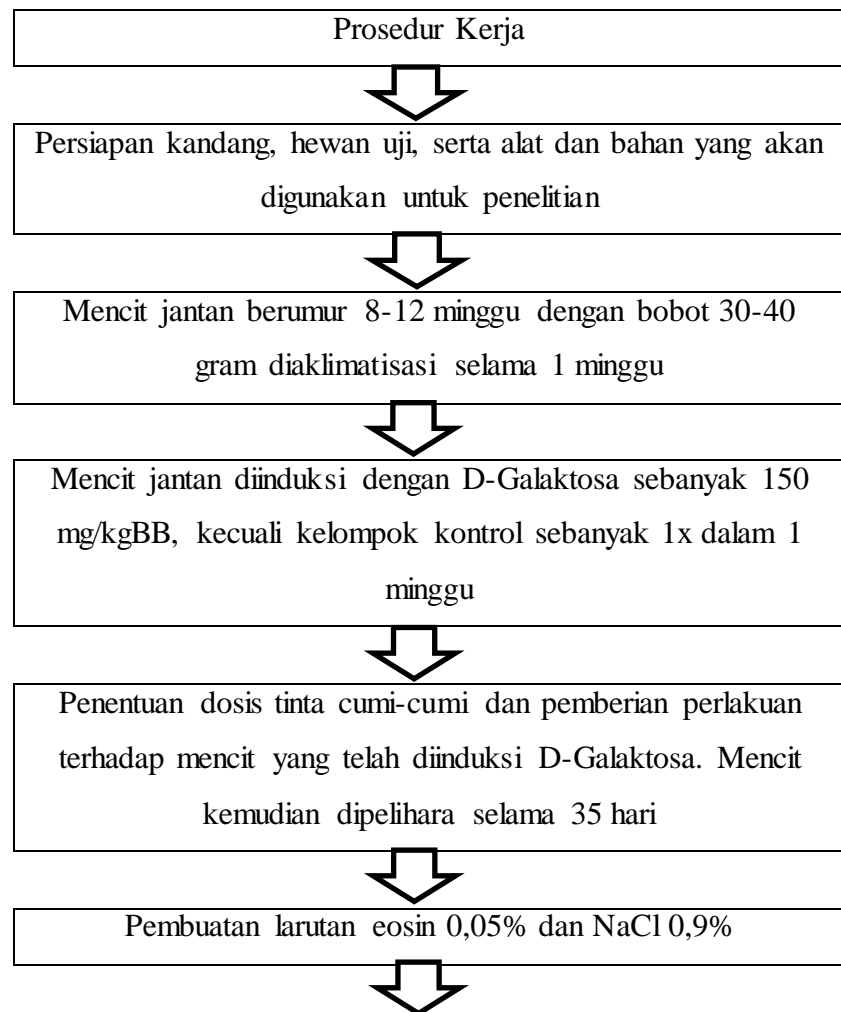
b = Jumlah spermatozoa yang terwarnai

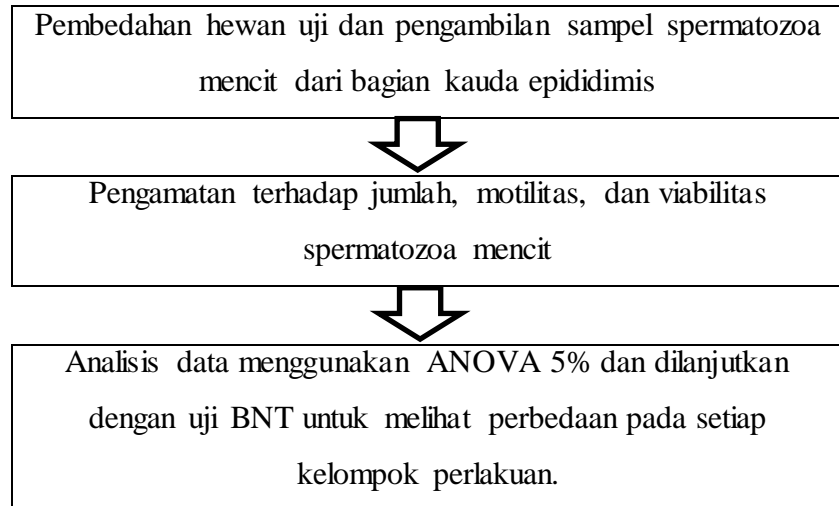
3.3.8. Analisis Data

Analisis data dilakukan menggunakan *Analysis of Variance* (ANOVA) dengan taraf 5% pada IBM SPSS 25 untuk melihat ada atau tidaknya perbedaan pada setiap perlakuan. Jika terdapat perbedaan yang nyata antar perlakuan, maka analisis data dilanjutkan menggunakan uji BNT (Beda Nyata Terkecil) sehingga dapat diketahui perbedaan yang terbentuk pada masing-masing perlakuan.

3.3.9. Diagram Alir Penelitian

Diagram alir penelitian ini disajikan sebagai berikut.





V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Penelitian yang telah dilakukan menghasilkan kesimpulan bahwa tinta cumi-cumi:

1. Meningkatkan jumlah spermatozoa mencit yang diinduksi D-Galaktosa dengan hasil terbaik ditunjukkan oleh perlakuan 2 (100 mL/kgBB), yaitu dengan jumlah spermatozoa sebanyak 64,767 juta/mL.
2. Meningkatkan motilitas spermatozoa mencit yang diinduksi D-Galaktosa dengan hasil yang paling baik ditunjukkan oleh perlakuan 2 (100 mL/kgBB), yaitu dengan rata-rata sebesar 64.740%.
3. Meningkatkan viabilitas spermatozoa mencit yang diinduksi D-Galaktosa dengan hasil yang paling baik ditunjukkan oleh perlakuan 2 (100 mL/kgBB), yaitu rata-rata sebesar 70,482%.

5.2. Saran

Hasil penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa tinta cumi-cumi mampu meningkatkan jumlah, motilitas, dan viabilitas spermatozoa mencit yang mengalami penurunan akibat diinduksi D-Galaktosa. Namun, hasil akhirnya belum mampu melebihi jumlah, motilitas, dan viabilitas spermatozoa mencit yang tidak mendapat perlakuan apapun. Diduga bahwa dosis tinta cumi-cumi yang diberikan belum mampu memperbaiki kerusakan yang diakibatkan oleh D-Galaktosa secara keseluruhan. Oleh sebab itu, diperlukan penelitian lanjutan menggunakan dosis yang berbeda,

sehingga dapat ditemukan dosis yang tepat untuk dikembangkan dalam bidang farmakologi dan medis. Selain itu, penulis menyadari bahwa penginduksian D-Galaktosa tidak hanya memberikan efek secara tak kasat mata terhadap penuaan, tetapi juga efek secara fisik. Oleh sebab itu diperlukan kajian lebih lanjut terkait hal tersebut.

DAFTAR PUSTAKA

- Adjoumani, J. J. Y., Wang K., Zhou M., Liu W., and Zhang D. 2017. Effect of Dietary Betalaine on Growth Performance, Antioxidant Capacity, and Lipid Metabolism in Blunt Snout Bream Fed a High Fat Diet. *Fish Physiology and Biochemistry*. 43(6): 1733-1745.
- Affandi, R. I., Mohammad F., and Arning W. E. 2019. Active Compounds on Squid (*Loligo* sp.) Ink Extract Powder as Immunostimulant Candidate to Against Shrimp Disease. *Research Journal of Life Sciences*. 6(3): 150-161.
- Agarwal, A., Mulgund A., Hamada A., and Chyatte M. R. 2015. A Unique View on Male Infertility around the Globe. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 13(1):
- Ahangarpour, A., Oroojan A. A., and Heidari H. 2014. Effects of Exendin-4 on Male Reproductive Parameters of D-Galactose Induced Aging Mouse Model. *World Journal of Mens Health*. 32(3): 176-183.
- Ahmadi, S., Bashiri R., Anari G. A., and Nadjarzadeh A. 2016. Antioxidant Supplement and Semen Parameters: an Evidence Based Review. *International Journal of BioMedicine*. 14(12): 729-736.
- Baskoro, M. S., Fis P., dan Agus S. 2011. *Atraktor Cumi-Cumi*. Semarang: Badan Penerbit Universitas Diponegoro.
- Beguiría, R., García D., Obradors A., Poisot F., Vassena R., and Vernaev V. 2014. Paternal Age and Assisted Reproductive Outcomes in ICSI Donor Oocytes: Is There an Effect of Older Fathers?. *Journal of Human Reproduction*. 29(10): 2114-2122.

- Bintang, S. S., Yarwardiah S., dan Muhammad I. 2019. Studi Preliminari Tentang Pengaruh D-Galaktosa dalam Menginduksi Stress Oksidatif Pada Mencit Jantan Galur Outbreal FK USU. *Jurnal Farmasi*. 2(1): 1-5.
- Biology Wise. 2022. The Process of Spermatogenesis Explained. [Internet]. <https://www.biologywise.com>. Diakses pada 20 Desember 2022 pukul 23.37 WIB.
- Busman, H. 2020. *Spermatozoa dan Spermatogenesis*. Lampung: Pustaka Ali Imron. x + 66 halaman.
- Carlson, D. 1996. Squid Anatomy. [Internet]. <https://www.carlsonstockart.com>. Diakses pada 15 Desember 2022 Pukul 10.20 WIB.
- Chen, Y., Liu H., Huang H., Ma Y., Wang R., Hu Y., Zheng X., Chen C., and Tang H. 2020. Squid Ink Polysaccharides Protect Human Fibroblast Against Oxidative Stress by Regulating NADPH Oxidase and Connexin43. *Frontiers in Pharmacology*. 10(1574): 1-11.
- Coelho, A. I., Berry G. T. and Rubio-Gozalbo M. E. 2015. Galactose Metabolism and Health. *Clinical Nutrition and Metabolic Care*. 18(4): 1-6.
- Derby, C. D. 2014. Cephalopod Ink: Production, Chemistry, Functions, and Applications. *Journal of Marine Drugs*. 12(5): 2700-2730.
- Dewi, N. L. P. M. C. I Komang L., dan Ni Komang Y. R. 2022. Gambaran Faktor-Faktor Penyebab Infertilitas dan Tingkat Keberhasilan Program Bayi Tabung yang Diikuti oleh Pasangan Usia Subur. *Jurnal Ilmiah Kebidanan*. 10(1): 1-8.
- Diartha, I. W. W., Ni W. S., dan Iriani S. 2016. Pengaruh Pemberian Ekstrak Tauge Ditambah Madu Terhadap Kualitas Spermatozoa Mencit Jantan (*Mus musculus L.*). *Jurnal Simbiosis*. 4(1): 1-5.
- Fatmawati, V. dan M. Ali Imron. 2017. Perilaku Koping Pada Lansia yang Mengalami Penurunan Gerak dan Fungsi. *Intuisi: Jurnal Psikologi Ilmiah*. 9(1): 26-38.

- Ferial, E. W. 2016. Kajian Infertilitas Pria dan Usaha Penanganannya. *Prosiding Seminar Nasional from Basic Science to Comprehensive Education*. Makassar: UIN Alauddin Makassar. Halaman 77-80.
- Gajendra, Raju C. V., Sarojini A., Amitha, Lakshmisha I. P., and Arun K. P. 2020. Antioxidant Activity of Melanin Free Ink (MFI) Extract from the Ink Sac of *Loligo duvauceli*. *Journal of Entomology and Zoology Studies*. 8(4): 1388-1392.
- Gu, Y. P., Yang X. M., Duan Z. H., Shang J. H., Luo P., Xiao W., Zhang D. Y. and Liu H. Z. 2017. Squid Ink Polysaccharide Prevents Autophagy and Oxidative Stress Affected by Cyclophosphamide in Leydig Cells of Mice: a Pilot Study. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. 20(11); 1194-1199.
- Halvaei, I., Litzky J., and Esfandiari N. 2020. Advanced Paternal Age: Effects on Sperm Parameters, Assisted Reproduction Outcomes and Offspring Health. *Journal of Reproductive Biology and Endocrinology*. 18(1): 110.
- Hao, L., Huang H., Gao J., Marshall C., Chen Y., and Xiao M. 2014. The Influence of Gender, Age, and Treatment Time on Brain Oxidative Stress and Memory Impairment Induced by D-Galactose in Mice. *Journal Neuroscience Letter*. 571: 45-49.
- Harris, D. H., Fronczak C., Roth L., and Maechem Randall. 2011. Fertility and the Aging Male. *Reviews in Urology*. 13(4); 184-190.
- Hassan, M. S., Mohammady E. Y., Saoudy M. R., El-Garhy H. A. S. Moustafa M. M. A., Mohamed S. A., and El-Haroun E. R. 2019. Effect on *Silybum marianum* Seeds as a Feed Additive on Growth Performance, Serum Biochemical Indices, Antioxidant Status, and Gene Expression of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) fingerlings. *Aquaculture*. 509(2): 178-187.
- Himpunan Endokrinologi Reproduksi dan Fertilitas Indonesia. 2013. *Konsensus Penanganan Infertilitas*. Himpunan Endokrinologi Reproduksi dan Fertilitas Indonesia. 90 halaman.
- Integrated Taxonomic Information System. 2022. *Loligo* Lamarck, 1798. *Internet*. www.itis.gov. Diakses pada Rabu, 02 November 2022 Pukul 14.26 WIB.

_____. 2022. *Mus musculus* Linnaeus, 1758. *Internet*. www.itis.gov. Diakses pada Senin, 21 November 2022 Pukul 12.02 WIB.

Jeyasanta, I. and Patterson J. 2020. Research Article: Bioactive Properties of Ink Gland Extract from Squid *Loligo duvauceli*. *Ecologia*. 10(1): 9-19.

Jin, K. 2010. Modern Biological Theories of Aging. *Aging and Disease*. 1(2): 72-74.

Khaira, K. 2010. Menangkal Radikal Bebas dengan Antioksidan. *Jurnal Sains dan Teknologi*. 2(2): 183-187.

Kolsi, R. B. A., Gargouri B., Sassi S., Frikha D., Lassoued S., and Belghith K. 2017. In Vitro Biological Properties and Health Benefits of a Novel Sulfated Polysaccharide Isolated from *Cymodocea nodosa*. *Lipids in Health and Disease*. 16(1): 252-262.

López-Otín, C., Blasco M. A., Partridge L., Serrano M., and Kroemer G. 2013. The Hallmarks of Aging. *Cell*. 153(6):1194-1217.

Lushchak, V.I. 2014. Classification of Oxidative Stress based on Its Intensity. *Experimental and Clinical Sciences Journal*. 26(13): 922-937.

Manehat, F. X., Dethan A. A., dan Tahuk P. K. 2021. Motilitas, Viabilitas, Abnormalitas Spermatozoa, dan pH Semen Sapi Bali dalam Pengencer Sari ir Tebu Kuning Telur yang Disimpan dalam Waktu yang Berbeda. *Journal of Tropical Animal Science and Technology*. 3(2): 76-90.

Mitchel, S. J., Scheibye-Knudsen M., Longo D.L., and de Cabo R. 2015. Animal Models of Aging Research: Implications of Human Aging and Age-Related Diseases. *Annual Review of Animal Biosciences*. 3: 283-303.

Mohammadi, E., Mehri S., Bostan H. B., and Hosseinzadeh H. 2018. Protective Effect of Crocin Against D-Galactose Induced Aging in Mice. *Avicenna Journal of Phytomedicine*. 8(1): 14-23.

- Molyneux, P. 2004. The Use of the Stable Free Radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) fo Estimating Antioxidant Activity. *Songklanakarin Journal Science and Technology*. 26(2): 211-219.
- Nadarajah, S. K., Radha V., and Mani J. 2017. Therapeutic Significane of *Loligo vulgaris* (Lamarck, 1798) Ink Extract: A Biomedical Approach. *Pharmacognosy and Natural Products*. 9(1): 105-109.
- Nimse, S. B. and Pal D. 2015. Free Radicals, Natural Antioxidants, and Their Reaction Mechanisms. *Royal Society of Chemistry*. 5: 27986-28006.
- Nugroho, R. A. 2018. *Mengenal Mencit Sebagai Hewan Laboratorium*. Samarinda. Mulawarman University Press.
- Omur, A. D., and Cohan K. 2016. Protective Effect of the Antioxidant Curcumin, Ellagic Acid, and Methionine on Motility, Mitochondrial Transmembrane Potential, Plasma Membrane, and Acrosome Integrity in Freeze-thawed Merino Ram Sperm. *Veterinari Medicina*. 61(1): 10-16.
- Parwata, M.O.A. 2016. *Antioksidan*. Bali: Program Pascasarjana Universitas Udayana.
- Phaniendra, A., Jestadi D.B., and Periyasamy L. 2015. Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. 30(1): 11-26.
- Pino, V., Sanz A., Valdés N., Crosby J., and Mackenna A. 2020. the Effect of Aging on Semen Parameters and Sperm DNA Fragmentation. *JBRA Assisted Reproduction*. 24(1): 82-86.
- Pubiandara, S., Sri S., dan Madi H. 2016. Pengaruh Penambahan Dosis Rofinosa dalam Pegencer Sitrat Kuning Telur Terhadap Motilitas, Persentase Hidup, dan Abnormalitas Spermatozoa Sapi Ongole. *Jurnal Ilmiah Peternakan Terpadu*. 4(4): 292-299.
- Rahmi, H. 2017. Review: Aktivitas Antioksidan dari Berbagai Sumber Buah-Buahan di Indonesia. *Jurnal Agrotek Indonesia*. 2(1): 34-38.

- Riska dan Ninik M., 2022. Pengaruh Asam Rosmarinik Pada Proses Penuaan. *Jurnal Biotek Medisiana Indonesia*. 11(1): 71-82.
- Salman, T., M., Olayaki L. A., Alagbonsi I. A., and Oyewopo A. O. 2016. Spermatotoxic Effects of Galactose and Possible Mechanisms of Action. *Middle East Fertility Society Journal*. 21: 82-90.
- Saraswati, A. 2015. Infertility. *Journal of Majority*. 4(5): 5-9.
- Sari, D. I. 2021. Uji Aktivitas Anti Aging Sediaan Krim Berbahan Aktif Kombinasi Ekstrak Lidah Buaya (*Aloe vera*) dan Alga Hijau (*Haemotococcus pluviialis*). *Skripsi*. Lampung: Fakultas Tarbiyah dan Keguruan Universitas Islam Negeri Raden Intan Lampung.
- Science Photo Library. 2022. Mouse Male Reproductive System Illustration Shwe . [Internet]. <https://www.sciencephoto.com>. Diakses pada 24 Januari 2023 pukul 23.52 WIB.
- Sgarbieri, V. C. and Pacheco M. T. B. 2017. Healthy Human Aging: Intristic and Environmental Factors. *Brazilian Journal of Food Technology*. 20: 1-20.
- Shwe, T., Prachayasakul W., Chattipakorn N., and Chattipakorn S. C. 2018. Role of D-Galactose Induced Brain Aging and Its Potential Used for Therapeutic Interventions. *Journal of Experimental Gerontology*. 101: 13-36.
- Situmorang, N. 2021. Pengaruh Pemberian D-Galaktosa Terhadap Berat Badan Mencit Betina. *Majalah Ilmiah Methoda*. 11(2): 133-137.
- Sudarti, N. W., Dwi A. Y. dan Ni M. S. 2019. Penurunan Kualitas Sperma Tikus (*Rattus novergivus*) yang Diinjeksi Vitamin C Dosis Tinggi dalam Jangka Waktu Lama. *Jurnal Metamorfosa*. 6(1): 7-13.
- Sulistiyoningrum, E. 2017. D-Galactose Induced Animal Model of Male Reproductive Aging. *Indonesia Journal of Medicine and Health*. 8(1): 19-27.

- Sutyarso, Busman H., Kanedi M., and Muhartono. 2016. Rhizome Extract of White Ginger (*Zingiber officinale* Roxb) Maintains Testicular Function of Aging Mice. *International Journal of Nutrition and Food Science*. 5(3): 175-178.
- Swastika, A., Mufrod, dan Purwanto. 2013. Aktivitas Antioksidan Krim Ekstrak Sari Tomat (*Solanum lycopersicum* L.). *Traditional Medicine Journal*. 18(3): 132-140.
- Vate, K. N. and Benjakul S. 2013. Antioxidative Activity of Melanin Free Ink from Splendid Squid (*Loligo formosana*). *International Aquatic Research*. 5(9): 1-12.
- Vincentius, A. dan Bare Y. 2022. Pemetaan Bioaktivitas Senyawa pada Kantong Tinta Cumi-cumi (*Loligo vulgaris*) Secara In Silico. *Jurnal Ilmiah Wahana Pendidikan*. 8(2): 9-16.
- Wagner, H., Cheng W. J., and Ko Y. E. 2018. Role of Reactive Oxygen Species in Male Infertility: an Updated Review of Literature. *Arab Journal of Urology*. 16(1): 35-43.
- World Health Organization. 2010. *WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen*. Fifth Edition. Geneva, Switzerland: World Health Organization.
- Wulandari, D.A. 2018. Peranan Cumi-Cumi Bagi Kesehatan. *Jurnal Oseana*. 43(3): 52-90.
- _____. 2018. Morfologi, Klasifikasi, dan Sebaran Cumi-Cumi Famili Lolingidae. *Oseana*. 43(2): 48-65.
- Zaharah, F. and Rabeta. 2018. Antioxidant and Antimicrobial Activities of Squid Ink Powder. *Journal of Food Research*. 2(1): 82-88.
- Zulaikhah, S. T. 2017. The Role of Antioxidant to Prevent Free Radicals in the Body. *Jurnal Sains Medika*. 8(1): 39-45.