

UJI EFEKTIVITAS PEMBERIAN EKSTRAK DAUN KERSEN (*Muntingia calabura* L.) TERHADAP SPERMATOZOA MENCIT (*Mus musculus* L.) SETELAH DIINDUKSI D-GALAKTOSA

(Skripsi)

Oleh

**LUCY ADI TAMA
2017061034**



**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
2024**

ABSTRACT

TESTING THE EFFECTIVENESS OF KERSEN LEAF (*Muntingia calabura* L.) ON MICE (*Mus musculus* L.) SPERMATOZOA AFTER D-GALACTOSE INDUCED

By

LUCY ADI TAMA

Free radicals can give the effect of reducing the quality of spermatozoa due to an increase in *Reactive Oxygen Species* (ROS) in sperm so that it can interfere with the process of spermatogenesis. D-Galactose is one of the triggers for increased ROS that cause oxidative stress. Oxidative stress control can be treated by herbal medicines such as kersen leaf. Kersen leaf has active compounds such as alkaloids, saponins, phenolics, flavonoids, ascorbic acid, and tannins which have good antioxidant activity to support spermatogenesis. This study aims to test the effectiveness of kersen leaf extract (*Muntingia calabura* L.) on mice spermatozoa (*Mus musculus* L.) after D-Galactose induced. This study began in September - November 2023 using a completely randomized design (CRD) which was divided into 5 treatment groups. Each treatment used 5 mice, namely control (K0), negative control (K-) induced D-Galactose 150 mg/kgBB, treatment 1 (P1) induced D-Galactose 150 mg/kgBB and kersen leaf extract 35 mg/kgBB, (P2) induced D-Galactose 150 mg/kgBB and kersen leaf extract 70 mg/kgBB, and (P3) induced D-Galactose 150 mg/kgBB and kersen leaf extract 105mg/kgBB for 35 days. After statistical analysis using Analysis of Variance (ANOVA) showed that the number, viability, motility, and morphology of spermatozoa increased after induced of kersen leaf extract at a dose of 105 mg/kgBB.

Key words: Kersen Leaf, Reactive Oxygen Species (ROS), Oxidative Stress.

ABSTRAK

UJI EFEKTIVITAS PEMBERIAN EKSTRAK DAUN KERSEN (*Muntingia calabura L.*) TERHADAP SPERMATOZOA MENCIT (*Mus musculus L.*) SETELAH DIINDUKSI D-GALAKTOSA

Oleh

LUCY ADI TAMA

Radikal bebas dapat memberikan efek penurunan kualitas spermatozoa akibat peningkatan *Reactive Oxygen Species* (ROS) pada sperma sehingga dapat mengganggu proses spermatogenesis. D-Galaktosa adalah salah satu pemicu meningkatnya ROS penyebab terjadinya stres oksidatif. Pengendalian stres oksidatif dapat menggunakan obat herbal seperti daun kersen. Daun kersen memiliki senyawa aktif berupa alkaloid, saponin, fenolik, flavonoid, asam askorbat, dan tanin yang memiliki aktivitas antioksidan yang baik untuk mendukung spermatogenesis. Penelitian ini bertujuan untuk menguji efektivitas ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura L.*) terhadap spermatozoa mencit (*Mus musculus L.*) setelah diinduksi D-Galaktosa. Pelaksanaan penelitian ini dimulai pada bulan September – November 2023 menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang terbagi dalam 5 kelompok perlakuan. Setiap perlakuan menggunakan 5 ekor mencit yaitu kontrol (K0), kontrol negatif (K-) diinduksi D-Galaktosa 150 mg/kgBB, perlakuan 1 (P1) diinduksi D-Galaktosa 150 mg/kgBB dan ekstrak daun kersen 35 mg/kgBB, (P2) diinduksi D-Galaktosa 150 mg/kgBB dan ekstrak daun kersen 70 mg/kgBB, dan (P3) diinduksi D-Galaktosa 150 mg/kgBB dan ekstrak daun kersen 105mg/kgBB selama 35 hari. Setelah dianalisis secara statistik menggunakan *Analysis of Variance* (ANOVA) menunjukkan bahwa jumlah, viabilitas, motilitas, dan morfologi spermatozoa normal meningkat setelah pemberian ekstrak daun kersen dengan dosis 105 mg/kgBB setelah diinduksi penuaan.

Kata Kunci: Daun kersen, *Reactive Oxygen Species* (ROS), Stres oksidatif

UJI EFEKTIVITAS PEMBERIAN EKSTRAK DAUN KERSEN (*Muntingia calabura* L.) TERHADAP SPERMATOZOA MENCIT (*Mus musculus* L.) SETELAH DIINDUKSI D-GALAKTOSA

Oleh

Lucy Adi Tama

Skripsi

Sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar

SARJANA SAINS

Pada

Jurusan Biologi

Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam

Universitas Lampung



**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
2024**

HALAMAN PENGESAHAN

Judul Skripsi

**: Uji Efektivitas Pemberian Ekstrak Daun Kersen
(*Muntingia calabura* L.) Terhadap Spermatozoa
Mencit (*Mus musculus* L.) Setelah Diinduksi
D-Galaktoza**

Nama Mahasiswa

: Lucy Adi Jama

NPM

: 2017061034

Program Studi

: S1 Biologi Terapan

Jurusan

: Biologi

Fakultas


: Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

MENYETUJUI

1. Komisi Pembimbing

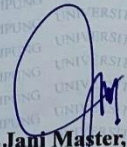
Pembimbing I

Pembimbing II


Prof. Dr. Hendri Busman, M.Biomed
NIP. 195901011987031001


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

2. Ketua Jurusan Biologi FMIPA


Dr. Jani Master, S.Si., M.Si.
NIP. 198301122008121001

MENGESAHKAN

1. **Tim Penguji**


Ketua

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



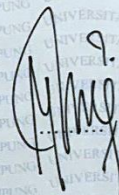
Sekretaris

: Prof. Dr. Sutyarso, M.Biomed.



Anggota

: Dr. Nuning Nurcahyani, M.Sc.



2. **Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam**



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

NIP. 197110012005011002

Tanggal Lulus Ujian Skripsi: 03 Januari 2024

PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Lucy Adi Tama
Npm : 2017061034
Jurusan : Biologi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Perguruan Tinggi : Universitas Lampung

Menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa apa yang tertulis dalam skripsi saya adalah hasil karya sendiri yang saya susun sesuai dengan memperhatikan implikasi etik yang berlaku dan bukan hasil plagiat karya orang lain. Saya tidak keberatan apabila data penelitian saya digunakan untuk kepentingan publikasi, sepanjang nama saya disebutkan.

Demikian pernyataan ini dibuat, apabila kemudian hari terbukti pernyataan saya tidak benar, maka saya siap menerima sanksi akademik yang berlaku.

Bandarlampung, 08 Januari 2024

Yang Menyatakan,



Lucy Adi Tama

NPM. 2017061034

RIWAYAT HIDUP



Penulis merupakan anak ketiga dari tiga bersaudara yang lahir di Kalipapan, Lampung Utara pada tanggal 11 Mei 2001 dari pasangan Bapak Iskandar Zulkarnain dan Ibu Supriyanti. Pada tahun 2013 penulis berhasil menyelesaikan Pendidikan dasar di SDN 1 Cipadang. Kemudian pada tahun 2016 penulis lulus dari bangku sekolah menengah pertama di SMP Gotong Royong dan setelah itu melanjutkan pendidikannya di SMAN 1 Gedong Tataan dan lulus pada tahun 2019. Pada tahun 2020 penulis melanjutkan pendidikannya ke jenjang perguruan tinggi sebagai mahasiswa Program Studi S1 Biologi Terapan di jurusan Biologi FMIPA Universitas Lampung. Selama menjadi mahasiswa penulis aktif dalam kegiatan kemahasiswaan diantaranya pernah menjadi Ketua Himpunan Mahasiswa Biologi (HIMBIO) FMIPA Universitas Lampung periode 2022, anggota *Public Relations* di Unit Kegiatan Mahasiswa (UKM) *English Society* (ESo) Universitas Lampung pada tahun 2022, dan pernah menjadi Kepala Dinas Advokasi dan Kesejahteraan Mahasiswa (ADKESMA) di Badan Eksekutif Mahasiswa (BEM) FMIPA Universitas Lampung pada tahun 2023. Selain aktif dalam kegiatan kemahasiswaan, penulis juga pernah menjadi asisten praktikum pada mata kuliah Teknik Biologi Molekuler, Biokonservasi, Mikrobiologi Umum, Bioteknologi, Mikroteknik, dan juga pernah menjadi asisten Bahasa Inggris. Semasa kuliah, penulis turut serta terlibat dalam visitasi akreditasi internasional (ASIIN) Biologi FMIPA Universitas Lampung pada tahun 2022, dan pernah terlibat dalam Pengabdian Masyarakat Bersama dosen tentang **“Penyuluhan Pemberdayaan Limbah Cair Aren Untuk Pembuatan Nata de Legen di Desa Gebang, Pesawaran, Lampung.”** Penulis juga aktif dalam mengikuti perlombaan, diantaranya mendapatkan juara 2 dalam Pemilihan Mahasiswa Berprestasi

(PILMAPRES) FMIPA Unila pada tahun 2022, juara 2 dalam *Debate Championship* FMIPA Unila, juara 3 *acapella* musik dalam Dies Natalis FMIPA Unila ke-32, Finalis Duta Generasi Berencana (Duta GenRe) Universitas Lampung pada tahun 2022. Tak hanya itu pada tahun 2023 penulis mewakili Universitas Lampung dalam *Student Mobility Programme* di Universiti Malaya, Kuala Lumpur, Malaysia dan pernah mengikuti Program Kredensial Mikro Mahasiswa Indonesia (KMMI) *Basic Health Safety Environment (HSE) Course* di Universitas Ngudi Waluyo Bekerjasama dengan Ahli Kesehatan Kerja Indonesia Jawa Tengah pada tanggal 2 Agustus-15 Oktober 2021. Penulis juga pernah mengikuti kegiatan Magang Bersertifikat pada tanggal 4 Januari-12 Februari 2023 di PUI-PT Pusat Riset Molekul Hayati Universitas Airlangga Surabaya dengan judul “**Uji Potensi Bakteri *Bacillus aryabhatai* dan *Bacillus megaterium* Sebagai Penghasil *Crude Antimicrobial Compounds* dan Pelarut Fosfat**”. Penulis juga telah melaksanakan Kuliah Kerja Nyata (KKN) di Desa Cilimus, Kecamatan Teluk Pandan, Kabupaten Pesawaran pada tanggal 26 Juni-4 Agustus 2023. Dan pada tanggal 21 November 2023 penulis pernah menjadi *volunteer* dalam acara Festival Kebangsaan Merdeka Belajar, Penguat Akar Kebangsaan Universitas Lampung.

MOTTO

“Menjadi Orang yang Lebih Baik tanpa Menjatuhkan Orang Lain.”

“Allah Tidak Membebani Seseorang Melainkan Sesuai dengan Kesanggupannya.”

(QS Al Baqarah: 286)

“A Winner is a Dreamer Who Never Gives Up.”

(Nelson Mandela)

“Dream Believe and Make it Happen.”

(Agnieszka Mo)

PERSEMBAHAN

Bismillahirrahmannirrahim

*Dengan menyebut nama Allah SWT yang maha pengasih lagi
maha penyayang*

*Kupersembahkan hasil karyaku ini sebagai bakti dan
tanggung jawab ku kepada kedua orang tua ku,*

Bapak Iskandar Zulkarnain dan Ibu Supriyanti,

*Yang selalu memberikan cinta yang tak pernah henti dan
memberikan dukungan, nasihat, serta doa di setiap
langkahku. Kepada kakak-ku yang selalu memberikan doa
dan nasihat yang tiada tara.*

Almamater Tercinta

SANWACANA

Bismillahirrahmanirrahim, Alhamdulillah rabbil' alamin.

Puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT. atas segala nikmat dan karunianya sehingga penulis bisa menyusun dan menyelesaikan skripsi ini dengan baik. Sholawat beriring salam tak lupa juga selalu tercurah kepada Nabi Muhammad SAW. semoga kelak kita bisa mendapatkan syafaatnya di yaumul akhir. Skripsi dengan judul **"Uji Efektivitas Pemberian Ekstrak Daun Kersen (*Muntingia calabura L.*) Terhadap Spermatozoa Mencit (*Mus musculus L.*) Setelah Diinduksi D-Galaktosa"** dapat terselesaikan dengan baik dan tepat pada waktunya karena atas rahmat dan ridho-Nya. Skripsi ini menjadi saksi bisu sebagai hasil penulis selama mengenyam pendidikan di Jurusan Biologi FMIPA Universitas Lampung. Penulis menyadari dalam penulisan skripsi ini masih terdapat kesalahan dan kekurangan, dan tidak terlepas pula dari dukungan, motivasi, kritik, saran dan masukan dari berbagai pihak. Dalam hal ini penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada:

1. Kedua orang tua penulis, Bapak Iskandar Zulkarnain dan Ibu Supriyanti yang selalu memberikan doa, dukungan baik secara moril maupun material serta nasihat yang tak ada henti kepada penulis;
2. Kepada kakak-kakak penulis, keponakan, serta keluarga besar yang telah memberikan dukungan, nasihat, doa serta motivasi kepada penulis;
3. Bapak Prof. Dr. Hendri Busman, M.Biomed., selaku dosen pembimbing I yang selalu memberikan arahan dan motivasi, serta bimbingan kepada penulis;
4. Bapak Prof. Dr. Sutyarso, M.Biomed., selaku dosen pembimbing II yang telah memberikan ilmu-Nya serta membimbing penulis;

5. Ibu Dr. Nuning Nurcahyani M.Sc., selaku dosen pembimbing akademik dan pembahas yang tidak hentinya memberi nasihat, doa serta motivasi kepada penulis;
6. Bapak Dr. Eng. Heri Satria, S.Si., M.Si. selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung;
7. Bapak Dr. Jani Master, S.Si., M.Si. selaku Ketua Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung;
8. Ibu Gina Dania Pratami, S.Si., M.Si. selaku Ketua Program Studi S1 Biologi Terapan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung;
9. Kepada rekan sejawat penulis, Khofifatuz, Rizka, Berti, Evita, dan Lilis yang membantu penulis dalam menyelesaikan penelitian ini;
10. Kepada Kak Cibul, Kak Dewi, Kak Mala, Kak Yosi, Kak Rachmat, Dwiki, dan Yusuf yang membantu penulis dalam menyelesaikan penelitian ini;
11. Teman-teman dekat penulis, Angel, Awan, Dina, Nismala, Riza, dan Reni yang selalu menjadi teman yang berkesan untuk penulis;
12. Kepada rekan-rekan HIMBIO dan teman-teman Biologi Angkatan 2020 yang telah memberikan kebersamaan selama penulis kuliah di Jurusan Biologi.

Akhir kata, terima kasih kepada seluruh pihak yang sudah membantu penulis dalam menyusun skripsi ini. Penulis menyadari masih terdapat kesalahan dan kekurangan dalam menulis skripsi ini, sehingga kritik, saran dan masukan sangat penulis butuhkan. Semoga dengan dibuatnya skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi orang yang membaca.

Bandarlampung, 20 Agustus 2023
Penulis,

Lucy Adi Tama

DAFTAR ISI

ABSTRACT	i
ABSTRAK	i
HALAMAN PENGESAHAN	iii
RIWAYAT HIDUP	ivi
MOTTO	viii
PERSEMBAHAN	ix
SANWACANA	x
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR TABEL	xvii
DAFTAR GAMBAR	xv
PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Tujuan Penelitian.....	4
1.3. Kerangka Pemikiran	5
1.4. Hipotesis	6
II. TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1. Proses Penuaan.....	7
2.2. Stres Oksidatif.....	8
2.3. D-Galaktosa	9
2.4. Mencit (<i>Mus musculus</i> L.).....	11
2.4.1. Klasifikasi Mencit (<i>Mus musculus</i> L.).....	12
2.4.2. Testis	13
2.4.3. Epididimis	13
2.4.4. Tubulus Seminiferus.....	15
2.4.5. Sel Sertoli.....	16
2.4.6. Sel Leydig	17

2.4.7.	Spermatogenesis	18
2.4.8.	Spermatozoa	19
2.5.	Daun Kersen (<i>Muntingia calabura</i> L.)	23
2.5.1.	Klasifikasi Kersen (<i>Muntingia calabura</i> L.)	24
2.5.2.	Aktivitas Farmakologi	24
III.	METODE PENELITIAN	27
3.1.	Waktu dan Tempat	27
3.2.	Alat dan Bahan	27
3.3.	Definisi Operasional	28
3.4.	Variabel Penelitian	29
3.5.	Rancangan Penelitian	29
3.6.	Alur Penelitian	31
3.6.1.	Tahap Persiapan	31
3.6.2.	Pembuatan Ekstrak Daun Kersen (<i>Muntingia calabura</i> L.)	31
3.6.3.	Induksi D-Galaktosa	32
3.6.4.	Induksi Ekstrak Daun Kersen	33
3.6.5.	Pengamatan Jumlah, Viabilitas, Motilitas, dan Morfologi Spermatozoa	33
3.6.6.	Analisis Data	36
3.6.7.	Diagram Alir Penelitian	38
IV.	HASIL DAN PEMBAHASAN	Error! Bookmark not defined.
4.1.	Hasil	Error! Bookmark not defined.
4.1.1.	Pengamatan Rata-Rata Jumlah Spermatozoa Mencit (<i>Mus musculus</i> L.)	39
4.1.2.	Pengamatan Rata-Rata Viabilitas Spermatozoa Mencit (<i>Mus musculus</i> L.)	40
4.1.3.	Pengamatan Rata-Rata Motilitas Spermatozoa Mencit (<i>Mus musculus</i> L.)	42
4.1.4.	Pengamatan Rata-Rata Morfologi Spermatozoa Mencit (<i>Mus musculus</i> L.)	43
4.2.	Pembahasan	45
4.2.1.	Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Kersen Terhadap Jumlah Spermatozoa	46
4.2.2.	Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Kersen Terhadap Viabilitas Spermatozoa	49
4.2.3.	Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Kersen Terhadap Motilitas Spermatozoa	52
4.2.4.	Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Kersen Terhadap Morfologi	

Spermatozoa.....	55
V. SIMPULAN DAN SARAN.....	59
5.1. Simpulan.....	59
5.2. Saran.....	60
DAFTAR PUSTAKA.....	61
LAMPIRAN.....	73

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Kelompok Perlakuan	30
Tabel 2. Data Rata-Rata Jumlah Spermatozoa Mencit Setelah Diinduksi D-Galaktosa dan Ekstrak Daun Kersen	39
Tabel 3. Data Rata-Rata Viabilitas Spermatozoa Mencit Setelah Diinduksi D-Galaktosa dan Ekstrak Daun Kersen	41
Tabel 4. Data Rata-Rata Motilitas Spermatozoa Mencit Setelah Diinduksi D-Galaktosa dan Ekstrak Daun Kersen	42
Tabel 5. Data Rata-Rata Morfologi Spermatozoa Mencit Setelah Diinduksi D-Galaktosa dan Ekstrak Daun Kersen	44

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Mekanisme faktor penyebab penuaan	8
2. Morfologi mencit (<i>Mus musculus</i> L.).....	12
3. Bagian-bagian epididimis.....	14
4. Tubulus seminiferus mencit (<i>Mus musculus</i> L.)	16
5. Pembelahan spermatogenesis.....	19
6. Bagian-bagian spermatozoa.....	19
7. Macam-macam morfologi spermatozoa abnormal.....	23
8. Daun kersen (<i>Muntingia calabura</i>).....	24
9. Morfologi spermatozoa mencit	45

I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Penuaan dini menjadi fenomena yang saat ini banyak dijumpai pada seseorang yang mengalami penuaan sebelum pada waktunya dan dapat menimbulkan masalah yang erat kaitannya dengan penyakit degeneratif. Secara alami, gejala penuaan akan muncul saat usia mendekati dekade keempat dan akan meningkat prosesnya seiring bertambahnya usia. Proses penuaan dapat menghilangkan kemampuan jaringan tubuh untuk memperbaiki dan mempertahankan struktur fungsionalnya. Selama proses penuaan, organ tubuh akan mengalami perubahan fungsional yang menyebabkan menurunnya efek fisiologis sistem organ dan berakibat menurunnya kualitas hidup seseorang (Situmorang & Zulham, 2020). Usia merupakan salah satu faktor yang dapat menurunkan kinerja dan fungsi organ. Pria memiliki mobilitas yang cukup tinggi dalam melakukan aktivitas sehari-hari. Kondisi lingkungan yang tidak bersih, polusi lingkungan yang tinggi, serta gaya hidup yang tidak sehat juga memicu proses penuaan dini yang dapat memengaruhi kesuburan pada pria seperti infertilitas (Rahmadiani, 2021).

Penuaan dini dapat disebabkan oleh beberapa faktor, diantaranya adalah radikal bebas. Radikal bebas adalah senyawa yang reaktif dan tidak stabil karena memiliki satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan pada orbit

terluar. Semakin tinggi senyawa radikal bebas yang masuk ke dalam tubuh maka semakin besar tingkat stres oksidatif yang dialami tubuh. Radikal bebas dapat menyebabkan kerusakan pada DNA sperma dengan merusak basa purin dan pirimidin yang menyebabkan apoptosis sel spermatozoa yang dapat memberikan efek penurunan kualitas spermatozoa oleh peningkatan *Reactive Oxygen Species* (ROS) pada sperma sehingga dapat mengganggu proses spermatogenesis (Awuy *et al.*, 2021). Apoptosis pada proses spermatozoa yang disebabkan adanya senyawa radikal bebas akibat meningkatnya jumlah ROS menjadi dasar kerusakan pada tubulus seminiferus (Dewanto *et al.*, 2017). Senyawa oksigen reaktif dihasilkan pada proses metabolisme oksidasi seperti mengoksidasi makanan menjadi sumber energi. Secara biologis, ROS yang paling berpengaruh pada sistem reproduksi yaitu *superoxide anion* ($O_2^{\cdot-}$), *hydroxyl radicals* (OH^{\cdot}), *peroxyl radicals* (RO_2^{\cdot}) dan *hydrogen peroxide* (H_2O_2).

Stres oksidatif yang ditimbulkan oleh radikal bebas dapat menyebabkan disfungsi hipofisis sehingga kadar serum testosteron menurun dan penekanan *gonadotropin releasing hormone* (GnRH) yang dapat menurunkan sekresi *lutening hormone* (LH) dan *follicle stimulating hormone* (FSH) (Ahangarpour *et al.*, 2014). Keadaan di atas dapat memengaruhi penurunan sel-sel spermatogenik dan diameter tubulus seminiferus testis yang merupakan tempat terjadinya spermatogenesis (Atang & Palupi, 2020). Stres oksidatif dapat menjadi faktor kerusakan membran plasma dan menyebabkan morfologi spermatozoa tidak normal karena adanya induksi peroksidasi lipid. Selain menginduksi peroksidasi lipid, stres oksidatif juga dapat menginduksi terjadinya kerusakan DNA dan mempercepat apoptosis sel epitel germinal dan berdampak pada menurunnya jumlah sel spermatogenik (Widhiantara & Permatasari, 2017). Peroksidasi lipid dapat memicu pembentukan dan meningkatkan sifat Malondialdehid (MDA) sebagai indikator stres oksidatif.

Spermatogenesis merupakan proses pembentukan spermatozoa dari spermatogonium yang terjadi pada tubulus seminiferus testis. Tubulus seminiferus dilapisi oleh sel Sertoli dan Spermatogonia yang berfungsi untuk memberikan nutrisi bagi sperma yang belum matang dan penghasil hormon *Androgen Binding Protein* (ABP) (Malini *et al.*, 2013). Testis merupakan tempat berlangsungnya spermatogenesis yang memiliki sifat rentan terhadap oksidasi dan radikal bebas yang dapat menyebabkan gangguan pada spermatogenesis dan membran spermatozoa. Membran sel spermatogenik tersusun atas asam lemak tak jenuh yang dapat mengakibatkan peroksidasi lipid, meningkatnya fluiditas membran, serta inaktivasi ikatan membran dengan enzim dan reseptor karena adanya radikal bebas dan stres oksidatif yang masuk. Kondisi tersebut dapat mengakibatkan peningkatan kerusakan sel spermatozoa, menurunnya ATP intraseluler, menurunnya viabilitas spermatozoa, serta menyebabkan morfologi sperma menjadi rusak dan kehilangan kemampuan kapasitasasi dan reaksi dari akrosom spermatozoa (Sukmaningsih *et al.*, 2009).

Model *Growth Hormone replacement therapy* menjadi pilihan terapi dalam *anti-aging medicine* (AAM) karena dapat menstimulasi pertumbuhan jaringan dan perbaikan fungsi testis. Terapi hormon secara sintesis dapat menimbulkan efek samping seperti meningkatkan risiko tromboemboli vena, paru emboli, penyakit jantung dan juga stroke (Miladiyah, 2003). Satu di antara terapi AAM dapat menggunakan obat herbal yang berasal dari tumbuhan yang memiliki senyawa antioksidan untuk menangkal radikal bebas adalah daun kersen (Puspitasari & Wulandari, 2017). Senyawa aktif yang dimiliki oleh daun kersen adalah alkaloid, saponin, fenolik, flavonoid, dan tannin. Di antara senyawa aktif tersebut, yang memiliki aktivitas antioksidan adalah alkaloid, fenolik dan flavonoid. Senyawa antioksidan dapat menurunkan senyawa radikal yang ada di dalam tubuh sehingga aktivitas metabolisme di dalam tubuh dapat bekerja secara normal.

Penelitian yang dilakukan Badami (2017), menunjukkan hasil bahwa pemberian ekstrak daun kersen memberikan efek protektif terhadap skor spermatogenesis mencit jantan yang diinduksi D-galaktosa. Penggunaan D-Galaktosa pada penelitian ini dikarenakan D-Galaktosa mampu memicu terjadinya penuaan pada sistem organ secara menyeluruh dan menyerupai peristiwa penuaan secara alamiah. Pemberian D-Galaktosa pada hewan model dapat meningkatkan produksi ROS dan *advanced glycation endproduct* sehingga memicu terjadinya stres oksidatif (Situmorang, 2021). Lama induksi D-Galaktosa dan terapi ekstrak daun kersen adalah 35 hari yang merupakan siklus spermatogenesis pada mencit jantan. Oleh karena itu penelitian ini dilakukan untuk mengetahui efektivitas pemberian ekstrak daun kersen terhadap spermatogenesis mencit jantan yang diinduksi D-galaktosa dengan lapang pandang yang lebih variatif.

1.2. Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Untuk mengetahui efektivitas pemberian ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura* L.) terhadap jumlah spermatozoa mencit (*Mus musculus* L.) setelah diinduksi D-galaktosa.
2. Untuk mengetahui efektivitas pemberian ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura* L.) terhadap viabilitas spermatozoa mencit (*Mus musculus* L.) setelah diinduksi D-galaktosa.
3. Untuk mengetahui efektivitas pemberian ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura* L.) terhadap motilitas spermatozoa mencit (*Mus musculus* L.) setelah diinduksi D-galaktosa.
4. Untuk mengetahui efektivitas pemberian ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura* L.) terhadap morfologi spermatozoa mencit (*Mus musculus* L.) setelah diinduksi D-galaktosa.

1.3. Kerangka Pemikiran

Penuaan dini merupakan kondisi dimana seseorang mengalami penuaan sebelum pada waktunya dan menimbulkan masalah erat kaitannya dengan penyakit degeneratif. Proses penuaan dapat menghilangkan kemampuan jaringan untuk memperbaiki dan mempertahankan struktur fungsionalnya sehingga organ tubuh akan mengalami perubahan fungsional serta akan menyebabkan menurunnya efek fisiologis sistem organ yang berakibat menurunnya kualitas hidup seseorang (Situmorang & Zulham, 2020).

Salah satu faktor penyebab terjadinya penuaan dini adalah radikal bebas. Radikal bebas dapat memacu peningkatan ROS dan menyebabkan apoptosis sel spermatozoa yang berakibat pada penurunan kualitas spermatozoa. Akumulasi radikal bebas yang masuk ke dalam tubuh dapat menyebabkan stres oksidatif. Stres oksidatif dapat menyebabkan kerusakan sel-sel spermatozoa, deformitas, serta infertilitas pada organ reproduksi pria (Agarwal & Prabakaran, 2005). Keadaan tersebut dapat menimbulkan masalah baru pada kesuburan pria sehingga perlu dilakukan uji untuk mengatasi masalah ini.

Tanaman herbal diketahui memberikan kontribusi terhadap dunia kesehatan baik secara individu maupun kolektif. Satu di antara upaya untuk meningkatkan kualitas sel-sel spermatozoa dan memperbaiki jaringan yang rusak pada spermatogenesis mencit jantan yang diinduksi D-Galaktosa adalah dengan pemberian ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura*). Ekstrak daun kersen dilaporkan mengandung senyawa aktif penting seperti alkaloid, fenolik serta flavonoid yang memiliki aktivitas antioksidan yang baik. Di dalam tubuh secara alamiah terdapat mekanisme antioksidan atau anti radikal bebas. Namun antioksidan endogen dirasa kurang mampu dalam menangkal radikal bebas yang masuk ke dalam tubuh. Sehingga diperlukan antioksidan eksogen yang bisa didapat dari bahan alam seperti daun kersen.

Dari deskripsi di atas, pada penelitian ini akan dilakukan pengujian pada 25 ekor mencit jantan yang diaklimatisasi selama satu minggu yang dibagi ke dalam lima kelompok perlakuan dengan lima kali ulangan. Perlakuan dibagi ke dalam kontrol nol yang tidak mendapatkan perlakuan induksi penuaan maupun pengobatan. Kontrol negatif yang diinduksi penuaan namun tidak diinduksi pengobatan. Serta tiga perlakuan dengan diinduksi penuaan dan pengobatan dengan ekstrak daun kersen dengan dosis yang telah ditentukan. Setelah setiap kelompok mendapat perlakuan, dilakukan pengamatan dengan melihat parameter jumlah, viabilitas, motilitas, serta morfologi spermatozoa mencit (*Mus musculus* L.).

1.4. Hipotesis

Hipotesis dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura* L.) dapat meningkatkan jumlah spermatozoa mencit (*Mus musculus* L.) setelah diinduksi D-Galaktosa.
2. Ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura* L.) dapat meningkatkan viabilitas spermatozoa mencit (*Mus musculus* L.) setelah diinduksi D-Galaktosa.
3. Ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura* L.) dapat meningkatkan motilitas spermatozoa mencit (*Mus musculus* L.) setelah diinduksi D-Galaktosa.
4. Ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura* L.) dapat meningkatkan normalitas morfologi spermatozoa mencit (*Mus musculus* L.) setelah diinduksi D-Galaktosa.

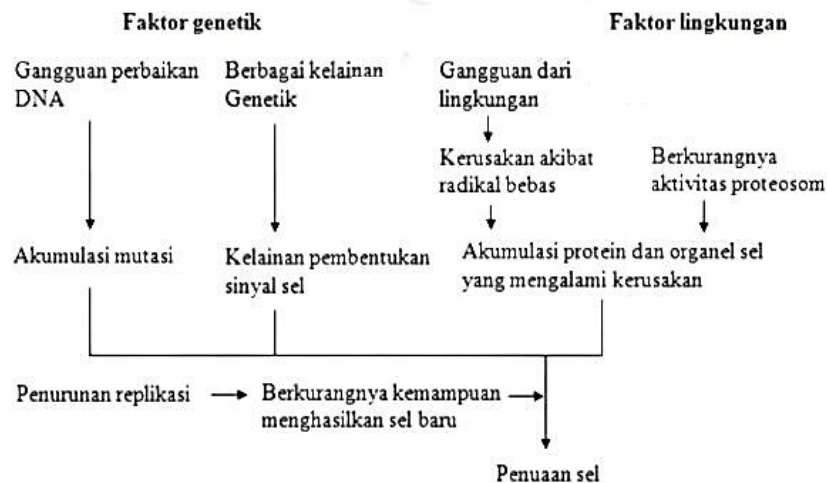
II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Proses Penuaan

Penuaan merupakan proses alamiah yang dialami oleh setiap makhluk hidup dan menjadi bagian dari proses kehidupan. Penuaan adalah masalah ontogenik yang diartikan suatu proses tumbuh tua dan gabungan dari seluruh perubahan fisiologis, genetik, molekul yang terjadi selama proses kehidupan.

Penuaan ditandai dengan menurunnya kemampuan tubuh untuk merespon stres, meningkatnya tidak seimbangnya homeostatis dan timbulnya suatu penyakit yang diakhiri dengan suatu kematian (Yusharyahya, 2021). Teori tentang penuaan dikelompokkan menjadi teori penuaan terprogram dan teori penuaan eror.

Proses penuaan disebabkan oleh berbagai faktor intrinsik maupun faktor ekstrinsik. Faktor intrinsik terjadi secara alamiah yang dialami oleh makhluk hidup seperti genetik, metabolisme sel, dan hormonal. Sementara itu, faktor ekstrinsik penuaan meliputi paparan radiasi sinar ultraviolet, *infrared*, polusi udara serta faktor lingkungan lain yang bersifat karsinogen. Jika hal ini terus dialami oleh suatu makhluk hidup, maka zat tersebut secara akumulatif dapat mengubah struktur dan fungsi organ. Faktor genetik seperti gangguan perbaikan DNA secara terus menerus akan menyebabkan terjadinya mutasi dan menyebabkan terjadinya kelainan pembentukan sinyal sel. Mutasi yang terus menerus dapat memicu menurunnya kemampuan sistem imun tubuh untuk mengenali dirinya sendiri. Mekanisme penuaan disajikan pada **Gambar 1**.



Gambar 1. Mekanisme faktor penyebab penuaan (Kumar *et al.*, 2011).

2.2. Stres Oksidatif

Stres oksidatif merupakan kondisi ketidakseimbangan antara produksi reaktif oksigen spesies (ROS) dan kemampuan mekanisme pelindung alami di dalam tubuh (antioksidan) untuk menghilangkan suatu zat reaktif dan memperbaiki sel yang rusak untuk mencegah terjadinya efek yang merugikan. Merujuk pada pernyataan Halliwell (2007) bahwa stres oksidatif dapat menjadi pemicu kerusakan sel dan merupakan dasar patogenesis penyakit kronik seperti kardiovaskuler, autoimun, pulmoner, gangguan metabolisme dan penuaan. Stres oksidatif dapat diukur dengan melihat tingkat kerusakan oksidatif pada lipid, protein, serta DNA yang diukur dengan biomarker spesifik (Rudzinska, 2008).

Peningkatan reaktif oksigen spesies (ROS) dapat merangsang terjadinya kerusakan suatu jaringan dengan mengaktifkan sejumlah jalur persinyalan seluler (Niki, 2012). Dalam kondisi normal ROS dibutuhkan oleh tubuh dalam proses perkembangan fungsi sel ketika setiap molekul kembali setelah mengalami oksidasi pada keadaan tereduksi (Agarwal *et al.*, 2012). Reaktif oksigen spesies sangat reaktif dan tidak stabil karena memiliki satu

atau lebih elektron yang tidak berpasangan pada orbit terluar. Untuk menjadi stabil, spesies radikal bebas harus mendapat elektron dari asam nukleat, lipid, protein, karbohidrat atau molekul terdekat yang menginduksi reaksi berantai penyebab kerusakan sel dan penyebab penyakit (Van *et al.*, 2002).

Pada sistem reproduksi pria, stres oksidatif dapat mengakibatkan gangguan dalam fungsi spermatozoa karena adanya peningkatan kerusakan pada DNA spermatozoa yang menyebabkan terjadinya apoptosis sel (Putri, 2015). Stres oksidatif menjadi faktor utama dalam etiologi dan infertilitas pria. Akumulasi *Reactive Oxygen Species* dapat merangsang peroksidasi lipid dan fragmentasi DNA yang dapat mengganggu motilitas sperma (Aitken *et al.*, 2008). Kerusakan DNA ditandai dengan putusannya rantai kimia atau adanya modifikasi susunan basa atau gula deoksiribosa yang menyebabkan siklus sel terhenti. Akibat adanya peroksidasi lipid oleh ROS dapat merangsang terbentuknya Malondialdehid (MDA) yang digunakan sebagai suatu indikator keberadaan radikal bebas di dalam tubuh serta kerusakan oksidatif membran sel. Keberadaan MDA ini dapat membentuk adisi dengan DNA, RNA dan protein yang mengganggu proses biosintesis protein (Aprini *et al.*, 2019).

2.3. D-Galaktosa

D-Galaktosa merupakan suatu aldohexose yang secara alami terdapat di dalam tubuh manusia. Menurut Coelho *et al.* (2015) D-Galaktosa tergolong ke dalam gula pereduksi yang dapat ditemukan di berbagai jenis makanan seperti madu, bit, keju, yoghurt, mentega, susu, keju, buah kiwi, dan seledri. Mengonsumsi makanan yang mengandung D-Galaktosa dapat menyebabkan gula mencapai lumen usus dan diangkut ke dalam sel oleh *sodium-dependent glucose transporters* tipe 1 (SGLT-1) memasuki aliran darah dan keluar sel dengan bantuan *glucose transport* tipe 2

(GLUT-2). Penggunaan D-Galaktosa sebagai model penuaan pada mencit karena dapat memicu terjadinya penuaan pada sistem organ secara menyeluruh dan menyerupai peristiwa penuaan secara alamiah (Ji *et al.*, 2017). Lee *et al.* (2020) menyatakan bahwa penggunaan D-Galaktosa pada mencit dapat menyebabkan aspek penuaan otak, defisit memori, degenerasi neuronal dan apoptosis, memicu terjadinya stres oksidatif penurunan produksi ATP, dan menyebabkan gangguan pada struktur mitokondria. Akumulasi D-Galaktosa yang berlebih dapat menyebabkan berbagai macam penyakit (Coelho *et al.*, 2015). Di dalam darah, ambang normal D-Galaktosa kurang dari 10 mg/dL dan jika melebihi ambang normal maka dapat memicu terjadinya stres oksidatif. Pada kadar yang tinggi D-Galaktosa dapat teroksidasi menjadi H_2O_2 dan menghasilkan aldehida. Akumulasi H_2O_2 dan aldehida dapat menyebabkan terjadinya disfungsi mitokondria karena adanya kerusakan intraseluler. Dosis harian maksimal yang diperbolehkan untuk orang dewasa sehat adalah 50 g galaktosa dan Sebagian besar nantinya akan dikeluarkan dari dalam tubuh setelah 8 jam dikonsumsi (Morava, 2014). Menurut Sulistyoningrum (2017), bahwa dosis yang tepat untuk menurunkan parameter sperma adalah 100-200 mg/kgBB.

Senyawa ini telah banyak digunakan sebagai model pada proses penuaan karena senyawa ini mampu mengintrestasikan proses penuaan yang hampir sama dengan proses penuaan secara biologis. D-Galaktosa bekerja dengan cara glikasi nonenzimatik dan produksi *advanced glycation end products* (AGEs). Glikasi dapat mengubah struktur dan fungsi DNA serta mtDNA. Efek dari pembentukan AGEs mampu menghasilkan ROS penyebab terjadinya disfungsi jaringan dan organ. D-Galaktosa juga menstimulasi produk senyawa radikal bebas dan mengganggu proses metabolisme karbohidrat yang dapat berakibat tubuh mengalami stres oksidatif dan terjadinya penuaan pada sistem organ secara menyeluruh dan menyerupai peristiwa penuaan secara alamiah mengakibatkan kerusakan oksidasi berlebih yang mempercepat terjadinya proses penuaan

(Badibostan *et al.*, 2019). Pemberian D-Galaktosa secara terus menerus dapat meningkatkan kadar galaktosa di dalam tubuh yang selanjutnya diubah menjadi galaktitol oleh aldose reduktase. Akumulasi galaktitol di dalam sel mengakibatkan perubahan tekanan osmotik, pembengkakan sel, disfungsi sel, dan penuaan. Hal itu terjadi karena galaktitol tidak dapat dimetabolisme oleh tubuh (Ye *et al.*, 2014).

2.4. Mencit (*Mus musculus* L.)

Mencit merupakan salah satu kelompok mamalia yang berkembang biak dengan cepat, mudah untuk dipelihara, siklus hidupnya pendek, karakteristik reproduksi, struktur anatomi, fisiologis serta genetiknya yang hampir sama dengan manusia. Oleh karena itu, mencit menjadi pilihan sebagai hewan model praktikum maupun penelitian di laboratorium (Mutiarahmi *et al.*, 2021).

Mencit umumnya dapat bertahan pada suhu 18-26°C, karena apabila suhu lingkungan lebih tinggi dapat menyebabkan mencit mengalami stres dan dehidrasi yang dapat memengaruhi hasil uji yang dilakukan (Garber *et al.*, 2010). Mencit tergolong hewan *nocturnal* yang lebih banyak melakukan aktivitas di malam hari.

Menurut Smith (1988), mencit yang dapat dijadikan sebagai hewan uji coba penelitian adalah mencit yang sehat, berusia 1-3 bulan dan memiliki berat badan 20-40 g. ciri-ciri mencit yang sehat yaitu memiliki bulu putih bersih dan tidak berdiri, mata jernih, serta aktif yang dapat dilihat pada

Gambar 2.



Gambar 2. Morfologi mencit (*Mus musculus* L.) (Yusuf *et al.*, 2022)

2.4.1. **Klasifikasi Mencit (*Mus musculus* L.)**

Menurut Kohn dan Clifford (2002), mencit diklasifikasikan sebagai berikut:

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

2.4.2. Testis

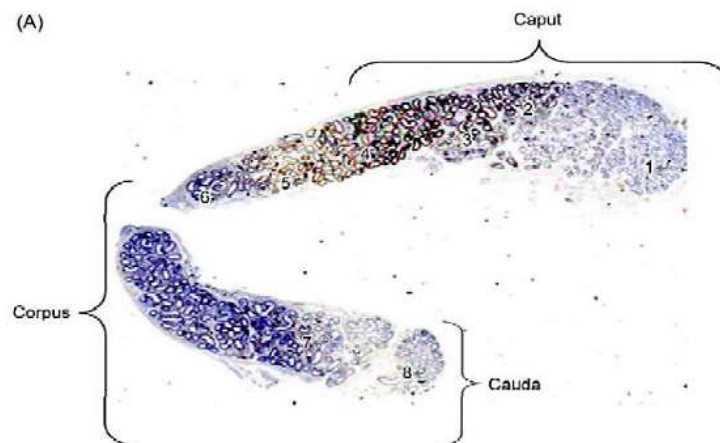
Testis merupakan salah satu organ genital pada pria yang berjumlah sepasang yang dibungkus skrotum dengan ukuran rata-rata 4 x 3 x 2,5 cm dengan berat \pm 32 gram. Dibandingkan dengan manusia, testis mencit hanya memiliki panjang sekitar 0,8 cm dan diameter 0,4-0,6 cm dan berat rata-rata yaitu 0,05-0,15 gram. Testis berfungsi sebagai organ yang memproduksi sperma dan mensintesis hormon androgen, testosteron dan dihidrotestosteron yang diselubung oleh *tunica albuginea* yang tebal berasal dari serat padat untuk melindungi testikel. Selubung *tunica albuginea* membentuk septum hingga masuk ke parenkim testis dan membaginya menjadi beberapa lobus yang terdiri dari kumpulan tubulus seminiferus. Sperma dialirkan dari tubulus seminiferus menuju saluran epididimis yang berakhir di dalam vas deferens sebelum menuju korpus kelenjar prostat (Basiru *et al.*, 2022).

2.4.3. Epididimis

Pada mamalia, spermatozoa akan mengalami diferensiasi saat sperma meninggalkan testis dan menuju epididimis (Moore, 1998). Epididimis merupakan tempat transportasi, pematangan, dan penyimpanan spermatozoa karena epididimis merupakan komponen traktus pada reproduksi pria dengan tingkat spesiasi yang tinggi. Sebagai tempat sekresi dan absorpsi, epitel epididimis menyediakan lingkungan yang potensial untuk pematangan spermatozoa. Merujuk pada pernyataan Jones (2004), epididimis pada mamalia memiliki dua fungsi utama yaitu:

1. Menyediakan lingkungan mikro yang unik di dalam lumen duktus yang berperan dalam membantu spermatozoa yang belum matang menjadi sel sperma yang fertil.
2. Menyimpan spermatozoa yang sudah fertil dan potensial di dalam kauda epididimis hingga spermatozoa diejakulasikan.

Spermatozoa yang berasal dari testis masih bersifat non-motil dan belum dapat melakukan fertilisasi sel telur secara *in vivo*. Di dalam epididimis, spermatozoa tersebut akan mengalami pematangan sempurna dan terjadi perubahan-perubahan selama proses pematangan yang disebabkan karena adanya perubahan konsentrasi ion luminal dan protein-protein yang disekresikan oleh epitelium epididimis ke dalam lumen (Cooper & Yeung, 2003). Menurut Cornwall (2009) epididimis dibagi menjadi tiga bagian yaitu caput, cauda dan corpus yang disajikan pada **Gambar 3**.



Gambar 3. Bagian-bagian epididimis (Li *et al.*, 2008).

2.4.4. Tubulus Seminiferus

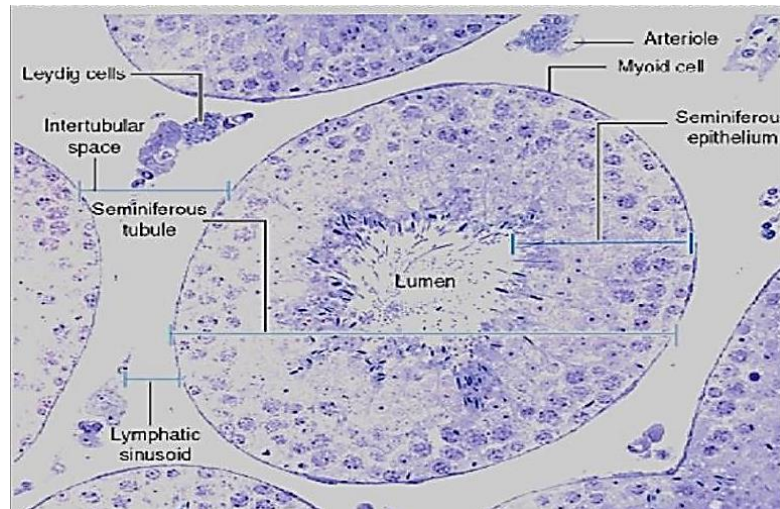
Spermatogenesis merupakan proses pembentukan sperma yang terjadi di dalam tubulus seminiferus yang dikelilingi lapisan dalam berupa sel Sertoli dan tersusun oleh jaringan ikat dan jaringan polos pada lapisan luar (Rizzo, 2010).

Tubulus seminiferus memiliki Panjang 30-70 cm dan berdiameter 150-250 μm yang dilapisi oleh epitel berlapis majemuk. Tubulus seminiferus berbentuk U yang kedua ujungnya mengalami anastomosis antar pembuluh lain pada rete testis yang merupakan tempat bermuara sperma, protein dan ion dari epitel seminiferus.

Tubulus seminiferus mempunyai lumen tunggal yang berada di tengah dan tersusun atas lapisan epitel seminiferus. Epitel seminiferus terdiri dari dua sel yaitu sel Sertoli yang terletak pada membran basal dan sel spermatogenik yang terdiri dari spermatogonia, spermatosit, dan spermatid. Sel Sertoli bertindak dalam menyokong dan menjaga perkembangan sel spermatogenik. Ketebalan epitel tubulus seminiferus sangat berpengaruh dalam menghasilkan sperma. Epitel tubulus seminiferus yang tebal menandakan jika sel-sel Sertoli dan sel spermatogenik dalam keadaan baik sehingga mampu menjalankan proses spermatogenesis dengan maksimal (Golalipour, 2011).

Tubulus seminiferus berisi sel-sel berlapis kompleks yang tersusun dari unsur-unsur berikut yang dapat dilihat pada **Gambar 4**.

1. Tunika fibrosa yang mencakup beberapa lapisan fibrosa.
2. Lamina Basalis yang berperan sebagai *immature* sel spermatogonium.
3. Epitel germinativum yang terdiri dari sel spermatogenik dan sel penyokong (sel Sertoli).



Gambar 4. Tubulus seminiferus mencit Jantan (*Mus musculus L.*)
(Tortora & Derrickson, 2014).

2.4.5. Sel Sertoli

Sel Sertoli adalah sel yang memiliki bentuk seperti piramida, bagian dasarnya melekat pada lapisan lamina basalis dan bagian ujungnya melekat pada lumen tubulus seminiferus dan menjadi salah satu sel penyusun tubulus seminiferus serta memberikan nutrisi bagi sperma yang belum matang (Hayati, 2011). Sel Sertoli berperan penting dalam produksi sperma dan menghasilkan *Androgen Binding Protein (ABP)*, inhibin B dan Aktivin. ABP berfungsi untuk mengikat testosteron, yang menyebabkan kadar testosteron pada tubulus seminiferus 100 kali lebih besar dari konsentrasi darah (Sherwood, 2012). Inhibin B berfungsi untuk mengontrol sekresi FSH yang dilepas oleh hipofisis anterior melalui hormon pelepasan gonadotropin dan hipotalamus yang diatur oleh mekanisme umpan balik negatif. Tak hanya itu, inhibin B juga berfungsi dalam memelihara dan menyokong proses spermatogenesis (Nicholls, 2012). Aktivin A memiliki fungsi dalam menstimulasi proliferasi dan diferensiasi sel Sertoli testis.

Sel Sertoli memiliki fungsi utama dalam menunjang, melindungi, dan mengatur nutrisi spermatozoa. Sel Sertoli juga berperan untuk fagositosis kelebihan sitoplasma pada spermatogenesis, sekresi protein pengikat androgen dan inhibin, serta produksi hormon anti mullerian (AMH). Sel Sertoli dilaporkan memiliki peran penting dalam pengaturan imunotoleran pada testis. Di dalam testis, sel Sertoli melindungi sel germinal dengan membentuk *blood testis barrier* (BTB) dan mensekresikan faktor pembentuk suasana toleran imunologis di sekitar testis (Dym & Fawcett, 1970).

2.4.6. Sel Leydig

Sel Leydig terletak pada jaringan interstisial testis di antara tubulus seminiferus. Sel Leydig memiliki fungsi untuk menghasilkan hormon testosteron oleh rangsangan *gonadotropin pituitary luteinizing hormone* (LH) yang bertindak selama proses spermatogenesis dan memengaruhi karakteristik seks sekunder pada pria (Malini *et al.*, 2013).

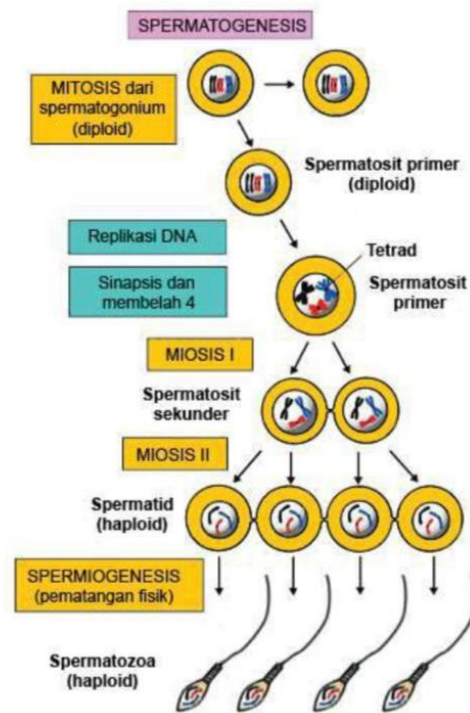
Sel Leydig berbentuk ovoid dan memiliki diameter 20 μm dan memiliki sitoplasma eosinofilik dan mengandung cairan lipid. Sel Leydig juga memiliki retikulum endoplasma elastis (RE) yang berhubungan dengan enzim yang diperlukan dalam sintesis testosteron dari kolesterol. Selaras dengan pendapat Odeh *et al.* (2014) bahwa adanya peningkatan jumlah lipi droplet, kristal-kristal, dan vakuola pada sitoplasma sel Leydig menunjukkan adanya penurunan kualitas sel Leydig yang diakibatkan penuaan.

Selama awal kehidupan janin dan perkembangan embrio, sel Leydig berdiferensiasi dan mensekresikan testosteron untuk pematangan seksual dan fungsi reproduksi. Testosteron berasosiasi dengan reseptor androgen dan bergerak menuju nukleus untuk

melakukan transkripsi gen. Sel Leydig akan aktif menjadi sel yang mensekresi androgen saat mendapat stimulasi gonadotropik pada masa pubertas dan tetap aktif sepanjang kehidupan (Plant, 2015).

2.4.7. Spermatogenesis

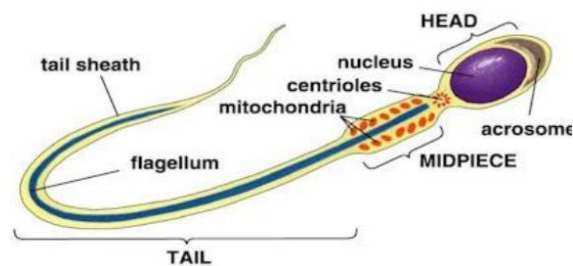
Proses spermatogenesis diawali dengan spermatogonium yang berkembang dari *primordial germ cells* bergerak menuju gonad yang sedang berkembang pada awal terjadinya embriogenesis. Spermatogonium merupakan sel diploid yang mengalami mitosis untuk membentuk lebih banyak spermatogonia dan spermatosid yang mengalami migrasi dari ruang basalis menuju ruang adluminal. Spermatosit primer akan melakukan pembelahan meiosis I untuk membentuk spermatosit sekunder yang mengalami pembelahan meiosis II untuk membentuk empat spermatid, masing-masing dengan jumlah kromosom tunggal yang haploid (Robertis, 1997). Sel yang haploid akan mengalami transformasi menjadi spermatozoa yang matang dengan melepaskan sitoplasma, penataan kembali organel dan juga pembentukan flagela. Sperma yang dihasilkan kemudian dimatangkan fisiologis dan disimpan di dalam epididimis (Albert *et al.*, 2002). Pembelahan spermatogenesis disajikan pada **Gambar 5**. Pelepasan spermatid dari epitel germinal diatur oleh kerja sel Sertoli (Holstein *et al.*, 2003).



Gambar 5. Pembelahan spermatogenesis (Pineda, 2005).

2.4.8. Spermatozoa

Spermatozoa merupakan sel haploid (n) gamet jantan yang terbentuk saat spermatogenesis di dalam tubulus seminifus yang terletak pada testis (Hayati *et al.*, 2010). Secara garis besar, spermatozoa tersusun dari bagian-bagian sperma yang terdiri atas bagian kepala (*head*), leher (*connecting piece*), dan bagian ekor (*tail*) yang ditunjukkan pada **Gambar 6**.



Gambar 6. Bagian-bagian spermatozoa

Bagian kepala sperma terdiri dari inti sel dan akrosom yang dilapisi oleh membran sel (Abbiramy *et al.*, 2010).

a. Jumlah

Jumlah merupakan hal yang paling utama dalam mengetahui kualitas spermatozoa seseorang. Khaki (2015) menyatakan bahwa ada beberapa indikator yang dapat menyebabkan infertilitas pada pria, seperti gangguan ejakulasi, kurangnya produksi sperma (*azoospermia*), atau jumlah spermatozoa yang terlalu sedikit (*oligozoospermia*). Menurut Ramadhani (2007) jumlah spermatozoa mencit dikatakan normal apabila memiliki jumlah sebanyak 50 juta/mL.

Bremner *et al.* (1981) berpendapat proses spermatogenesis dipengaruhi oleh fungsi hipotalamus yang menyekresikan hormon GnRH dan merangsang *Luteinizing Hormone* (LH), serta *Follicle Stimulating Hormone* (FSH). Dalam hal ini tentu berpengaruh pada keberadaan hormon testosteron yang disekresikan sel Leydig akibat stimulasi LH, serta keberadaan sel Sertoli yang menyekresikan *Androgen Binding Protein* (ABP). ABP berfungsi untuk mengikat testosteron, yang menyebabkan kadar testosteron pada tubulus seminiferus meningkat (Sherwood, 2012). Meningkatnya hormon testosteron akan berpengaruh pada proses pembelahan sel-sel germinal pada pembentukan spermatosit sekunder yang terjadi saat fase meiosis (Guyton & Hall, 1997).

b. Viabilitas

Viabilitas atau daya hidup spermatozoa merupakan kemampuan spermatozoa untuk dapat bertahan hidup di lingkungan atau keadaan tertentu. Spermatozoa yang hidup transparan atau tidak

terwarnai setelah diberi zat warna. Hal ini karena membran plasma yang memiliki sifat semipermeabel tersusun atas lipoprotein dengan kondisi baik sehingga zat warna tidak dapat menembus membran. Sedangkan spermatozoa yang mati adalah spermatozoa yang terwarnai zat warna karena adanya kerusakan membran plasma sehingga zat warna dapat menembus membran (Rizki *et al.*, 2019). Hal tersebut menandakan integritas akrosom membran spermatozoa yang rusak akan menyebabkan molekul asing dapat masuk dan menyebabkan sel spermatozoa akan mati.

c. **Motilitas**

Motilitas menjadi salah satu representasi sperma yang sehat dan sangat penting dalam proses fertilisasi. Motilitas merupakan gerakan progresif sperma menurut Syarif *et al.* (2016), ciri motilitas spermatozoa yang normal yang bergerak lurus kedepan, lincah, cepat, dan gerakan ekor berirama. Hal ini sesuai dengan pernyataan Oka *et al.* (1998) bahwa spermatozoa yang baik bergerak lurus dan arahnya kedepan, sedangkan sperma yang tidak baik yang bergerak zig-zag, berputar-putar dan bergerak lambat.

Motilitas sperma mencit dikatakan normal dan baik jika spermatozoa yang bergerak (motil) lebih dari 50%, dan dikatakan kurang baik atau tidak normal jika spermatozoa yang bergerak (motil) kurang dari 50% (Nuraini *et al.*, 2012). Kategori motilitas spermatozoa terbagi menjadi ke dalam beberapa kategori yaitu pergerakan cepat, pergerakan lambat, bergerak di tempat, dan tidak bergerak sama sekali (Pebrianti, 2013).

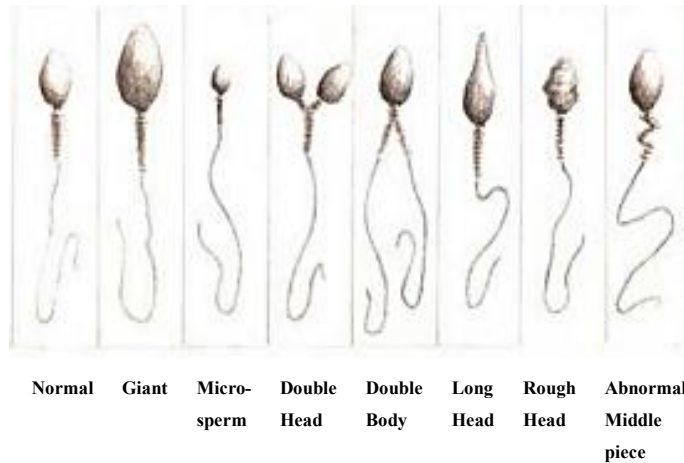
d. Morfologi

Nugraheni *et al.* (2003) mengatakan bahwa sel sperma yang normal apabila memiliki kepala, leher, badan, dan ekor. Spermatozoa pada mencit memiliki bentuk kepala (*cauda*) seperti bulan sabit atau kait dengan panjang kurang lebih 0,008 mm dari total panjang dari kepala hingga ekor yakni kurang lebih 0,1226 mm, bagian tengah (*middle piece*) pendek, serta ekor (*cauda*) yang panjang dan tidak menggulung (Nurmasyitah, 2018). Spermatozoa abnormal jika memiliki bentuk kepala yang terlalu kecil atau besar, bagian Tengah (*middle piece*) yang terlalu panjang, ekor melingkar atau ganda (Sudatri *et al.*, 2015). Kelainan morfologi sperma di bawah 20% masih dianggap normal, namun apabila nilainya mencapai 50% dapat memicu terjadinya infertilitas (Toilehere, 1985).

Kepala spermatozoa tersusun atas nukleus yang mengandung materi genetik sperma. Pada daerah kepala terdapat akrosom yang merupakan vesikel berisi enzim yang melapisi ujung kepala yang berperan untuk menembus sel ovum pada proses fertilisasi (Sherwood, 2015). Pada bagian tengah memiliki mitokondria yang berperan dalam menghasilkan energi (ATP) dalam kelangsungan hidup sperma, serta bekerja sama dengan ekor dalam pergerakan spermatozoa (Wibisono, 2010).

Ekor sperma merupakan bagian yang berperan penting dalam motilitas sperma dengan bantuan ATP dari mitokondria (Sherwood, 2015). Menurut Guyton *et al.* (2014), ekor sperma tersusun atas tiga komponen utama yaitu: (a) kerangka utama yang tersusun atas 11 mikrotubulus atau disebut juga aksonema, (b) membran sel tipis dan menutupi aksonema, (c) mitokondria yang berkumpul dan mengelilingi aksonema. Berikut

merupakan gambaran spermatozoa abnormal menurut Kamel (2010) yang disajikan pada **Gambar 7**.



Gambar 7. Macam-macam morfologi spermatozoa abnormal

2.5. Daun Kersen (*Muntingia calabura* L.)

Kersen (*Muntingia calabura* L.) merupakan kelompok tumbuhan perdu kelompok dikotil yang memiliki tinggi pohon sekitar 2-10 m. Di Indonesia, kersen atau talok hanya dimanfaatkan sebagai tumbuhan peneduh karena memiliki daun yang rindang dan selalu hijau. Daun kersen mengandung senyawa metabolit sekunder seperti flavonoid, tanin, *triterpene*, saponin, polifenol yang membuktikan adanya aktivitas antioksidatif. Di daerah Asia dan Amerika, tanaman kersen dapat dengan mudah dijumpai (Balakrishnan, 2011).

Menurut Prasetyo & Sasongko (2014) daun kersen memiliki bentuk bulat dengan memiliki Panjang sekitar 2,5-15 cm dengan lebar antara 1-6,5 cm. Daun kersen memiliki warna hijau muda dengan ditutupi bulu halus di bagian bawah daun dengan tepi daun bergerigi, ujung runcing, dan struktur berseling mendatar yang dapat dilihat pada **Gambar 8**.



Gambar 8. Daun kersen (*Muntingia calabura* L.) (Zahara, 2018).

2.5.1. Klasifikasi Kersen (*Muntingia calabura* L.)

Menurut Kosasih *et al.* (2013) *Muntingia calabura* diklasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Magnoliophyta
Class	: Magnoliopsida
Order	: Malvales
Family	: Muntingiaceae
Genus	: <i>Muntingia</i>
Spesies	: <i>Muntingia calabura</i> L.

2.5.2. Aktivitas Farmakologi

Penelitian yang dilakukan oleh Syahara (2019), ekstraksi etanol daun kersen terbukti memiliki berbagai metabolit sekunder seperti alkaloid, flavonoid, dan saponin. Selain itu, dalam Zakaria *et al.* (2014) menyebutkan bahwa daun kersen mengandung berbagai

senyawa kimia seperti flavonoid, tannin, triterpene, saponin, fenolik dan polifenol. Di antara senyawa aktif tersebut, yang memiliki aktivitas antioksidan adalah alkaloid, fenolik dan flavonoid. Senyawa fenol dan flavonoid berperan dalam menangkal radikal bebas. Fenol menyumbangkan proton untuk menghambat peroksidasi lipid oleh radikal bebas (Balakrishnan, 2011). Senyawa aktif yang dimiliki oleh daun kesen adalah saponin, flavonoid, dan tannin (Surjowardojo *et al.*, 2014).

Ekstrak daun kesen memiliki kandungan zat-zat bioaktif yang terbukti dapat meminimalisir efek kerusakan sel dari radikal bebas (Khan *et al.*, 2015). Diperkuat oleh pernyataan Ramadas *et al.* (2015) bahwa dalam akar, daun, dan buah kesen terkandung berbagai senyawa seperti karbohidrat, protein, polifenol, flavonoid, asam askorbat, alfa-tokoferol, dan juga klorofil. Khan *et al.* (2015) menambahkan jika seluruh senyawa ini memiliki mekanisme kerja yang berhubungan maka akan dapat menekan stres oksidatif di dalam tubuh. Hal ini tentu berdampak pada fungsi organ tubuh salah satunya organ reproduksi.

Pada sistem reproduksi pria, stres oksidatif dapat mengakibatkan gangguan dalam fungsi spermatozoa karena adanya peningkatan kerusakan pada DNA spermatozoa yang menyebabkan terjadinya apoptosis sel (Putri, 2015). Stres oksidatif menjadi faktor utama dalam etiologi dan infertilitas pria. Merujuk pada pernyataan Kuntorini *et al.* (2013) bahwa senyawa flavonoid yang dimiliki oleh daun kesen merupakan senyawa antioksidan alami dan memiliki efek menekan berbagai reaksi oksidasi dan dapat bertindak sebagai pereduksi radikal hidroksil, superoksida, dan radikal peroksil. Reaksi peroksidasi lipid yang disebabkan oleh radikal bebas mampu dihambat oleh kemampuan penyumbang

proton dari kelompok hidroksil yang terkandung dalam senyawa fenol (Balakrishnan *et al.*, 2011).

Senyawa polifenol yang terkandung di dalam daun kersen memiliki aktivitas antiglikasi atau menghambat reaksi glikosidasi dengan penghambatan signaling RAGEs (Sadowska *et al.*, 2015). Asam askorbat atau Vitamin C merupakan kelompok antioksidan yang larut dalam air dan mampu menghambat produksi radikal bebas dan mengurangi peroksidasi lipid pada testis (Aitken *et al.*, 2008). Kandungan senyawa alfa-tokoferol merupakan antioksidan yang larut lemak dan mampu menangkal radikal bebas dalam keadaan hidrofobik serta mampu menghambat dua radikal bebas hanya dengan satu molekulnya (Kontush *et al.*, 2015).

III. METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan September - November 2023. Penelitian diawali dengan pembuatan ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura* L.) di Laboratorium Botani Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung. Kemudian proses aklimatisasi hewan uji bertempat di Rumah Pemeliharaan Hewan Uji Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung. Kemudian untuk proses pembedahan dan pengamatan spermatozoa mencit (*Mus musculus* L.) dilaksanakan di Laboratorium Zoologi Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung.

3.2. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah neraca analitik untuk menimbang bahan dan simplisia yang akan digunakan dalam pembuatan ekstrak, *beaker glass* sebagai tempat atau wadah dari larutan ekstrak daun kersen, gelas ukur untuk mengukur volume pelarut yang akan dicampurkan dengan simplisia, mikroskop cahaya digunakan untuk proses pengamatan spermatozoa, *haemocytometer* untuk memudahkan dalam proses menghitung spermatozoa, *autoclave* sebagai alat sterilisasi, oven untuk mengeringkan daun kersen, *rotary evaporator* untuk proses

mendapatkan ekstrak kental, corong Buchner dan kertas saring untuk proses penyaringan ekstrak, *hand counter* digunakan untuk membantu proses perhitungan spermatozoa, batang pengaduk untuk menghomogenkan maserasi, *blender* digunakan untuk menghaluskan daun kersen, suntikan dan sonde digunakan untuk proses induksi, alat tulis untuk mencatat *logbook* penelitian, dan kotak kandang mencit sebagai tempat tinggal mencit selama proses penelitian.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah hewan percobaan berupa mencit jantan usia 2-3 bulan dengan berat badan 25-35 gram. Bahan tumbuhan untuk penelitian ini adalah daun kersen (*Muntingia calabura* L.) yang diperoleh dari lingkungan sekitar tempat tinggal di Desa Cipadang, Kecamatan Gedongtataan, Kabupaten Pesawaran. Daun tua diambil dengan kriteria berwarna hijau tua, memiliki tekstur tebal, diambil dibawah 2 daun muda dari pucuk, serta dipilih daun yang belum menguning (Kemenkes RI, 2011). Kemudian daun diekstrak dengan pelarut aquades. D-galaktosa digunakan untuk menginduksi penuaan pada sistem organ. Zat warna eosin 1% untuk memudahkan proses pengamatan viabilitas spermatozoa, NaCl 0,9% untuk menjaga suhu organ pada suhu ruang, *pellet* dan air untuk makan dan minum mencit, sekam padi sebagai alas pada kandang mencit.

3.3. Definisi Operasional

Agar tidak menimbulkan pengertian ganda, penulis memberikan pengertian untuk menjelaskan operasional penelitian sebagai berikut:

- a. Kualitas adalah keseluruhan ciri dan karakteristik suatu produk yang dapat memuaskan kebutuhan, dinyatakan secara tegas dan tersamar.
- b. Jumlah spermatozoa adalah banyaknya spermatozoa dalam semen
- c. Viabilitas spermatozoa adalah kemampuan hidup spermatozoa dalam semen.

- d. Motilitas spermatozoa adalah satuan ukuran gerak spermatozoa yang terdiri dari tipe pergerakan dan kecepatan gerak spermatozoa.
- e. Morfologi spermatozoa adalah penampakan struktur tubuh yang terdiri atas tiga bagian utama yaitu kepala yang berisi inti, badan (leher), dan ekor sebagai alat gerak.

3.4. Variabel Penelitian

Variabel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

- a. Variabel bebas: Ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura* L.) dengan dosis 35mg/kgBB, 70mg/kgBB, dan 105mg/kgBB.
- b. Variabel terikat: Jumlah, viabilitas, motilitas, dan morfologi spermatozoa mencit jantan yang diinduksi D-Galaktosa dan terapi ekstrak daun kersen.
- c. Variabel kontrol: Jenis hewan uji coba yaitu mencit jantan, jumlah mencit yang digunakan, umur mencit, berat badan mencit, suhu, dan makanan standar mencit.

3.5. Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental murni Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan pendekatan *post test only-control group*.

Pengelompokkan sampel dan penentuan jumlah ulangan menggunakan rumus Federer (1963), yaitu $(t-1)(n-1) \geq 15$. Dimana t merupakan jumlah perlakuan dan n merupakan banyaknya jumlah ulangan.

Tabel 1. Kelompok Perlakuan

No	Perlakuan (P)	Uraian	Keterangan
1	K ₀	Mencit diperlakukan dalam keadaan normal	Kontrol
2	K-	Mencit diinduksi D-galaktosa 150mg/kgBB	Kontrol Negatif
3	P1	Mencit diinduksi D-galaktosa 150mg/kgBB dan diberikan terapi ekstrak daun kersen dengan dosis 35 mg/kgBB	Perlakuan
4	P2	Mencit diinduksi D-galaktosa 150mg/kgBB dan diberikan terapi ekstrak daun kersen dengan dosis 70 mg/kgBB	Perlakuan
5	P3	Mencit diinduksi D-galaktosa 150mg/kgBB dan diberikan terapi ekstrak daun kersen dengan dosis 105 mg/kgBB	Perlakuan

Keterangan:

K = Kontrol

P1 = Perlakuan ekstrak daun kersen dosis 35 mg/kgBB

P2 = Perlakuan ekstrak daun kersen dosis 70 mg/kgBB

P3 = Perlakuan ekstrak daun kersen dosis 105 mg/kgBB

3.6. Alur Penelitian

3.6.1. Tahap Persiapan

a. Persiapan Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang akan digunakan disterilkan terlebih dahulu untuk menghilangkan kotoran dan zat renik lainnya. Daun kersen yang didapat kemudian dibawa ke Laboratorium Botani Jurusan Biologi FMIPA Unila untuk diambil ekstraknya.

b. Aklimatisasi Hewan Uji

Hewan percobaan yang digunakan yaitu mencit jantan berusia 8 minggu dengan berat badan 25-35 g sebanyak 25 ekor. Mencit terlebih dahulu diaklimatisasi selama tujuh hari pada kandang plastik yang diberi sekam sebagai alas dan ditutup dengan ram kawat agar mencit tidak keluar dan tetap mendapatkan sirkulasi udara yang baik. Menurut Mutiarahmi *et al.* (2021), aklimatisasi dilakukan sebagai pemeliharaan hewan uji yang bertujuan agar hewan uji dapat beradaptasi dengan lingkungan baru. Selama perlakuan mencit diberikan ransum atau pelet sebagai sumber pakan standar. Selain pakan, mencit juga diberikan air minum supaya tidak dehidrasi dan stres.

3.6.2. Pembuatan Ekstrak Daun Kersen (*Muntingia calabura* L)

Daun kersen segar dicuci bersih dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran yang menempel di daun, kemudian dikering-anginkan selama satu malam dan dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 37°C selama 3 hari. Setelah kering, daun dipotong kecil-kecil sebelum akhirnya dihaluskan menggunakan *blender*.

Pada penelitian ini simplisia daun kersen dimaserasi terlebih dahulu dengan aquades selama 7 hari dengan perbandingan 100 g bubuk daun kersen dalam 1 L aquades. Penggunaan pelarut aquades karena memiliki sifat yang polar dan baik untuk proses ekstraksi. Senyawa aktif daun kersen seperti alkaloid, flavonoid, fenolik, tanin, dan asam askorbat bersifat polar. Sesuai dengan pernyataan Anggitha (2012) bahwa sifat kelarutan senyawa saat ekstraksi sama dengan sifat dari pelarut yang digunakan. Selanjutnya dilakukan proses pemekatan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 60°C sehingga diperoleh ekstrak kental dan kemudian dikeringkan dalam desikator sehingga diperoleh ekstrak kering yang digunakan untuk percobaan (Syabania *et al.*, 2021).

Penggunaan ekstrak daun kersen pada penelitian Mahmood *et al.* (2011) pada *Rattus norvegicus* yaitu menggunakan dosis 250 mg/kgBB dan 500 mg/kgBB. Pada penelitian ini digunakan subjek penelitiannya adalah mencit, sehingga perlu dilakukan konversi perhitungan dosis dengan mengalikan faktor konversi dosis tikus ke mencit 0,14 (Paget & Barnes, 1964), sehingga dosis yang digunakan pada penelitian ini adalah $250 \text{ mg/kgBB} \times 0,14 = 35 \text{ mg/kgBB}$, $500 \text{ mg/kgBB} \times 0,14 = 70 \text{ mg/kgBB}$, dan $750 \text{ mg/kgBB} \times 0,14 = 105 \text{ mg/kgBB}$.

3.6.3. Induksi D-Galaktosa

Sebanyak 20 ekor mencit diinduksi D-Galaktosa dengan dosis yang telah ditentukan secara oral menggunakan sonde selama 35 hari yang menurut Whittingham & Wood (1993) siklus pembentukan spermatozoa pada mencit terdiri dari 8 hari (mitosis), 13 hari (meiosis), dan 13,5 hari (spermiogenesis). Dosis yang digunakan dalam penelitian ini adalah 150 mg/kgBB. Hal ini berdasarkan pada pernyataan Sulistyoningrum (2017) bahwa dosis yang tepat

untuk menurunkan parameter sperma adalah 100-200 mg/kgBB. Pemberian D-Galaktosa bertujuan untuk meningkatkan kadar radikal bebas di dalam tubuh sehingga mencit mengalami stres oksidatif dan dapat mempercepat proses penuaan. Agar sampel homogen, dilakukan perhitungan dari berat badan hewan uji coba yang digunakan. Selama perlakuan, dilakukan pengamatan terhadap kondisi kesehatan mencit yang meliputi perilaku harian mencit, nafsu makan dan berat badan mencit.

3.6.4. Induksi Ekstrak Daun Kersen

Kelompok perlakuan mencit yang telah diinduksi D-Galaktosa, diberikan terapi *antiaging* dengan memberikan ekstrak daun kersen dengan dosis 35 mg/kgBB, 70 mg/kgBB, dan 105 mg/kgBB. Ekstrak daun kersen diberikan secara oral dengan sonde sebanyak satu kali setiap harinya pukul 09.00 WIB. Pemberian ekstrak daun kersen dimaksud karena daun kersen memiliki kandungan zat-zat bioaktif yang terbukti dapat meminimalisir efek kerusakan sel dari radikal bebas (Khan *et al.*, 2015).

3.6.5. Pengamatan Jumlah, Viabilitas, Motilitas, dan Morfologi Spermatozoa

a. Jumlah

Spermatozoa diambil dari bagian *cauda* epididimis yang sudah dipotong dan dipisahkan dari testis. Kemudian cauda epididimis diletakkan pada cawan berisi NaCl 0,9% lalu ditekan secara perlahan menggunakan bantuan pinset hingga cairan spermatozoa keluar. Kemudian diambil sebanyak satu tetes suspensi spermatozoa dan diencerkan menggunakan 1mL NaCl 0,9%. Menurut Freund & Peterson (1976) jumlah semen

dikatakan normal apabila memiliki konsentrasi spermatozoa lebih dari 20 juta/ML. Sedangkan menurut Ramadhani (2007) jumlah spermatozoa mencit bisa dikatakan normal apabila memiliki jumlah sebanyak 50 juta/mL. Menurut Bijanti *et al.*, (2002) rumus perhitungan jumlah spermatozoa adalah sebagai berikut:

$$\text{Jumlah sel/mL} = \text{jumlah spermatozoa (n)} \times 10^4 \times \text{pengenceran}$$

b. Viabilitas

Spermatozoa yang hidup dan mati dapat dilihat berdasarkan reaksinya terhadap pewarna eosin yang digunakan. Sel spermatozoa yang hidup tidak menyerap zat warna eosin dan tetap jernih karena membran plasma berupa membran dwilapis *semipermeable* yang terdiri dari lapisan lipoprotein yang berfungsi secara baik sehingga tidak dapat ditembus oleh zat warna. Sedangkan sel spermatozoa yang mati (tidak motil) berwarna merah karena menghisap zat warna eosin yang diberikan karena permeabilitas membran plasma telah rusak terutama di daerah pangkal kepala yang tidak tertutup akrosom sehingga dapat mudah ditembus oleh molekul zat warna (Setiawan, 2005). Pengamatan viabilitas spermatozoa dilakukan dengan mengambil 1 tetes suspensi sperma yang telah diencerkan menggunakan NaCl 0,9% kemudian ditetaskan zat warna eosin 1% pada gelas objek dan ditutup menggunakan pentutup objek kemudian di fiksasi dan diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 400x. Menurut Pubiandara *et al.* (2016) nilai viabilitas dinyatakan dalam persen pada rumus berikut.

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

Keterangan:

a: jumlah sperma yang hidup

b: jumlah sperma yang mati

c. Motilitas

Motilitas spermatozoa menjadi salah satu representasi sperma yang sehat dan sangat penting dalam proses fertilisasi.

Kecepatan motilitas spermatozoa dipengaruhi oleh pergerakan ion, transpor membran spermatozoa, dan integritas membran spermatozoa. Pengamatan motilitas spermatozoa berdasarkan kriteria WHO (1994) yaitu kategori 0 (sperma tidak bergerak sama sekali), kategori 1 (sperma bergerak lambat), kategori 2 (sperma bergerak kedepan dengan kecepatan sedang atau berputar-putar) kategori 3 (sperma bergerak lurus ke depan).

Cauda epididimis mencit diambil dan diletakkan dalam cawan Petri berisi NaCl 0,9% untuk menjaga suhu agar sperma tidak mati. Kemudian *cauda* epididimis ditekan secara perlahan menggunakan pinset hingga sperma keluar dan diaduk dengan cara *pipetting*. Sebanyak satu tetes suspensi spermatozoa ditetaskan pada gelas objek dan ditutup menggunakan penutup objek. Pengamatan dilakukan di bawah mikroskop dengan perbesaran 400x. Presentase kategori sperma motil ditentukan berdasarkan rumus berikut (Salman *et al.*, 2016).

$$\text{Presentase motilitas (\%)} = \frac{a}{a+b} \times 100\%$$

Keterangan:

a: jumlah sperma bergerak

b: jumlah sperma tidak bergerak

d. Morfologi

Pengamatan morfologi spermatozoa dilakukan dengan membuat sediaan apusan yang diberi satu tetes suspensi spermatozoa pada kaca objek. Sampel spermatozoa diambil dari *cauda* epididimis dengan cara menyayat dan menekan secara perlahan hingga sperma keluar. Pengamatan morfologi sperma dilakukan dengan membedakan bentuk sperma normal dan abnormal. Spermatozoa normal memiliki bagian kepala (*caput*) yang berbentuk seperti kait atau bulan sabit, bagian tengah (*middle piece*) yang pendek, serta bagian ekor (*cauda*) yang panjang dan tidak menggulung (Astuti, 2009). Sedangkan morfologi spermatozoa abnormal memiliki bentuk kepala yang terlalu besar atau terlalu kecil, ekor menggulung atau keriting, serta aglutinasi antar kepala dengan kepala. Presentase morfologi spermatozoa dapat menggunakan rumus Astuti (2009) berikut.

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

Keterangan:

a: jumlah morfologi sperma normal

b: jumlah morfologi sperma abnormal

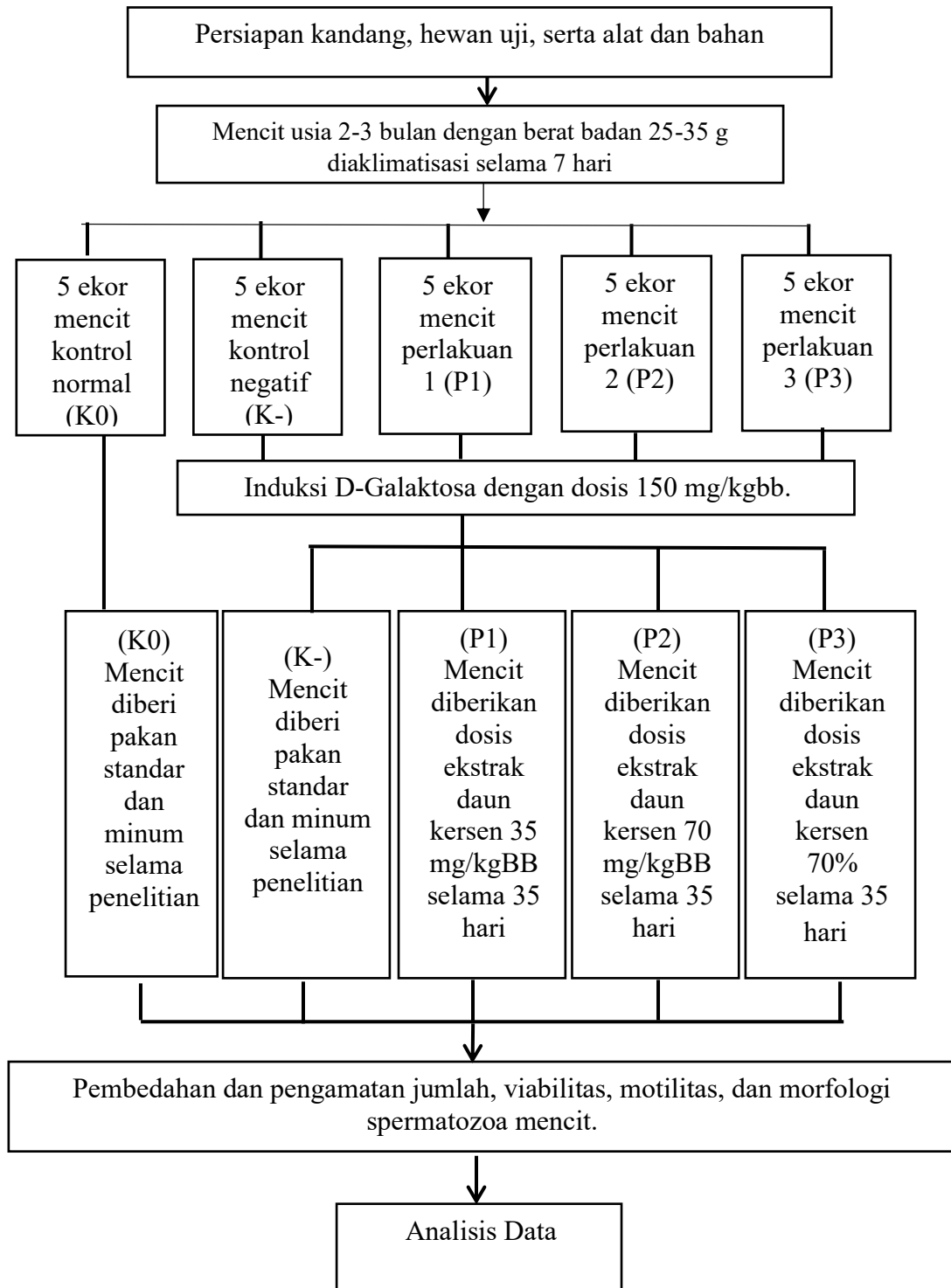
3.6.6. Analisis Data

Data hasil penelitian kemudian dianalisis secara statistik menggunakan software SPSS 25. Data yang didapat diuji normalitas data menggunakan uji Shapiro-wilk, kemudian dilanjutkan dengan uji homogenitas dengan uji Levene. Kemudian data yang sudah homogen di uji menggunakan *Analysis of Variance* (ANOVA) untuk mengetahui perlakuan yang diberikan signifikan

atau tidak. Perbedaan dinyatakan signifikan apabila $p < 0,05$. Setelah itu dilanjutkan dengan uji *post hoc* selang berganda Duncan ($\alpha=5\%$) untuk melihat perlakuan mana yang paling efektif.

3.6.7. Diagram Alir Penelitian

Adapun diagram alir yang digunakan dalam penelitian ini sebagai berikut:



V. SIMPULAN DAN SARAN

5.1. Simpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat ditarik kesimpulan bahwa:

1. Pemberian ekstrak daun kersen dapat meningkatkan jumlah spermatozoa mencit setelah diinduksi D-Galaktosa dengan hasil terbaik ditunjukkan oleh perlakuan 3 dosis (105 mg/kgBB), dengan rata-rata jumlah spermatozoa sebesar 82.20 juta/mL.
2. Pemberian ekstrak daun kersen dapat meningkatkan viabilitas spermatozoa mencit setelah diinduksi D-Galaktosa dengan hasil terbaik ditunjukkan oleh perlakuan 3 dosis (105 mg/kgBB), dengan rata-rata viabilitas spermatozoa sebesar 54.00%.
3. Pemberian ekstrak daun kersen dapat meningkatkan motilitas spermatozoa mencit setelah diinduksi D-Galaktosa dengan hasil terbaik ditunjukkan oleh perlakuan 3 dosis (105 mg/kgBB), dengan rata-rata motilitas spermatozoa sebesar 65.00%.
4. Pemberian ekstrak daun kersen dapat meningkatkan normalitas morfologi spermatozoa mencit setelah diinduksi D-galaktosa dengan hasil terbaik ditunjukkan oleh perlakuan 3 dosis (105 mg/kgBB), dengan rata-rata morfologi spermatozoa spermatozoa normal sebesar 63.00%.

5.2. Saran

Penelitian yang telah dilakukan terbukti mampu meningkatkan normalitas morfologi, meningkatkan motilitas, viabilitas, serta meningkatkan jumlah spermatozoa mencit yang mengalami stres oksidatif akibat adanya induksi D-Galaktosa. Namun pada penelitian ini memiliki keterbatasan dalam mengukur kadar *Malondialdehyde* (MDA) sebagai indikator peningkatan radikal bebas. Oleh sebab itu diperlukan penelitian lebih lanjut terkait hal tersebut.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbiramy, V. S., & Shanthi, V. 2010. Spermatozoa Segmentation and Morphological Parameter Analysis Based Detection of Teratozoospermia. *International Journal of Computer Applications*, 3(7): 0975-8887.
- Agarwal, A., & Prabakaran, A. 2005. Oxidative Stress and Antioxidants in Male Infertility: a Difficult Balance. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*, 3(1): 1-8.
- Ahangarpour, A., Oroojan, A. A., & Heidari, H. 2014. Effects of Exendin-4 on Male Reproductive Parameters of D-Galactose Induced Aging Mouse Model. *The World Journal of Men's Health*, 32(3): 176.
- Aitken, R.J., & Roman, S.D. 2008. Antioxidant Systems and Oxidative Stress in The Testes. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1(1): 15-24.
- Alahmar., Ahmed, T. 2019. Role of Oxydative Stress in Male Infertility: An Updated Review. *Journal of Human Reproduction Science*. 12(1): 4-18.
- Albert, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts., & Walter, P. 2002. Molecular Biology of The Cell: Germ Cells and Fertilization. *Garland Science*, (4): 1127-56.
- Al-Sultani., Sami R Al-Katib, Saad Al- Zayadi. 2013. Effect of Vitamin C on In Vitro Sperm Activation of Asthenozoospermic Infertile Patients. *American Journal of Research Communication*, 1(10): 40-41.
- Anggitha, I. 2012. *Performa Flokulasi Bioflokula DYT Pada Beragam Keasaman dan Kekuatan Ion Terhadap Turbiditas Larutan Kaolin*. Universitas Pendidikan Indonesia: Jakarta.
- Aprini, U. R., Novianry, V., & Zakiah, M. 2019. Pengaruh Pemberian Astaxanthin Terhadap Kadar Malondialdehid Pada Kerusakan Jaringan Testis Tikus Putih Yang Diinduksi Formaldehid Secara Oral. *Cerebellum*, 5(1): 1234-1247.

- Astuti, S. 2009. Kualitas Spermatozoa Tikus Jantan yang Diberi Tepung Kedelai Kaya Isoflavon. *MKB*, 41(4): 180-6.
- Atang & Palupi, S. 2020. Pengaruh Antioksidan Alami pada Berat Testis Mencit (*Mus musculus*) yang Terpapar Senyawa Kimia Plastik. *Journal Research of Empowerment and Development*, 1(2): 43–44.
- Awuy, F. D., Purwanto, D. S., & Mewo, Y. M. 2021. Pengaruh Pemberian Vitamin C Terhadap Kualitas Spermatozoa Yang Terpapar Asap Rokok. *Jurnal E-Biomedik*, 9(2): 240–247.
- Badami, N., & Sulistyningrum. 2017. Pengaruh Ekstrak Air Daun Kersen (*Muntingia calabura*) Terhadap Skor Spermatogenesis Pada *Mus musculus* Balb/C Terinduksi D-Galaktosa. *Skripsi*: Universitas Islam Indonesia.
- Badibostan, H., Mehri, S., Mohammadi, E., & Hosseinzadeh, H. 2019. Protective Effect of Thymoquinone on D-galactose-Induced Aging in Mice. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*, 14(1): 14–23.
- Balakrishnan. 2011. Tyrosine Inhibition and Antioxidant Properties of *Muntingia calabura* Extracts: In Vitro Studies. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 2(2): 0975-6299.
- Basiru, A., Abdullahi, I. O., Adakole, A. S., Jimoh, A. G., Abdulfatai, A., & Mistura, A. O. 2022. Correlation Between Testicular Biometrics and Serum Level of Reproductive Hormones of Crossed Arewa Breed of Stallions in Ilorin, Nigeria. *Media Kedokteran Hewan*, 33(2): 53–62.
- Baszary, C. D. U., Kakisina, P., & Linda. 2021. Peningkatan Motilitas dan Viabilitas Spermatozoa Mencit (*Mus musculus*) Diabetes Mellitus Tipe- II Setelah Diberi Diet Tepung Sagu (*Metroxylon sagu* Rottb). *Biofaal Journal*, 2(1): 42–46.
- Berawi, K. N., Wahyudo, R., & Pratama, A. 2019. Potensi Terapi *Moringa oleifera* (Kelor) Pada Penyakit Degeneratif. *JK Unila*, 3(1): 210–214.
- Bijanti, R., Partosoewignjo, S., Wahyuni, R. S., & Utomo, B. 2002. *Penuntun Praktik Laboratorium Klinik Veteriner Edisi 3*. Laboratorium Patologi Klinik Veteriner Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya.
- Bremner, W. J., Alvin, M., Matsumoto., Allen, M., Sussman., & Alvin, C. P. 1981. Follicle-Stimulating Hormone And Human Spermatogenesis. *The Journal of Clinical Investigation*, (68): 1044-1052.
- Busman, H. 2020. *Spermatozoa dan Spermatogenesis*. Pustaka Ali Imron. Lampung.

- Christijanti, W., & Utami, N. R. 2007. Efek Pemberian Antioksidan Vitamin C dan E terhadap Kualitas Spermatozoa Tikus Putih Terpapar Allethrin. *Biosaintifika*, 2(1): 18–26.
- Casper, R. F., Meriano, K. A., Jarvi, L. Cowan, M., & Lucato, L 1995. The Hypo-osmotic Swelling Test for Selection of Viable Sperm for Intracytoplasmic Sperm Injection in Men with Complete Asthenozoospermia. *Fertility and Sterility*, 64(5): 973-976.
- Claudia., Queljoe., & Tendean. 2013. Perbedaan Kualitas Spermatozoa Mencit Jantan (*Mus musculus* L.) yang Diberikan Vitamin C Setelah Pemaparan Asap Rokok. *Jurnal e- Biomedik*; 1(1): 629-634.
- Coelho, A. I., Berry, G. T., & Rubio-Gozalbo, M. E. 2015. Galactose Metabolism and Health. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 18(4): 422–427.
- Cooper, T.G and C.H. Yeung. 2003. Acquisition of Volume Regulatory Response of Sperm Upon Maturation in the Epididymis and the Role of the Cytoplasmic Droplet. *Microsc Res Tech*, (61): 28-38.
- Cornwall, G.A. 2009. New Insights Into Epididymal Biology and Function. *Human Reproduction Update*, 15(2): 213-227.
- Dahlan, M. S., Tjokronegoro, A. 2002. Oxidative Stress and Male Infertility: Pathophysiology and Clinical Implication. *Jurnal Kedokteran Yarsi*; 10(1): 50-9.
- Dewanto, H., Lisdiana, & Isnaeni, W. 2017. Pengaruh Ekstrak Kulit Buah Rambutan terhadap Kualitas Sperma Tikus yang Terpapar Asap Rokok. *Life Science*, 6(2): 62–68.
- Dja'afara, A.L., Wantouw, B., & Tendean, L. 2015. Pengaruh Pemberian Kopi Terhadap Kualitas Spermatozoa Tikus Wistar Jantan (*Rattus norvegicus*) yang Diberi Paparan Asap Rokok. *Jurnal e-Biomedik (eBm)*, 3(2).
- Dym, M., & DW, Fawcett. 1970. The Blood-Testis Barrier in the Rat and the Physiological Compartmentation of the Seminiferous Epithelium. *Biol. Reprod.* (3): 308-326.
- Federer, W. 1963. *Experimental Design, Theory and Application*. New York:Mac Millan.
- Fitriani., Eriani, K., & Sari, W. 2009. The Effect of Cigarettes Smoke Exposed Causes Fertility of Male Mice (*Mus musculus*). *Jurnal Natural*, 10(2): 1-6.
- Freitas, M. J., Vijayaraghavan, S., & Fardilha, M. 2017. Signaling Mechanisms in Mammalian Sperm Motility. *Handbook Biology of Rep*, 96(1): 2–12.

- Freund, M., & Peterson, R. N. 1976. *Semen Evaluation and Fertility*. The C.V. Mosby Company, Saint Louis: 344-354.
- Garber, JC. 2010. *Guide For the Care and Use of Laboratory Animals*. Washington DC. National Academic Press.
- George, S. K., Jiao, Y., Bishop, C. E., Lu, B. 2012. Oxidative Stress is Involved in Age- Dependent Spermatogenic Damage of Immp21 Mutant Mice. *Free Rad Bio Med*, (52): 2223-2232.
- Golalipour, M. J., Balajadeh, B. K., Ghafari, S., Azarhosh, R., & Khori, V. 2011. Protective Effect of *Urtica dioica* L. (Urticaceae) on Morphometric and Morphologic Alterations of Seminiferous Tubules in STZ Diabetic Rats. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 14(5): 472–477.
- Grosso, G., Bei, R., Mistretta, A., Marventano, S., Calabrese, G., & Masuelli, L. 2013. Red Orange: Experimental Models and Epidemiological Evidence of its Benefits on Human Health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1–11.
- Guyton, A. C. & Hall J. E. 1997. *Medical Physiology, 9th ed.* Philadelphia: Saunders Company.
- Guyton, A.C., & Hall, J. E. 2014. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran*. Edisi 12. Penerjemah: Ermita, I., Ibrahim, I. Singapura:Elsevier.
- Hafez, D. A. 2010. Effect of Extracts of *Ginger goots* and *Cinnamon bark* on Fertility of Male Diabetic Rats. *J Am Sci*;6: 940-47.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. 2007. Cellular Responses to Oxidative Stress: Adaptation, Damage, Repair, Senescence, and Health. *In Free Radical Biology and Medicine*. (4): 187-267.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. 1999. Free Radicals, Other Rective Species and Disease. *In free Radicals in Biology Medicine*. New York: Oxford University
- Haron, M. N., & Mohamed, M. 2016. Effect of Honey on the Reproductive System of Male Rat Offspring Exposed to Prenatal Restraint Stress. *Andrologia*. 48(5): 525-531.
- Hayati, A., Mangkoewidjojo, S., Hinting, A., & Moeljoprawiro, S. 2006. Hubungan Kadar MDA Sperma Dengan Integritas Membran Spermatozoa Tikus (*Rattus norvegicus*) Setelah Pemaparan 2-Methoxyethanol. *J Biol Res*. 11(2). 151-4.
- Hayati, A. 2011. *Spermatologi*. Surabaya: Airlangga University Press (AUP).

- Holdcraft, R.W., & Braun. 2004. Hormonal Regulation of Spermatogenesis. *International Journal of Andrology* (27): 335-342.
- Holstein, AF., Schulze, W., & Davidoff, M. 2003. Understanding Spermatogenesis is a Prerequisite for Treatment. *Reproduction Biol Endocrinol*, (1). 1-16.
- Ji, M., Su, X., Liu, J., Zhao, Y., Li, Z., Xu, X., ... Nashun, B. 2017. Comparison of Naturally Aging and D-Galactose Induced Aging Model in Beagle Dogs. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 14(6): 5881-5888
- Jones, R. 2004. Sperm Survival Versus Degradation in the Mammalian Epididymis: A Hypothesis. *Biology of Reproduction*, (71): 1405-1411.
- Kamel, R. M. 2010. Management of the Infertile Couple: an Evidence-Based Protocol. *Reprod Biol Endocrinol*, (8): 21.
- Karim, D. 2011. Pengaruh Paparan Asap Rokok Elektrik Terhadap Motilitas, Jumlah Sperma dan Kadar MDA Testis Mencit (*Mus musculus L.*) Tesis. Medan: Universitas Sumatera Utara, (1): 60-1.
- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. 2011. *Pedoman Umum Panen dan Pascapanen Tanaman Obat*. Badan Litbang Kesehatan Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional. Jakarta.
- Khaki, A., Fathiazad, F., Nouri, M., Khaki, A. A., Ghanbari, Z., Ghanbari, M., Ouladsahebmadarek, E., Javadi, L., & Farzadi, L. 2011. Anti-Oxidative Effects of Citro Flavonoids on Spermatogenesis in Rat. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 5(6): 721-72.
- Khan, Y.M.A., Mundasada, S. C., & Ramadas, D. 2015. Antioxidant Activity: Root, Leaves and Fruits Aqueous Extracts of *Muntingia calabura*. *Journal of Innovations in Pharmaceuticals and Biological Sciences*, 2(4):363-368.
- Kohn, D. F., & Clifford, C. B. 2002. Biology and Diseases of Rats. In *Laboratory Animal Medicine* (Issue January).
- Kontush, A., Finnckh, B., Karten, B., Kolschutter, A., & Beisiegel, U. 2015. Antioxidant and Prooxidant Activity of Alfa tokopherol in Human Plasma and Low Density Lipoprotein. *Journal of Lipid Research*, 37:1436-1448.
- Kosasih, E., Supriatna, N., & Ana, E. 2013. *Informasi Singkat Benih Kersen/Talok (Muntingia calabura L.)*. Balai Perbenihan Tanaman Hutan Jawa dan Madura.
- Kumar, A., Prakash, A., & Dogra, S. 2011. *Centella asiatica* Attenuates D-Galactose-Induced Cognitive Impairment, Oxidative and Mitochondrial Dysfunction in Mice. *International Journal of Alzheimer's Disease*, 2011.

- Kuntorini, E. M., Fitiana, S., & Astuti, D. 2013. Antioksidan Ekstrak Metanol Daun Kersen (*Muntingia calabura*). *Prosiding Semirata FMIPA Universitas Lampung*. Program Studi Biologi FMIPA Universitas Lampung Mangkurat.
- Kunwar, A. & Priyadarsini, K.I. 2011. Free Radicals, Oxidative Stress and Importance of Antioxidants in Human Health. *Journal Med Allied Sci*, 1(2): 53-60.
- Latif, R. 2013. Cocoa and Human Health : A Review. *Netherl J Med*, 71(2): 63-68.
- Lee, J., Kim, Y. S., Kim, E., Kim, Y., & Kim, Y. 2020. Curcumin and Hesperetin Attenuate D-Galactose-Induced Brain Senescence in vitro and in vivo. *Nutrition Research and Practice*, 14(5), 438–452.
- Liao, C. H., Chen, B. H., Chiang, H. S., Chen, C. W., Chen, M. F., & Ke, C. C. 2016. Mengoptimalkan Model Tikus Penuaan Reproduksi Pria dengan Injeksi D-Galaktosa. *Int J Mo. Sci*, (17): 1-10.
- Li, X., Q. Liu., S. Liu., J. Zhang and Y. Zhang. 2008. New Member of the Guanosine Triphosphatase Activating Protein Family in the Human Epididymis. *Acta Biochim Biophys Sin*, 40(10): 855-863.
- Lu, J. M., Lin, P. H., Yao, Q., & Chen, C. 2010. Chemical and Molecular Mechanisms of Antioxidants: Experimental Approaches and Model Systems. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 14(4): 840-860.
- Mahmood, N.D., Mamat, S.S., Kamisan, F.H., Kamarolzaman, M.F.F., Nasir, N., & Mohtaruddin, N. 2014. Amelioration of Paracetamol Induced Hepatotoxicity in Rat by The Administration of Methanol Extract of *Muntingia calabura* L. Leaves. *Biology Medical Research International*, 1-14.
- Malini, Desak Made., Ratningsih, N., Fitriani, N., Rahmi, D. 2013. Potensi Regenerasi Sel Sertoli Dan Sel Leydig Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Diabetes Pasca Pemberian Ekstrak Etanol Kulit Buah Jengkol (*Archidendron pauciflorum*). *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9), 1689–1699.
- Miladiyah, I. 2003. Tinjauan Risiko dan Manfaat Hormon Replacement Therapy pada Wanita Menopause. In *Mutiara Medika*, 3(2): 102–112.
- Moore, H.D. 1998. Contribution of Epididymal Factors to Sperm Maturation and Storage. *Andrologia*, (30): 233-239.
- Morava, E. 2014. Galactose supplementation in phosphoglucomutase-1 deficiency; review and outlook for a novel treatable CDG. *Molecular Genetics and Metabolism*, 112(4): 275–279.

- Mutiarahmi, C. N., Hartady, T., & Lesmana, R. 2021. Use of Mice As Experimental Animals in Laboratories That Refer To the Principles of Animal Welfare: a Literature. *Indonesia Medicus Veterinus*, 10(1): 134–145.
- Nakada, K., Sato, A., Yoshida, K., Morita, T., Tanaka, H., Inoue, S. I., & Hayashi, J. I. 2006. Mitochondria-Related Male Infertility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(41): 15148–15153.
- Narayana, K. 2008. An Aminoglycoside Antibiotic Gentamycin Induces Oxidative Stress, Reduces Antioxidants Reserve, and Impairs Spermatogenesis in Rats. *J Toxicol Sci*, 33(1): 85-96.
- Nicholls, P. 2012. Classical Catalase: Ancient and Modern. *Archives of Biochemistry and Biophysics*: 95-101.
- Niki, E. 2012. Do Antioxidants Impair Signaling by Reactive Oxygen Species and Lipid Oxidative Products. *FEBS Letters* 586(21): 3767-3770.
- Nishantini, A., Ruba, A .A., & Mohan, V. R. 2012. Total Phenolic, Flavonoid Contents and In Vitro Antioxidants Activity of Leaf Of *Suaeda monoica* Forssk Ex Gmel (Chenopodiaceae). *International Journal of Advanced Life Science (IJALS)*, 1(5): 34-43.
- Nugraheni, T., Astirin, OP., & Widiyani, T. 2003. Pengaruh Vitamin C Terhadap Perbaikan Spermatogenesis dan Kualitas Spermatozoa Mencit (*Mus musculus*) Setelah Pemberian Ekstrak Tembakau (*Nicotinia tabacum*). *Biofarmasi*, 1(1):13-19.
- Nuraini, T., Dadang, K., & Efy, A. 2012. Penyuntikan Ekstrak Biji *Carica papaya* L. Varietas Cibinong Pada *Macaca fascicularis* L. Dan Kualitas Spermatozoa Serta Kadar Hormon Testosteron. *Makara Kesehatan*, 16: 9-16.
- Nurmasyitah. 2018. Pengaruh Medan Listrik Terhadap Gerak Acak dan Viabilitas Spermatozoa Mencit (*Mus musculus*). *Jurnal IPA dan Pembelajaran IPA*, 2(2):1-10.
- Oka, T. G. 1998. *Penuntun Praktikum Patologi Klinik*. Bagian Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Udayana. Denpasar.
- Paget, G.E., & Barnes, J.M. 1964. Toxicity Test. *Evaluation of Drug Activities Pharmacometrics*, 1:161-62.
- Pamungkas, W. 2013. Aplikasi vitamin E Dalam Pakan: Kebutuhan dan Peranan Untuk Meningkatkan Reproduksi, Sistem Imun, dan Kualitas Daging Pada Ikan. *Media Akuakultur*, 8(2): 145-150.

- Patil., Rahul, B., Vora, Shreya R., Milai., & Meena M. 2009. Antioxidant effect of Plant Extracts on Phospholipids Levels in Oxidatively Stressed Male Reproductive Organs in Mice. *Iranian Journal of Reproductive Medicine* 1(7): 35-39.
- Pebrianti, N. M. L. 2013. Kualitas Spermatozoa Mencit Jantan Dewasa (*Mus musculus* L.) Setelah Diberikan Monosodium Glutamat (MSG). *Jurnal Simbiosis*, 1(1): 40-50.
- Pereira, R., Sa, R., Barros, A., & Sousa, M. 2017. Major Regulatory Mechanisms Involved in Sperm Motility. *Asian Journal of Andrology*, 19(1): 5–14.
- Pineda, J. A. 2005. The Functional Significance of mu Rhythms: Translating Seeing and Hearing into Doing. *Brain Research Reviews*, (50): 57-68.
- Plant, T. M. 2015 '60 Years of Neuroendocrinology: The Hypothalamo-Pituitary–Gonadal Axis', *Journal of Endocrinology*, 226(2): T41–T54.
- Prasetyo, A.D., & Sasongko, H. 2014. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol 70% Daun Kersen (*Muntingia calabura* L.) Terhadap Bakteri *Bacillus subtilis* dan *Shigella dysenteriae*. *JUPEMASI-PBIO*, (1)1: 98-102.
- Pubiandara, S., Sri, S., & Madi, H. 2016. Pengaruh Penambahan Dosis Rofinosa Dalam Pengencer Sitrat Kuning Telur Terhadap Motilitas, Presentase Hidup, dan Abnormalitas Spermatozoa Sapi Ongole. *Jurnal Ilmiah Peternakan Terpadu*, 4(4): 292-299.
- Puspitasari, A. D., & Wulandari, R. L. 2017. Aktivitas Antioksidan dan Penetapan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Etil Asetat Daun Kersen (*Muntingia calabura*). *Jurnal Pharmascience*, 4(2): 167–175.
- Putri, AP. 2015. Efek Vitamin C terhadap Spermatozoa yang Diberi Paparan Asap Rokok. *J Majority*. 4(1).
- Quratul'aini, S. 2006. Pengaruh Pemberian Vitamin E Terhadap Jumlah Spermatozoa Mencit Jantan yang Diberi Paparan Asap Rokok. *Skripsi*. Universitas Diponegoro. Semarang.
- Rahmadiani, D. 2021. Ekstrak Pollen Kurma (*Phoenix dactylifera* L) Sebagai Terapi Infertilitas Pada Pria. *Jurnal Ilmiah Kesehatan Sandi Husada*. 10(1), 31–40.
- Ramadas, D., Muhammad A.K.Y., & Mudasada, S.C. 2015. Antioxidant Activity: Root, Leaves, and Fruits Aqueous Extracts of *Muntingia calabura*. *JIPBS*, 2(4): 363-368.
- Ramadhani, D. 2007. Pengaruh Pemberian Ekstrak *Pimpinella pruatja* Molkenb (Purwoceng) Fraksi Kloroform Secara Oral Terhadap Kualitas Spermatozoa

Mus musculus L. (Mencit) Jantan Galur DDY. Skripsi. Departmen Biologi FMIPA-UI, Depok.

- Rizki, C. D., Kurniasari, D., & Maulana, A. M., & Zuliyanto, A. 2019. Pengaruh Ekstrak Etanol Daun Kemangi (*Ocimum basillicum*) terhadap Kadar Ureum dan Kreatinin Tikus Galur Wistar Jantan (*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi Monosodium Glutamat (MSG). *Herb-Medicine Journal*. 2(1):12-19.
- Rizzo, D. 2010. Fundamentals Of Anatomy & Physiology (3rd ed.). Thomson Learning International Division.
- Robertis, E. D. P. 1997. *Cell and Molecular Biology: Meiosis and Sexual Reproduction*. Lea and Febiger, Philadelphia.
- Ros, E. 2010. Health Benefits of Nut Consumption. *Nutrients*, (2): 652–82.
- Rudzinska, Magdalena, Korczak, Jozef, Gramza, Anna, Wasowicz, Erwin, Dutta., & Pares. 2008. Inhibition of Stigmasterol Oxidation by Antioxidants in Purified Sunflower Oil. *Journal of AOAC International*, 87 (2): 499-504.
- Rumanta, M. T. W., Surjono & Sudarwati, S. 2001. Pengaruh Asam Metoksiasetat Terhadap Organ Reproduksi Mencit (*Mus musculus*) Swiss Webster Jantan. *Prosiding Institut Teknologi Bandung*. 33(2).
- Sadowska, B.I., & Bartosz, G. 2015. Prevention of Protein Glycation by Natural Compounds. *Molecule*, 20(2): 3309-3334.
- Saleh, R. A., Agarwal, A. 2002. Oxidative Stress and Male Infertility: From Research Bench to Clinical Practice. *J*, 23(6).
- Salman, T.M., Olayaki, L.A., Alagbonsi, I.A., & Oyewopo, A.O. 2016. Spermatotoxic Effects of Galactose and Possible Mechanisms of Action. *Middle East Fertility Society Journal*, 21: 82-90.
- Saputri, A. 2007. Pengaruh Pemberian Ekstrak Kedelai (*Glycine max*) Terhadap Motilitas Sperma Mencit Balb/c Jantan. *Karya Tulis Ilmiah*. Semarang. Fakultas Kedokteran UNDIP.
- Sari, I. D. 2009. *Handbook of Cermin Dunia Kedokteran*. Pusat Penelitian dan Pengembangan PT. Kalbe Farma, Indonesia, 36(2): 89–93.
- Sari, W. N., Saebani, S., & Dhanardhono, T. 2018. Pengaruh Pemberian Butylated Hydroxytoluene (2,6-di-tert-butyl-4-methylphenol) Per Oral Dosis Bertingkat Terhadap Gambaran Histopatologis Hepar Tikus Wistar. *Jurnal Kedokteran Diponegoro*, 7(2): 1344-1357.
- Sen, S., Chakraborty, R. 2011. The Role of Antioxidants in Human Health. *Oxidative Stress Diagnostics*, 1083: 1–37.

- Setiawan, A. 2005. Viabilitas Spermatozoa Mencit (*Mus musculus*) Jantan Setelah Pemberian Ekstrak Kuda Laut. *Jurnal Penelitian Sains*, 17:25-34.
- Setyaningsih, V. R. 2011. Pengaruh Pemberian Infus Simplisia Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) Secara Oral Terhadap Kualitas Spermatozoa Mencit (*Mus musculus* L.) Jantan Galur DDY. *Skripsi*. Depok: Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam Departemen Biologi UI. 14.
- Situmorang, N. 2021. Pengaruh Pemberian D-Galaktosa Terhadap Berat Badan Mencit Betina. *Majalah Ilmiah METHODA*, 11(2): 133–137.
- Shaikh, N. H., Deshmukh., Vidya M., Walvekar, & Madhuri, V. 2015. Alteration in Testicular Morphology and Sperm Count due to Glycowithanolides Treatment during Aging. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 3(8): 72-77.
- Sherwood, L. 2012. *Fisiologi Manusia Dari Sel ke Sistem*. 6th ed. Jakarta: EGC.
- Sherwood, L. 2015. *Human Physiology: From Cell to Systems*. *Cengage Learning*. Vol 2. EGC. Jakarta.
- Situmorang, N., & Zulham, Z. 2020. Malondialdehyde (Mda) (Zat Oksidan Yang Mempercepat Proses Penuaan). *Jurnal Keperawatan Dan Fisioterapi (Jkf)*, 2(2): 117–123.
- Smith, JB., & Mangkoewidjojo S. 1988. *Pemeliharaan, Pembiakan, dan Penggunaan Hewan Percobaan di Daerah Tropis*. Penerbit Universitas Indonesia. Jakarta.
- Soehadi, K. 1987. Mencari Kontrasepsi Pria Dengan Meneliti Khasiat Obat-Obatan Tradisional. *Medika*. 13-17.
- Sudatri, N.W., Ni Made, S., Anak Agung, S.A.A., & Dwi, A.Y. 2015. Kualitas Spermatozoa Mencit yang Terpapar Radiasi Sinar-X Secara Berulang. *Jurnal Veteriner*, 16(1):56-61.
- Sulistyoingrum, E. 2017. D-Galactose Induced Animal Model of Male Reproductive Aging. *Jurnal Kedokteran dan Kesehatan Indonesia*. Vol. 8. 19-28.
- Sukmaningsih. 2009. Penurunan Jumlah Spermatisit Pakiten dan Spermatid Tubulus Seminiferus Testis Pada Mencit (*Mus musculus*) yang Dipaparkan Asap Rokok. *Jurnal Biologi XIII*, (2): 31-35.
- Sukmaningsih, S., Ermayanti, I. G. A. M., Wiratmini, N. I., & Sudatri, N. W. 2009. Gangguan Spermatogenesis Setelah Pemberian Monosodium Glutamat Pada Mencit (*Mus musculus* L.). *Jurnal Biologi*, XV(2): 49–52.

- Sukmawati, E., Arifianti, R. I., & Purwantara, B. 2014. Daya Tahan Spermatozoa terhadap Proses Pembekuan pada Berbagai Jenis Sapi Pejantan Unggul. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner*, 19(3): 168-175.
- Surjowardojo, P., Sarwiyono, I., & Thohari A.R. 2014. Quantitative and Qualitative Phytochemicals Analysis of *Muntingia calabura*. *J Biol Agric Health*, 4: 84-88.
- Susmiarsih, T. 2010. Peran Genetik DNA Mitokondria (mtDNA) Pada Motilitas Spermatozoa. *Pharma Medika*, 2 (2): 1-7.
- Sutyarso., Annida, S., Kanedi, M., Busman, H., & Nurcahyani, N. 2018. Penurunan Laju Penuaan Reproduksi Mencit Jantan (*Mus musculus* Linn.) Dengan Pemberian Ekstrak Jahe (*Zingiber officinale*) Dalam Pakan. *Jurnal Biologi Eksperimen dan Keanekaragaman Hayati*, 5(1): 1-10.
- Syabania, M., Pambudi, D. B., Wirasti, W., & Rahmatullah, S. 2021. Karakteristik dan Evaluasi Granul Ekstrak Daun Kersen (*Muntingia calabura* L.) dengan Metode Granulasi Basah. *Prosiding Seminar Nasional Kesehatan*, 1: 1737–1746.
- Syahara, S., Harahap, U., & Widyawati, T. 2019. Activity of *Muntingia calabura* Leaves Ethanolic Extract on Glucose and Insulin Blood Levels in Streptozotocin Induced Rat. *Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development*, 7(4): 8-11.
- Syarif, Y. M., Bachri, M. S., & Nurain, L. H. 2016. Potensi Ekstrak Etanol 70% Akar Saluang Balum (*Lavanga sermentosa* blume kurz) Terhadap Kualitas dan Viabilitas Sperma Mencit. *Pharmaciana*, 6(2): 131-138.
- Tian, J., Ishibashi, K., Reiser, K., Grebe, R., & Biswal, S. 2005. Penuaan Lanjutan yang Disebabkan Oleh Produk Akhir Glikasi dari Epitel Pigmen Retina dan Koroid: Respons Transkripsional yang Komprehensif. *Proc Natl Acad Sci AS*, 102: 11846–51.
- Toilehere, M.R. 1985. *Fisiologi Reproduksi pada Ternak*. Bandung: Penerbit Angkasa.
- Tortora, G. J., & Derrickson, B. 2014. *Principles of Anatomy and Physiology*, in *Principles of Anatomy and Physiology* (14th ed.). United States of America: John Wiley & Sons.
- Umbayev, B., Askarova, S., Almbayeva, A., Saliev, T., Masoud, A. R., & Dennis, B. 2020. Galactose Induced Skin Aging: The Role of Oxidative Stress. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 1-15.
- Valli, H., Phillips, B. T., Shetty, G., Byrne, J. A., Clark, A. T., Meistrich, M. L., & Orwig, K. E. 2014. Germline Stem Cells: Toward the Regeneration of

- Spermatogenesis. *Fertility and Sterility*, 101(1): 3–13.
- Van Langendonckt, A., Casanas Roux, F., & Donnez, J. 2002. Oxidative Stress and Peritoneal Endometriosis. *Fertility and Sterility*. (77): 70-861.
- Venkatesh, S., Pharm, M., Singh, G., Gupta, N. P., Kumar, R., Deecaraman, M., & Dada, R. 2009. Correlation of Sperm Morphology and Oxidative Stress in Infertile Men. *Iran J Reprod Med*, 7(1): 29-34.
- Verstraeten, S. V., Oteiza, P. I., & Fraga, C. G. 2004. Membrane Effect of Cocoa Procyanidins in Liposome and Jurkat. *Bio Res*, 37(2): 293-300.
- Whittingham, D. G., & Wood, M. J. 1993. Reproductive Physiology. *The Mouse in Biomedical Research*, (3).
- Wibisono, Herman. 2010. *Atlas Spermatologi (Buku Kedua dari Panduan Laboratorium Andrologi)*. Reflika Aditama: Bandung.
- Widhiantara, I. G., & Permatasari, A. A. A. P. 2017. Terapi Testosteron Meningkatkan Jumlah Sel Leydig dan Spermatogenesis Mencit (*Mus Musculus*) yang Mengalami Hiperlipidemia. *Jurnal Media Sains*, 1(2), 77–83.
- Winarsih, H. 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Yogyakarta: Kanisi.
- Yusharyahya, S. N. 2021. Mekanisme Penuaan Kulit sebagai Dasar Pencegahan dan Pengobatan Kulit Menua. *EJournal Kedokteran Indonesia*, 9(2): 150.
- Ye, Y., Jia, R. R., Tang, L., & Chen, F. 2014. In vivo Antioxidant and Anti Skin Aging Activities of Ethyl Acetate Extraction From *Idesia Polycarpa* Defatted

Fruit Residue in Aging Mice Induced by D-Galactose. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*, 185716. 1-12.

Yeung, H. W., & Chan, W. Y. 1993. Antiproliferative and Teratogenic Activities From Seed of *Luffa aegyptiaca*. *Gen Pharmacology*, 24(3): 655.

Yusuf, M., Al-Gizar, R. M., Rorong, A. Y. Y., Badaring, R. D., Aswanti, H., Ayu, M. S., Nurazizah, Dzalsabila, A., Ahyar, M., Wulan, W., Putri, Jelita M., & Arisma, F. W. 2022. Percobaan Memahami Perawatan Dan Kesejahteraan Hewan Percobaan. *Jurusan Biologi FMIPA Program Studi Biologi*, 1–109.

Zahara, M., & Suryady. 2018. Kajian Morfologi dan Review Fitokimia Tumbuhan Kersen (*Muntingia calabura* L). *jurnal ilmiah pendidikan dan pembelajaran*, 5(2): 69-74.

Zakaria, Z.A., Sani, M.H.M., Cheema, M.S., Kader, A.K., Kek, T.L., & Salleh, M.Z. 2014. Antinociceptive Activity of Methanolic Extract of *Muntingia calabura* Leaves: Further Elucidation of The Possible Mechanisms. *BioMedCenter Complementary and Alternative Medicine*, 14:63.

Zulaikhah, S. T. 2017. The Role of Antioxidants to Prevent Free Radicals in The Body. *Jurnal Sains Medika*, 8(1): 39-45.