

PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL LADA HITAM (*Piper nigrum L*) PADA ANALISIS SEMEN (KONSENTRASI, MOTILITAS, MORFOLOGI SPERMA) MODEL DIABETES TIKUS PUTIH JANTAN *Rattus novergicus*

(SKRIPSI)

Oleh

MAYANG SYIFA CANIA

NPM. 2158011007



**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG**

2025

PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL LADA HITAM (*Piper nigrum L*) PADA ANALISIS SEMEN (KONSENTRASI, MOTILITAS, MORFOLOGI SPERMA) MODEL DIABETES TIKUS PUTIH JANTAN *Rattus novergicus*

Oleh

Mayang Syifa Cania

2158011007

Skripsi

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

Pada

Fakultas Kedokteran Universitas Lampung



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

2025

Judul Skripsi : **PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL LADA HITAM (*Piper nigrum L*) PADA ANALISIS SEMEN (KONSENTRASI, MOTILITAS, MORFOLOGI SPERMA) MODEL DIABETES TIKUS PUTIH JANTAN *Rattus novvergicus***

Nama Mahasiswa : **Mayang Syifa Cania**

No. Pokok Mahasiswa : 2158011007

Program Studi : Pendidikan Dokter

Fakultas : Kedokteran



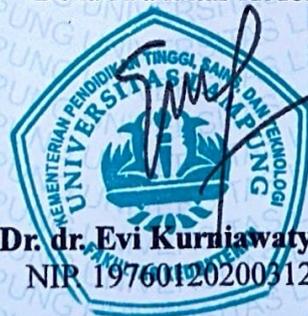
Pembimbing 1

Pembimbing 2

dr. Exsa Hadibrata, S.Ked., Sp.U
NIP. 198612082010121006

dr. Intan Kusumaningtyas, Sp. OG, MPH
NIP. 198707242022032006

2. Dekan Fakultas Kedokteran

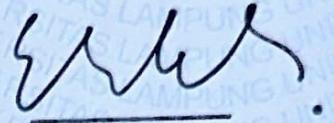


Dr. dr. Evi Kurniawaty, M.Sc
NIP. 197601202003122001

MENGESAHKAN

1. **Tim Penguji**

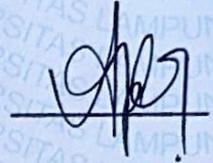
Ketua : dr. Exsa Hadibrata, S.Ked., Sp.U



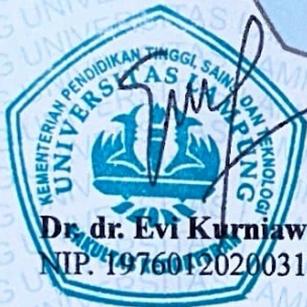
Sekretaris : dr. Intan Kusumaningtyas, Sp.OG, MPH



**Penguji
Bukan Pembimbing : Dr. dr. Ety Apriliana, S.Ked., M.Biomed**



2. **Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Lampung**



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

Tanggal Lulus Ujian Skripsi : 22 Januari 2025

LEMBAR PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan dengan sebenarnya, bahwa:

1. Skripsi dengan judul **“PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL LADA HITAM (*Piper nigrum L*) PADA ANALISIS SEMEN (KONSENTRASI, MOTILITAS, MORFOLOGI SPERMA) MODEL DIABETES TIKUS PUTIH JANTAN *Rattus novergicus*”** adalah hasil karya saya sendiri dan tidak melakukan penjiplakan atau pengutipan atas karya penulis lain dengan cara tidak sesuai dengan tata etika ilmiah yang berlaku dalam masyarakat akademik atau yang disebut plagiat.
2. Hak intelektualitas atas karya ilmiah ini diserahkan sepenuhnya kepada Universitas Lampung.

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

Bandar Lampung, 22 Januari 2025

Pembuat Pernyataan



Mayang Syifa Cania

RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan di Tanjung Karang tanggal 17 Januari tahun 2003. Anak kedua dari dua bersaudara. Dari pasangan bapak Saeful Hidayat dan ibu Rina Kusumawardani.

Penulis telah menempuh pendidikan di Taman Kanak-Kanak 02 Yapindo pada tahun 2008, Sekolah Dasar (SD) 02 Yapindo pada tahun 2010, Sekolah Menengah Pertama (SMP) Gula Putih Mataram pada tahun 2016, dan Sekolah Menengah Atas Negeri (SMAN) 9 Bandar Lampung pada tahun 2018.

Pada tahun 2021, penulis terdaftar sebagai salah satu Mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Selama menjadi mahasiswa, penulis telah aktif dalam Lembaga Kemahasiswaan (LK) yang ada di Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Pada tahun 2022-2024 penulis telah bergabung pada Badan Eksekutif Mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Insyaa Allah pada tahun ini akan menghantarkan penulis untuk mendapatkan gelar Sarjana Kedokteran.

Persembahkan kecil untuk keluarga terbaikku:

Papa, Mama dan Kakak tercinta.

*Sehat selalu dan panjang umur ya, dunia terlalu berat jika dijalani tanpa doa
dari kalian disetiap langkah.*

**Allah punya milyaran pintu rezeki, milyaran jalan keluar, milyaran
kemudahan, kita hanya perlu untuk tidak putus asa dengan Rahmat-Nya**

(Q.S At-Talaq : 03)

SANWACANA

Alhamdulillahirabbil'alamin, puji dan syukur penulis ucapkan kepada Allah SWT yang telah melimpahkan segala rahmat dan karunia-Nya sehingga skripsi dengan judul **“PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL LADA HITAM (*Piper nigrum L*) PADA ANALISIS SEMEN (KONSENTRASI, MOTILITAS, MORFOLOGI SPERMA) MODEL DIABETES TIKUS PUTIH JANTAN *Rattus novergicus*”** sebagai syarat untuk mendapatkan gelar sarjana kedokteran di Universitas Lampung dapat diselesaikan. Keberhasilan dalam penyusunan skripsi ini telah banyak dibantu oleh berbagai pihak. Ucapan terimakasih yang sebesar-besarnya saya berikan kepada:

1. Prof. Dr. Ir. Lusmeilia Afriyani, S.T., D.E.A., IPM., ASEAN.Eng., selaku Rektor Universitas Lampung
2. Dr. dr. Evi Kurniawaty, S.Ked., M.Sc., selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Lampung yang membantu dalam proses pembelajaran semua kuliah dan penyelesaian skripsi.
3. dr. Exsa Hadibrata, S.Ked, Sp.U., selaku pembimbing 1 saya yang telah memberikan banyak sekali bimbingan, saran, motivasi, hingga dukungan selama proses penyusunan skripsi dan proses penelitian.
4. dr. Intan Kusumaningtyas, Sp.OG, MPH., selaku pembimbing 2 saya yang senantiasa memberikan masukan, bimbingan, dan kesempatan waktu dalam

proses pembelajaran dan tempatnya untuk memberikan kritik serta saran dalam penyelesaian skripsi ini.

5. Dr. dr. Ety Apriliana, M.Biomed., selaku pembahas atas kesediannya dalam membahas serta memberikan kritik dan saran yang membangun dalam penyelesaian skripsi ini dan diberikan ketersediaan untuk memberi pelajaran pada perkuliahan.
6. dr. Intanri Kurniati, Sp.PK., selaku Kaprodi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung yang membantu dalam proses pembelajaran semua kuliah.
7. dr. Risti Graharti, S.Ked., M.Ling selaku pembimbing akademik penulis selama penulis menjadi mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Lampung yang telah memberikan masukan dan dukungan dalam bidang akademik.
8. Semua dosen pengajar dan karyawan Fakultas Kedokteran Universitas Lampung yang membantu dalam proses pembelajaran semua kuliah dan penyelesaian skripsi ini.
9. Kedua orang tua tercinta, dengan rasa syukur yang tak terhingga, penulis mengucapkan terima kasih kepada Papa Saeful Hidayat dan Mama Rina Kusumawardani, atas limpahnya doa, cinta, dukungan, kasih sayang yang tak pernah putus dan motivasi sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini. Semoga Papa dan Mama selalu diberikan Kesehatan dan umur Panjang, karena penulis akan senantiasa membutuhkan doa Papa dan Mama dalam setiap Langkah dan pencapaian hidup penulis.
10. Saudara kandung penulis kakak Iran Raksa Hidayat, yang selalu memberikan semangat, doa dan motivasi kepada penulis. *He is the*

strongest man I know with a heart of gold. Thank you for always being there for me. I hope ur my brother in every universe we live in.

11. Segenap keluarga besar penulis yang telah memberi dukungan dan doa kepada penulis.
12. Sahabat-sahabat penulis sejak SMA; Azqiya Putri, Imel Queen, Rizky Nazolla, Andini Ayu, Natasya Azri, Fasya, dan Dea Shakila. Terima kasih sudah menjadi keluarga tak sedarah yang selalu ada dengan memberikan dukungan yang tulus, selalu merayakan penulis dan menjadi pendengar yang baik. *I would choose you guys to be my bestie in every lifetime again and again.*
13. Kepada teman-teman Kiyowo, terima kasih sudah menjadi bagian penting dalam perjalanan selama 3,5 tahun ini. Mulai dari daring, sesi ganjil genap, dan akhirnya kita bisa belajar di ruangan yang sama. Terimakasih juga untuk segala kebersamaan, dukungan dan semangat yang tak pernah pudar.
14. Kepada teman-teman Rumdin, terimakasih untuk segala tempat yang nyaman, waktu dan perasaan kebersamaan selama menjadi teman belajar masa kuliah ini.
15. Kepada teman satu bimbingan dan penelitian, terimakasih atas semangat, dukungan, kesabaran, serta kebersamaan selama penelitian skripsi ini berlangsung.
16. Semua pihak yang tidak bisa disebutkan satu persatu yang telah memberikan dukungan serta menyumbangkan ilmu, ide, dan pemikirannya dalam pembuatan skripsi ini.

Akhir kata penulis menyadari bahwa skripsi ini masih sangat jauh dari kata sempurna. Penulis berharap semoga Allah SWT senantiasa mencurahkan rahmat dan hidayah-Nya kepada semua pihak yang telah banyak membantu. Semoga skripsi ini dapat menjadi sesuatu yang bermanfaat, segala saran dan masukan akan penulis terima dengan senang hati.

Bandar Lampung, 2025

Penulis

Mayang Syifa Cania

ABSTRACT

EFFECT OF ADMINISTRATION OF BLACK PEPPER ETHANOL EXTRACT (*Piper nigrum* L) IN CEMENT ANALYSIS (CONCENTRATION, MOTILITY, SPERM MORPHOLOGY) MALE WHITE RAT DIABETES MODEL *Rattus norvegicus*

By

Mayang Syifa Cania

*Introduce: Diabetes mellitus (DM) is a chronic metabolic disease that can cause male reproductive disorders due to oxidative stress that inhibits spermatogenesis. One potential alternative therapy for infertility caused by DM is the use of antioxidant-active plants, such as black pepper (*Piper nigrum* L.). This study aims to evaluate the effect of black pepper ethanol extract on the concentration, motility, and morphology of spermatozoa in male white rats (*Rattus norvegicus*) as a diabetes model.*

Method: This is an experimental study with a Posttest-Only Randomized Control Group design. A total of 24 rats were divided into four groups: negative control (K1), positive control (K2, rats induced with alloxan 150 mg/kg body weight), and two treatment groups with black pepper extract at doses of 13 mg/kg body weight (P1) and 24.5 mg/kg body weight (P2). Diabetes was induced by intraperitoneal injection of alloxan, followed by the administration of the extract for 8 days. The concentration, motility, and morphology of spermatozoa were measured using a Neubauer counting chamber and a light microscope. Data analysis was performed using Kruskal-Wallis and Post Hoc LSD tests.

Result: The results showed that the P2 group had the highest sperm concentration (158.16 million cells/mL) and motility (3.16%) compared to the other groups, with lower abnormal sperm morphology compared to the positive control. Statistical tests showed significant differences between groups ($p < 0.05$).

Conclusion: In conclusion, black pepper extract has the potential to improve sperm quality in a diabetes model rat through the antioxidant activity of piperine. Further research is needed to explore the molecular mechanisms and its clinical potential in humans.

Keywords: Diabetes mellitus, spermatogenesis, black pepper, antioxidants, piperine

ABSTRAK

PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL LADA HITAM (*Piper nigrum L*) PADA ANALISIS SEMEN (KONSENTRASI, MOTILITAS, MORFOLOGI SPERMA) MODEL DIABETES TIKUS PUTIH JANTAN *Rattus norvegicus*

Oleh

Mayang Syifa Cania

Pendahuluan: Diabetes mellitus (DM) merupakan penyakit metabolik kronis yang dapat menyebabkan gangguan reproduksi pria akibat stres oksidatif yang menghambat spermatogenesis. Salah satu terapi alternatif potensial untuk infertilitas akibat DM adalah penggunaan tanaman beraktivitas antioksidan, seperti lada hitam (*Piper nigrum L.*). Penelitian ini bertujuan mengevaluasi pengaruh ekstrak etanol lada hitam terhadap konsentrasi, motilitas, dan morfologi spermatozoa tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) model diabetes.

Metode: Jenis penelitian adalah eksperimental dengan rancangan *Posttest-Only Randomized Control Group*. Sebanyak 24 ekor tikus dibagi menjadi empat kelompok: kontrol negatif (K1), kontrol positif (K2, tikus yang diinduksi aloksan 150 mg/kgBB), serta dua kelompok perlakuan dengan ekstrak lada hitam dosis 13 mg/kgBB (P1) dan 24,5 mg/kgBB (P2). Induksi diabetes dilakukan dengan aloksan secara intraperitoneal, diikuti pemberian ekstrak selama 8 hari. Konsentrasi, motilitas, dan morfologi spermatozoa diukur menggunakan bilik hitung *Neubauer* dan mikroskop cahaya. Analisis data menggunakan uji *Kruskal-Wallis* dan *Post Hoc LSD*.

Hasil: Hasil penelitian menunjukkan kelompok P2 menunjukkan konsentrasi (158,16 juta sel/mL) dan motilitas spermatozoa (3,16%) tertinggi dibandingkan kelompok lain, dengan morfologi spermatozoa abnormal yang lebih rendah dibandingkan kontrol positif. Uji statistik menunjukkan perbedaan signifikan antar kelompok ($p < 0,05$).

Kesimpulan: Ekstrak lada hitam berpotensi meningkatkan kualitas sperma pada tikus model diabetes melalui aktivitas antioksidan piperin. Penelitian lebih lanjut diperlukan untuk eksplorasi mekanisme molekuler dan potensi klinisnya pada manusia.

Kata Kunci: Diabetes mellitus, spermatogenesis, lada hitam, antioksidan, piperin

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR ISI	i
DAFTAR TABEL	iv
DAFTAR GAMBAR	v
DAFTAR LAMPIRAN	vi
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.4 Manfaat Penelitan	3
 BAB II TINJAUAN PUSTAKA	 5
2.1 Diabetes Mellitus.....	5
2.1.1 Pengertian diabetes.....	5
2.1.2 Epidemiologi	5
2.1.3 Patogenesis Diabetes Mellitus.....	6
2.2 Spermatozoa	10
2.2.1 Morfologi Spermatozoa	10
2.2.2 Konsentrasi Spermatozoa.....	12
2.2.3 Motilitas Spermatozoa	13
2.2.4 Spermatogenesis.....	13
2.3 Pengaruh Diabetes Melitus terhadap Kualitas Spermatozoa.....	16
2.4 Lada Hitam (<i>Piper nigrum L</i>).....	17
2.4.1 Biji Lada Hitam.....	17
2.4.2 Klasifikasi Lada Hitam (<i>Piper nigrum L</i>)	17
2.4.3 Kandungan Lada Hitam (<i>Piper nigrum L</i>).....	17

2.4.4	Manfaat Piperin dalam Sistem Reproduksi Pria	18
2.4.5	Manfaat Piperin pada Pasien dengan Diabetes Melitus	18
2.5	Aloksan.....	19
2.5.1	Mekanisme Aloksan dalam Diabetes Mellitus.....	19
2.6	Hewan Coba Tikus Putih Jantan (<i>Rattus norvegicus</i>)	20
2.6.1	Klasifikasi Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>) Galur <i>Sprague Dawley</i>	20
2.6.2	Karakteristik Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>) Galur <i>Sprague Dawley</i>	20
2.6.3	Siklus Spermatogenesis Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>) Galur <i>Sprague Dawley</i>	21
2.7	Kerangka Teori.....	22
2.8	Kerangka Konsep	23
2.9	Hipotesis	23
BAB III METODE PENELITIAN		24
3.1	Jenis dan Desain Penelitian	24
3.2	Waktu dan Tempat Penelitian	24
3.2.1	Waktu Penelitian	24
3.2.2	Tempat Penelitian.....	24
3.3	Subyek Penelitian	24
3.3.1	Populasi	24
3.3.2	Sampel.....	24
3.3.3	Kelompok Perlakuan.....	26
3.4	Identifikasi Variabel dan Definisi Operasional	26
3.4.1	Variabel Penelitian	26
3.4.2	Definisi Operasional.....	27
3.5	Alat dan Bahan Penelitian	29
3.5.1	Alat Penelitian	29
3.5.2	Bahan Penelitian.....	29
3.6	Prosedur Penelitian	29
3.6.1	Pengadaan Hewan Uji	29

3.6.2	Pemeliharaan Hewan Uji.....	29
3.6.3	Pengamatan dan Terminasi Hewan Uji.....	30
3.6.4	Pembuatan Ekstrak Lada Hitam.....	30
3.6.5	Prosedur Analisis Profil Kimia Ekstrak EtOH Lada Hitam.....	31
3.6.6	Induksi Aloksan	32
3.6.7	Pembedahan	33
3.6.8	Pengambilan dan Pengamatan Spermatozoa.....	33
3.7	Analisis Data	35
3.8	Alur Penelitian.....	37
3.9	Etika Penelitian.....	38
BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN.....		39
4.1	Hasil Penelitian.....	39
4.2	Pembahasan	47
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....		53
5.1	Kesimpulan.....	53
5.2	Saran.....	53
DAFTAR PUSTAKA		55

DAFTAR TABEL

	Halaman
Lampiran 1. Jadwal penelitian	61
Lampiran 2. Hasil pemeriksaan gula darah.....	61
Lampiran 3. Pembedahan.....	61
Lampiran 4. Alokasan.....	62
Lampiran 5. Ekstrak lada hitam	62
Lampiran 6. Hasil pemeriksaan sperma	62
Lampiran 7. Sperma Tikus.....	63
Lampiran 8. Analisis data	65

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Morfologi sperma (WHO, 2021).....	12
Gambar 2. Proses Spermatogenesis (Sadewo et al., 2019).....	15
Gambar 3. Mekanisme Aloksan (Wulandari et al., 2024).....	20
Gambar 4. Kerangka Teori.....	22
Gambar 5. Kerangka Konsep.....	23
Gambar 6. Alur Penelitian.....	37
Gambar 7. Hasil kandungan lada hitam.....	39
Gambar 8. Sperma normal (A), sperma abnormal (B).....	41

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Jadwal penelitian	61
Lampiran 2. Hasil pemeriksaan gula darah.....	61
Lampiran 3. Pembedahan.....	61
Lampiran 4. Aloksan	62
Lampiran 5. Ekstrak lada hitam	62
Lampiran 6. Hasil pemeriksaan sperma	62
Lampiran 7. Sperma Tikus Normal.....	63
Lampiran 8. LC-MS/MS data ekstrak etanol Lada Hitam	74

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Diabetes mellitus adalah penyakit metabolik kronis yang tidak menular, ditandai dengan meningkatnya kadar glukosa dalam darah (hiperglikemia) akibat gangguan pada sekresi atau fungsi insulin, atau kombinasi keduanya. Meskipun penyakit ini tidak dapat disembuhkan, kondisi tersebut masih dapat dikontrol. Diabetes mellitus juga dapat memicu berbagai gangguan kesehatan, termasuk masalah medis, psikologis, dan seksual, yang pada akhirnya berpotensi menyebabkan infertilitas (Suarni *et al.*, 2020). Diabetes melitus (DM) dan infertilitas semakin sering dijumpai di masyarakat saat ini. Kurangnya pemahaman membuat banyak orang menganggap keduanya tidak saling berhubungan. Namun, berbagai penelitian menunjukkan bahwa diabetes melitus yang tidak terkontrol dapat menyebabkan infertilitas. Kadar glukosa darah yang tinggi pada penderita diabetes melitus berkontribusi terhadap kerusakan sel dengan meningkatkan produksi reactive oxygen species (ROS), yang kemudian memicu stres oksidatif pada jaringan dan merusak membran mitokondria. Stres oksidatif ini juga menyebabkan kerusakan pada endotel pembuluh darah, mengakibatkan mikroangiopati yang menghambat distribusi nutrisi melalui pembuluh darah ke jaringan yang berperan dalam pembentukan spermatozoa. Akibatnya, proses spermatogenesis di testis menjadi terganggu dan tidak berjalan dengan sempurna (Adelati *et al.*, 2016).

Testis dalam proses reproduksi mempunyai dua fungsi utama yaitu memproduksi hormon dan spermatozoa. Kedua fungsi tersebut secara anatomi berlangsung terpisah yaitu hormon testosteron dihasilkan oleh sel leydig, sedangkan sel spermatozoa dihasilkan oleh sel epitel tubulus seminiferus.

Stres oksidatif juga dapat mengganggu jalur *hypothalamus pituitary gonad axis* sehingga pengeluaran hormon menjadi tidak normal. Apabila sel-sel dan hormon pada testis mengalami gangguan maka tahapan spermatogenesis akan terganggu, menyebabkan produksi spermatozoa berkurang, dan pada akhirnya berujung pada masalah infertilitas (Adelati *et al.*, 2016).

Infertilitas adalah kondisi yang ditandai dengan ketidakmampuan mencapai kehamilan setelah satu tahun berhubungan seksual tanpa menggunakan kontrasepsi. Masalah ini menjadi perhatian serius dalam hubungan suami-istri karena tidak hanya berdampak pada kesehatan, tetapi juga memengaruhi aspek ekonomi dan psikologis akibat proses evaluasi serta pengobatan yang panjang. Infertilitas dapat terjadi pada pria, wanita, atau keduanya. Meskipun sering dikaitkan dengan masalah reproduksi wanita, penelitian menunjukkan bahwa faktor pria berkontribusi pada 45-50% kasus infertilitas. Infertilitas pada pria dapat disebabkan oleh berbagai faktor, termasuk ketidakseimbangan hormon dan kelainan pada sperma (Pairunan *et al.*, 2022).

Biaya pengobatan diabetes melitus (DM) dan infertilitas tergolong tinggi, sehingga diperlukan upaya pengembangan alternatif pencegahan dan pengobatan yang lebih terjangkau serta menggunakan bahan yang mudah diperoleh. Penggunaan obat herbal telah lama menjadi bagian dari kehidupan manusia, terutama di negara berkembang, sebagai solusi dalam perawatan kesehatan. Di Indonesia, berbagai rempah-rempah berpotensi digunakan sebagai alternatif pengobatan infertilitas pada pasien dengan diabetes melitus, salah satunya adalah lada hitam (Harahap *et al.*, 2017). Lada hitam (*Piper nigrum* L.) adalah tanaman yang dimanfaatkan sebagai rempah-rempah sekaligus obat tradisional dalam pengobatan masyarakat Indonesia. Kandungan utama dalam lada hitam, yaitu alkaloid piperin, memberikan rasa pedas dan berperan sebagai antioksidan yang bermanfaat bagi kesehatan (Iskandar, 2021).

Antioksidan adalah substansi yang diperlukan tubuh untuk menetralkan radikal bebas dan mencegah kerusakan yang ditimbulkannya. Antioksidan menstabilkan radikal bebas dengan melengkapi kekurangan elektron yang dimiliki radikal bebas dan menghambat terjadinya reaksi berantai dari pembentukan radikal bebas yang dapat menimbulkan stres oksidatif (Harahap *et al.*, 2017). Penelitian yang dilakukan oleh Sutyarso & Kanedi, (2016) menunjukkan hasil yang sesuai pula. Penelitian ini menggunakan 25 mg dosis lada hitam dalam waktu 90 hari dengan perbandingan pelarut etanol dan air yang diberikan pada tikus jantan albino didapatkan hasil adanya peningkatan pada morfologi spermatozoa tikus (Sutyarso & Kanedi, 2016).

Berdasarkan uraian di atas, maka penulis tertarik untuk melakukan penelitian mengenai pengaruh pemberian ekstrak etanol lada hitam pada analisis semen (konsentrasi, motilitas, morfologi sperma) model diabetes Tikus putih jantan *Rattus norvegicus*. Penelitian dilakukan dengan induksi aloksan pada hewan uji tikus putih jantan.

1.2 Perumusan Masalah

Berdasarkan uraian di atas didapatkan permasalahan yaitu apakah ada pengaruh pemberian ekstrak etanol lada hitam pada analisis semen (konsentrasi, motilitas, morfologi sperma) model diabetes tikus putih jantan *Rattus norvegicus*.

1.3 Tujuan Penelitian

- a. Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol lada hitam pada analisis semen (konsentrasi, motilitas, morfologi sperma) model diabetes tikus putih jantan *Rattus norvegicus*.
- b. Mengetahui dosis terbaik ekstrak lada hitam diantara dua dosis penelitian.

1.4 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberi manfaat:

1. Bagi Penulis

Mendapatkan ilmu pengetahuan baru pada penulisan skripsi, dan dapat mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol lada hitam pada analisis semen (konsentrasi, motilitas, morfologi sperma) model diabetes tikus putih jantan *Rattus norvegicus*.

2. Bagi Pendidikan

Hasil penelitian pada skripsi ini dapat menjadi referensi pembelajaran serta pengembangan ilmu dalam bidang kedokteran mengenai pengaruh pemberian ekstrak etanol lada hitam pada analisis semen (konsentrasi, motilitas, morfologi sperma) model diabetes tikus putih jantan *Rattus norvegicus*.

3. Bagi Masyarakat

Hasil penelitian dapat menjadi sumber informasi agar masyarakat dapat mengetahui manfaat dari rempah-rempah di Indonesia terutama lada hitam yang berasal dari Lampung.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Diabetes Mellitus

2.1.1 Pengertian diabetes

Diabetes melitus (DM) merupakan kelompok penyakit metabolik yang ditandai dengan hiperglikemia akibat gangguan metabolisme karbohidrat, lemak, dan protein. Gangguan ini terjadi karena defisiensi insulin, penurunan efektivitas insulin, atau kombinasi keduanya. Pada diabetes tipe 1 dan tipe 2, faktor genetik dan lingkungan dapat menyebabkan penurunan massa atau fungsi sel β secara progresif, yang akhirnya memicu hiperglikemia. Setelah hiperglikemia terjadi, semua penderita diabetes memiliki risiko mengalami komplikasi kronis, meskipun tingkat perkembangannya dapat bervariasi (Petersmann *et al.*, 2018; ADA, 2022).

2.1.2 Epidemiologi

Indonesia menempati peringkat keempat sebagai negara dengan jumlah penderita diabetes terbanyak di dunia, setelah Amerika Serikat, China, dan India. Prevalensi diabetes di Indonesia diperkirakan akan mengalami peningkatan signifikan, mencapai 2-3 kali lipat pada tahun 2030 dibandingkan tahun 2000. Menurut Organisasi Kesehatan Dunia (WHO), jumlah penderita diabetes pada tahun 2000 tercatat sebanyak 171 juta orang dan diproyeksikan meningkat dua kali lipat menjadi 366 juta pada tahun 2030. Pusat Data dan Informasi Kementerian Kesehatan Republik Indonesia juga menyebutkan bahwa estimasi terakhir IDF (*International Diabetes Federation*) pada tahun 2035

terdapat 592 juta orang yang hidup dengan diabetes di dunia (Lestari & Zulkarnain, 2021).

2.1.3 Patogenesis Diabetes Mellitus

Resistensi insulin pada sel otot dan hati serta penurunan jumlah sel β pankreas merupakan mekanisme utama dalam patofisiologi diabetes melitus. Selain itu, beberapa organ lain juga berperan dalam perkembangan diabetes melitus tipe 2, termasuk jaringan lemak yang mengalami peningkatan lipolisis, saluran gastrointestinal yang mengalami defisiensi inkretin, sel α pankreas yang menyebabkan hiperglukagonemia, ginjal yang meningkatkan absorpsi glukosa, serta otak yang mengalami resistensi insulin. Gangguan pada organ-organ tersebut berkontribusi terhadap gangguan toleransi glukosa pada penderita diabetes. Secara garis besar patogenesis hiperglikemia disebabkan oleh sebelas hal (*egregious eleven*) yaitu:

a. Kegagalan sel β pancreas

Sel β pankreas berperan dalam memproduksi insulin, dan ketika fungsinya menurun secara signifikan, hal ini dapat menjadi indikasi terjadinya diabetes melitus. Beberapa obat antidiabetes yang bekerja dengan menstimulasi atau mendukung fungsi sel β pankreas meliputi sulfonilurea, meglitinid, agonis *glucagon-like peptide-1* (GLP-1), serta penghambat *dipeptidyl peptidase-4* (DPP-4) (Son & Accili, 2023).

b. Disfungsi sel α pankreas

Sel α pankreas berperan dalam regulasi kadar glukosa darah melalui sintesis dan sekresi glukagon. Saat tubuh berada dalam kondisi puasa, kadar glukagon dalam plasma meningkat, yang kemudian merangsang produksi glukosa oleh hati (*hepatic glucose production*). Untuk menghambat sekresi atau aktivitas glukagon, beberapa jenis obat antidiabetes dapat digunakan, termasuk *GLP-1 receptor agonist*, penghambat *dipeptidyl peptidase-4* (DPP-4), dan amylin (Dludla *et*

al., 2023).

c. Sel lemak

Sel lemak berkontribusi terhadap peningkatan lipolisis, yang menyebabkan peningkatan kadar asam lemak bebas (*free fatty acid / FFA*) dalam plasma. Kadar FFA yang tinggi dapat merangsang glukoneogenesis serta memicu resistensi insulin di hati dan otot, yang pada akhirnya menyebabkan peningkatan sekresi insulin. Gangguan metabolik yang disebabkan oleh FFA ini dikenal sebagai lipotoksisitas. Salah satu kelompok obat yang bekerja pada jalur ini adalah tiazolidindion, yang membantu meningkatkan sensitivitas insulin dan mengurangi efek negatif dari lipotoksisitas (Shaker *et al.*, 2023).

d. Otot

Pada pasien dengan diabetes melitus tipe 2, terjadi gangguan kerja insulin yang kompleks di dalam sel otot (*intramioselular*), yang disebabkan oleh gangguan fosforilasi tirosin. Kondisi ini menghambat transportasi glukosa ke dalam sel otot, menurunkan sintesis glikogen, serta mengurangi oksidasi glukosa. Obat yang bekerja untuk memperbaiki gangguan ini adalah metformin dan tiazolidindion, yang berfungsi meningkatkan sensitivitas insulin dan memperbaiki metabolisme glukosa dalam tubuh (Matthews *et al.*, 2023).

e. Hepar

Pada pasien diabetes melitus tipe 2, resistensi insulin yang berat menyebabkan peningkatan glukoneogenesis, sehingga produksi glukosa oleh hati (*hepatic glucose production*) meningkat. Untuk menekan proses ini, digunakan metformin, yang bekerja dengan menghambat glukoneogenesis di hati, sehingga membantu menurunkan kadar glukosa darah dan meningkatkan sensitivitas insulin (Tsamos *et al.*, 2023).

f. Otak

Insulin berperan sebagai penekan nafsu makan yang kuat. Namun, pada individu obesitas, baik dengan diabetes melitus (DM) maupun tanpa DM, terjadi hiperinsulinemia sebagai respons kompensasi terhadap resistensi insulin. Kondisi ini dapat menyebabkan peningkatan asupan makanan akibat resistensi insulin yang juga terjadi di otak. Untuk mengatasi gangguan ini, digunakan beberapa obat seperti *GLP-1 receptor agonist* (GLP-1 RA), amilin, dan bromokriptin, yang bekerja dengan memodulasi nafsu makan serta meningkatkan sensitivitas insulin (Moosaie *et al.*, 2023).

g. Kolon/mikrobiota

Perubahan komposisi mikrobiota di usus besar berperan dalam perkembangan hiperglikemia. Penelitian telah menunjukkan bahwa mikrobiota usus memiliki keterkaitan dengan diabetes melitus (DM) tipe 1, DM tipe 2, serta obesitas, yang menjelaskan bagaimana kelebihan berat badan dapat memicu diabetes. Untuk mengatasi kondisi hiperglikemia, probiotik dan prebiotik diproyeksikan sebagai mediator yang berpotensi membantu mengoptimalkan keseimbangan mikrobiota usus dan meningkatkan metabolisme glukosa (Veličkov *et al.*, 2023).

h. Usus halus

Saluran pencernaan memiliki peran penting dalam penyerapan karbohidrat melalui kerja enzim alfa-glukosidase, yang memecah polisakarida menjadi monosakarida. Monosakarida ini kemudian diserap oleh usus, yang menyebabkan peningkatan kadar gula darah setelah makan. Menariknya, glukosa yang dikonsumsi secara oral merangsang respons insulin yang jauh lebih besar dibandingkan jika diberikan secara intravena. Fenomena ini dikenal sebagai *efek incretin*, yang dipengaruhi oleh dua hormon utama, yaitu *glucagon-like polypeptide-1* (GLP-1) dan *glucose-dependent insulinotropic polypeptide* atau *gastric inhibitory polypeptide* (GIP).

Pada pasien diabetes melitus tipe 2, terjadi defisiensi *glucagon-like polypeptide-1* (GLP-1) serta resistensi terhadap *glucose-dependent insulinotropic polypeptide* (GIP). Selain itu, hormon inkretin dengan cepat dipecah oleh enzim *dipeptidyl peptidase-4* (DPP-4), sehingga durasi kerjanya hanya berlangsung dalam beberapa menit. Untuk mengatasi hal ini, digunakan obat *penghambat DPP-4*, yang memperpanjang efek inkretin dalam merangsang sekresi insulin. Selain itu, acarbose juga dapat digunakan untuk menghambat aktivitas enzim alfa-glukosidase, yang berperan dalam pemecahan karbohidrat, sehingga membantu mengendalikan kadar glukosa darah setelah makan (Lal *et al.*, 2023).

i. Ginjal

Ginjal memiliki peran penting dalam patogenesis diabetes melitus tipe 2, terutama dalam pengaturan kadar glukosa darah. Setiap hari, ginjal menyaring sekitar 163 gram glukosa melalui proses filtrasi. Dari jumlah tersebut, sekitar 90% akan diserap kembali di *tubulus proksimal convoluted* dengan bantuan enzim *sodium-glucose co-transporter-2* (SGLT-2), sementara 10% sisanya diabsorpsi melalui *sodium-glucose co-transporter-1* (SGLT-1) yang bekerja di bagian tubulus desenden dan asenden. Proses reabsorpsi ini memastikan bahwa tidak ada glukosa yang terbuang dalam urin pada individu dengan fungsi ginjal normal.

Pada pasien diabetes melitus, terjadi peningkatan ekspresi gen *sodium-glucose co-transporter-2* (SGLT-2), yang menyebabkan peningkatan reabsorpsi glukosa di tubulus ginjal. Akibatnya, kadar glukosa dalam darah meningkat karena ginjal menyerap kembali lebih banyak glukosa daripada yang seharusnya. Obat yang menghambat kinerja SGLT-2 akan mengurangi reabsorpsi glukosa di ginjal, sehingga glukosa dapat diekskresikan melalui urin. Contoh obat yang bekerja melalui mekanisme ini adalah *penghambat SGLT-2*, seperti dapagliflozin, empagliflozin, dan canagliflozin (Jin *et al.*, 2023).

j. Lambung

Penurunan produksi amilin pada penderita diabetes merupakan akibat dari kerusakan sel β pankreas. Defisiensi amilin ini menyebabkan pengosongan lambung menjadi lebih cepat, yang mengakibatkan peningkatan penyerapan glukosa di usus kecil. Kondisi ini berkontribusi terhadap peningkatan kadar glukosa darah setelah makan (*postprandial hyperglycemia*), yang menjadi salah satu karakteristik utama diabetes melitus (Yousefzadeh *et al.*, 2023).

k. Sistem imun

Sitokin dapat memicu respons fase akut, yang dikenal sebagai inflamasi derajat rendah, sebagai bagian dari aktivasi sistem imun bawaan (*innate immune system*). Kondisi ini berperan penting dalam patogenesis diabetes melitus tipe 2 dan berhubungan dengan berbagai komplikasi, seperti dislipidemia dan aterosklerosis. Peradangan sistemik tingkat rendah ini juga berkontribusi terhadap stres endotel akibat peningkatan permintaan metabolik untuk insulin, yang dapat memperburuk resistensi insulin dan disfungsi vaskular pada penderita diabetes.

2.2 Spermatozoa

2.2.1 Morfologi Spermatozoa

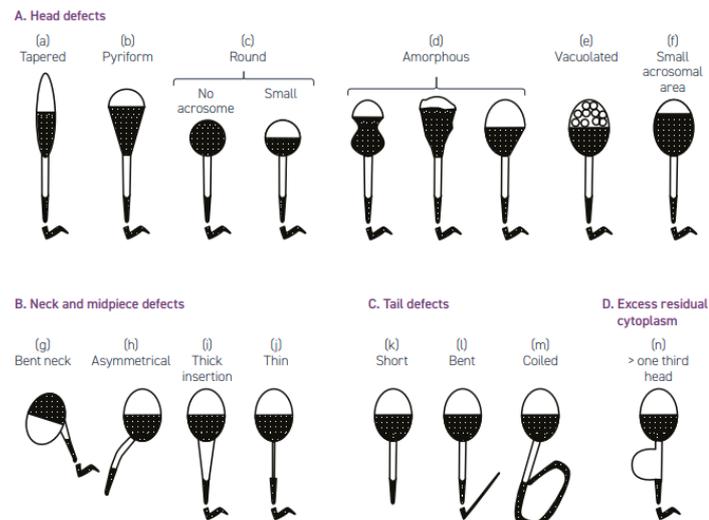
Morfologi spermatozoa merupakan faktor penting yang menentukan kemampuan fertilisasi. Fertilisasi hanya dapat terjadi jika spermatozoa memiliki bentuk yang normal, karena hanya spermatozoa dengan morfologi yang baik yang mampu membuahi sel telur. Meskipun jumlah spermatozoa dalam batas normal, gangguan pada morfologi dapat menurunkan kemampuan fungsionalnya, sehingga berdampak pada keberhasilan pembuahan (Apriora *et al.*, 2015).

Spermatozoa terdiri dari beberapa bagian utama, yaitu kepala, akrosom, bagian tengah, dan ekor. Kepala spermatozoa terutama tersusun dari nukleus yang mengandung informasi genetik. Nukleus ini terdiri dari sel berinti padat dengan sedikit sitoplasma dan dikelilingi oleh lapisan membran sel. Pada dua pertiga bagian anterior kepala, terdapat struktur tebal yang disebut akrosom, yang mengandung enzim hialuronidase. Enzim ini berfungsi untuk mencerna filamen proteoglikan dan protein, memungkinkan spermatozoa menembus ovum selama proses fertilisasi. Kelainan morfologi sperma dapat meliputi ukuran kepala yang abnormal (*makro* atau *mikro*), ketiadaan kepala, bentuk kepala yang tidak normal (*amorf* atau *round*), serta gangguan pada ekor, seperti ekor pendek, spiral, atau ganda (Hasri, 2021).

Kepala spermatozoa harus memiliki bentuk yang halus, berkontur teratur, dan umumnya berbentuk oval. Wilayah akrosomal harus tampak jelas dan mencakup sekitar 40–70% dari area kepala. Daerah akrosomal tidak boleh mengandung vakuola besar, dan jika terdapat vakuola kecil, jumlahnya tidak boleh lebih dari dua serta tidak boleh menempati lebih dari seperlima bagian kepala sperma. Selain itu, daerah pasca-akrosom harus bebas dari vakuola. Bagian tengah spermatozoa harus ramping, simetris, serta memiliki panjang yang kira-kira sama dengan kepala sperma untuk memastikan fungsi dan pergerakan yang optimal (WHO, 2021).

Bagian tengah spermatozoa harus memiliki sumbu utama yang sejajar dengan sumbu utama kepala. Ekor (*tail*) harus memiliki kaliber yang seragam sepanjang panjangnya, lebih tipis dibandingkan bagian tengah, dan memiliki panjang sekitar 45 μm , atau kira-kira 10 kali panjang kepala. Ekor dapat melingkar kembali selama tidak terdapat sudut tajam yang mengindikasikan adanya flagel yang patah. Selain itu, keberadaan tetesan sitoplasma yang ukurannya kurang dari

sepertiga ukuran kepala sperma normal masih dianggap wajar dan tidak mengganggu fungsi spermatozoa (WHO, 2021).



Gambar 1. Morfologi sperma (WHO, 2021).

2.2.2 Konsentrasi Spermatozoa

Konsentrasi spermatozoa mengacu pada jumlah spermatozoa dalam satu ejakulat setiap kali semen dikumpulkan. Konsentrasi sperma yang dianggap normal adalah lebih dari 15 juta per mililiter atau total lebih dari 40 juta dalam satu ejakulat. Jika jumlah spermatozoa kurang dari 15 juta per mililiter, kondisi ini disebut *oligozoospermia*, sedangkan apabila tidak ditemukan spermatozoa sama sekali dalam ejakulat, kondisi tersebut disebut *azoospermia* (Tendean *et al.*, 2015).

Warna semen mencerminkan kekentalan (*konsistensi*) serta konsentrasi spermatozoa yang terkandung di dalamnya. Dalam kondisi normal, semakin tinggi konsentrasi spermatozoa, maka semen akan memiliki konsistensi yang lebih kental dan warna yang lebih pekat. Sebaliknya, jika semen lebih encer, hal ini menunjukkan konsentrasi spermatozoa yang lebih rendah, yang ditandai dengan warna yang lebih pucat (Rosnizar *et al.*, 2021).

2.2.3 Motilitas Spermatozoa

Motilitas merupakan karakteristik utama gamet jantan yang memungkinkan spermatozoa bergerak secara aktif untuk mencapai dan menembus gamet betina, baik dalam sistem fertilisasi internal maupun eksternal. Kemampuan motilitas sperma dipengaruhi oleh berbagai faktor eksternal dan internal serta bergantung pada struktur flagela, yang berperan dalam pergerakan dan arah gerak spermatozoa (Iqra *et al.*, 2023).

Penurunan motilitas spermatozoa terjadi akibat berkurangnya ketersediaan energi, yang menyebabkan destabilisasi membran sel. Gangguan integritas membran ini dipicu oleh penumpukan asam laktat, yang meningkatkan permeabilitas membran terhadap ion kalsium di dalam mitokondria. Akibatnya, sintesis ATP menurun, sehingga cadangan energi yang diperlukan untuk pergerakan spermatozoa menjadi berkurang. Kondisi ini menyebabkan motilitas spermatozoa melemah, menghambat kemampuannya dalam mencapai dan membuahi sel telur (Manehat *et al.*, 2021).

2.2.4 Spermatogenesis

Proses pembentukan sperma (*spermatogenesis*) berlangsung di dalam tubulus seminiferus selama fase aktif seksual. Proses ini distimulasi oleh hormon gonadotropik yang disekresikan oleh kelenjar pituitari anterior. Spermatogenesis umumnya dimulai pada usia sekitar 13 tahun dan terus berlanjut sepanjang kehidupan, meskipun produksinya cenderung menurun seiring bertambahnya usia (Sadewo *et al.*, 2019).

Sistem reproduksi pria menghasilkan sel spermatozoa yang memiliki bentuk khas, terdiri dari kepala, leher, dan ekor. Spermatozoa merupakan hasil maturasi dari sel epitel germinal yang disebut *spermatogonia*, yang terletak dalam dua hingga tiga lapisan di sepanjang batas luar epitel tubulus seminiferus. Proses perkembangan

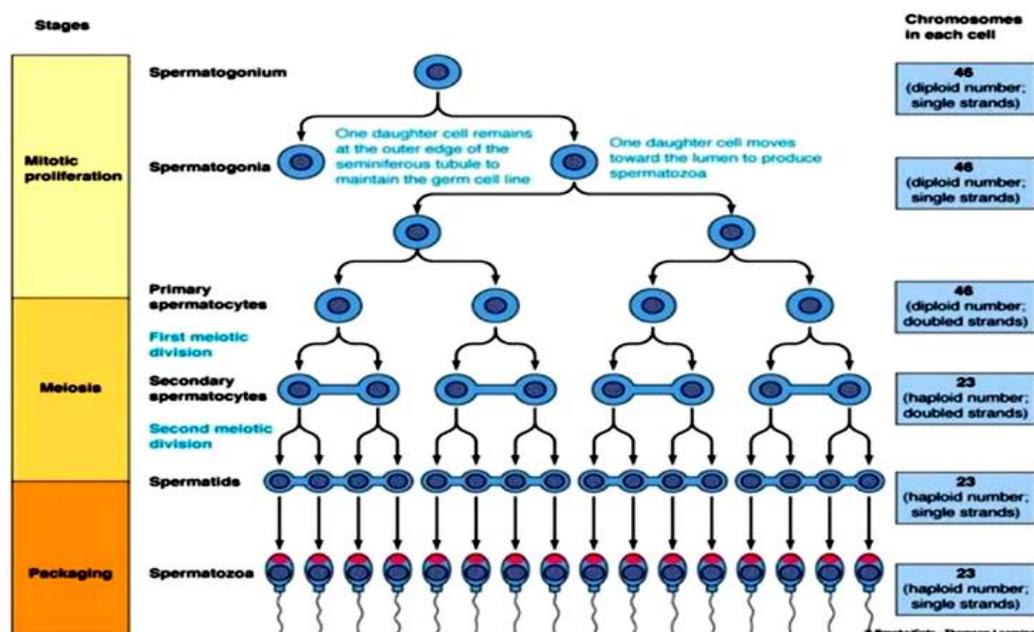
spermatogonia menjadi spermatozoa disebut *spermatogenesis*, yang berlangsung di dalam tubulus seminiferus selama masa kehidupan seksual aktif. Spermatogenesis dipicu oleh hormon gonadotropin yang disekresikan oleh kelenjar hipofisis anterior, dimulai sekitar usia 13 tahun dan berlangsung sepanjang hidup, meskipun produksi spermatozoa cenderung menurun seiring bertambahnya usia (Sadewo *et al.*, 2019)

Pada tahap awal spermatogenesis, spermatogonia primitif berkumpul di sepanjang membran basal epitel germinativum dan dikenal sebagai *spermatogonia tipe A*. Sel-sel ini mengalami pembelahan sebanyak empat kali, menghasilkan 16 sel yang lebih terdiferensiasi, yaitu *spermatogonia tipe B*. Selanjutnya, spermatogonia tipe B bermigrasi menuju bagian sentral tubulus seminiferus di antara sel-sel Sertoli. Sel Sertoli memiliki membran yang kuat dan saling berlekatan pada bagian basal serta lateralnya, membentuk lapisan pertahanan yang melindungi spermatogonia dari penetrasi kapiler di sekitar tubulus seminiferus. Namun, spermatogonia yang telah mengalami diferensiasi untuk menjadi spermatozoa dapat melewati lapisan pertahanan ini untuk melanjutkan proses pematangan (Sadewo *et al.*, 2019).

Tahap selanjutnya dalam spermatogenesis adalah pembelahan meiosis. Selama 24 hari, setiap spermatogonium yang telah memasuki lapisan sel Sertoli mengalami modifikasi bertahap dan membesar, membentuk *spermatosit primer*. Pada akhir hari ke-24, spermatosit primer mengalami pembelahan meiosis pertama, menghasilkan dua *spermatosit sekunder*. Pada tahap awal pembelahan meiosis ini, seluruh DNA dalam 46 kromosom mengalami replikasi. Setiap kromosom yang telah bereplikasi terdiri dari dua *kromatid* yang tetap terikat pada sentromer, dengan kedua kromatid membawa salinan gen yang identik (Sadewo *et al.*, 2019).

Pada tahap ini, *spermatosit primer* mengalami pembelahan meiosis pertama, menghasilkan dua *spermatosit sekunder*. Dalam proses ini, setiap kromosom berpisah, sehingga masing-masing spermatosit sekunder menerima 23 kromosom, yang masing-masing masih terdiri dari dua *kromatid* yang berikatan pada sentromer. Dalam waktu dua hingga tiga hari, terjadi *pembelahan meiosis kedua*, di mana kedua kromatid dari masing-masing 23 kromosom memisahkan diri pada sentromer. Proses ini menghasilkan dua pasang sel spermatid, di mana setiap spermatid mengandung satu set 23 kromosom tunggal (Sadewo *et al.*, 2019).

Dalam beberapa minggu setelah tahap pembelahan meiosis, setiap spermatid mengalami proses pematangan yang dipandu oleh sel Sertoli. Proses ini melibatkan pengurangan sebagian sitoplasma, penataan ulang kromatin dalam inti untuk membentuk kepala spermatozoa yang padat, serta pengumpulan sisa sitoplasma dan membran sel di salah satu ujungnya guna membentuk ekor. Hasil akhirnya adalah spermatozoa yang terdiri dari kepala dan ekor (Sadewo *et al.*, 2019).



Gambar 2. Proses Spermatogenesis (Sadewo *et al.*, 2019)

2.3 Pengaruh Diabetes Melitus terhadap Kualitas Spermatozoa

Diabetes melitus merupakan gangguan metabolik yang ditandai dengan kadar gula darah tinggi akibat gangguan produksi atau fungsi insulin, atau kombinasi keduanya. Jika tidak ditangani dengan baik, DM dapat menyebabkan komplikasi, termasuk infertilitas. Kondisi ini terjadi akibat kerusakan pada organ reproduksi pria, khususnya testis, yang berkontribusi pada penurunan kualitas spermatozoa dan berujung pada gangguan kesuburan (Arundani *et al.*, 2021). Infertilitas akibat diabetes melitus dapat terjadi akibat kerusakan pada epididimis, yang mengganggu migrasi spermatozoa dan fungsi reproduksi secara keseluruhan. Kondisi ini ditandai dengan penurunan konsentrasi sel spermatogonium, berkurangnya jumlah spermatozoa dalam testis dan epididimis, menyempitnya diameter tubulus seminiferus, serta menurunnya motilitas sperma. Hiperglikemia atau kadar gula darah yang tinggi berkontribusi terhadap kerusakan sel dengan meningkatkan produksi *reactive oxygen species* (ROS), yang memicu stres oksidatif. Akumulasi ROS dapat menyebabkan cedera sel melalui peroksidasi lipid, serta kerusakan oksidatif pada protein dan DNA. Akibatnya, proses peroksidasi lipid merusak membran spermatozoa serta mitokondria DNA, yang pada akhirnya menurunkan kualitas spermatozoa (Arundani *et al.*, 2021).

Penderita diabetes mengalami disfungsi hormon insulin yang menyebabkan akumulasi glukosa dalam darah, dikenal sebagai hiperglikemia. Kondisi ini, bersama dengan defisiensi insulin, dapat mempengaruhi struktur dan fungsi jaringan, serta meningkatkan produksi *Reactive Oxygen Species* (ROS), yang berperan dalam mengganggu proses spermatogenesis di tubulus seminiferus. Peningkatan ROS juga berdampak pada kerusakan membran mitokondria, yang mengurangi efektivitas induksi apoptosis pada sel sperma. Selain menurunkan konsentrasi sperma, diabetes melitus juga memengaruhi motilitasnya. Gangguan motilitas ini disebabkan oleh mikroangiopati yang menghambat suplai nutrisi ke tubulus seminiferus, sehingga memicu apoptosis sel spermatogenik dalam kondisi hiperglikemia. Akibatnya, perkembangan

sperma terganggu, yang dapat menyebabkan kelainan morfologi serta penurunan kualitas hidup spermatozoa (Bulqis *et al.*, 2020).

2.4 Lada Hitam (*Piper nigrum L*)

2.4.1 Biji Lada Hitam

Indonesia adalah negara yang kaya akan rempah-rempah, salah satunya adalah lada, yang juga dikenal sebagai merica atau sahang. Lada dengan nama ilmiah *Piper nigrum L*. memiliki rasa yang sedikit pedas, pahit, serta bersifat hangat. Rempah ini dijuluki *The King of Spices* atau "Rajanya Rempah-Rempah" dalam sejarah perdagangan dunia. Lada hitam telah menjadi salah satu komoditas rempah tertua yang diperdagangkan sejak masa penjajahan Belanda. Tanaman ini mengandung berbagai senyawa penting seperti minyak atsiri, minyak lemak, dan pati. Selain digunakan sebagai rempah, biji lada hitam juga dimanfaatkan oleh masyarakat untuk meningkatkan cita rasa masakan (Ikhlas *et al.*, 2023).

2.4.2 Klasifikasi Lada Hitam (*Piper nigrum L*)

Kingdom	: <i>Plantae Sub</i>
Kingdom	: <i>Virdiplantae</i>
Divisi	: <i>Tacheophyta</i>
Kelas	: <i>Magnoliopsida</i>
Ordo	: <i>Piperceae</i>
Famili	: <i>Piperceae</i>
Genus	: <i>Piper L</i>
Spesies	: <i>Piper nigrum L</i>

2.4.3 Kandungan Lada Hitam (*Piper nigrum L*)

Lada hitam mengandung berbagai senyawa kimia, di antaranya saponin, flavonoid, minyak atsiri, kavisin, resin, protein, amilum, serta senyawa aktif seperti piperin, piperiline, piperoleine, poperanine, piperonal, dihidrokarveol, kanyofillene oksida, kariptone, trans-

piocarrol, dan minyak lada. Piperin, sebagai salah satu komponen utama, memiliki empat isomer struktural, yaitu piperin (*trans-trans*), isopiperin (*cis-trans*), chavicin (*cis-cis*), dan isochavicin (*trans-cis*). Penelitian terbaru menunjukkan bahwa piperin berperan sebagai senyawa aktif utama dengan berbagai manfaat kesehatan, termasuk sebagai antioksidan, imunomodulator, antikanker, hepatoprotektif, antiinflamasi, antiulserasi, dan antimikroba. Selain itu, piperin juga diketahui mampu menghambat stres oksidatif serta melindungi tubuh dari radikal bebas, *Reactive Oxygen Species* (ROS), dan peroksidasi lipid (Iskandar, 2021).

2.4.4 Manfaat Piperin dalam Sistem Reproduksi Pria

Piperin memiliki aktivitas antioksidan yang berperan dalam mengurangi zat reaktif thiobarbituric acid serta mempertahankan kadar enzim antioksidan seperti superoksida dismutase, katalase, glutathione-S-transferase, dan glutathione. Mekanisme ini membantu mengurangi stres oksidatif yang disebabkan oleh diet tinggi lemak dalam sel. Sebagai tanaman dengan sifat antioksidan, lada hitam mampu menetralkan *Reactive Oxygen Species* (ROS), yang jika berlebihan dalam tubuh dapat menurunkan jumlah serta motilitas spermatozoa. Piperin, sebagai komponen utama lada hitam, juga diduga berkontribusi dalam meningkatkan kadar hormon testosteron secara tidak langsung, yang berperan penting dalam regulasi fungsi reproduksi pria (Hasri, 2021).

2.4.5 Manfaat Piperin pada Pasien dengan Diabetes Melitus

Piperin dapat mengurangi obesitas dan mengurangi peradangan pada makrofag jaringan adiposa (ATM), yang berhubungan erat dengan resistensi insulin pada obesitas. Hasil penelitian Liu *et al.*, 2020 menunjukkan bahwa piperin lebih efektif daripada metformin dalam menurunkan berat badan, mengurangi akumulasi lipid hati, dan memperbaiki profil lipid serum pada tikus obesitas. Piperin juga

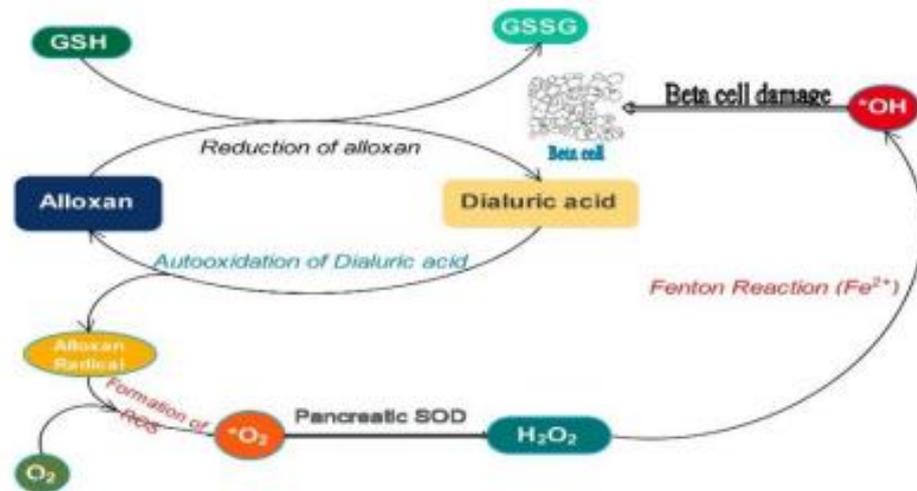
menurunkan kadar sitokin pro-inflamasi dan polarisasi makrofag M1 yang berperan dalam inflamasi metabolik, yang meningkatkan sensitivitas insulin. Selain itu, piperin mengurangi kadar LPS serum pada tikus obesitas, yang terkait dengan perbaikan resistensi insulin. Penelitian Liu *et al.*, 2020 menunjukkan bahwa piperin memiliki efek positif dalam meningkatkan sensitivitas insulin dan mengurangi peradangan metabolik pada tikus obesitas yang mengalami resistensi insulin.

2.5 Aloksan

2.5.1 Mekanisme Aloksan dalam Diabetes Mellitus

Aloksan merupakan senyawa yang sering digunakan dalam penelitian untuk menginduksi kondisi diabetik (hiperglikemia) pada hewan coba. Senyawa ini bekerja dengan cepat dan permanen dalam meningkatkan kadar glukosa darah dalam waktu 2–3 hari, sehingga menghasilkan kondisi yang menyerupai diabetes melitus tipe 1 pada manusia. Secara struktural, aloksan memiliki bentuk 5,5-dihidroksil pirimidin-2,4,6-trion, yang merupakan turunan urea dengan rumus molekul $C_4H_2N_2O_4$ dan massa molekul relatif 142,06. Aloksan dapat dibuat melalui oksidasi asam urat menggunakan asam nitrat, sementara dalam bentuk monohidratnya, senyawa ini diperoleh dari oksidasi asam barbiturat dengan kromium trioksida (Wulandari *et al.*, 2024).

Aloksan dapat menyebabkan diabetes melalui dua mekanisme utama, yaitu menghambat sekresi insulin dengan mengganggu aktivitas glukokinase serta meningkatkan produksi reactive oxygen species (ROS). Pada glukokinase, aloksan berikatan dengan gugus tiol, sehingga menghambat oksidasi glukosa, menurunkan produksi ATP, dan akhirnya mengurangi sintesis insulin. Selain itu, peningkatan ROS mengakibatkan kerusakan DNA sel beta pankreas, yang pada akhirnya memicu kematian atau nekrosis sel, sehingga sel beta kehilangan fungsinya dalam memproduksi insulin (Wulandari *et al.*, 2024).



Gambar 3. Mekanisme Aloksan (Wulandari *et al.*, 2024)

2.6 Hewan Coba Tikus Putih Jantan (*Rattus norvegicus*)

2.6.1 Klasifikasi Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Galur Sprague Dawley

Taksonomi Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Galur Sprague Dawley (Hedrich, 2020).

Kerajaan	: <i>Animalia</i>
Divisi	: <i>Chordata</i>
Subdivisi	: <i>Vertebrata</i>
Kelas	: <i>Mammalia</i>
Ordo	: <i>Rodentia</i>
Famili	: <i>Muridae</i>
Genus	: <i>Rattus</i>
Spesies	: <i>Rattus norvegicus</i> (Sprague Dawley)

2.6.2 Karakteristik Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Galur Sprague Dawley

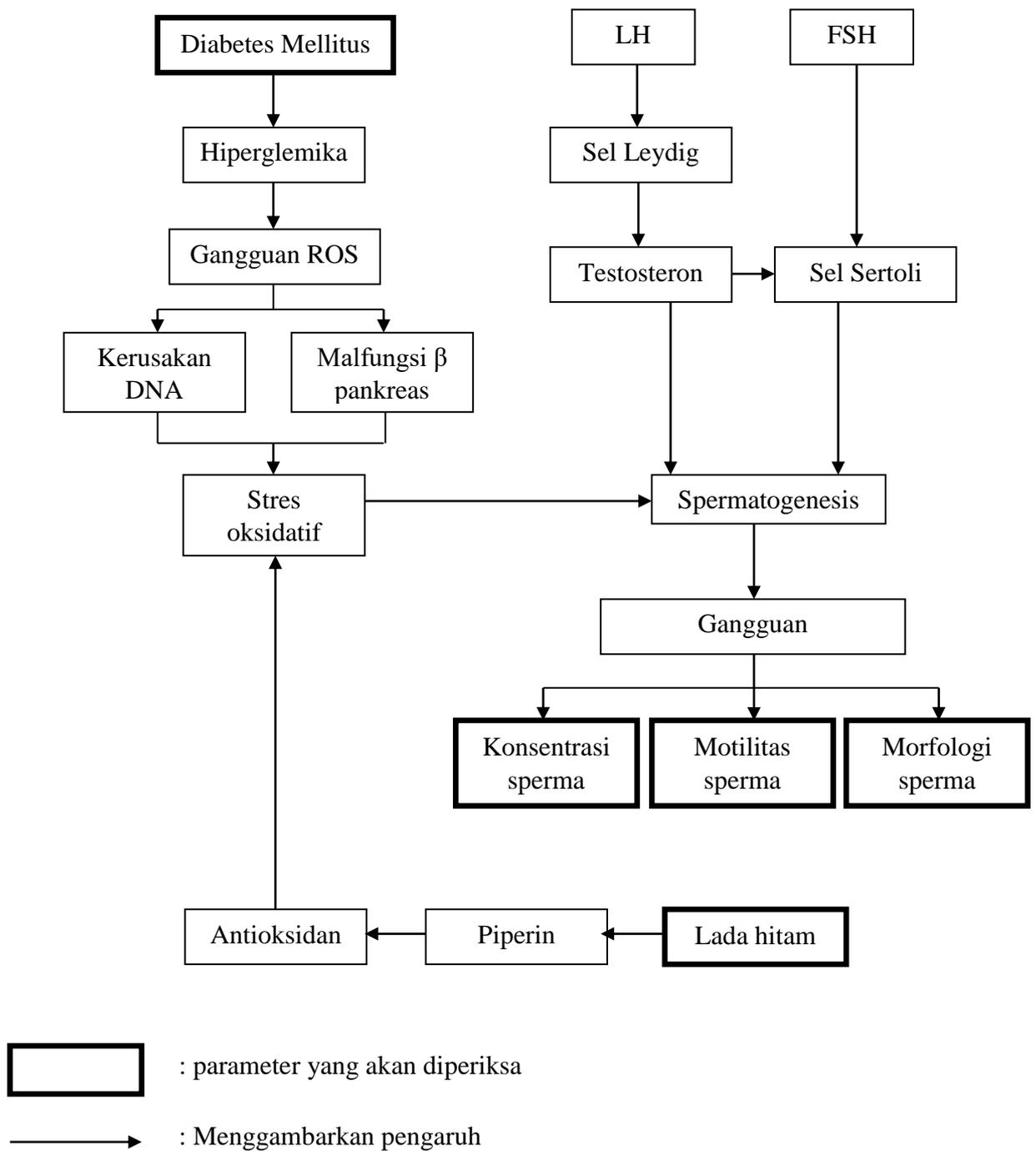
Tikus putih (*Rattus norvegicus*) merupakan hewan uji yang sering digunakan dalam berbagai bidang penelitian kesehatan dan biologi (Hedrich, 2020). Tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang sering digunakan pada penelitian yaitu jenis galur wistar (Nugroho *et al.*,

2018). Jenis tikus ini memiliki waktu pengembangbiakan yang singkat, sehingga tikus putih menjadi mamalia yang banyak digunakan untuk proses penelitian (Hedrich, 2020). Pemilihan usia tikus dalam penelitian harus menyesuaikan dari tujuan penelitian. Usia tikus dapat diklasifikasikan sebagai berikut, usia neonatal (usia 0-14 hari, berat badan 14 gram), penyapihan (usia 14-35 hari, berat badan 45 gram), remaja (usia 35-63 hari, berat badan 115 gram), dewasa muda (usia > 63 hari, berat badan 300 gram) (Ghasemi *et al.*, 2021).

2.6.3 Siklus Spermatogenesis Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Galur *Sprague Dawley*

Spermatogenesis dipengaruhi oleh beberapa hormon utama, termasuk testosteron, LH (Luteinizing Hormone), dan FSH (Follicle-Stimulating Hormone), yang diatur oleh GnRH (Gonadotropin-Releasing Hormone) melalui poros hipotalamus-hipofisis-testis. LH merangsang sel Leydig di testis untuk memproduksi testosteron, sementara FSH berperan dalam stimulasi sel Sertoli untuk menghasilkan protein pengikat androgen (ABP), yang membantu transportasi testosteron ke tubulus seminiferus dan epididimis guna mendukung proses spermatogenesis. Pada tikus, satu siklus spermatogenesis yang terdiri dari 14 tahap memerlukan waktu sekitar 12 hari untuk diselesaikan (Azrifitria & Putri, 2023). Menurut Mbongue *et al.* Lada hitam merangsang fungsi reproduksi pria setelah 8 hari pengobatan karena meningkatkan sekresi organ seks, hal ini dibuktikan adanya peningkatan kadar testostosterone sehingga diharapkan dapat meningkatkan spermatogenesis.

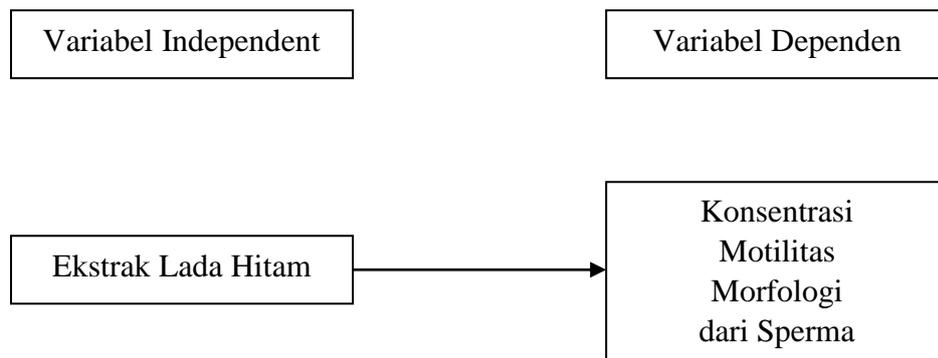
2.7 Kerangka Teori



Gambar 4. Kerangka Teori

(Sadewo *et al.*, 2019; Hasri, 2021; Wulandari *et al.*, 2024)

2.8 Kerangka Konsep



Gambar 5. Kerangka Konsep

2.9 Hipotesis

- H₀: Tidak terdapat pengaruh pemberian ekstrak etanol lada hitam pada analisis semen (konsentrasi, motilitas, morfologi sperma) model diabetes tikus putih jantan *Rattus norvegicus*.
- H₁: Terdapat pengaruh pemberian ekstrak etanol lada hitam pada analisis semen (konsentrasi, motilitas, morfologi sperma) model diabetes tikus putih jantan *Rattus norvegicus*.

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Desain Penelitian

Jenis penelitian yaitu eksperimental dengan rancangan penelitian *Posttest-Only Randomized Control Group*. Dalam penelitian ini dilakukan randomisasi, artinya sebelum diberikan perlakuan semua kelompok kontrol dan eksperimen dianggap sama sehingga pengelompokan kelompok kontrol dan eksperimen dilakukan secara acak.

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

3.2.1 Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan pada bulan September-Oktober tahun 2024.

3.2.2 Tempat Penelitian

Penelitian ini telah dilaksanakan di *Inalab DNA*

3.3 Subyek Penelitian

3.3.1 Populasi

Populasi penelitian ini yaitu tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur wistar jantan dengan berat 100-150 gram dan berusia antara 2,5 dan 3 bulan

3.3.2 Sampel

Hewan uji yang akan digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur wistar jantan dengan berat 100-150 gram. Besar

sampel yang digunakan atas perhitungan rumus *Frederer* (1963) dalam Sumiati *et al.* (2017), sebagai berikut

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

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

$$3n - 3 \geq 15$$

$$3n \geq 18$$

$$n \geq 6$$

Maka, banyaknya ulangan setiap kelompok percobaan adalah 6 ekor. Namun, jumlah ini harus diolah untuk diperhitungkan kembali agar dapat mengantisipasi *drop out* atau hilangnya unit eksperimen, dengan rumusan sebagai berikut (Lwanga *et al.*, 1991):

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

Keterangan:

n = besar sampel

t = jumlah kelompok perlakuan

N = besar sampel koreksi

f = perkiraan proporsi *drop out* (10%)

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

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

$$N = 6,7$$

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

3.3.3 Kelompok Perlakuan

1. Kelompok 1

Kelompok tikus yang tidak diinduksi aloksan dan tanpa pemberian ekstrak lada hitam yang diberikan makanan yang berfungsi sebagai nilai kontrol normal (Kontrol 1).

2. Kelompok 2

Kelompok tikus yang diinduksi aloksan 150 mg/kgBB (i.p) tanpa pemberian ekstrak lada hitam (Kontrol 2).

3. Kelompok 3

Kelompok tikus yang diberikan ekstrak lada hitam 122,5 mg/kgBB dengan pelarut etanol dan diinduksi aloksan 150 mg/kgBB (i.p) (Kelompok Perlakuan 1).

4. Kelompok 4

Kelompok tikus yang diberikan ekstrak lada hitam 245 mg/kgBB dengan pelarut etanol, dan diinduksi aloksan 150 mg/kgBB (i.p) (Kelompok Perlakuan 2).

Perlakuan pemberian ekstrak diberikan setiap hari selama 8 hari pada seluruh kelompok. Menurut Mbongue *et al.* Lada hitam merangsang fungsi reproduksi pria setelah 8 hari pengobatan karena meningkatkan sekresi organ seks, hal ini dibuktikan adanya peningkatan kadar *testosterone*.

3.4 Identifikasi Variabel dan Definisi Operasional

3.4.1 Variabel Penelitian

1. Variabel bebas (*independent variable*) yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah Ekstrak Lada Hitam

2. Variabel terikat (*dependent variable*) yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah:
- Konsentrasi spermatozoa
 - Motilitas spermatozoa
 - Morfologi spermatozoa

3.4.2 Definisi Operasional

Tabel 1. Definisi Operasional

Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala Ukur
Ekstrak Lada Hitam	Lada hitam dibuat menjadi ekstrak dengan zat pelarut metanol dan heksana. Lalu, di evaporasi sehingga menjadi serbuk. Setelah itu, dicampur dengan aquades 160 ml dan 400 ml, diberikan kepada tikus selama 8 hari.	Sonde Lambung	Diberikan pada kelompok perlakuan Dosis ekstrak lada hitam 122,5 mg/kgBB dan 245 mg/BB	Numerik
Konsentrasi spermatozoa	Konsentrasi merupakan jumlah spermatozoa per ml cairan semen setelah melalui tahap pengenceran. Konsentrasi normal yaitu lebih atau sama dengan 20 juta per ml dan menimbulkan kelainan jika jumlahnya di	Mikroskop	Jumlah spermatozoa yang telah diperoleh dikalikan dengan faktor pengencer dan faktor hemositometer	Numerik

Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala Ukur
	bawah 20 juta per ml.			
Motilitas spermatozoa	Motilitas adalah fungsi karakteristik gamet jantan yang memungkinkan sperma secara aktif mencapai dan menembus gamet betina dalam organisme dengan fertilisasi internal dan eksternal.	Mikroskop	Penilaian menggunakan skoring 0-100% dengan skala 5%	Numerik
Morfologi spermatozoa	Morfologi spermatozoa adalah bentuk spermatozoa baik normal maupun abnormal, abnormalitas dapat terjadi pada (kepala, <i>midpiece</i> atau ekor)	Mikroskop	Perhitungan dilakukan dengan menghitung jumlah spermatozoa normal dibagi dengan jumlah spermatozoa abnormal dan normal dikali dengan 100.	Numerik

3.5 Alat dan Bahan Penelitian

3.5.1 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan yaitu neraca elektronik, kandang tikus sebanyak 4 kandang, timbangan, tempat makan dan minum tikus, sonde lambung, toples plastik dengan tutup, mikroskop, kalkulator, pipet tetes, *object glass*, *cover glass*, kaca arloji, cawan petri, spuit *oral* 1 cc, kapas, seperangkat alat bedah (*dissecting set*), *improved naubauer*, *handscoen* dan masker.

3.5.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan yaitu tikus jantan galur *Sprague Dawley*, ekstrak lada hitam, pelarut etanol, sekam, aloksan, pakan tikus, air minum, bahan-bahan pengamat mikroskop, NaCl 0,9%, zat pewarnaan (Giemsa, Eosin 0,5%).

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Pengadaan Hewan Uji

Hewan uji berupa tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague Dawley* berjumlah 24 ekor. Tikus ini didapat dari *Animal Vet* di Bogor yang bekerjasama dengan Institut Pertanian Bogor (IPB) *University*.

3.6.2 Pemeliharaan Hewan Uji

Hewan uji tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague Dawley* dibagi menjadi 4 kelompok secara random dan dimasukkan kedalam kandang. Hewan uji dilakukan aklimatisasi selama 1 minggu agar hewan uji dapat menyesuaikan diri dengan lingkungan uji coba. Tikus ditempatkan di kandang pemeliharaan yang berbentuk wadah dengan penutup kawat yang dilapisi sekam kayu keras berukuran ketebalan 0,5-1 cm. Sekam tersebut diganti setiap tiga hari sekali untuk menjaga kebersihan dan menghindari infeksi mikroorganisme yang berpotensi membahayakan kelangsungan hidup hewan uji. Pada masa aklimatisasi hewan uji diberikan pakan standar pellet BR 2 dan air

minum *ad libitum*, jika ada tikus yang sakit pada proses aklimatisasi, tidak akan diikutsertakan dalam penelitian.

3.6.3 Pengamatan dan Terminasi Hewan Uji

Masing-masing tikus putih pada tiap kelompok akan dicampur dengan tikus betina. Pada saat terjadi perkawinan dan telah terjadi ereksi, dalam waktu cepat dilakukan terminasi tikus dengan cara *cervical dislocation*. Terminasi harus dilakukan secepat-cepatnya supaya kadar RNA NOS (*ribonucleic acid nitric oxide synthase*) pada korpus kavernosum masih tinggi. Setelah tikus mati, dilakukan pembedahan dan pemotongan organ penis tikus untuk penilaian ekspresi enzim NOS dan produk NO (*nitric oxide*), dan pengambilan organ testis untuk menilai kadar *hormone intratesticular*.

3.6.4 Pembuatan Ekstrak Lada Hitam

- a. Buah lada hitam (*Piper nigrum* L.) diperoleh dari petani lada di Kecamatan Gisting Tanggamus, Lampung, Indonesia.
- b. Buah lada hitam mengalami dehidrasi dan dihaluskan menjadi bubuk 100 gram.
- c. Selanjutnya digunakan etanol sebanyak 300 ml untuk mengekstrak bubuk lada hitam, kemudian dikocok sebanyak tiga kali.
- d. Setelah itu, hasil yang akan didapatkan berupa filtrat dan residu. Hasil filtrat diuapkan sehingga menghasilkan ekstrak etanol sebesar 10 gram.
- e. Penentuan dosis untuk setiap perlakuan didasarkan pada penelitian yang dilakukan oleh Mbongue *et al.*, 2005 dan Kesuma, 2013. Penelitian tersebut menggunakan dosis pemberian sebesar 122,5mg/KgBB selama 8 hari.
- f. Penentuan dosis untuk perlakuan ditetapkan atas rata-rata berat hewan uji yaitu sekitar 100 gram. Sehingga didapatkan dosis yang dibutuhkan pada kelompok perlakuan satu dan kelompok

perlakuan dua (P1 dan P2) adalah $122,5 \text{ mg/KgBB} \times 0,1 \text{ Kg}$ (berat tikus) = 12,25 mg dibulatkan menjadi 13 mg, dan $245 \text{ mg/KgBB} \times 0,1 \text{ Kg}$ (berat tikus) = 24,5 mg.

3.6.5 Prosedur Analisis Profil Kimia Ekstrak EtOH Lada Hitam.

- a. Lada hitam dihaluskan dengan menggunakan blender dan dimaserasi menggunakan EtOH selama 24 jam (Muttaqin *et al.*, 2023).
- b. Filtrat yang diperoleh disaring untuk menghilangkan komponen yang tidak diinginkan. Kemudian filtrat dipekatkan menggunakan rotary evaporator pada suhu 40 C dan tekanan 60 mbar (Quinn *et al.*, 2024).
- c. Ekstrak yang diperoleh disimpan dalam kulkas hingga diperlukan. Selanjutnya, identifikasi senyawa dari ekstrak EtOH yang diperoleh dianalisis menggunakan LC-MS/MS Positive Mode. Fraksi aktif dilarutkan dalam metanol pada konsentrasi 1 mg/mL, dan 12 μL sampel diinjeksi ke dalam HPLC (Quinn *et al.*, 2024).
- d. Analisis dilakukan menggunakan ACQUITY UPLC® H-Class System (Waters, Beverly, MA, AS), dilengkapi dengan kolom ACQUITY UPLC® HSS C18 (1,8 μm , 2,1 \times 100 mm) (Waters, Beverly, MA, AS) dan dideteksi dengan Xevo G2-S QToF Mass Spectrometer (Waters, Beverly, MA, AS). File data mentah (.raw) yang diperoleh dari analisis diproses lebih lanjut menggunakan perangkat lunak MassLynx (Waters, Beverly, MA, AS) untuk menginterpretasikan informasi spektrum massa (Quinn *et al.*, 2024).
- e. Analisis Base Peak Intensity (BPI) dilakukan pada energi ionisasi rendah, dengan fokus pada peningkatan sensitivitas dan akurasi deteksi senyawa (Quinn *et al.*, 2024).
- f. Untuk pembuatan profil senyawa, komposisi unsur dari setiap puncak yang terdeteksi dianalisis menggunakan alat bantu elemental composition pada Masslynx (Quinn *et al.*, 2024).

- g. Penjelasan struktur dilakukan berdasarkan pola fragmentasi yang diamati dalam data MS/MS. Komposisi dan struktur senyawa yang dihasilkan kemudian dibandingkan dengan literatur yang relevan dan basis data akses terbuka seperti PubChem untuk mengidentifikasi dan mengonfirmasi senyawa dari sampel (Aguilar-Alarcón *et al.*, 2024)

3.6.6 Induksi Aloksan

Tikus yang digunakan dalam percobaan diberikan aloksan melalui suntikan intraperitoneal tunggal dari larutan yang baru diproduksi dalam normal saline, dengan dosis 150 mg/kgBB (Pongoh *et al.*, 2020). Peningkatan kadar gula darah setelah induksi aloksan berkaitan dengan cepatnya absorpsi aloksan ke dalam sel beta pankreas, karena struktur molekulnya yang menyerupai glukosa dan sifatnya yang hidrofilik memungkinkan aloksan untuk masuk melalui plasma membran dengan perantaraan glucose transporter 2 (GLUT2). Setelah berada di dalam sel beta, aloksan memicu reaksi redoks yang menghasilkan superoksida, yaitu radikal bebas yang berkontribusi pada kerusakan sel beta pancreas (Wulandari *et al.*, 2024).

Untuk mengatasi hipoglikemia yang berpotensi mematikan yang disebabkan oleh pelepasan insulin berlebihan dari pankreas yang diinduksi aloksan, tikus diberi larutan glukosa 20% (5-10 ml) secara oral setelah 6 jam. Selanjutnya tikus dipelihara selama 24 jam berikutnya sambil diberi larutan yang mengandung 5% air-glukosa untuk menghindari terjadinya hipoglikemia.

Setelah di induksi dengan aloksan, tikus yang positif diabetes melitus (kadar gula darah > 200 mmHg) dikelompokkan kemudian diambil darahnya untuk pengukuran kadar glukosa darah hari pertama. Pengambilan darah dilakukan secara intraperitoneal dengan mengukur

kadar glukosa darah sewaktu dengan metode enzimatik (glukosa oksidase) menggunakan glucometer (Ulfa *et al.*, 2020).

3.6.7 Pembedahan

- a. Setelah 8 hari perlakuan, masing-masing hewan coba diterminasi dengan cara meletakkan ibu jari dan jari telunjuk di setiap sisi leher pada dasar tengkorak agar terjadi dislokasi leher. Kemudian, mempersiapkan alat bedah (bak paraffin, gunting, pinset, jarum, gelas arloji) yang digunakan.
- b. Pengambilan, penimbangan dan pengukuran testis setelah selesai proses pembedahan, dilakukan pengambilan bagian testis dengan menggunakan pinset. Kemudian, testis tikus diletakkan pada gelas ukur berisi NaCl agar dapat dengan mudah memisahkan testis dengan lemak. Lalu, testis dipisahkan dengan epididimis.

3.6.8 Pengambilan dan Pengamatan Spermatozoa

Setelah dilakukan proses pembedahan, selanjutnya dilakukan prosedur sebagai berikut:

- a. Pengambilan sekresi kauda epididimis dengan cara memotong bagian proksimal korpus epididimis dan bagian distal vas deferens. Setelah itu, kauda epididimis dimasukkan ke dalam cawan petri yang berisi 1 ml NaCl 0,9%, kemudian bagian proksimal kauda dipotong sedikit dengan gunting lalu kauda ditekan dengan perlahan hingga cairan sekresi epididimis keluar dan tersuspensi dengan NaCl 0,9%. Suspensi spermatozoa dari cauda epididimis yang telah diperoleh dapat digunakan untuk pengamatan yang meliputi konsentrasi, motilitas dan morfologi spermatozoa.
- b. Perhitungan konsentrasi spermatozoa dilakukan dengan cara mengambil spermatozoa pada cauda epididimis. Spermatozoa yang didapat diletakkan pada cawan penguap yang berisi cairan NaCl

sebanyak 250 μ L. Spermatozoa dimasukkan ke dalam bilik hitung *Neubauer* (hemasitometer) sampai kamar *Neubauer* terisi rata kemudian hitung jumlah spermatozoa pada salah satu kamar hitung *Neubauer* dan selanjutnya ditentukan pengenceran yang akan dilakukan dalam jumlah kotak yang akan di hitung. Kemudian amati di bawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 40x (Safwan *et al.*, 2016).

Hasil perhitungan dimasukkan ke dalam rumus perhitungan jumlah sperma/ml dengan rumus (Reni *et al.*, 2013):

$$\text{Jumlah sperma} = \frac{N}{n} \times \frac{1}{20} \times \text{faktor pengencer}$$

- c. Motilitas spermatozoa dihitung dengan menempelkan kauda yang telah disayat pada *object glass* kemudian ditetaskan NaCl sebanyak 1 tetes. Campuran spermatozoa dan NaCl tadi diambil satu tetes dan ditetaskan pada *object glass* yang lain dan ditutup dengan *cover glass*. Pengamatan terhadap spermatozoa yang bergerak progresif dilakukan secara subjektif pada delapan lapang pandang yang berbeda dengan mikroskop cahaya pembesaran 400x.

Motilitas spermatozoa selanjutnya diamati aktivitas gerak spermatozoa dimana spermatozoa motil akan bergerak. Spermatozoa yang motil akan bergerak ke depan dan spermatozoa yang bergerak ditempat, bergerak melingkar, bergerak mundur dan diam sebagai spermatozoa yang tidak motil, penilaian menggunakan skoring 0- 100% dengan skala 5% (Rizal *et al.*, 2016).

Berdasarkan motilitas individual, maka penilaian terhadap kualitas spermatozoa adalah dengan skor 0-5 sebagai berikut (Manehat *et al.*, 2021):

- a. Nilai 0, jika spermatozoa imotil atau tidak bergerak
 - b. Nilai 1, jika gerakan spermatozoa berputar di tempat
 - c. Nilai 2, jika gerakan spermatozoa melingkar, kurang dari 50% bergerak progresif dan tidak ada gelombang
 - d. Nilai 3, jika 50% -80% spermatozoa bergerak progresif dan menghasilkan gerakan massa
 - e. Nilai 4, jika spermatozoa bergerak secara progresif dan membentuk gelombang dengan 90% spermatozoa motil
 - f. Nilai 5, jika gerakan spermatozoa yang sangat progresif, membentuk gelombang yang sangat cepat dan menunjukkan 100% sperma motil
- d. Morfologi spermatozoa dianalisis dengan meneteskan suspensi spermatozoa pada kaca objek, lalu membuat preparat apus yang dikeringkan di udara. Preparat tersebut kemudian difiksasi menggunakan metanol selama 5 menit, diikuti pewarnaan dengan giemsa selama 15 menit. Setelah itu, preparat dicuci dengan akuades dan dikeringkan pada suhu ruangan sebelum diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000 kali untuk mengidentifikasi morfologi spermatozoa tikus *Rattus norvegicus*. Persentase spermatozoa dengan morfologi normal dan abnormal dihitung, dengan penilaian morfologi abnormal dilakukan pada 200 spermatozoa.

Persentase abnormalitas spermatozoa (PAS) dapat dihitung berdasarkan persamaan berikut Berek pada (Manehat *et al.*, 2021):

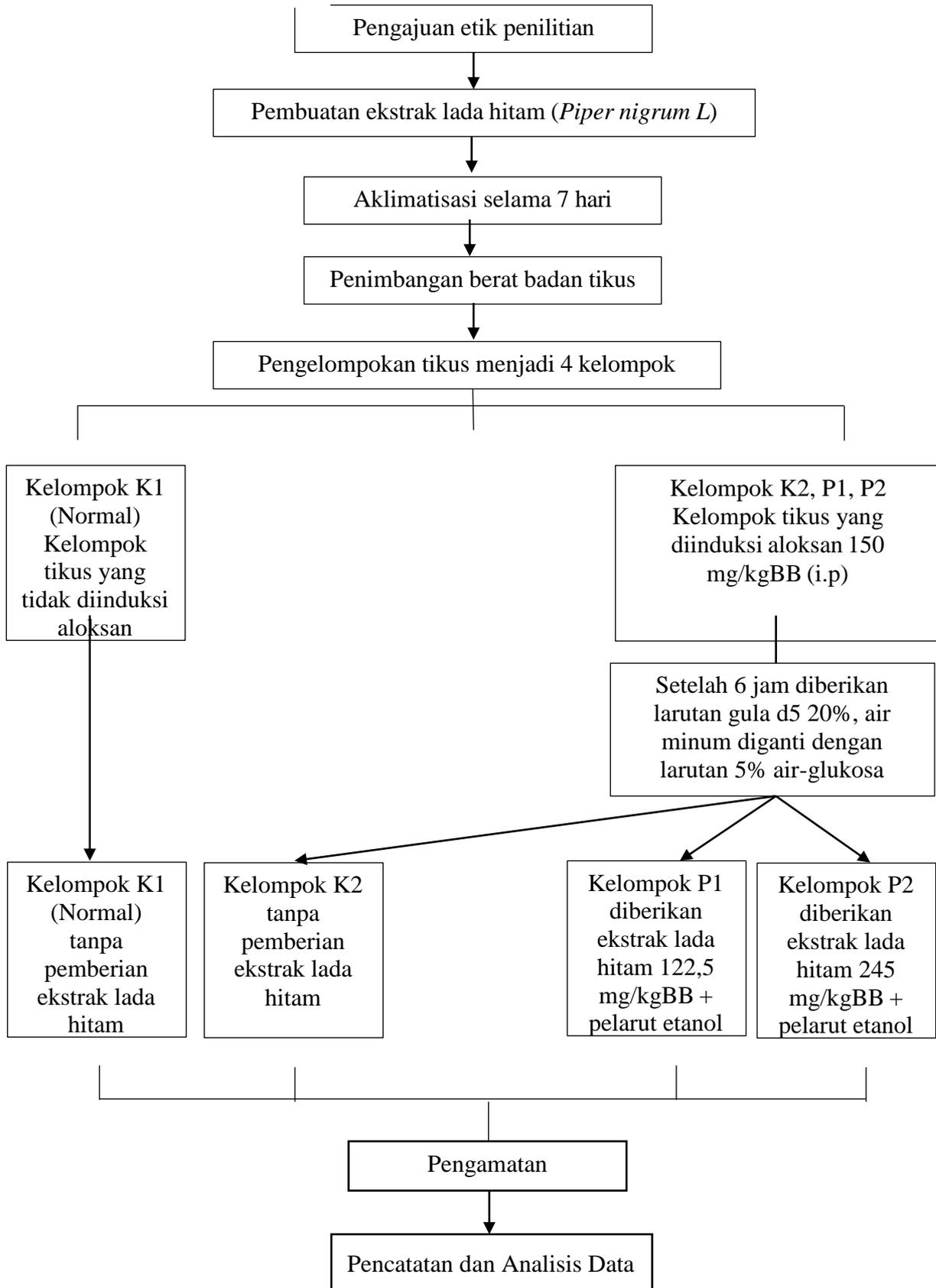
$$\text{PAS} = \frac{\text{Spermatozoa abnormal}}{\text{total sperma yang dihitung}} \times 100$$

3.7 Analisis Data

Data hasil penelitian dianalisis menggunakan uji normalitas Shapiro-Wilk (untuk jumlah sampel ≤ 50) guna menentukan distribusi data. Jika data

berdistribusi normal, digunakan uji parametrik, sedangkan jika tidak, digunakan uji non-parametrik. Selanjutnya, dilakukan uji homogenitas menggunakan uji Levene untuk menilai keseragaman varians data. Jika data terdistribusi normal dan memiliki varians yang homogen, analisis dilanjutkan dengan uji parametrik One Way ANOVA. Jika hasil uji menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$), maka dilakukan analisis lanjut dengan Post Hoc LSD untuk mengidentifikasi perbedaan antar kelompok perlakuan.

3.8. Alur Penelitian



Gambar 6. Alur Penelitian

3.9 Etika Penelitian

Etika penelitian (*Ethical clearance*) pada penelitian ini akan diajukan untuk mendapat persetujuan etik dari Komite Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Lampung.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

1. Terdapat pengaruh pemberian ekstrak etanol lada hitam pada analisis semen (konsentrasi, motilitas, morfologi sperma) model diabetes tikus putih jantan yang diinduksi aloksan.
2. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa kelompok perlakuan 2 dengan dosis 245 mg/kgBB memiliki efek yang lebih baik dalam meningkatkan kualitas semen yang berhubungan dalam proses spermatogenesis yang terganggu akibat diabetes

5.2 Saran

1. Untuk masyarakat dapat mengadopsi gaya hidup sehat, seperti pola makan seimbang, olahraga teratur, dan pengelolaan stres, yang secara umum dapat meningkatkan kesehatan reproduksi, termasuk kualitas sperma. Serta mencari informasi yang lebih luas tentang pentingnya menjaga kesehatan reproduksi, baik bagi pria maupun wanita, termasuk pemahaman tentang faktor-faktor yang dapat memengaruhi kesuburan, seperti pola makan. Mempertimbangkan penggunaan lada hitam, khususnya ekstrak etanol lada hitam, sebagai salah satu alternatif alami dalam meningkatkan kualitas sperma, khususnya bagi individu yang mengalami gangguan kesuburan atau terkait dengan diabetes.
2. Untuk institusi terkait diharapkan lebih aktif dalam menyebarkan informasi terkait masalah kesuburan dan potensi pengobatan alternatif berbasis herbal yang dapat membantu, dengan tetap memperhatikan pentingnya konsultasi medis. Program penyuluhan yang lebih terstruktur tentang pentingnya menjaga kesehatan sperma dan sel telur sebelum merencanakan kehamilan juga perlu didorong oleh institusi

terkait, termasuk melalui kampanye kesehatan publik. Serta dapat bekerja sama untuk mengembangkan dan menyebarkan temuan-temuan ilmiah yang berkaitan dengan kesehatan reproduksi, baik dalam konteks pengobatan konvensional maupun alternatif.

3. Untuk peneliti selanjutnya dapat melakukan penelitian tentang efek samping jangka panjang dari penggunaan ekstrak herbal seperti lada hitam perlu dilakukan untuk memastikan bahwa penggunaannya aman bagi kesehatan dalam jangka panjang. Serta uji toksisitas ekstrak etanol lada hitam agar tidak terjadi pemberian dosis yang salah.

DAFTAR PUSTAKA

- ADA, A.D.A. 2022. 13. Older Adults: Standards of Medical Care in Diabetes—2022. *Diabetes Care*, 45(Supplement_1): S195–S207.
- Adelati, S., Juniarto, A.Z. & Miranti, I.P. 2016. Histopatologi Spermatogenesis Testis Tikus Wistar Diabetes Melitus. *Jurnal Kedokteran Diponegoro (Diponegoro Medical Journal)*, 5(4): 1760–1769.
- Alrizaldi, A., Aisyah, R. & Jatmiko, S.W. 2021. The Effect of Coffee on The Quantity of Spermatozoa of Diabetic Wistar Rats Inducted By Aloxan. *Herb-Medicine Journal: Terbitan Berkala Ilmiah Herbal, Kedokteran dan Kesehatan*, 4(2): 11–22.
- Apriora, V.D., Amir, A. & Khairisyaf, O. 2015. Gambaran Morfologi Spermatozoa pada Perokok Sedang di Lingkungan PE Group yang Datang ke Bagian Biologi Fakultas Kedokteran Universitas Andalas. *Jurnal Kesehatan Andalas*, 4(2).
- Arundani, P., I'tishom, R. & Purwanto, B. 2021. Pemberian Ekstrak Rumpuk Kebar (*Biophytum Petersianum* Klotszch) Terhadap Viabilitas Spermatozoa Mencit (*Mus Musculus*) Diabetes Melitus. *Oceana Biomedicina Journal*, 4(1): 26–37.
- Azrifitria, A. & Putri, E. 2023. Efek Ekstrak Etanol 70% Daun Kemangi (*Ocimum americanum* L.) Terhadap Perbaikan Sel Spermatogenik Tikus Sprague-Dawley Jantan. *Pharmaceutical and Biomedical Sciences Journal (PBSJ)*, 5(1): 1–8.
- Bulqis, A. R., Ermayanti, N. G. A. M., & Wirasiti, N. 2020. Perbedaan kualitas sperma pada pasien penderita diabetes mellitus tipe 1 dan 2 di rsud. Lamadukelleng, sengkang, sulawesi selatan. *SIMBIOSIS*. 7(1): 17-27
- Dludla, P. V, Mabhida, S.E., Ziqubu, K. & *et al.* 2023. Pancreatic β -cell dysfunction in type 2 diabetes: Implications of inflammation and oxidative stress. *World Journal of Diabetes*, 14(3): 130–146.
- Ekaputri Hz, T.W., Sari, I.P. & Rizal, D.M. 2018. The Effect of Ethanol Extract of *Piper nigrum* L. Fruit on Reproductive System in Adult Male Wistar Rats: A Study of FSH, LH, Testosterone Level and Spermatogenic Cells. *Indonesian Journal of Pharmacy/Majalah Farmasi Indonesia*, 29(3).

- Ghasemi, A., Jeddi, S. & Kashfi, K. 2021. The Laboratory Rat: Age and Body Weight Matter. *EXCLI journal*, 20: 1431.
- Harahap, E.W., Sandora, N. & Winarto, W. 2017. Pengaruh Pemberian Antioksidan Vitamin C dan E Terhadap Konsentrasi Spermatozoa Mencit (*Mus Musculus*) yang Dipapar Asap Rokok. *Jurnal Ilmu Kedokteran (Journal of Medical Science)*, 5(1): 26–34.
- Hasri, H.A.S. 2021. Efektivitas Ekstrak Lada Hitam (*Piper Nigrum L*) dan Zink (Zn) Terhadap Viabilitas dan Morfologi Sperma. *Jurnal Medika Hutama*, 3(01 Oktober): 1507–1511.
- Hedrich, H.J. 2020. Taxonomy and Stocks and Strains. In *The Laboratory Rat*. Elsevier: 47–75.
- Ikhlas, E.N., Rizkuloh, L.R. & Mardianingrum, R. 2023. Analisa In Silico Senyawa Biji Lada Hitam (*Piper nigrum L.*) Terhadap Aktivitas Antioksidan. *Jurnal Riset Rumpun Ilmu Kesehatan*, 2(2): 301–321.
- Iqra, K.N., Amelia, A.C.R., Tarigan, S.N.Z.B.R. & *et al.* 2023. Pengaruh Pemberian Ekstrak Jahe Merah (*Zingiber Officinale Var. Rubrum*) dalam Meningkatkan Motilitas dan Morfologi Spermatozoa Mencit (*Mus Musculus L.*). *Jurnal Ilmu Kedokteran dan Kesehatan*, 10(12): 3417–3425.
- Iskandar, P.F. 2021. Efektivitas Ekstrak Lada Hitam (*Piper nigrum L*) Terhadap Jumlah dan Motilitas Spermatozoa. *Jurnal Ilmiah Kesehatan Sandi Husada*, 10(2): 683–688.
- Jin, S., Song, Y., Zhou, L. & *et al.* 2023. Depletion of CUL4B in macrophages ameliorates diabetic kidney disease via miR-194-5p/ITGA9 axis. *Cell Reports*, 42(6): 112550.
- Kesuma, D.G. 2013. Pengaruh Pemberian Ekstrak Lada Hitam (*Piper nigrum L*) Dan Seng (Zn) Terhadap Motilitas, Jumlah Dan Morfologi Spermatozoa Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Jantan Strain Wistar. *Medical Journal of Lampung University*, 2(3).
- Lal, R., Bhardwaj, R., Minz, R.W. & *et al.* 2023. Usefulness of a double immunofluorescence technique for detection of intestinal tTG-IgA deposits in diabetic and non-diabetic children with celiac disease. *Pediatrics & Neonatology*, 64(4): 388–397.
- Lestari, L. & Zulkarnain, Z. 2021. Diabetes Melitus: Review Etiologi, Patofisiologi, Gejala, Penyebab, Cara Pemeriksaan, Cara Pengobatan dan Cara Pencegahan. In *Prosiding Seminar Nasional Biologi*. 237–241.
- Liu, C., Yuan, Y., Zhou, J. *et al.* 2020. Piperine ameliorates insulin resistance via inhibiting metabolic inflammation in monosodium glutamate-treated obese mice. *BMC Endocrine Disorders*, 20: 1-15.

- Lwanga, S.K., Lemeshow, S. & Organization, W.H. 1991. *Sample Size Determination in Health Studies: A Practical Manual*. World Health Organization.
- Manehat, F.X., Dethan, A.A. & Tahuk, P.K. 2021. Motilitas, Viabilitas, Abnormalitas Spermatozoadanphsemen Sapi Bali Dalam Pengencer Sari Air Tebu-Kuningtelur yang Disimpan Dalam Waktu yang Berbeda. *Journal of Tropical Animal Science and Technology*, 3(2): 76–90.
- Matthews, J.J., Turner, M.D., Santos, L. & *et al.* 2023. Carnosine increases insulin-stimulated glucose uptake and reduces methylglyoxal-modified proteins in type-2 diabetic human skeletal muscle cells. *Amino Acids*, 55(3): 413–420.
- Mbongue, F.G.Y., Kamtchouing, P., Essame, O.J.L. & *et al.* 2005. Effect of The Aqueous Extract of Dry Fruits of Piper Guineense on The Reproductive Function of Adult Male Rats. *Indian Journal of Pharmacology*, 37(1): 30–32.
- Moosaie, F., Mohammadi, S., Saghazadeh, A. & *et al.* 2023. Brain-derived neurotrophic factor in diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*, 18(2): e0268816.
- Nugroho, S.W., Fauziyah, K.R., Sajuthi, D. & *et al.* 2018. Profil Tekanan Darah Normal Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Galur Wistar dan Sprague-Dawley. *Acta VETERINARIA Indonesiana*, 6(2): 32–37.
- Pairunan, E.G., Rumbajan, J.M. & Turalaki, G.L.A. 2022. Gen-gen pada Infertilitas Pria. *eBiomedik*, 10(1).
- Petersmann, A., Nauck, M., Müller-Wieland, D. & *et al.* 2018. Definition, Classification and Diagnosis of Diabetes Mellitus. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, 126(07): 406–410.
- Pongoh, A.F., De Queljoe, E. & Rotinsulu, H. 2020. Uji Antidiabetik Ekstrak Etanol Bunga Pepaya (*Carica papaya L.*) terhadap Tikus Putih Jantan (*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi Aloksan. *Pharmacon*, 9(1): 160–169.
- Reni, S., Kanedi, M., Nurcahyani, N. & *et al.* 2013. Histologi Testis Mencit (*Mus musculus L.*) Muda Dan Tua Yang Diberi Ekstrak Lada Hitam (*Piper nigrum L.*). *Jurnal Ilmiah Biologi Eksperimen dan Keanekaragaman Hayati (J-BEKH)*, 1(2): 92–95.
- Rizal, M., Sulistiowati, D., Sulaiman, A. & *et al.* 2016. Daya Hidup Spermatozoa Epididimis Kambing Peranakan Ettawa yang Dipreservasi dengan Pengencer Tris dan Bberbagai Konsentrasi Maltosa. *Jurnal Sain Veteriner*, 34(1): 122–129.

- Rosnizar, R., Nurfajri, N., Dasrul, D. & *et al.* 2021. Evaluasi Kualitas Spermatozoa Pada Beberapa Frekuensi Ejakulasi Terhadap Kerbau Lokal (*Bubalus bubalis*). *Jurnal Bioleuser*, 5(1).
- Sadewo, G.B., Hermawati, D. & Ariani, M.D. 2019. Pengaruh Pemberian Jus Alpukat (*Persea Americana* Mill) Terhadap Konsentrasi Spermatozoa Tikus Wistar Jantan yang Dipapar Asap Rokok. *Jurnal Kedokteran Diponegoro (Diponegoro Medical Journal)*, 8(2): 823–831.
- Safwan, S., Sugara, T. & Rohmi, M.K. 2016. Pengaruh Ekstrak Daun Kemangi (*Ocimum sanctum* L.) Terhadap Motilitas dan Konsentrasi Spermatozoa Mencit Jantan (*Mus musculus*). *Jurnal Ilmiah Ibnu Sina*, 1(2): 173–181.
- Shaker, A.M., Mohamed, M.E., Ramzy, T. & *et al.* 2023. Serum fatty acid-binding protein 4 as a biomarker for early detection of diabetic nephropathy in type 2 diabetes. *The Egyptian Journal of Internal Medicine*, 35(1): 22.
- Shari, A. 2022. Seleksi Spermatozoa pada Fertilisasi In Vitro (IVF). *Indonesian Journal of Health Science*, 2(1): 1–8.
- Son, J. & Accili, D. 2023. Reversing pancreatic β -cell dedifferentiation in the treatment of type 2 diabetes. *Experimental & Molecular Medicine*. <https://www.nature.com/articles/s12276-023-01043-8>.
- Stojanović-Radić, Z., Pejčić, M., Dimitrijević, M., *et al.*, J. 2019. Piperine-a major principle of black pepper: a review of its bioactivity and studies. *Applied Sciences*, 9(20): 4270.
- Sumiati, T., Ratnasari, D. & Febriyani, L. 2017. Uji Aktivitas Salep Ekstrak Etanol Daun Jambu Biji (*Psidium Guajava* Linn.) Terhadap Luka Bakar Derajat II Pada Tikus Jantan Putih. *Jurnal Farmamedika (Pharmamedika Journal)*, 2(1): 40–48.
- Sutyarso, M. & Kanedi, M. 2016. The Effect of Fruit Extracts of Black Pepper on The Fertility Potential of Male Albino Mice. *American Journal of Medical and Biological Research*, 4(1): 1–4.
- Tendean, P., Tendean, L. & Wantouw, B. 2015. Gambaran Spermogram Penderita Infertil dengan Varikokel. *eBiomedik*, 3(3).
- Tsamis, G., Vasdeki, D., Koufakis, T. & *et al.* 2023. Therapeutic Potentials of Reducing Liver Fat in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Close Association with Type 2 Diabetes. *Metabolites*, 13(4): 517.
- Ulfa, A.M., Nofita, N. & Bonita, B.N. 2020. Uji Aktivitas Penurunan Kadar Glukosa Darah Ekstrak Etanol Kulit Jeruk Nipis (*Citrus Aurantifolia*) Pada Tikus Jantan Sprague Dawley Yang Diinduksi Aloksan. *JFM (Jurnal Farmasi Malahayati)*, 3(2): 126–138.

- Veličkov, A.I., Djordjević, B., Lazarević, M. & *et al.* 2023. Distributions of Platelet-Derived Growth Factor Receptor- α Positive Cells and Interstitial Cells of Cajal in the Colon of Rats with Diabetes Mellitus Type 2. *Medicina*, 59(2): 308.
- Wulandari, N.L.W.E., Udayani, N.N.W., Dewi, N.L.K.A.A. & *et al.* 2024. Artikel Review: Pengaruh Pemberian Induksi Aloksan Terhadap Gula Darah Tikus. *Indonesian Journal of Pharmaceutical Education*, 4(2).
- Yousefzadeh, N., Jeddi, S., Zarkesh, M. & *et al.* 2023. Altered Sialin mRNA Gene Expression in Type 2 Diabetic Male Wistar Rats: Implications for Nitric Oxide Deficiency. *Scientific Reports*, 13(1): 4013.