

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Obesitas adalah keadaan ketidakseimbangan antara asupan dan pengeluaran energi dalam jangka panjang. Ketika energi yang masuk melalui makanan melebihi energi yang digunakan untuk metabolisme dan aktivitas sehari-hari, kelebihan energi disimpan sebagai lemak dalam jaringan adiposa, menyebabkan penambahan berat badan. Asupan energi tinggi sering kali berasal dari makanan padat energi dan tinggi lemak, sementara pengeluaran energi rendah biasanya disebabkan oleh kurangnya aktivitas fisik. Kombinasi dari gaya hidup kurang aktif dan pola makan tidak seimbang ini menyebabkan akumulasi lemak berlebih di tubuh (Riswanti, 2016).

Pola makan yang cenderung lebih banyak mengonsumsi makanan berlemak dan tinggi kolesterol berisiko menyebabkan peningkatan kadar lipid dalam darah atau disebut dengan hiperlipidemia (Widhiantara *et al.*, 2018). Keadaan hiperlipidemia berkorelasi positif dengan munculnya berbagai penyakit degeneratif seperti PJK (Penyakit Jantung Koroner), diabetes melitus, kanker, obesitas, dislipidemia, stroke, dan penurunan fungsi reproduksi hewan jantan (infertilitas). Beberapa dampak hiperlipidemia pada sistem reproduksi hewan jantan antara lain: penurunan motilitas spermatozoa, morfologi spermatozoa yang tidak normal, terhambatnya sekresi hormon testosteron dan *Luteinizing Hormone* (LH), degenerasi sel leydig, dan gangguan spermatogenesis (Permatasari dan Widhiantara, 2017).

Obesitas dapat menurunkan kualitas sperma, menyebabkan disfungsi ereksi, rendahnya kadar testosteron, dan menurunnya konsentrasi serta motilitas sperma. Hewan jantan obesitas juga mengalami peningkatan cacat sperma dan penurunan kemungkinan fertilitas. Salah satu penyebab utama penurunan kualitas sperma pada hewan jantan obesitas adalah kerusakan akibat *Reactive Oxygen Species* (ROS). Ketidakseimbangan antara produksi ROS dan kapasitas antioksidan, yang dikenal sebagai stres oksidatif, berkontribusi pada 30-80% kasus infertilitas hewan jantan (Jing *et al.*, 2023).

Peningkatan produksi radikal bebas dan ketidaksesuaian perkembangan lipid peroksida pada tingkat jaringan, keadaan tersebut memicu stres oksidatif yang merupakan suatu patofisiologi infertilitas pada hewan jantan. Tikus yang mengalami hiperlipidemia, menunjukkan terjadinya penurunan yang signifikan dari kadar testosteron plasma. Penurunan ini terjadi akibat dari terganggunya poros hipotalamus-hipofisis-testis dan degenerasi sel leydig, peningkatan produksi radikal bebas akibat dengan antioksidan maupun pengobatan farmakologis (18).

jenis pengobatan farmakologis, yaitu dengan obat sintetik sional (herbal). Meskipun obat sintetik sering kali efektif dalam penyakit, penggunaannya sering disertai dengan efek samping (Nuralinda *et al.*, 2016). Daun mangga (*Mangifera indica* L) tumbuhan yang di mana senyawa yang terkandung di dalamnya



adalah flavonoid, isoflavonoid, fenolik, vitamin C dan beta karoten sehingga berpotensi sebagai antioksidan yang dapat berpotensi menghambat radikal bebas (Nurdianti dan Rahmiyani, 2016).

Antioksidan merupakan zat yang dapat melawan pengaruh bahaya dari radikal bebas yang terbentuk sebagai hasil metabolisme oksidatif, yaitu hasil dari reaksi-reaksi kimia dan proses metabolik yang terjadi di dalam tubuh (Nurdianti dan Rahmiyani, 2016). Stres oksidatif dapat dicegah dan dikurangi dengan asupan antioksidan yang dapat meredam dampak negatif radikal bebas antara lain dengan menghambat pembentukan radikal bebas sehingga menjadi stabil dan tidak berbahaya bagi sel tubuh. Kandungan flavonoid dapat menekan stres oksidatif, memperbaiki peroksidase lipid, menurunkan kerusakan jaringan testis dan mencegah atrofi tubulus seminiferus (Tias, 2019).

Berdasarkan latar belakang tersebut, maka untuk mengetahui pengaruh penggunaan ekstrak daun mangga (*Mangifera indica L.*) pada kasus diet tinggi lemak terhadap sistem reproduksi hewan jantan maka dilakukan penelitian pengaruh pemberian ekstrak etanol daun mangga (*Mangifera indica L.*) terhadap indeks spermatogenesis tikus wistar (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi pakan tinggi lemak.

1.2 Tujuan dan Manfaat

1.2.1 Tujuan Penelitian

- a. Untuk melihat apakah terdapat pengaruh pemberian ekstrak etanol daun mangga (*Mangifera indica L.*) terhadap indeks spermatogenesis tikus wistar (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi diet tinggi lemak.

1.2.2 Manfaat Penelitian

- a. Manfaat Pengembangan Ilmu
Manfaat pengembangan ilmu pada penelitian ini adalah untuk mengetahui spermatogenesis tikus wistar (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi diet tinggi lemak setelah pemberian ekstrak etanol daun mangga (*Mangifera indica L.*).
- b. Manfaat Aplikasi
Manfaat aplikasi pada penelitian ini agar dapat menjadi rujukan bagi penelitian selanjutnya



1.3 Kajian Pustaka

1.3.1 Tikus Wistar

Tikus sering digunakan sebagai hewan percobaan dalam penelitian ilmiah. Sebelum suatu percobaan diterapkan pada manusia atau primata lainnya, biasanya dilakukan terlebih dahulu pada hewan percobaan seperti tikus. Hal ini karena tikus memiliki banyak kesamaan dengan manusia, terutama dalam sistem fungsi tubuhnya (Fitria *et al.*, 2015).



Gambar 1. Tikus Wistar (*Rattus norvegicus*), dengan salah satu ciri mata merah (Rosidah *et al.*, 2020).

Source: Rosidah *et al.* (2020) *Jurnal Bioteknologi & Biosains Indonesia*. 7(1): 136-146. <https://DOI:10.30972/vet.3416606>

Rattus norvegicus strain wistar memiliki karakteristik morfologi yaitu memiliki kepala yang lebar, telinga yang panjang, ekor yang panjangnya proposional dengan tubuhnya (panjangnya kurang dari panjang tubuh). Fenotip albino pada tikus wistar termanifestasi dalam warna putih, dengan mata yang menonjol dalam warna merah muda atau merah (Aisyah *et al.*, 2023). Selain itu, tikus ini memiliki ukuran tubuh yang moderat hingga besar untuk tikus laboratorium, memiliki usia reproduksi pada 7-10 minggu dengan berat badan 100-227g. Taksonomi *Rattus norvegicus* sebagai berikut (Wati *et al.*, 2024):

Kingdom	: Animalia
Phylum	: Chordata
Subphylum	: Vertebrata
Class	: Mammalia
Subclass	: Theria
Infraclass	: Eutheria
Order	: Rodentia
Suborder	: Myomorpha
Family	: Muridae
Superfamily	: Muroidea
Subfamily	: Murinae
Genus	: Rattus
Species	: Rattus norvegicus



1.3.2 Obesitas

Obesitas merupakan masalah epidemi global yang terus meningkat dari waktu ke waktu. Menurut *World Health Organization (WHO)*, obesitas didefinisikan sebagai akumulasi lemak yang berlebihan atau tidak normal hingga dapat mengganggu kesehatan. Pada pria, obesitas tidak hanya menjadi faktor pendukung, tetapi juga diduga sebagai salah satu penyebab utama infertilitas karena memengaruhi parameter semen (Putri dan Nadhirah, 2024). Masalah obesitas tidak hanya terjadi pada manusia, tetapi juga pada hewan kesayangan seperti kucing dan anjing. Penilaian obesitas pada hewan dilakukan melalui Indeks Massa Tubuh (IMT), dimana berat badan yang melebihi 20% dari berat ideal dianggap obesitas (Riswanti, 2016)

Menurut Arora *et al.*, (2023), adapun tabel *Body Condition Score (BCS)* untuk tikus sebagai berikut

Tabel 1. Penilaian tikus *Body Condition Score (BCS)*

BCS	Gambar	Keterangan
1		<ul style="list-style-type: none"> Segmentasi tulang belakang tampak jelas tidak ada lapisan daging di atas panggul dorsal Segmentasi <i>vertebrae caudal</i> menonjol
2		<ul style="list-style-type: none"> Segmentasi tulang belakang menonjol Lapisan daging tipis menutupi panggul, sedikit lemak Lapisan daging tipis menutupi tulang ekor, segmentasi dapat diraba dengan sedikit tekanan
3		<ul style="list-style-type: none"> Segmentasi tulang belakang mudah teraba Penyimpanan lemak subcutan yang sedang di atas panggul Penyimpanan lemak sedang di sekitar pangkal ekor, tulang ekor dapat diraba namun tidak tersegmentasi
4		<ul style="list-style-type: none"> Segmentasi kolom vertebra dengan sedikit tekanan Lemak subcutan tebal yang tersimpan di atas panggul bagian dorsal, tulang panggul dapat diraba dengan tekanan kuat Lemak tebal tersimpan di pangkal ekor, tulang ekor tidak teraba
		<ul style="list-style-type: none"> Segmentasi tulang belakang dapat diraba dengan tekanan kuat Lemak subcutan tebal yang tersimpan di atas panggul, bagian dorsal tulang panggul tidak teraba jika ditekan kuat Lemak tebal tersimpan di pangkal ekor, tulang ekor tidak teraba



Metode seperti *Body Condition Score* (BCS), yang menggabungkan penilaian visual dan palpasi jaringan adiposa, digunakan untuk mengklasifikasikan kondisi tubuh hewan ke dalam kategori tertentu, sehingga membantu memahami dampak obesitas pada kesehatan secara keseluruhan, termasuk potensi gangguan reproduksi (Riswanti, 2016).

1.3.3 Lemak

Lemak adalah molekul yang mengandung oksigen (O), hidrogen (H), karbon (C), nitrogen (N), dan fosfor (P). Molekul lemak terdiri dari empat komponen utama: satu molekul gliserol dan tiga molekul asam lemak. Lemak sangat penting untuk tubuh hewan karena berfungsi sebagai pelindung terhadap suhu dingin, pelarut vitamin A, D, E, dan K, penyusun hormon, dan sebagai sumber energi tertinggi (Santika, 2016).

Lemak, terutama dalam bentuk kolesterol, berperan penting sebagai prekursor utama dalam sintesis hormon steroid pada jantan. Kolesterol diubah menjadi pregnenolon di mitokondria sel, yang menjadi bahan dasar pembentukan hormon seperti testosteron, dihidrotestosteron (DHT), estrogen, dan progesteron. Testosteron merupakan hormon utama pada jantan yang berperan dalam perkembangan karakteristik seksual sekunder, sementara DHT adalah bentuk aktif yang memengaruhi fungsi reproduksi dan perkembangan organ seksual. Selain itu, kolesterol juga berkontribusi pada produksi kortikosteroid seperti kortisol, yang berfungsi dalam regulasi metabolisme energi dan respon stres. Oleh karena itu, asupan lemak yang seimbang sangat penting untuk menjaga fungsi hormonal yang optimal (Agustinus *et al.*, 2018).

Lemak atau lipid adalah senyawa organik yang bersifat nonpolar, sehingga tidak larut dalam air, tetapi larut dalam pelarut nonpolar seperti eter, alkohol, dan benzena. Di dalam tubuh makhluk hidup seperti hewan pasti memiliki lemak. Lemak merupakan salah satu sumber energi yang sangat penting dibutuhkan makhluk hidup guna melakukan aktivitas sehari-hari. Hewan mempunyai tubuh yang membutuhkan kadar lemak yang seimbang. Hal ini untuk menjaga agar cadangan energi tetap ada. Namun, jika lemak terdapat di dalam tubuh melebihi batas normal maka akan mengalami obesitas yang pada akhirnya akan menimbulkan berbagai macam jenis penyakit (Restusari, 2024).

1.3.4 Testis

Testis merupakan kelenjar utama dalam sistem reproduksi jantan yang bertanggung jawab dalam produksi gamet atau spermatozoa jantan (spermatogenesis) dan sintesis hormon jantan atau androgen (steroidogenesis). Terdapat sepasang testis yang terletak di daerah inguinal, tersimpan di dalam



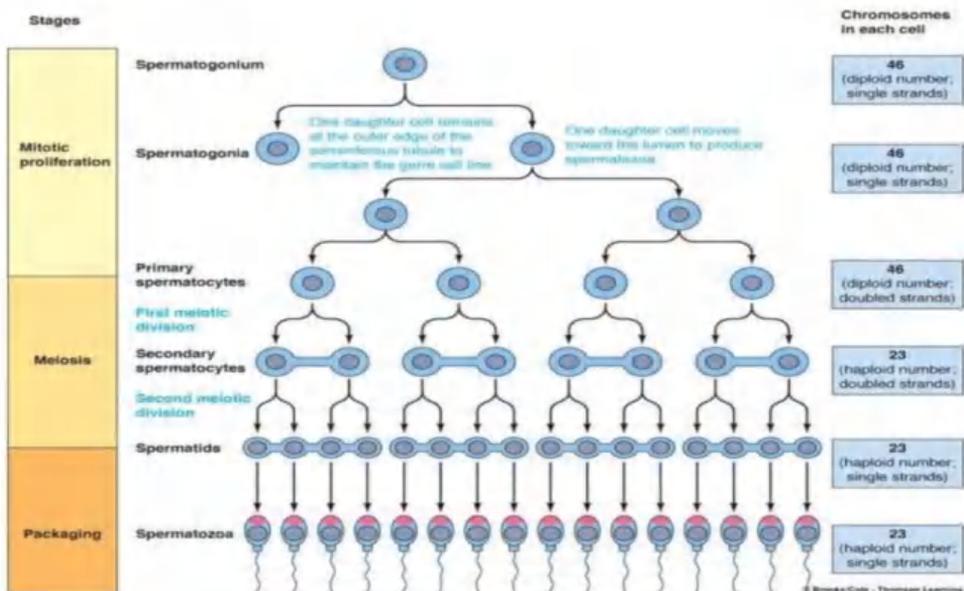
iliki suhu test lebih rendah dari suhu tubuh (sekitar 2–4 °C) yang spermatogenesis (Fitria *et al.*, 2015). Organ testis tikus normal memiliki ciri-ciri yang khas, yaitu berwarna merah muda, dengan yang saat diraba, serta berbentuk oval. Ciri-ciri ini menunjukkan yang berada dalam kondisi sehat dan tidak mengalami perubahan dapat menjalankan fungsi reproduksi secara optimal (Harun *et*



Gambar 2. Organ testis tikus normal, berwarna merah muda, konsistensi yang kenyal serta memiliki bentuk yang oval

Source : (Harun *et al.*,2017) *Jurnal Ilmiah Mahasiswa Veteriner*, 1(2), 226-234. <https://jim.usk.ac.id/FKH/article/view/2886>

Tubulus seminiferus adalah bagian utama testis yang terdiri dari sejumlah besar sel epitel germinal yang disebut spermatogonia (spermatogonium = tunggal). Spermatogonia terletak di dua sampai tiga lapisan luar sel-sel epitel tubulus seminiferus, spermatogonia terus menerus membelah untuk memperbanyak diri, sebagian dari spermatogonia berdiferensiasi melalui tahap-tahap perkembangan tertentu untuk membentuk sperma melalui proses yang disebut spermatogenesis (Susetyarani, 2015).



Gambar 3. Proses spermatogenesis

Source : (Shari, 2022) *Indonesian Journal of Health Science*, 2(1): 1-8.

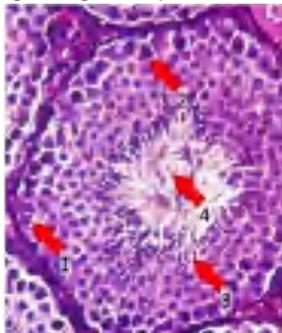
<http://dx.doi.org/10.54957/ijhs.v2i1.135>



Optimized using
trial version
www.balesio.com

is adalah perkembangan sel germinal spermatogonia menjadi matang di dalam tubulus seminiferus. Dimulai dari pembelahan tipe A di tepi membran basal menjadi spermatogonia tipe B, sudah ke lapisan sel sertoli untuk melewati pembelahan an spermatosit primer yang membelah menjadi spermatosit

sekunder. Meiosis kedua menghasilkan spermatid yang dimodifikasi oleh sel sertoli untuk menjadi spermatozoa matang dengan kepala, leher, dan ekor (shari, 2022).



Gambar 4. Histologi testis tikus normal. 1) Spermatogonia, 2) Spermatisit, 3) Spermatid, 4) Spermatozoa (Azzahra *et al.*, 2023)

Source : (Azzahra *et al.*, 2023) *Jurnal Kedokteran Diponegoro*, 5(4), 1760-1769.
<https://doi.org/10.14710/dmj.v5i4.15962>

1.3.5 Daun Mangga (*Mangifera indica* L)

Tanaman mangga menyebar ke wilayah Asia Tenggara termasuk Indonesia. Mangga merupakan tanaman berbuah musiman yang berupa pohon dan berasal dari India. Mangga memiliki potensi untuk dikembangkan karena tingkat keragaman genetiknya yang tinggi. Variasi pada bentuk, ukuran dan warna buah mangga menunjukkan keragaman genetik yang tinggi. Taksonomi *Mangifera indica* L. sebagai berikut (Mahdiyah dan Husni, 2019):

Kingdom	: <i>Plantae</i>
Divisi	: <i>Tracheophyta</i>
Kelas	: <i>Magnoliopsida</i>
Ordo	: <i>Sapindales</i>
Famili	: <i>Anacardiaceae</i>
Genus	: <i>Mangifera</i>
Spesies	: <i>Mangifera indica</i> L.

Daun mangga (*Mangifera indica* L) adalah salah satu tumbuhan yang dimana senyawa yang terkandung di dalamnya adalah flavonoid, isoflavonoid, fenolik, vitamin C dan beta karoten sehingga berpotensi sebagai antioksidan yang dapat berpotensi menghambat radikal bebas. Antioksidan merupakan zat yang dapat melawan pengaruh bahaya dari radikal bebas yang terbentuk sebagai hasil metabolisme oksidatif, yaitu hasil dari reaksi-reaksi kimia dan proses metabolik yang terjadi di dalam tubuh (Nurdianti dan Rahmiyani, 2016).



golek memiliki kandungan senyawa bioaktif seperti flavonoid, alkaloid, dan saponin. Penelitian menunjukkan bahwa ekstrak golek memiliki aktivitas antioksidan yang kuat, dengan isolasi senyawa jenis isoflavon yang memiliki potensi menangkal ani *et al.*, 2019). Ekstrak dari daun mangga arum manis juga memiliki aktivitas antioksidan seperti flavonoid dan fenolik yang memiliki potensi menghambat radikal bebas (Wigati dan Pratoko, 2024),

Menurut Afifah *et al.* (2023), flavonoid merupakan senyawa polifenol yang memiliki aktivitas antioksidan yang sangat kuat. Senyawa ini berperan dalam melindungi sel-sel germinal dari kerusakan akibat radikal bebas yang memicu stres oksidatif. Dengan menekan tingkat stres oksidatif, flavonoid berkontribusi dalam menjaga keberlangsungan sel-sel germinal di dalam tubulus seminiferus, yang merupakan komponen penting dalam proses pematangan sperma. Menurut Rodrigues (2023), flavonoid mampu menetralkan radikal bebas melalui mekanisme penyumbangan atom hidrogen atau elektron. Proses ini disebut sebagai mekanisme transfer atom hidrogen dan transfer elektron tunggal. Dengan berinteraksi dengan radikal bebas, flavonoid dapat mengurangi dampak kerusakan yang diakibatkan oleh Reactive Oksigen Spesies (ROS).



BAB II METODE PENELITIAN

2.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini telah dilaksanakan dari bulan Agustus hingga November 2024. Penelitian menggunakan hewan coba berupa tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur wistar berkelamin jantan. Tikus yang digunakan memiliki bobot 200-300 gram yang diperoleh dari Kabupaten Maros, kemudian akan diaklimatisasi dan diberikan perlakuan di *Animal Lab* Rumah Sakit Hewan Pendidikan Universitas Hasanuddin. Tempat pengambilan sampel serta pemeriksaan sampel dilakukan di Laboratorium Patologi Rumah Sakit Hewan Pendidikan Universitas Hasanuddin. Penelitian ini telah mendapatkan Persetujuan Etik dari Komisi Etik Hewan dan Penelitian Rumah Sakit Hewan Universitas Hasanuddin dengan nomor 002/UN4.1.RSHUH/B/PP36/2025, yang berlaku hingga 23 Januari 2026. Seluruh prosedur penelitian dilakukan sesuai dengan standar kesejahteraan hewan dan peraturan yang telah ditetapkan.

2.2 Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini yaitu berupa penelitian eksperimental laboratoris untuk melihat pengaruh pemberian ekstrak etanol daun mangga (*Mangifera indica* L.) terhadap spermatogenesis testis tikus wistar yang diinduksi diet tinggi lemak.

2.3 Materi Penelitian

2.3.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu ayakan (ukuran 40 Mesh), *blade*, blender, batang pengaduk, botol minum, *cassette*, *cover glass*, gelas ukur, gunting, *handscoon*, *incubator* (Mammert, Jerman), kandang ukuran 45 cm x 35 cm, kompor *portable* (Phillips, Indonesia), mikroskop olympus CX22 (ICEN, Cina), optilab 22, mikrotom, nampan, *object glass*, pemanas, penggaris, pinset, pipet tetes, sendok, sonde *needle*, *sputit* 3 ml, tabung reaksi, tempat spesimen, timbangan elektrik (Ohaus), *vacuum rotary evaporator* (Rotavapor, Swiss).

2.3.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu 24 ekor tikus *wistar* (*Rattus norvegicus*) jantan umur 2-3 bulan dengan berat 200-300 gram, alkohol bertingkat (70%, 80%, 90%, 95%), air, alkohol absolut I, alkohol absolut II, anhidrat asetat, asam sulfat, *aquades*, daun mangga arumanis dan mangga golek, etanol 70%, FeCl (III) 1%, Hematoksin-Eosin (HE), HCl, HCl 2N, kloroform, mentega, minyak kelapa, *neutral buffered formalin*, pakan standar, pakan tinggi lemak komersil, *paraffin*, *reagen Dragendroff*, *reagen Mayor*, serbuk magnesium, telur bebek, *tissue embedding*, *xylol*



Hewan Coba

lebih dahulu disterilkan dengan cara dikeringkan di bawah jian diberi serbuk kayu sebagai alas kandang. Setelah kandang ditempatkan dan diberi pakan pelet pada pagi dan sore hari *ad libitum* secukupnya. Kandang juga diberi anyaman kawat kemudian tikus diaklimatisasi selama 7 hari dan bersamaan kstrak.

2.4.2 Pembuatan Pakan Formulasi Diet Tinggi Lemak

Pakan formulasi yang akan diberikan kepada masing-masing kelompok perlakuan dibuat dengan kombinasi beberapa bahan yang mengandung kadar lemak. Bahan yang digunakan untuk membuat pakan formulasi diet tinggi lemak terdiri dari campuran mentega, minyak kelapa, dan telur bebek. Perbandingan ketiga bahan yang mengandung lemak tersebut yaitu 1:1:1 (gram), Campuran pakan ini diberikan kepada tikus sebanyak 2% dari total berat badan. Mentega dan minyak terlebih dahulu dipanaskan kemudian dicampur dengan kuning telur, setelah itu pakan formulasi ini kemudian dicampurkan dengan pakan diet tinggi lemak komersial yang telah di haluskan sebanyak 10 gram per ekor lalu dibuat dalam bentuk bolus-bolus.

2.4.3 Ekstraksi Daun Mangga (*Mangifera Indica L.*)

Ekstrak berupa sediaan pekat yang diperoleh dengan mengekstraksi zat aktif dari simplisia menggunakan pelarut sesuai seperti pelarut etanol. Kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan. Proses penguapan dilakukan untuk mendapatkan ekstrak pekat (Kementerian Kesehatan RI, 2020). Daun mangga arum manis dan mangga golek yang telah dikumpulkan, dicuci dan dibersihkan dari kotoran dengan air mengalir kemudian ditiriskan. Daun selanjutnya dirajang dan dikering anginkan pada suhu ruangan. Daun yang telah kering diblender hingga menjadi serbuk simplisia. Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70% hingga pelarut menjadi bening. Hasil maserasi disaring kemudian maseratnya dipekatkan dengan *rotary vacuum evaporator* pada suhu 40°C hingga diperoleh ekstrak kental (Robiyanto *et al.*, 2018).

2.4.4 Skrining Fitokimia

1. Identifikasi senyawa flavonoid

Sebanyak 10 µL ekstrak di dalam mikropipet, ditotolkan pada plat silika gel, fase gerak *n-hexane:etil asetat:asam formiat* (6:4:0,2), dengan penampak bercak sitroborat. Uji positif jika bercak berwarna kuning-hijau berpendar di bawah sinar UV-366nm setelah penyemprotan penampak bercak (Dewi *et al.*, 2021).

2. Identifikasi senyawa tanin

Sebanyak 10 µL ekstrak di dalam mikropipet, ditotolkan pada plat silika gel, fase gerak metanol:air (6:4) dengan penampak bercak FeCl₃ 5%. Uji positif jika bercak berwarna biru di bawah sinar UV-366nm setelah penyemprotan penampak bercak (Dewi *et al.*, 2021).

3. Identifikasi senyawa alkaloid

Sebanyak 10 µL ekstrak di dalam mikropipet, ditotolkan pada plat silika gel, fase gerak butanol:asam asetat:air (4:1:5) dengan penampak bercak *Dragendorf*. Uji positif jika bercak berwarna merah coklat di bawah sinar tampak setelah penyemprotan penampak bercak (Dewi *et al.*, 2021).



4. Identifikasi senyawa saponin

Sejumlah sampel ekstrak daun mangga dalam tabung reaksi ditambahkan 10 mL akuades panas, biarkan dingin lalu kocok secara kuat selama 30 detik. Kemudian tetesi asam klorida (HCl) 2N ke dalam tabung dan amati perubahan yang terjadi. Busa yang tidak hilang selama 10 menit setinggi 1-10 cm menunjukkan adanya senyawa saponin (Yuliawati *et al.*, 2022).

2.4.5 Perlakuan Sampel

Penentuan besar sampel yang digunakan dalam satu kelompok serta jumlah pengelompokan yang akan dilakukan dihitung dengan menggunakan rumus *Federer*.

Rumus *Federer*:

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

n = jumlah sampel perkelompok

t = jumlah pengelompokan

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

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

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

$$3n - 3 \geq 15$$

$$3n \geq 15 + 3$$

$$3n \geq 18$$

$$n \geq 6$$

Besar sampel pada penelitian ini yaitu 24 ekor tikus wistar yang dibagi dalam 4 kelompok perlakuan, untuk setiap kelompok perlakuan terdapat 6 ekor tikus wistar.

- K- : Kelompok kontrol negatif diberikan pakan standar selama 30 hari
- K+ : Kelompok kontrol positif yang diberikan pakan tinggi lemak komersil dan formulasi selama 30 hari
- KP1 : Kelompok yang diberikan pakan tinggi lemak komersil dan formulasi kemudian pemberian ekstrak etanol daun mangga arum manis dosis 150 mg/kg BB selama 30 hari
- KP2 : Kelompok yang diberikan pakan tinggi lemak komersil dan formulasi kemudian pemberian ekstrak etanol daun mangga golek dosis 150 mg/kg BB selama 30 hari

Mekanisme pemberian ekstrak etanol daun mangga (*Mangifera indica* L.) dimulai dengan pemberian pakan diet tinggi lemak komersil berupa pakan pelet di pagi hari jam 08.00 WITA. Kemudian diikuti dengan pemberian ekstrak etanol daun mangga (*Mangifera indica* L.) pada jam 10.00 WITA secara oral. Pemberian ekstrak diberikan sebanyak 0,6 ml dengan sediaan 30 mg ekstrak etanol daun mangga. Selanjutnya pada jam 16.00 WITA tikus kembali diberi pakan tinggi lemak komersil

perlakuan dilakukan 30 hari.

Preparat Histopatologi Testis

Preparat histopatologi meliputi fiksasi, dehidrasi, *clearing*, *cutting*, *staining*, *mounting*, dan *skoring*.

Histopatologi testis dibuat dengan metode parafin dan fiksatif yang adalah larutan 10% *Neutral Buffered Formalin* (NBF). Tahapan setelah proses fiksasi adalah melakukan pemotongan tipis



jaringan setebal kurang lebih 4 mm. Pisau yang digunakan untuk *trimming* adalah pisau *scalpel* No. 22-24. Jumlah potongan jaringan yang dapat dimuat dalam *embedding cassette* berkisar antara 1-5 buah disesuaikan dengan ukuran organ.

2. Dehidrasi jaringan dilakukan setelah *trimming* untuk mengeluarkan air yang terkandung dalam jaringan dengan menggunakan cairan dehidran seperti etanol atau *iso propyl* alkohol. Etanol yang digunakan yaitu konsentrasi bertingkat mulai 70%, 80%, 90%, 95%, dan 100%. Cairan dehidran kemudian dibersihkan dari dalam jaringan dengan menggunakan reagen pembersih yaitu xylol. Reagen pembersih ini akan diganti dengan parafin dengan cara dimasukkan dalam larutan parafin cair. Parafin yang digunakan mempunyai titik cair 56-58°C.
3. *Embedding* dilakukan setelah melalui proses dehidrasi, jaringan yang berada di dalam *embedding cassette* dipindahkan ke dalam *base mold*, kemudian diisi dengan parafin cair dan dilekatkan pada *embedding cassette* yang disebut blok.
4. *Cutting* dilakukan saat jaringan dalam blok yang telah dingin, selanjutnya dipotong pada ketebalan irisan 3 µm dengan *rotary microtome*. Irisan tersebut ditempel pada gelas objek kemudian dibiarkan kering pada suhu kamar.
5. *Staining*, dilakukan setelah preparat mikroskopis kering. Pewarnaan dengan metode pewarnaan *Hematoxylin Eosin*.
6. *Mounting*, dilakukan dengan meneteskan entelan secukupnya dan ditutup dengan *cover glass*. Pengamatan preparat pada setiap perlakuan dilakukan dengan mikroskop cahaya untuk mengamati histopatologis testis antar kelompok perlakuan.
7. *Scoring*, setelah dilakukan pemotongan dan pewarnaan, lalu sampel di evaluasi dibawah mikroskop, bagian jaringan diperiksa dan diklasifikasi seperti pada tabel di bawah ini:

Tabel 2. Skoring penilaian terhadap indeks spermatogenesis

skor	Karakteristik
4	Hanya spermatogonia yang ada
3	Ada spermatogonia dan spermatisit
2	Spermatogonia, spermatisit, spermatid dan spermatozoa < 5 sel
1	spermatogonia, spermatisit, spermatid dan spermatozoa > 5 sel

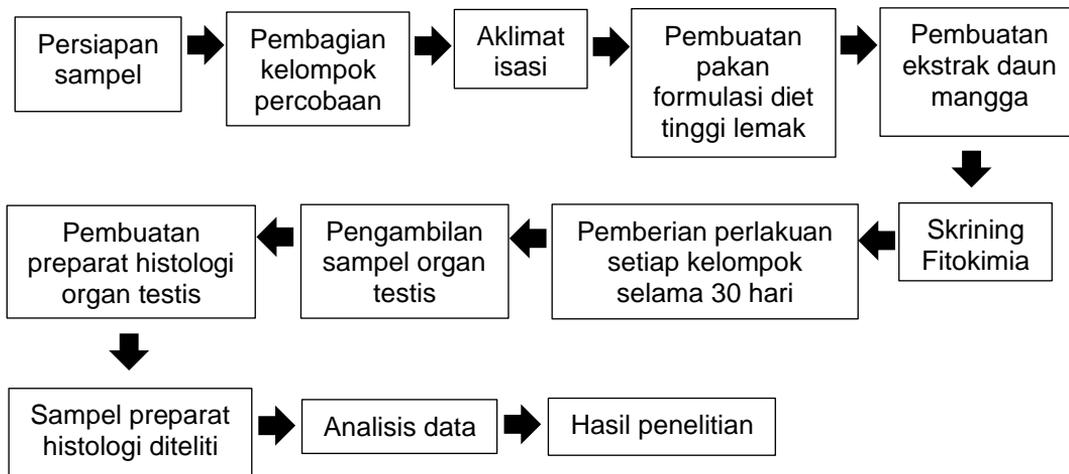
abi et al., (2022) *Acta Cirurgica Brasileria*, 25, 242-248.
0.1590/s0102-86502010000300005



2.5 Analisis Data

Analisis data dalam penelitian ini dilakukan secara deskriptif kualitatif dengan menggunakan sistem skoring untuk keempat lapang pandang dengan menilai pola spermatogenesis testis pada tubulus seminiferus. Skor diberikan berdasarkan komponen seluler yang teramati, yaitu spermatogonia, spermatosit, spermatid, dan spermatozoa. Skor 4 mencerminkan kondisi dengan hanya spermatogonia yang terlihat, menunjukkan gangguan parah pada proses spermatogenesis. Skor 3 menunjukkan keberadaan spermatogonia dan spermatosit, yang menandakan adanya gangguan pada tahap perkembangan sel sperma berikutnya. Skor 2 menunjukkan adanya spermatogonia, spermatosit, dan spermatid, namun jumlah spermatozoa kurang dari 5 sel. Skor 1 merupakan kondisi terbaik, dengan spermatogonia, spermatosit, spermatid, dan jumlah spermatozoa lebih dari 5 sel, menandakan spermatogenesis yang berlangsung optimal. Data yang diperoleh dari pengamatan mikroskopis ini digunakan untuk menggambarkan pola distribusi skor di setiap kelompok sampel, yang kemudian dianalisis untuk mengidentifikasi adanya perbedaan dalam tingkat kerusakan atau perbaikan jaringan testis, baik pada kelompok kontrol maupun kelompok perlakuan.

2.6 Alur Penelitian



Gambar 5. Alur Penelitian

