

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Reproduksi adalah proses biologis yang dilakukan oleh organisme untuk menghasilkan keturunan. Melalui proses ini, induk memindahkan materi genetik kepada anaknya (Ayuningtiyas, 2021). Fungsi reproduksi dikendalikan oleh sumbu hipotalamus-hipofisis-gonad, yang dipengaruhi oleh berbagai faktor, termasuk kondisi metabolisme dan status nutrisi. Ketidakseimbangan energi, baik kekurangan maupun kelebihan, dapat menyebabkan gangguan fungsi reproduksi. Hal ini berkontribusi pada timbulnya masalah seperti pubertas dini, menopause, andropause, gangguan ovulasi, dan hipogonadisme. Selain itu, kelebihan berat badan dan obesitas diketahui sebagai faktor risiko penting untuk berbagai penyakit, termasuk kanker pada jaringan reproduksi (Cruijeras dan Casanueva, 2015).

Obesitas merupakan salah satu penyebab utama kelompok penyakit tidak menular, termasuk gangguan kesuburan. Pada hewan jantan, infertilitas didefinisikan sebagai kegagalan pembuahan setelah kawin selama 12 bulan atau lebih. Infertilitas ini dapat disebabkan oleh penurunan produksi atau motilitas spermatozoa, yang berpengaruh pada kemampuan spermatozoa mencapai dan menembus sel telur selama pembuahan. Proses spermatogenesis, yaitu pembentukan spermatozoa dari spermatogonia, diatur oleh hormon testosteron, follicle-stimulating hormone (FSH), dan luteinizing hormone (LH) yang dihasilkan oleh sel Leydig dan Sertoli di tubulus seminiferus (Utomo *et al.*, 2019).

Kesuburan sangat bergantung pada kualitas spermatozoa serta keberhasilan pengirimannya ke sel telur. Selain hormon, spermatogenesis juga dipengaruhi oleh faktor-faktor lain seperti gangguan fungsi epididimis, paparan radiasi, peningkatan suhu juga obesitas yang dapat menyebabkan ketidakseimbangan antara produksi radikal bebas dan antioksidan, yang berujung pada stres oksidatif. Kondisi ini dapat merusak struktur dan fungsi testis, serta menurunkan kualitas spermatozoa (Utomo *et al.*, 2019).

Buah delima (*Punica granatum L.*) merupakan salah satu sumber antioksidan alami yang kaya akan polifenol dan antosianin. Polifenol dalam buah delima, termasuk flavonoid seperti flavonol dan antosianin, memiliki aktivitas antioksidan yang kuat. Antosianin berperan penting dalam mencegah kerusakan akibat stres oksidatif dengan menetralkan radikal bebas dan melindungi sel tubuh. Penelitian menunjukkan bahwa flavonoid dalam buah delima dapat menekan stres oksidatif, memperbaiki peroksidase lipid, menurunkan kerusakan jaringan pada testis, dan mencegah atrofi tubulus seminiferus. Antioksidan dalam buah delima juga meningkatkan kualitas spermatozoa dan memperbaiki gambaran histologis tubulus seminiferus pada tikus yang mengalami stres oksidatif (Tias, 2019).

Penelitian ini penting dilakukan untuk mengeksplorasi efek pemberian ekstrak daun delima terhadap kualitas spermatozoa pada tikus Wistar jantan yang diinduksi dengan diet tinggi lemak. Dengan demikian, penelitian ini diharapkan dapat memberikan kontribusi dalam pengembangan terapi berbasis bahan alami untuk meningkatkan kualitas spermatozoa pada kondisi infertilitas akibat pola makan tidak sehat.

1.2 Rumusan Masalah

Bagaimana kualitas spermatozoa tikus jantan setelah pemberian ekstrak daun delima yang diinduksi diet tinggi lemak?

1.3 Tujuan Penelitian

Untuk melihat apakah terdapat pengaruh pemberian ekstrak daun delima (*Punica granatum L.*) terhadap kualitas spermatozoa tikus wistar (*Rattus norvegicus*) jantan yang diinduksi diet tinggi lemak.

1.4 Manfaat Penelitian

1. Manfaat Pengembangan Ilmu

Manfaat pengembangan ilmu pada penelitian ini adalah untuk mengetahui kualitas spermatozoa tikus wistar (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi diet tinggi lemak setelah pemberian ekstrak daun delima (*Punica granatum* L.).

2. Manfaat Aplikasi

Manfaat aplikasi pada penelitian ini agar dapat menjadi rujukan bagi penelitian selanjutnya

1.5 Hipotesis

Berdasarkan uraian diatas, dapat diambil hipotesis penelitian bahwa adanya perubahan pada kualitas spermatozoa dari pemberian ekstrak daun delima pada tikus wistar yang diinduksi pakan tinggi lemak yang diamati melalui konsenstrasi, motilitas dan morfologi spermatozoa.

1.6 Keaslian Penelitian

Penelitian mengenai “Efek Ekstrak Daun Delima (*Punica Granatumi* L.) Terhadap Kualitas Spermatozoa Tikus Wistar (*Rattus Norvegicus*) Jantan Yang Diinduksi Diet Tinggi Lemak” belum pernah dilakukan sebelumnya, tetapi penelitian serupa pernah dilakukan.

Tabel 1. Keaslian Penelitian

Penulis	Judul
Santoso <i>et al.</i> , 2019	Potensi Pemberian Ekstrak Buah Delima (<i>Punica Granatum</i> L) Terhadap Kualitas Spermatozoa Tikus Putih (<i>Rattus Norvegicus</i>) Yang Terpapar Panas
Widjaya, RR Alvira, 2012	Uji Antifertilitas Ekstrak Etanol 70% Biji Delima (<i>Punica granatum</i> L) Pada Tikus Jantan Strain <i>Sprague-Dawley</i> Secara <i>in vivo</i>

1.7 Kajian Pustaka

1.7.1 Daun Delima (*Punica granatum* L.)



Gambar. 1 Tumbuhan *Punica granatum* (Setiawati, 2014)

(*Punica granatum* L.) merupakan salah satu sumber antioksidan dari tumbuh-tumbuhan dengan kandungan *polifenol* dan *antosianin* yang cukup tinggi. Polifenol pada daun delima terdiri dari flavonoid (flavonol, antosianin). Antosianin menjadi salah satu antioksidan kuat yang mampu mencegah berbagai kerusakan akibat stress oksidatif sehingga mampu melindungi sel dari radikal bebas. Stress 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 stress oksidatif, memperbaiki peroksidase lipid, menurunkan kerusakan jaringan di testis, dan

mencegah atrofi tubulus seminiferus. Aktivitas antioksidan daun delima meningkat di testis sehingga dapat mencegah kerusakan sel akibat stress oksidatif dan memperbaiki gambaran histologis testis serta kualitas spermatozoa tikus (Bahaudin, 2021). Selain itu, daun delima dijelaskan mengandung senyawa antibakteri. daun delima memiliki kandungan senyawa berupa alkaloid, flavonoid, tanin dan senyawa fenolik (fangidae *et al.*, 2018).

Beberapa senyawa lainnya yang terdapat pada *Punica granatum* yaitu alkaloid, saponin dan steroid berpengaruh baik secara langsung maupun tidak langsung terhadap keseimbangan hormonal tubuh, khususnya yang bertanggung jawab dalam menstimulasi proses spermatogenesis, yaitu *testosterone*, *Luteinizing hormone*, *Follicle stimulating hormone*, *estrogen* dan *growth hormone* (Widjaya, 2012).

Ketidak-seimbangan hormon-hormon tersebut dapat menurunkan bahkan dapat membuat sampai tidak terjadinya proses spermatogenesis, sehingga menyebabkan infertilitas. Terganggunya proses spermatogenesis selanjutnya akan berpengaruh pada penurunan ukuran diameter tubulus seminiferus sehingga jumlah spermatozoa yang matang di epididimis mengalami penurunan dan mengakibatkan penurunan pada bobot testis (Widjaya, 2012).

1.7.2 Tikus Wistar (*Rattus Norvegicus*)



Gambar. 2 Tikus Putih Galur wistar (Komang *et al.*, 2014)

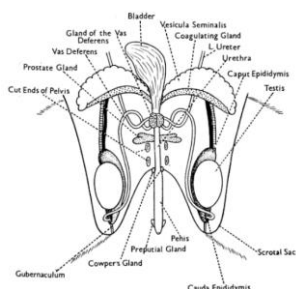
Galur tikus yang sering digunakan untuk penelitian adalah *galur Wistar* dan *Sprague dawley*. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) *galur Sprague dawley* dikembangkan dari tikus putih galur Wistar. Ciri-ciri *galur Wistar*, yaitu bertubuh panjang dengan kepala lebih sempit, telinga tebal dan pendek dengan rambut halus, mata berwarna merah, dan ekornya tidak pernah lebih panjang dari tubuhnya. Bobot badan tikus jantan pada umur dua belas minggu mencapai 240 gram sedangkan betinanya mencapai 200 gram (Komang *et al.*, 2014).

Obesitas pada tikus lebih mudah diperkirakan dengan BMI. BMI tikus wistar jantan yang normal berkisar antara 0,45 g/cm² hingga 0,68 g/cm². Tikus wistar jantan dengan BMI di atas 0,68 g/cm² dikategorikan sebagai obesitas. BMI pada tikus dihitung dengan cara berat badan (g) dibagi dengan panjang² (cm²) (Novelli *et al.*, 2007).

Indeks Lee biasa digunakan sebagai pengukuran obesitas pada ekperimental tikus. Indeks Lee dihitung dengan cara akar pangkat 3 dari berat badan (g) dibagi dengan panjang hidung hingga anus (cm) dikalikan dengan 1000 (Lei *et al.*, 2007). Apabila nilai indeks Lee > 300, maka tikus tersebut dinyatakan obesitas (Kosnayani *et al.*, 2021).

1.7.3 Reproduksi Tikus Jantan

1.7.3.1 Sistem Reproduksi Tikus Jantan



Gambar. 3 Anatomi Sistem Reproduksi Tikus Jantan (Fitria *et al.*, 2015).

Testis merupakan kelenjar utama dalam sistem reproduksi jantan yang bertanggung jawab terhadap produksi gamet jantan atau spermatozoa (spermatogenesis) dan sintesis hormon jantan atau androgen (*steroidogenesis*). Testis berjumlah sepasang, terletak di inguinal, tersimpan dalam kantung skrotum. Pada *mammal*, testis turun dan keluar dari rongga abdomen (*peritoneal*) menuju posisi *ekstrakorporeal* dan akhirnya masuk ke dalam skrotum (*inguinoskrotal*). Proses ini dikenal sebagai *descensus testiculorum* yang dikendalikan oleh androgen. Dengan posisi ini temperatur testis menjadi lebih rendah daripada temperatur tubuh (sekitar 2–4 °C) yang diperlukan untuk spermatogenesis (Fitria *et al.*, 2015).

Selain testis, terdapat kelenjar-kelenjar kelamin pelengkap (*accessory sex glands*), yaitu: vesikula seminalis, kelenjar koagulasi, prostat, *bulbourethralis* (kelenjar *cowper*), dan ampula. Kelenjar-kelenjar ini menghasilkan berbagai sekret yang berperan dalam transportasi spermatozoa, buffer, suplai nutrisi dan substrat metabolik untuk kehidupan spermatozoa terutama motilitas dan fertilitas, fungsi pelumasan, dan membentuk *vaginal plug*. Sekret yang dihasilkan *accessory sex glands* bersama-sama dengan spermatozoa dan sekret epididimis disebut semen. Spermatogenesis berlangsung di dalam tubulus seminiferus testis. Spermatogenesis meliputi beberapa fase, yaitu: mitosis, meiosis, spermiogenesis, golgi, capping, acrosomal, dan maturasi. Spermatozoa sebagai produk spermatogenesis mengalami migrasi dari tubulus seminiferus testis menuju epididimis untuk maturasi dan disimpan sementara. Stimulasi menyebabkan sebagian spermatozoa dialirkan melalui vas deferens menuju ampula untuk ditambahkan cairan dari *accessory sex glands* membentuk semen yang siap diejakulasikan (Fitria *et al.*, 2015).

1.7.3.2 Spermatozoa dan Spermatogenesis

Spermatozoa merupakan hasil spermatogenesis yang berisi informasi genetik. Awalnya pada tubulus seminiferus terdapat spermatogonium yang berubah menjadi spermatosit, kemudian melalui proses meiosis spermatosit berubah menjadi spermatid, lalu spermatid melewati proses diferensiasi sehingga menjadi spermatozoa (Dorland, 2013). Spermatogenesis adalah suatu proses kompleks ketika spermatogonium (sel germinativum primordial yang relatif belum diferensiasi) yang mengandung 46 kromosom berproliferasi dan diubah menjadi spermatozoa yang sangat khusus dan motil yang berisi 23 kromosom (Sherwood, 2013).

Spermatogenesis pada tikus putih galur wistar membutuhkan waktu selama 48 hari (Solihati, 2013). Spermatogenesis dimulai dengan spermatogonium yang merupakan sel punca dengan kromosom diploid. Spermatogonium akan mengalami mitosis dengan cara meninggalkan membran basalis melalui tight junction pada blood-testis barrier, lalu mengalami perkembangan dan berubah menjadi spermatosit primer yang memiliki kromosom diploid ($2n$). Sementara itu, beberapa spermatogonium akan tetap berada di dekat membran basalis dari tubulus seminiferus. Setelah itu spermatosit primer akan mereplikasi DNA dan memulai meiosis. Pada meiosis I, pasangan kromosom homolog akan berada pada bidang ekuator dan terjadilah pindah silang. Kemudian benang spindel akan menarik salinan kromosom pada setiap pasangan ke kutub pembelahan yang berlawanan lalu terbentuklah 2 sel yang disebut spermatosit sekunder dengan kromosom haploid (n). Setiap kromosom pada spermatosit sekunder terdiri dari dua kromatid yang dilekatkan oleh sentromer. Pada spermatosit sekunder tidak terjadi replikasi DNA. Pada meiosis 2, kromosom akan berjejer pada bidang ekuator dan kemudian dua kromatid pada tiap kromosom akan memisah dan terbentuklah empat sel haploid yang disebut spermatid. Tahap akhir dari spermatogenesis adalah spermiogenesis yang merupakan perkembangan dari spermatid haploid menjadi spermatozoa. Pada tahap ini tidak terjadi pembelahan. Setiap spermatid akan berubah menjadi satu sel spermatozoa (Tortora *et al.*, 2014).

1.7.3.3 Hormon Reproduksi Jantan

Menurut Tortora *et al.* (2014) hormon reproduksi jantan yang mempengaruhi proses spermatogenesis adalah sebagai berikut :

1. *Gonadotropin Releasing Hormone* (GnRH) : dikeluarkan oleh sel neurosekretori di hipotalamus berperan untuk menstimulasi pituitari bagian anterior untuk meningkatkan sekresi *Luteinizing hormone* (LH) dan *Follicle Stimulating Hormone* (FSH).
2. *Luteinizing hormone*: menstimulasi sel intersisial yang berada di antara tubulus seminiferus untuk mensekresikan hormone testosteron. Testosteron menurunkan pelepasan GnRH dan LH.
3. *Follicle stimulating hormone* (FSH): FSH dan testosteron menstimulasi sel sustentakuler untuk mensekresikan *Androgen Binding Protein* (ABP) ke lumen tubulus seminiferus dan cairan intersisial di sekitar sel spermatogenik. ABP berikatan dengan testosteron, mempertahankan konsentrasi tinggi. Testosteron menstimulasi tahap akhir dari spermatogenesis di tubulus seminiferus. Apabila derajat spermatogenesis yang dibutuhkan untuk fungsi reproduksi jantan sudah tercapai, sel sustentakuler akan melepaskan inhibin, suatu protein yang berperan untuk menghambat FSH melalui pituitari anterior. Sedangkan jika spermatogenesis rendah, maka inhibin yang dilepaskan akan lebih rendah, sehingga FSH lebih banyak disekresikan dan meningkatkan spermatogenesis.
4. Testosteron: hormon androgen utama dan merupakan hormon steroid yang disintesis dari kolesterol yang terdapat pada testis. Testosteron adalah hormon yang larut lemak sehingga mudah berdifusi keluar dari sel intersisial ke cairan intersisial dan kemudian masuk ke darah.

1.7.3.4 Hubungan Obesitas dengan Reproduksi

Obesitas sangat mempengaruhi organ-organ reproduksi salah satunya yaitu terjadi inflamasi. Inflamasi yang terjadi disebabkan oleh peningkatan ROS yang menimbulkan keadaan stres oksidatif. Keadaan stres oksidatif ini memberikan efek negatif pada testis berupa penurunan motilitas spermatozoa dan spermatogenesis juga peningkatan apoptosis sel germinal testis. Pemberian pakan tinggi lemak untuk menginduksi sindrom metabolik akan meningkatkan asam lemak bebas (FFA) dan lipogenesis sehingga menyebabkan hiperplasia dan hipertrofi adiposit. Adiposit yang mengalami hipertrofi dan hiperplasia akan memicu peningkatan produksi sitokin proinflamasi (de Moura e Dias *et al.*, 2021). Pada testis keadaan stress oksidatif akan meningkatkan defek pada spermatozoa dan fragmentasi DNA (Ting dan Bertrand, 2016).

1.7.3.5 Hubungan Ekstrak Daun Delima dengan Kualitas Spermatozoa

Hubungan antara efek ekstrak daun delima (*Punica granatum L.*) dengan kualitas spermatozoa pada tikus Wistar jantan yang diinduksi diet tinggi lemak terletak pada kemampuan ekstrak daun delima untuk mengurangi stres oksidatif dan meningkatkan kesehatan reproduksi. Diet tinggi lemak diketahui dapat menyebabkan obesitas dan stres oksidatif, yang berperan besar dalam menurunkan kualitas spermatozoa, seperti konsentrasi, motilitas, dan morfologi normal. Hal ini disebabkan oleh peningkatan produksi radikal bebas dan penurunan kapasitas antioksidan dalam daun delima mengandung senyawa aktif seperti flavonoid, tanin, dan alkaloid, yang memiliki sifat antioksidan. Senyawa ini mampu menetralkan radikal bebas dan mengurangi kerusakan oksidatif pada sel-sel tubuh, termasuk sel-sel dalam testis. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa flavonoid dalam daun delima dapat menekan peroksidasi lipid, meningkatkan aktivitas enzim antioksidan seperti *superoxide dismutase* (SOD) dan *glutathione peroxidase* (GPx), serta melindungi spermatogonia dan spermatozoa dari kerusakan akibat stres oksidatif (Aitken dan Drevet, 2020).

Pada tikus tinggi lemak, stres oksidatif juga dapat mempengaruhi integritas membran sel spermatozoa dan menurunkan kualitas spermatozoa secara keseluruhan. Pemberian ekstrak daun delima dilaporkan mampu memperbaiki kualitas spermatozoa, termasuk konsentrasi, motilitas, dan morfologi, melalui pengurangan stres oksidatif dan perbaikan lingkungan mikro testis (Tias, 2019).

BAB II METODOLOGI PENELITIAN

2.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini telah dilaksanakan bulan Maret hingga Juni 2024. Penelitian menggunakan hewan coba berupa tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur wistar berkelamin jantan. Tikus yang digunakan memiliki bobot 200-250 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.

2.2 Alat dan Bahan

2.2.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu timbangan digital, timbangan analitik, kandang ukuran 45 cm x 35 cm dan label kandang, tempat pakan dan botol minum, mistar, tabung ukur 50 ml, gelas beaker 50 mL, gelas beaker 500 mL, gelas beaker 1000 mL, labu terukur, mikropipet, klip plastik, spoit 3 cc, batang pengaduk, hotplate (pemanas), sonde oral, wadah pembiusan, alat bedah minor, neubauer improved, blender, batang pengaduk, kompor *portable* (Phillips, Indonesia), mikroskop olympus CX22 (ICEN, Cina), optilab 22, nampan, *object glass*, *cover glass*, *vacuum rotary evaporator* (Rotavapor, Swiss).

2.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu 24 ekor tikus *wistar* (*Rattus norvegicus*) jantan umur ± 3 bulan dengan berat 200-250 gram, sekam, daun delima, etanol 96%, *Eosin* 2%, mentega, lemak sapi, kuning telur bebek, pakan standar, NaCl 0,9%, aquades, *ether*, kapas, masker bedah, *handscoon*, kapas, *tissue* dan NaCMC

2.3 Populasi Sampel Penelitian

Populasi dalam penelitian ini adalah tikus putih galur wistar (*Rattus norvegicus*). Tikus putih galur wistar jantan dengan berat 200-250 gram, berumur ± 3 bulan yang bergerak aktif, kondisi fisik sehat, dan tidak cacat secara anatomis. Adapun sampel diambil dari populasi tikus wistar jantan dan besar sampel ditentukan berdasarkan rumus *Federer*.

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

Keterangan:

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.

a. KK- : Kelompok kontrol negatif diberikan pakan standar dan air minum secara

ad libitum selama 16 minggu

- b. KK+ : Kelompok kontrol positif yang diberikan pakan diet tinggi lemak dan air minum secara *ad libitum* selama 16 minggu
- c. KP1 : Kelompok tikus yang diberikan diet tinggi lemak dan air minum secara *ad libitum* selama 13 minggu, serta diberikan ekstrak daun delima dengan dosis 500 mg/kgBB via sonde pada awal minggu ke-14 hingga akhir minggu ke-16.
- d. KP2 : Kelompok tikus yang diberikan diet tinggi lemak dan air minum secara *ad libitum* selama 13 minggu, serta diberikan ekstrak daun delima dengan dosis 800 mg/kgBB via sonde pada awal minggu ke-14 hingga akhir minggu ke-16.

2.4 Prosedur Penelitian

1. Pemeliharaan Hewan Model

Sebelum memulai percobaan, tikus di aklimatisasi di dalam kandang selama 7 hari untuk penyeragaman cara hidup dan makanannya. Tiap tikus dipisah dan ditempatkan di kandangnya sendiri. Kesehatan tikus dipantau tiap harinya dan berat badan tikus ditimbang tiap 1 minggu. Tikus ditempatkan secara individual dalam kandangnya masing-masing dan diberikan pakan diet standar serta air minum secara *ad libitum*.

2. Penginduksian diet tinggi lemak (HFD), pemberian ekstrak daun delima (EDD) pada tikus dibagi menjadi 2 kelompok kontrol dan 2 kelompok perlakuan yang terdiri dari:

- | | | | |
|----------------|--------|---------|----------------------|
| • Kelompok KK- | 6 ekor | (-) HFD | (-) EDD |
| • Kelompok KK+ | 6 ekor | (+) HFD | (-) EDD |
| • Kelompok KP1 | 6 ekor | (+) HFD | (+) EDD 500 mg/kg BB |
| • Kelompok KP2 | 6 ekor | (+) HFD | (+) EDD 800 mg/kg BB |

Penginduksian diet tinggi lemak diberikan secara oral selama 13 minggu, ekstrak daun delima diberikan secara oral melalui sonde selama 3 minggu.

3. Pembuatan Ekstraksi Daun Delima (*Punica granatum* L.)

Daun delima dicuci dengan air mengalir sampai bersih dan ditiriskan, lalu dirajang kecil-kecil dan dikeringkan dengan cara diangin-anginkan pada suhu ruang. Setelah kering kemudian dibersihkan kembali dari kotoran yang mungkin tertinggal saat pengeringan lalu diolah dengan cara ditumbuk hingga menjadi bubuk halus dan diperoleh daun delima kering. Pengekstraksian dilakukan dengan cara 1 kg daun delima kering di masukkan ke wadah maserasi dan ditambahkan etanol 96% hingga daun delima terendam. Diaduk dan didiamkan selama 2 x 24 jam lalu disaring untuk mendapatkan filtrat. Lalu filtrat yang diperoleh dipekatkan dengan *rotary evaporator* hingga didapatkan ekstrak kental dan ditimbang untuk menghitung rendemennya.

4. Diberikan Diet Tinggi Lemak

Diet tinggi lemak yang diberikan berupa pakan yang diberikan secara oral dengan komposisi pakan berupa 50% lemak sapi, 25% mentega, 10% kuning telur bebek dan 15% pakan standar. Tiap tikus yang mendapat perlakuan induksi diet tinggi lemak akan menerima 30 gr diet perhari serta air minum secara *ad libitum* selama 13 minggu.

5. Pengamatan Sampel Kualitas Spermatozoa

a. Konsentrasi Spermatozoa

Setelah masa perlakuan selama 16 minggu selesai, dilakukan pengambilan spermatozoa pada cauda epididimis tikus wistar. Organ epididimis kauda diletakkan di cawan petri, dicacah serta disuspensikan menggunakan 2 ml NaCl 0,9%. Jumlah spermatozoa dihitung dengan hemasitometer *Improved Neubauer* menggunakan pengenceran yang dihisap dengan pipet leukosit. pemeriksaan pada kamar hitung hemasitometer *Improved Neubauer*, selanjutnya diteteskan pada kamar hitung. Pemeriksaan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 40x dan 100x. Jumlah spermatozoa dihitung di 5 kotak. Menurut Karimah (2017), jumlah spermatozoa dihitung dengan rumus sebagai berikut:

Konsentrasi (Juta/ml) = Faktor pengencer x jumlah dalam 5 kotak x $0,05 \times 10^6$

b. Motilitas Spermatozoa

Penghitungan motilitas spermatozoa diawali dengan mengambil suspensi spermatozoa sebanyak 10-15 μ l. Selanjutnya suspensi tersebut diletakkan pada *object glass* dan ditutup dengan menggunakan *cover glass*. Penilaian dilakukan dengan menggunakan mikroskop pembesaran 40x. Motilitas dinilai berdasarkan kategori spermatozoa yang bergerak dan tidak bergerak. Penghitungan persentase motilitas spermatozoa menggunakan rumus sebagai berikut (Bingga, 2021).

$$\text{Persentase motilitas spermatozoa} = \frac{A}{A+B} \times 100\%$$

Keterangan :

A : Bergerak

B : Tidak bergerak

c. Abnormalitas Spermatozoa

Untuk pengamatan morfologi, suspensi spermatozoa diteteskan di atas *object glass*, dibuat preparat hapus dan dikeringkan di udara. Selanjutnya sediaan hapus difiksasi dengan *ethanol* selama 5 menit, kemudian dikeringkan. Setelah kering, sediaan hapus dilakukan pewarnaan dengan *eosin* selama 1 menit. Setelah itu, sediaan dibilas dan dikeringkan. Setelah kering, amati di bawah mikroskop dengan perbesaran 400 kali. Pengamatan diulang 2 kali pada masing-masing tikus untuk menentukan presentase morfologi spermatozoa normal dan abnormal pada satu preparat. Dicatat bentuk/kelainan tiap spermatozoa pada setiap lapang pandang dan terakhir dihitung persentase morfologi spermatozoa yang normal dan abnormal (Gunawan *et al.*, 2017).

$$\text{Persentase abnormalitas spermatozoa} = \frac{ab}{n} \times 100\%$$

Keterangan:

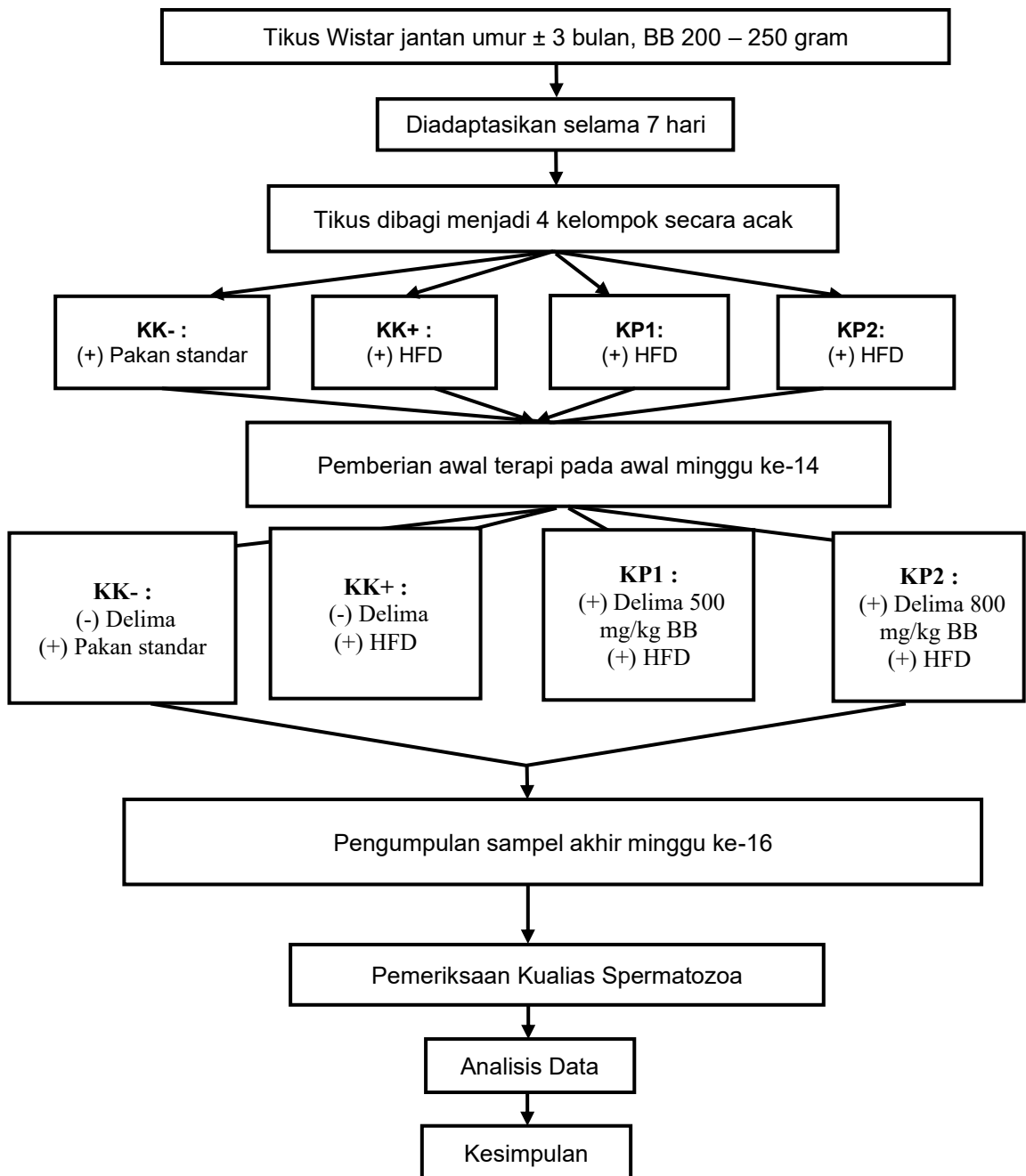
ab= Spermatozoa abnormal

n= Jumlah spermatozoa

2.5 Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis secara statistika dengan *One Way Anova* menggunakan program komputer SPSS for Windows, dan apabila terdapat perbedaan nyata dilanjutkan menggunakan uji *post hoc test* LSD sedangkan data kualitatif yang didapat disajikan secara deskriptif dalam bentuk gambar. Parameter yang diamati adalah melihat konsentrasi, motilitas, dan morfologi dari spermatozoa yang dihasilkan setelah pemberian ekstrak daun delima.

2.6 Alur Penelitian



Gambar. 4 Alur Penelitian