

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Reproduksi merupakan kemampuan suatu organisme untuk terus berkembang biak dan menghasilkan individu baru. Proses ini berperan penting dalam memastikan terbentuknya keturunan baru dan pewarisan genetik dari induk (Hayati, 2019). Pada hewan jantan, sistem reproduksi berfungsi untuk menghasilkan sel kelamin jantan atau spermatozoa. Proses fisiologis dalam tubuh hewan jantan dapat mempengaruhi proses produksi, pematangan, dan kelangsungan hidup spermatozoa (Bertolla, 2020).

Kualitas spermatozoa merupakan faktor utama dalam menentukan keberhasilan reproduksi pada hewan jantan. Kemampuan hewan jantan dalam menghasilkan keturunan bergantung pada kualitas spermatozoa yang diproduksi oleh testis melalui proses spermatogenesis, dan kemampuan organ reproduksi membawa spermatozoa hingga menuju dan bertemu dengan sel telur (Umar et al., 2015). Penilaian kualitas spermatozoa dapat dilakukan melalui beberapa parameter, yaitu secara makroskopis dan mikroskopis. Parameter pemeriksaan mikroskopis spermatozoa mencakup motilitas spermatozoa, konsentrasi, persentase spermatozoa hidup, dan tingkat abnormalitas spermatozoa. Penilaian parameter tersebut penting untuk menentukan kualitas reproduksi pada hewan jantan dan memastikan kemampuan fertilisasinya (Rosnizar et al., 2021).

Salah satu upaya yang dapat dilakukan untuk meningkatkan kualitas spermatozoa yaitu dengan pemberian senyawa bioaktif, seperti flavonoid, alkaloid, dan polifenol yang berperan sebagai antioksidan, juga vitamin C dan vitamin E. Buah markisa (*Passiflora edulis*) merupakan salah satu sumber flavonoid alami yang memiliki potensi sebagai agen antioksidan. Menurut Weyya et al. (2024), buah markisa memiliki kandungan nutrisi yang tinggi. Buah markisa mengandung berbagai senyawa bioaktif seperti karotenoid (β -karoten dan lutein), polifenol (asam galat, piceatannol, dan asam neoklorogenat), serta flavonoid (vetexi), yang memiliki aktivitas antioksidan kuat. Selain itu, buah markisa juga mengandung vitamin C yang berperan penting dalam menjaga keseimbangan redoks seluler.

Buah markisa (*Passiflora edulis*) merupakan salah satu komoditas khas Sulawesi Selatan tepatnya di Malino, Kabupaten Gowa, yang dikenal sebagai salah satu daerah penghasil utama markisa. Meskipun demikian, pemanfaatan buah markisa masih belum optimal untuk dapat meningkatkan nilai tambahnya (Fauzan dan Nathaniel, 2022). Manfaat senyawa bioaktif dalam buah markisa juga telah banyak diteliti. Penelitian mengenai manfaat kandungan ekstrak buah markisa (*Passiflora edulis*) bagi kesehatan telah dilakukan sebelumnya oleh Kristanti dan Purnawati (2023), penelitian tersebut membahas manfaat kandungan ekstrak buah markisa (*Passiflora edulis*) sebagai sumber mineral, vitamin A, C, D, dan E juga flavanoid seperti polifenol alami yang memiliki aktivitas antioksidan dan bermanfaat bagi kesehatan. Namun, kajian yang secara spesifik mengevaluasi pengaruh pemberian ekstrak buah markisa terhadap kualitas spermatozoa pada hewan model, khususnya mencit, masih terbatas.

Berdasarkan hal tersebut, penelitian ini bertujuan untuk melihat potensi kandungan senyawa bioaktif pada buah markisa dan penggunaannya dalam bidang reproduksi. Penelitian ini dilakukan untuk melihat pengaruh pemberian ekstrak buah

markisa terhadap kualitas spermatozoa mencit (*Mus musculus L.*). Penelitian ini akan meninjau parameter kualitas spermatozoa, seperti motilitas, konsentrasi dan morfologi spermatozoa. Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi referensi awal dalam pengembangan terapi alami untuk meningkatkan kualitas spermatozoa.

1.1.1 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah dipaparkan, maka dapat diambil rumusan masalah sebagai berikut:

1. Bagaimana pengaruh ekstrak buah markisa (*Passiflora edulis*) terhadap kualitas spermatozoa pada mencit (*Mus musculus L.*)?
2. Berapa dosis ekstrak buah markisa (*Passiflora edulis*) yang optimal digunakan dalam meningkatkan kualitas spermatozoa mencit (*Mus musculus L.*)?

1.1.2 Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah yang telah dipaparkan maka dapat tujuan penelitian pada penelitian ini sebagai berikut:

1. Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak buah markisa (*Passiflora edulis*) terhadap kualitas spermatozoa mencit berdasarkan parameter motilitas, konsentrasi, dan morfologi spermatozoa.
2. Menentukan dosis ekstrak buah markisa (*Passiflora edulis*) yang optimal digunakan untuk meningkatkan kualitas spermatozoa mencit (*Mus musculus L.*)

1.1.3 Manfaat Penelitian

1. Manfaat Pengembangan Ilmu
Penelitian ini diharapkan menjadi dasar penelitian yang lebih lanjut terkait pemanfaatan senyawa bioaktif dalam bidang reproduksi hewan, khususnya potensi ekstrak buah markisa sebagai sumber antioksidan alami yang berperan dalam meningkatkan kualitas spermatozoa.
2. Manfaat Aplikasi
Penelitian ini diharapkan menjadi referensi dalam mencari alternatif alami untuk meningkatkan kualitas spermatozoa pada hewan jantan bagi bidang kedokteran hewan.

1.1.4 Hipotesis

Berdasarkan uraian di atas, dapat diambil hipotesis penelitian bahwa senyawa bioaktif yang berperan sebagai antioksidan, seperti flavonoid, alkaloid, polifenol, dan vitamin C serta vitamin E yang terkandung dalam ekstrak buah markisa, dapat meningkatkan kualitas spermatozoa pada mencit.

1.1.5 Keaslian Penelitian

Berdasarkan penelusuran pustaka penulis, hingga saat ini belum ditemukan publikasi penelitian secara spesifik mengenai bagaimana pengaruh pemberian ekstrak markisa (*Passiflora edulis*) terhadap kualitas spermatozoa mencit (*Mus musculus L.*). Namun, penelitian yang pernah dilakukan dan berkaitan dengan topik ini yaitu penelitian yang dilakukan oleh Kristanti dan Purnawati (2023), dengan judul "The Effects of Passion Fruit (*Passiflora Edulis*) Seed Extract For Health Benefit". Penelitian tersebut membahas terkait manfaat kandungan ekstrak buah markisa (*Passiflora edulis*) sebagai sumber mineral, vitamin A, C, D, dan E juga flavanoid seperti polifenol alami yang memiliki

aktivitas antioksidan dan bermanfaat bagi kesehatan. Selain itu, penelitian sebelumnya juga telah dilakukan oleh Anggun et al. (2023) dengan judul “Pengaruh Pemberian Ekstrak Tauge Terhadap Kualitas Spermatozoa Mencit Jantan (*Mus musculus*)”. Penelitian tersebut meneliti efek ekstrak tauge yang juga mengandung senyawa bioaktif seperti, flavonoid, alkaloid, polifenol, dan vitamin C serta vitamin E yang berpengaruh meningkatkan kualitas spermatozoa, sehingga dapat dijadikan sebagai referensi dalam penelitian ini.

1.2 Kajian Pustaka

1.2.1 Markisa (*Passiflora edulis*)

1.2.1.1 Klasifikasi Markisa (*Passiflora edulis*)

Klasifikasi markisa menurut Ismailiyanti (2022) adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Spermatophyte
Sub Divisi	: Angiospermae
Class	: Dicotyledoneae
Ordo	: Passiflorae
Famili	: Passifloraceae
Genus	: <i>Passiflora</i>
Spesies	: <i>Passiflora edulis</i>



Gambar 1. Buah Markisa (He et al., 2020)

Menurut He et al. (2020), buah markisa (*Passiflora edulis*) berasal dari genus *Passiflora* terdiri dari sekitar 500 spesies. *Passiflora edulis* adalah salah satu spesies yang terkenal karena memiliki nilai ekonomi dan manfaat dalam pengobatan. Buah markisa berukuran relatif kecil (panjang 4-9 cm dan Diameter 3,5-7 cm) dan memiliki kulit berwarna kuning yang keras, dan tebal. Bijinya berwarna hitam dan daging buahnya bersifat asam dan memiliki rasa aromatik yang kuat.

1.2.1.2 Kandungan dan Manfaat

Buah markisa (*Passiflora edulis*) merupakan tanaman yang tersebar luas di wilayah tropis dan subtropis di dunia dan dikenal karena keseimbangan nutrisinya dan manfaatnya bagi kesehatan. Berdasarkan hasil identifikasi menggunakan uji fitokimia, komponen utama yang terdapat dalam buah markisa meliputi flavonoid, polifenol, pektin, dan karotenoid. Selain itu, buah ini juga kaya akan berbagai nutrisi seperti vitamin C, vitamin E, serat pangan, vitamin B, niasin, zat besi, fosfor, dan mineral lainnya. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa senyawa bioaktif dan kandungan nutrisi dalam buah markisa memiliki berbagai manfaat kesehatan, termasuk sebagai antioksidan,

antimikroba, antiinflamasi, antihipertensi, hepatoprotektif, antidiabetes, dan memiliki aktivitas antidepresan (He et al., 2020).

Kandungan nutrisi buah markisa yang tinggi mencakup senyawa bioaktif, vitamin, dan mineral, menjadikannya salah satu sumber antioksidan yang potensial. Senyawa bioaktif yang ditemukan di dalamnya meliputi flavonoid (70,1 mg setara kuersetin per 100 g), polifenol, karotenoid (3,8 mg β -karoten setara per 100 g), dan vitamin C (44,4 mg asam askorbat setara per 100 g), yang berperan dalam aktivitas antioksidan. Selain itu, berdasarkan uji FRAP, senyawa fenolik dalam buah markisa juga menunjukkan aktivitas antioksidan yang tinggi (Malaterre et al., 2016).

Selain komponen tersebut, buah markisa juga mengandung pektin dan serat pangan yang memiliki manfaat efektif sebagai antioksidan. Bagian kulit, *pulp*, dan bijinya diketahui memiliki kandungan kalsium dan seng yang cukup tinggi. Sementara itu, sari buahnya secara alami mengandung mineral seperti kalsium (Ca), mangan (Mn), fosfor (P), kalium (K), dan lainnya. *Pulp* buah markisa sendiri dikenal sebagai sumber makanan kaya flavonoid, dengan total flavonoid sebesar 158,0 mg/mL, isoorientin sebesar 16,2 mg/mL (Zeraik dan Yariwake, 2010), dan *quercetin* sebesar 0,42 mg/g. Flavonoid utama yang berhasil diidentifikasi dalam buah markisa meliputi *vitexin*, *isovitexin*, *isoorientin*, apigenin, *quercetin*, luteolin, dan turunannya (He et al., 2020).

1.2.2 Mencit (*Mus musculus L.*)

Taksonomi mencit menurut Nugroho (2018) adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Sub filum	: Vertebrata
Class	: Mamalia
Sub class	: Theria
Ordo	: Rodentia
Famili	: Muridae
Sub Famili	: Murinae
Genus	: <i>Mus</i>
Spesies	: <i>Mus musculus</i>



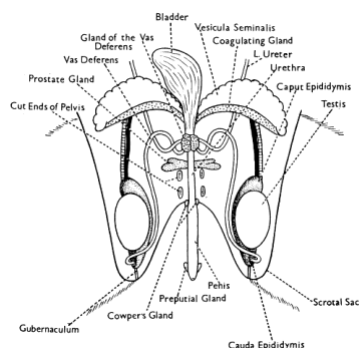
Gambar 2. Mencit (*Mus musculus L.*) (Khairani et al., 2024)

Nugroho (2018), menyatakan bahwa mencit dikelompokkan dalam *class* mamalia. Seperti telah diketahui, mamalia adalah kelompok hewan vertebrata yang menduduki tempat tertinggi dalam perkembangan hewan. Penggunaan mencit sebagai hewan model sekitar 40% dalam penelitian atau sebagai hewan model laboratorium. Penggunaan mencit sebagai hewan model ini dikarenakan mencit memiliki karakteristik

reproduksi yang mirip dengan mamalia lain, seperti sapi, kambing, domba dan babi. Selain itu, mencit juga memiliki siklus hidup yang relatif pendek dan mudah untuk ditangani. Kemiripan anatomi dan fisiologi mencit dengan kelompok mamalia lain menjadi alasan mencit sering digunakan sebagai hewan uji laboratorium dan penelitian.

1.2.3 Organ Reproduksi

Sistem reproduksi jantan terdiri dari beberapa struktur utama, termasuk *epididimis* dan duktus deferens, kelenjar reproduksi tambahan (kelenjar ampula, kelenjar vesikuler, prostat, dan kelenjar bulbourethral), uretra, juga penis. Testis berperan dalam produksi spermatozoa (sel sperma) dan hormon testosteron sebagai hormon reproduksi utama pada jantan. Selain itu, skrotum yang merupakan organ eksternal memiliki fungsi penting dalam menyediakan lingkungan yang optimal bagi proses produksi dan pematangan spermatozoa (Iqra et al., 2023). Pada hewan jantan, organ reproduksi internal meliputi sepasang testis sebagai penghasil spermatozoa dan *epididimis* yang berfungsi sebagai saluran pematangan spermatozoa. Sementara itu, organ reproduksi eksternal mencakup penis yang berperan dalam transfer spermatozoa ke dalam saluran reproduksi betina (Susetyarini et al., 2019). Secara umum, sistem reproduksi jantan memiliki tiga fungsi utama, yaitu menghasilkan dan mematangkan spermatozoa di testis, menyimpan dan mengangkut spermatozoa melalui saluran reproduksi, juga mendepositkan semen ke dalam saluran reproduksi betina melalui penis (Iqra et al., 2023).



Gambar 3. Organ Reproduksi Mencit Jantan (Fitria et al., 2015)

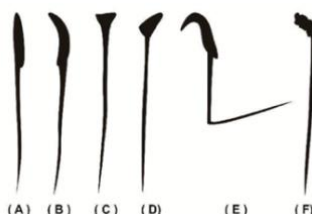
Selain organ reproduksi, sistem reproduksi juga melibatkan berbagai hormon yang berperan dalam mendukung proses reproduksi, baik pada jantan maupun betina. Pada hewan jantan, terdapat empat fungsi utama hormon reproduksi, yaitu mempertahankan proses spermatogenesis, memproduksi spermatozoa, mengontrol perilaku seksual (libido dan agresivitas), dan membentuk karakteristik sekunder pada tubuh. Salah satu hormon utama dalam sistem reproduksi jantan adalah testosteron, yang memiliki peran penting dalam mengatur spermatogenesis, memelihara sel Sertoli, dan menentukan kualitas spermatozoa. Selain itu, testosteron juga berperan dalam perkembangan karakteristik seksual sekunder, mempertahankan perilaku seksual yang normal, dan mendukung produksi spermatozoa. Hormon ini juga berperan dalam menjaga kelangsungan hidup spermatozoa di dalam *epididimis*, sehingga gangguan dalam sekresinya dapat menyebabkan penurunan jumlah spermatozoa yang hidup. Proses pembentukan spermatozoa dalam testis dikenal sebagai spermatogenesis, yaitu

proses internal yang berlangsung secara rutin di dalam tubuh untuk menghasilkan sel spermatozoa di testis, sebagai organ reproduksi utama pada jantan (Iqra et al., 2023).

1.2.4 Kualitas Spermatozoa

Kemampuan spermatozoa dalam membuahi sel telur dipengaruhi oleh kualitas dan kuantitasnya, yang mencakup konsentrasi, motilitas, dan morfologi spermatozoa. Spermatozoa dengan kualitas yang rendah tidak mampu membuahi sel telur secara optimal (Dewanto et al., 2017). Proses pembentukan spermatozoa berlangsung di dalam tubulus seminiferus yang terletak di dalam testis. Spermatozoa yang memiliki bentuk normal umumnya berbentuk memanjang, terdiri dari kepala, leher, dan ekor (Susetyarini et al., 2019). Kualitas spermatozoa dinilai berdasarkan beberapa parameter, yaitu motilitas, yang dikategorikan menjadi motilitas baik, kurang baik, dan tidak motil; morfologi, yang mencakup bentuk normal atau abnormal dengan kemungkinan kelainan pada kepala, *midpiece*, atau ekor; konsentrasi spermatozoa; dan viabilitas atau daya hidup spermatozoa. Parameter-parameter ini berperan penting dalam menentukan tingkat fertilitas individu jantan (Wati et al., 2023).

Analisis abnormalitas spermatozoa dilakukan dengan mengamati morfologi spermatozoa. Spermatozoa normal pada mencit terdiri dari tiga bagian utama, yaitu kepala, leher, dan ekor. Gerakan normal spermatozoa bergerak lurus ke depan, yang dipengaruhi oleh keseimbangan gerak ekornya. Keseimbangan ekor spermatozoa sangat bergantung pada bentuk morfologinya, sehingga nilai motilitas sangat ditentukan oleh proporsi spermatozoa dengan bentuk yang normal. Spermatozoa yang diproduksi oleh testis mencit memiliki variasi dalam panjang, lebar, dan bentuk. Kepala spermatozoa mencit berbentuk sabit atau kait, bagian tengah (*midpiece*) pendek, dan ekor yang sangat panjang (Wati et al., 2023).



Gambar 4. Contoh Morfologi Spermatozoa Abnormal (A) Kepala Tidak Terkait, (B) Kepala Berbentuk Pisang, (C dan D) Kepala Berbentuk Pin, (E) Ekor Bengkok, (F) Kepala Amorfo (Luthfi dan Noor, 2015)

Kepala spermatozoa mencit memiliki panjang sekitar 0,008 mm, sementara panjang total spermatozoa normal berkisar 0,1226 mm. Kelainan morfologis spermatozoa hingga 20% masih dianggap normal, tetapi apabila angka ini mendekati 50%, dapat menyebabkan gangguan fertilitas. Abnormalitas morfologi spermatozoa dapat menghambat pergerakan energi menuju ekor, sehingga mengurangi kecepatan motilitasnya. Selain itu, kelainan morfologi juga menyebabkan spermatozoa tidak mampu bergerak cepat dan lurus, yang pada akhirnya dapat menurunkan potensi fertilisasi. Motilitas spermatozoa sangat bergantung pada suplai energi dalam bentuk *adenosine triphosphate* (ATP) yang dihasilkan dari proses metabolisme seluler (Wati et al., 2023).

Motilitas merupakan karakteristik esensial dari gamet jantan yang memungkinkan spermatozoa untuk secara aktif mencapai dan menembus gamet betina, baik dalam organisme dengan fertilisasi internal maupun eksternal. Motilitas spermatozoa dipengaruhi oleh berbagai faktor internal dan eksternal serta bergantung pada struktur flagelanya (Iqra et al., 2023). Analisis spermatozoa dapat mengidentifikasi berbagai gangguan fertilitas pada jantan, seperti *oligozoospermia* (konsentrasi spermatozoa rendah), *asthenozoospermia* (penurunan motilitas spermatozoa), *teratozoospermia* (morfologi spermatozoa abnormal), dan kombinasi dari ketiganya (*oligoasthenoteratozoospermia*). Evaluasi kualitas spermatozoa berdasarkan parameter tersebut menjadi indikator penting dalam menentukan fertilitas jantan dan potensinya dalam keberhasilan reproduksi.

1.2.5 Pengaruh Buah Markisa Terhadap Kualitas Spermatozoa

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Ahmadi et al. (2016), terdapat berbagai studi yang meneliti pengaruh nutrisi terhadap kualitas spermatozoa. Hasil penelitian menunjukkan bahwa sekitar 30-80% kasus infertilitas berkaitan dengan penurunan kapasitas antioksidan total dalam cairan seminal. Selain itu, pemberian antioksidan terbukti memiliki hubungan positif terhadap peningkatan kualitas spermatozoa. Cairan spermatozoa sendiri mengandung antioksidan alami, seperti vitamin E, vitamin C, superoksida dismutase, glutathione, dan tioredoksin. Beberapa parameter penting dalam penilaian kualitas spermatozoa, seperti konsentrasi, motilitas, dan morfologi, dapat mengalami perbaikan dengan pemberian kombinasi antioksidan dan multivitamin.

Flavonoid, sebagai salah satu senyawa antioksidan alami dengan berat molekul rendah yang banyak ditemukan pada tanaman dan jamur, memiliki sifat antioksidan yang efektif dalam menjaga fungsi sistem reproduksi jantan, termasuk meningkatkan kualitas spermatozoa (Mishra et al., 2024). Selain itu, vitamin C merupakan antioksidan yang larut dalam air dan berperan sebagai kofaktor utama dalam berbagai proses hidroksilasi dan amidasi. Peningkatan asupan vitamin C dapat meningkatkan konsentrasi vitamin C dalam plasma spermatozoa, yang pada gilirannya dapat mencegah kerusakan DNA dan meningkatkan motilitas spermatozoa. Selain itu, vitamin E juga berperan dalam meningkatkan jumlah dan pergerakan spermatozoa (Ahmadi et al., 2016). Dengan adanya kandungan bioaktif dan vitamin tersebut, buah markisa berpotensi dalam meningkatkan kualitas spermatozoa dan mendukung kesehatan reproduksi jantan.

BAB II METODOLOGI PENELITIAN

2.1 Waktu dan Tempat Pelaksanaan Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Mei-Juli 2025. Penelitian dilakukan dengan memberikan perlakuan hewan uji di *Animal Lab* Rumah Sakit Hewan Universitas Hasanuddin, pembuatan ekstrak buah markisa dilakukan di Laboratorium Biofarmaka LPPM Universitas Hasanuddin dan pengambilan sampel serta pemeriksaan sampel dilakukan di Laboratorium Reproduksi Kedokteran Hewan Universitas Hasanuddin.

2.2 Jenis Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode penelitian eksperimental laboratorium yang bersifat kuantitatif. Metode yang digunakan adalah eksperimen *in vivo*, di mana mencit jantan (*Mus musculus L.*) digunakan sebagai hewan uji untuk mengevaluasi pengaruh pemberian ekstrak buah markisa (*Passiflora edulis*) terhadap kualitas spermatozoa. Penelitian ini melibatkan pemberian perlakuan berupa ekstrak buah markisa dengan dosis tertentu kepada kelompok mencit jantan, kemudian dilakukan pengamatan dan analisis terhadap parameter kualitas spermatozoa, seperti motilitas, konsentrasi, dan morfologi abnormal spermatozoa. Data yang diperoleh dianalisis secara statistik untuk melihat adanya perbedaan signifikan antara kelompok perlakuan dan kelompok kontrol.

2.3 Populasi dan Sampel

Penelitian ini menggunakan metode *simple random sampling* untuk pemilihan sampel. Hewan uji yang digunakan adalah mencit jantan dengan usia 2-3 bulan dan berat sekitar 20-30 gram. Sampel berasal dari populasi mencit yang dibeli pada peternak di sekitar Kota Makassar, dan jumlahnya ditentukan berdasarkan rumus Federer:

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

Keterangan:

n = jumlah sampel per kelompok

t = jumlah kelompok perlakuan

Dalam penelitian ini terdapat 4 kelompok perlakuan dan pengambilan sampel dilakukan satu kali (satu waktu pengamatan). Perhitungannya sebagai berikut:

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

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

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

$$3n - 3 \geq 15$$

$$3n \geq 18$$

$$n \geq 6$$

Dengan demikian, setiap kelompok perlakuan membutuhkan 6 ekor mencit jantan. Total kebutuhan sampel dihitung berdasarkan 4 kelompok perlakuan. Jadi, total mencit yang digunakan dalam penelitian ini adalah 24 ekor, dengan setiap kelompok terdiri dari 6 ekor mencit jantan.

- a. K0: Kelompok kontrol mencit jantan yang diberikan pakan standar dan air minum secara *ad libitum* selama 28 hari.
- b. K1: Kelompok mencit jantan yang diberikan pakan dan air minum secara *ad libitum*. Selanjutnya, diberikan ekstrak buah markisa sekali sehari dengan dosis 100 mg/kg BB via sonde 28 hari.

- c. K2: Kelompok mencit jantan yang diberikan pakan dan air minum secara *ad libitum*. Selanjutnya, diberikan ekstrak buah markisa sekali sehari dengan dosis 200 mg/kg BB via sonde 28 hari.
- d. K3: Kelompok mencit jantan yang diberikan pakan dan air minum secara *ad libitum*. Selanjutnya, diberikan ekstrak buah markisa sekali sehari dengan dosis 400 mg/kg BB via sonde 28 hari.

2.4 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan ialah alat bedah minor, batang pengaduk, blender, *cover glass*, *freeze dryer* (BUCHI, Swiss), gelas beaker 1000 mL, gelas beaker 50 mL, gelas beaker 500 mL, *hotplate* (pemanas), kandang ukuran 45 cm x 35 cm dan label kandang, labu terukur, mikropipet, mikroskop (Olympus CX23, Jepang), nampan, *neubauer improved hemasitometer*, *object glass*, oven, *rotary evaporator* (BUCHI, Swiss), sonde *oral*, tabung ukur 50 mL, tempat pakan dan botol minum, timbangan analitik, timbangan digital, wadah ekstrak dan wadah pembiusan.

Bahan yang digunakan ialah 24 ekor mencit jantan (*Mus musculus L.*) dengan usia 2-3 bulan dan berat sekitar 20-30 gram, anastesi ketamin+*xylazin*, alkohol 70%, *aquades*, buah markisa, *eosin*, etanol 70%, *handscoon*, kertas saring, masker bedah, NaCl 0,9%, pakan standar, sekam, *sputit* 1cc, dan *tissue*.

2.5 Prosedur Penelitian

2.5.1 Pembuatan Ekstrak Buah Markisa

Buah markisa (*Passiflora edulis*) yang digunakan sebagai sampel dalam penelitian ini diperoleh dari Malino, Sulawesi Selatan. Prosedur pembuatan ekstrak buah markisa merujuk pada jurnal Sudarwati et al. (2024), bahwa pembuatan ekstrak buah markisa digunakan buah markisa sebanyak 5 Kg dan dilakukan pemisahan buah markisa dari kulitnya dan bagian biji serta pulp diambil. Selanjutnya, dilakukan pengeringan selama 3 hari dengan sinar matahari. Biji dan pulp yang telah dikeringkan kemudian dikeringkan lagi menggunakan oven selama 2 hari. Biji dan pulp yang telah dioven kemudian dihaluskan menggunakan *chopper* atau blender dan dihasilkan simplisia sebanyak 554 gram. Simplisia yang dihasilkan kemudian setiap 184,7 gram dimasukkan ke dalam masing masing wadah maserasi yaitu 3 wadah, kemudian ditambahkan pelarut etanol 70% sebanyak 750mL pada setiap wadahnya atau sekitar 1:4 sesuai dengan prinsip maserasi yang dilakukan oleh Putri et al. (2024). Proses maserasi dilakukan selama tiga kali 24 jam dalam kondisi tertutup dan terlindung dari paparan sinar matahari, dengan pengadukan sesekali. Selanjutnya, larutan hasil maserasi pada hari kedua dan ketiga disaring menggunakan kertas saring dan ditambahkan etanol 70% sebanyak 500mL pada setiap wadahnya. Larutan hasil maserasi disaring menggunakan kertas saring untuk memperoleh ekstrak cair. Maserasi dilakukan hingga larutan menjadi jernih (remaserasi). Ekstrak cair yang diperoleh kemudian diuapkan menggunakan *rotary evaporator* selama 2 hari hingga seluruh pelarut menguap yang akan menghasilkan ekstrak pekat dari buah markisa. Filtrat yang tersisa selanjutnya diuapkan kembali menggunakan *freeze dryer* hingga diperoleh ekstrak padat.

2.5.2 Perlakuan Hewan Coba

1. Pemeliharaan Hewan Uji

Sebelum percobaan dimulai, mencit jantan menjalani proses aklimatisasi selama 7 hari dalam kandang untuk memastikan keseragaman pola hidup dan asupan

makanannya. Setiap mencit jantan ditempatkan secara individual dalam kandang terpisah, dengan pemantauan kesehatan yang dilakukan setiap hari. Selama masa aklimatisasi, mencit diberikan pakan dan air minum secara *ad libitum* untuk memenuhi kebutuhan nutrisinya.

2. Pemberian ekstrak buah markisa (EBM) pada mencit dibagi menjadi 1 kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan yang terdiri dari:

- | | | |
|----------------|--------|----------------------|
| a. Kelompok K0 | 6 ekor | (-) EBM |
| b. Kelompok K1 | 6 ekor | (+) EBM 100 mg/kg BB |
| c. Kelompok K2 | 6 ekor | (+) EBM 200 mg/kg BB |
| d. Kelompok K3 | 6 ekor | (+) EBM 400 mg/kg BB |

Pemberian ekstrak buah markisa dengan dosis tersebut berdasarkan dengan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Syarif et al. (2016) bahwa penggunaan ekstrak yang digunakan untuk memberikan pengaruh terhadap kualitas spermatozoa digunakan dosis 100 mg/Kg BB. Selain itu, pada penelitian tersebut penggunaan dosis 200 mg/Kg BB dan 400 mg/kg BB memberikan pengaruh yang paling baik terhadap motilitas spermatozoa yang diujikan pada hewan mencit. Ekstrak buah markisa diberikan secara *oral* sebanyak 0,5 mL untuk setiap mencitnya menggunakan sonde yang diberikan sekali sehari selama 28 hari.

2.5.3 Pengamatan Kualitas Spermatozoa

a. Motilitas

Luthfi dan Noor (2015), menjelaskan bahwa setelah dilakukan perlakuan selama 28 hari. Dilakukan nekropsi dan pengambilan sampel spermatozoa dilakukan dengan mengambil cairan sperma pada organ epididimis tepatnya pada *cauda epididimis*. Kemudian diletakkan pada cawan petri dan dipotong kecil dan disuspensikan menggunakan 1 mL NaCl 0,9 untuk membiarkan spermatozoa berenang. Motilitas spermatozoa ditentukan secara subjektif dengan menggunakan *object glass*. Perhitungan motilitas spermatozoa dilakukan dengan mengambil suspensi spermatozoa sebanyak 10 µL dengan menggunakan pipet. Selanjutnya suspensi tersebut di tutup menggunakan *cover glass*. Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 200x. Motilitas spermatozoa dapat dinilai dengan melihat spermatozoa yang bergerak dan tidak bergerak. Menurut Bingga (2021), penghitungan persentase motilitas spermatozoa dapat menggunakan rumus sebagai berikut:

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

Keterangan :

A = Bergerak

B = Tidak bergerak

b. Konsentrasi

Luthfi dan Noor (2015), menjelaskan bahwa konsentrasi spermatozoa dihitung dengan menggunakan *improved neubauer haemocytometer*. Bersihkan permukaan slide hemasitometer dengan alkohol 70%. Lekatkan gelas penutup pada ruang hitung. Suspensi yang digunakan yaitu 10 µL yang diambil menggunakan mikropipet. Letakkan slide hemasitometer pada mikroskop dan biarkan selama 10 menit agar spermatozoa terserap dan menetap pada ruang hitung. Pembesaran 10x pada mikroskop menggunakan lensa objektif untuk memfokuskan garis grid pada ruang hitung.

Spermatozoa pada setiap ruang hitung dalam hemasitometer dihitung dengan melakukan pengamatan menggunakan mikroskop dengan pembesaran 200x. Spermatozoa yang dihitung adalah kepala spermanya, sehingga jika terdapat kepala spermatozoa tanpa ekor pun juga dihitung. Konsentrasi spermatozoa adalah rata-rata jumlah spermatozoa (dari kedua ruang hitung) dibagi dengan volume tersebut. Sehingga, konsentrasi spermatozoa yang diperoleh adalah jumlah spermatozoa per μL , yang sama dengan juta sperma/mL atau dapat dirumuskan sebagai berikut:

$$\text{Konsentrasi spermatozoa (sel/mL)} = N \times 5 \times \text{FP} \times 10.000$$

Keterangan:

N = Jumlah rata rata spermatozoa dalam *chamber*

FP = Faktor pengencer

“5” = Faktor koreksi dimana hanya menghitung 5 kotak dari 25 kotak pada ruang hitung

“10.000” = Faktor koreksi 0,0001 mL/ *chamber*

c. Morfologi Abnormal

Penilaian morfologi abnormal spermatozoa dilakukan dengan melihat bagian utama yaitu, kepala, leher dan ekor. Pengujian dilakukan menggunakan teknik apus dengan menggunakan *object glass*. Teteskan suspensi spermatozoa dan eosin dengan perbandingan 1:1 pada *object glass*. Buatlah apusan dan keringkan dengan menyandarkan pada kemiringan $30-40^\circ$ selama 5 menit pada suhu kamar. Slide diamati dengan pembesaran 100x (Luthfi dan Noor, 2015). Gunawan et al. (2017), menjelaskan bahwa dalam menentukan presentase morfologi spermatozoa normal dan abnormal pada sediaan dinilai dengan melihat spermatozoa pada setiap lapang pandang. Persentase morfologi spermatozoa normal dan abnormal dapat dihitung dengan menggunakan rumus:

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

Keterangan:

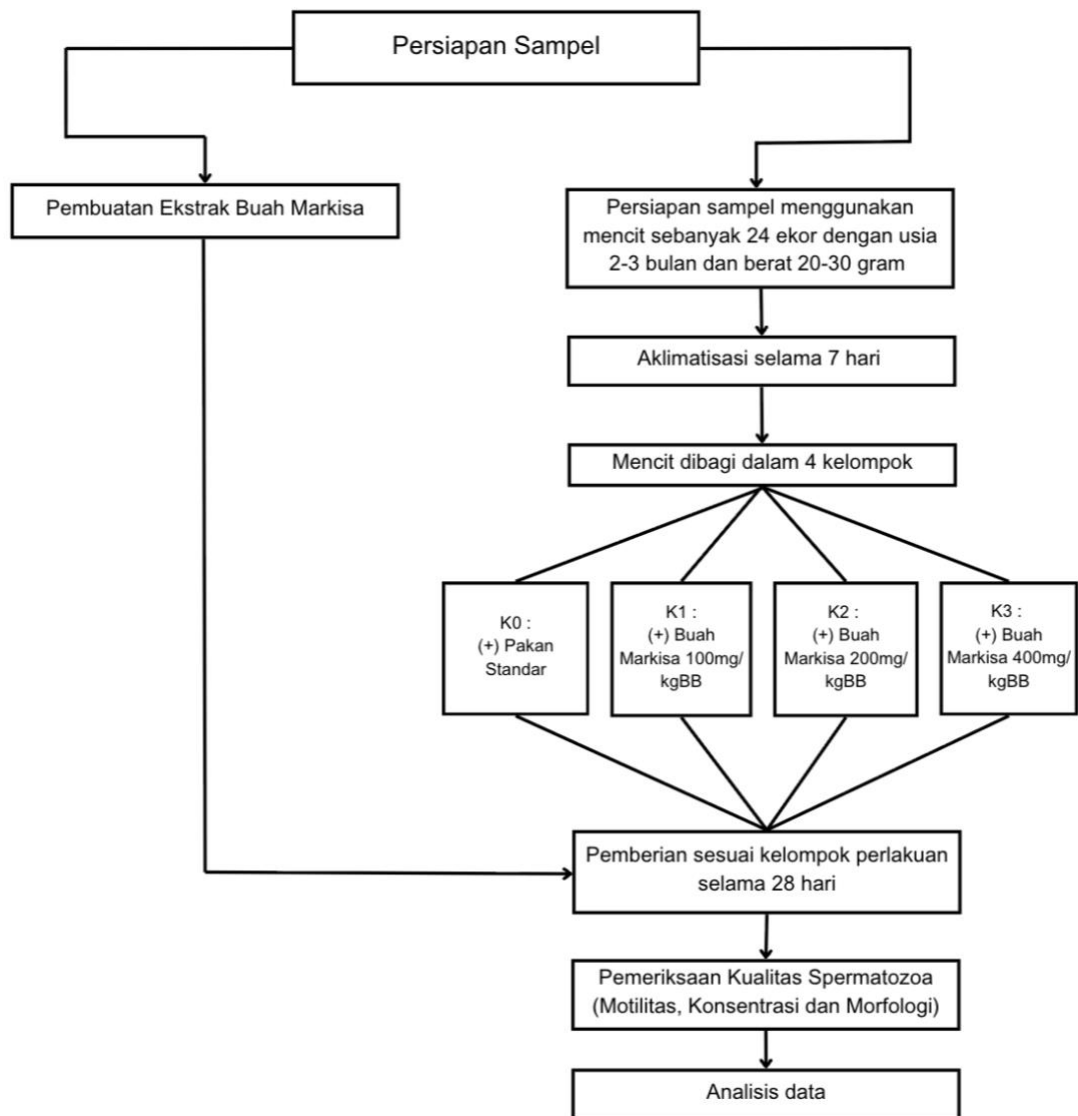
ab = Spermatozoa abnormal

n = Jumlah spermatozoa

2.6 Analisis Data

Data hasil penelitian dikumpulkan dari masing masing pengujian kemudian ditabulasi dan dianalisis secara statistika. Analisis data dilakukan menggunakan uji statistik *Kruskal-Wallis* dengan program IBM SPSS® 25 dan apabila terdapat perbedaan nyata dilanjutkan menggunakan uji *Mann Withney* sedangkan data kualitatif yang didapat disajikan secara deskriptif dalam bentuk gambar. Parameter yang diamati adalah melihat motilitas, konsentrasi dan morfologi abnormal dari spermatozoa yang dihasilkan setelah pemberian ekstrak buah markisa.

2.7 Alur Penelitian



Gambar 5. Alur Penelitian