

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Pengendalian populasi hewan, khususnya hewan liar dan hewan peliharaan yang tidak terkontrol, menjadi salah satu isu penting dalam bidang kesehatan hewan dan kesehatan masyarakat. Peningkatan populasi yang tidak terkendali tidak hanya berdampak pada kesejahteraan hewan itu sendiri, tetapi juga berpotensi meningkatkan risiko penyebaran penyakit zoonosis serta konflik antara hewan dan manusia. Metode konvensional seperti kastrasi bedah memang efektif dalam menekan laju reproduksi, namun memiliki berbagai keterbatasan, antara lain dari segi biaya, kebutuhan fasilitas dan tenaga medis, risiko anestesi, serta pertimbangan aspek kesejahteraan hewan (Massei et al., 2024). Kondisi tersebut mendorong pengembangan pendekatan alternatif yang lebih aplikatif, minimal invasif, dan berpotensi lebih mudah diterapkan dalam skala populasi yang luas. Salah satu pendekatan yang mulai banyak dikaji adalah pemanfaatan bahan alami sebagai agen biologis yang mampu memodulasi fungsi reproduksi (Dawood et al., 2024).

Sejalan dengan perkembangan tersebut, penggunaan ekstrak tanaman sebagai suplemen alami maupun terapi komplementer pada hewan kecil seperti anjing dan kucing semakin berkembang dalam praktik kedokteran hewan. Senyawa bioaktif tumbuhan diketahui memiliki aktivitas antioksidan, antiinflamasi, serta berperan dalam mendukung sistem imun, sehingga kerap dimanfaatkan sebagai alternatif atau pendamping terapi konvensional. Namun demikian, setiap senyawa bioaktif yang diberikan kepada hewan tetap berpotensi menimbulkan respons fisiologis tertentu, baik yang bersifat protektif maupun yang berisiko. Variasi metabolisme antarspesies, khususnya pada hewan kecil, menuntut adanya evaluasi ilmiah yang komprehensif terhadap keamanan serta efek biologis suatu bahan sebelum diaplikasikan secara luas (Guo et al., 2024). Dengan demikian, kajian ilmiah terhadap efek sistemik maupun reproduktif suatu ekstrak tanaman menjadi sangat penting.

Salah satu tanaman herbal yang secara tradisional telah lama dimanfaatkan adalah daun sirih (*Piper betle* L.). Tanaman ini mengandung berbagai metabolit sekunder seperti alkaloid, flavonoid, tanin, dan minyak atsiri yang berkontribusi terhadap aktivitas farmakologisnya. Berbagai penelitian melaporkan potensi daun sirih sebagai antifungi, antibakteri, antioksidan, dan antiinflamasi. Akan tetapi, di samping manfaat terapeutiknya, beberapa studi eksperimental pada hewan pengerat menunjukkan bahwa ekstrak daun sirih pada dosis tertentu dapat memengaruhi fungsi reproduksi jantan, termasuk menurunkan kualitas spermatogenesis (Lubis dan Syahfitri, 2023). Penelitian oleh Wuwungan et al. (2017) juga melaporkan adanya pengaruh ekstrak etanol daun sirih terhadap motilitas, morfologi, dan jumlah spermatozoa pada tikus putih jantan galur Wistar (Wuwungan et al., 2017). Temuan-temuan tersebut mengindikasikan bahwa ekstrak daun sirih tidak hanya memiliki potensi sebagai agen terapeutik, tetapi juga berpotensi berperan sebagai modulator sistem reproduksi jantan.

Sistem reproduksi jantan sendiri merupakan sistem biologis yang sangat sensitif terhadap paparan zat bioaktif. Proses spermatogenesis berlangsung melalui tahapan proliferasi, meiosis, dan diferensiasi sel yang kompleks di dalam tubulus seminiferus, sehingga setiap perubahan pada mikroarsitektur testis dapat berdampak langsung

terhadap fertilitas. Gangguan struktur histologis seperti degenerasi sel germinal, disorganisasi lapisan spermatogenik, maupun penurunan kepadatan sel dapat berimplikasi pada penurunan kemampuan reproduksi. Oleh karena itu, evaluasi histopatologi testis menjadi salah satu metode utama untuk menilai potensi suatu bahan sebagai agen antifertilitas maupun untuk mengkaji aspek keamanannya (Stefenie et al., 2020).

Selain sistem reproduksi, parameter hematologi seperti jumlah eritrosit, leukosit, dan trombosit merupakan indikator penting kondisi fisiologis hewan secara menyeluruh. Dalam pengembangan bahan alami sebagai agen pengendali populasi, evaluasi hematologi diperlukan untuk memastikan bahwa efek yang dihasilkan bersifat selektif terhadap sistem reproduksi dan tidak menimbulkan gangguan sistemik yang merugikan. Perubahan pada parameter hematologi kerap menjadi indikator dini adanya efek toksik akibat paparan senyawa bioaktif (Guo et al., 2024). Oleh karena itu, pemeriksaan hematologi menjadi bagian integral dalam penilaian profil keamanan suatu ekstrak tanaman.

Meskipun sejumlah penelitian telah melaporkan pengaruh ekstrak daun sirih terhadap parameter sperma, kajian yang secara simultan mengevaluasi perubahan histopatologi testis dan parameter hematologi masih relatif terbatas. Padahal, integrasi kedua parameter tersebut sangat penting untuk menilai secara komprehensif potensi ekstrak daun sirih sebagai agen modulator fertilitas sekaligus memastikan aspek keamanannya secara sistemik.

Berdasarkan uraian tersebut, penelitian ini dilakukan untuk menganalisis pengaruh pemberian ekstrak daun sirih (*Piper betle L.*) terhadap gambaran histopatologi testis dan parameter hematologi mencit (*Mus musculus L.*). Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan dasar ilmiah mengenai potensi ekstrak daun sirih sebagai kandidat agen pengendali fertilitas jantan berbasis bahan alami, sekaligus mengevaluasi dampaknya terhadap kondisi fisiologis secara umum sebagai langkah awal pengembangan strategi pengendalian populasi yang lebih aplikatif, minimal invasif, dan berbasis fitobiotik.

1.2 Teori

1.2.1 Daun Sirih (*Piper betle L.*)

Dalam sistematika (taksonomi) tumbuhan, kedudukan daun sirih diklasifikasikan sebagai berikut (Iftirosi, 2020):

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Magnoliphyta
Kelas	: Magnolipsida
Ordo	: Piperales
Famili	: Piperaceae
Genus	: <i>Piper</i>
Spesies	: <i>Piper betle L.</i>



Gambar 1. Daun sirih hijau (*Piper betle* L) (Iftirosi, 2020)

Tanaman sirih banyak ditemukan di wilayah Asia tropis hingga Afrika Timur dan tersebar luas di berbagai negara seperti Indonesia, Thailand, Malaysia, India, Sri Lanka, dan Madagaskar. Tanaman ini dikenal sebagai salah satu tanaman obat yang memiliki banyak manfaat dan telah digunakan secara turun-temurun dalam pengobatan tradisional. Masyarakat memanfaatkan daun sirih hijau untuk mengatasi berbagai gangguan kesehatan, seperti menghentikan perdarahan, mengobati gatal-gatal, mengatasi sariawan, serta mengobati infeksi akibat bakteri dan jamur. Selain itu, akar sirih juga diketahui memiliki efek sebagai kontrasepsi alami bagi wanita (Sadiyah et al., 2022).

Sirih termasuk dalam famili *Piperaceae* dan merupakan tanaman merambat yang dapat tumbuh dengan menopang batang pohon lain, mencapai ketinggian sekitar 5 hingga 15 meter. Daun sirih bersifat tunggal dan tersusun secara berseling dengan bentuk yang bervariasi, mulai dari bundar telur hingga lonjong, dengan pangkal berlekuk menyerupai jantung. Ujung daunnya runcing dengan tepi yang sedikit menggulung ke bawah, memiliki panjang sekitar 5-18 cm dan lebar 3-12 cm. Permukaan atas daunnya berwarna hijau mengilap, sedangkan bagian bawahnya lebih kasar dan kusam, dengan tulang daun yang menonjol. Daun sirih memiliki aroma khas serta rasa pedas, sementara batangnya berbentuk bulat, lunak, berwarna hijau kecoklatan, dan bertekstur kasar serta berkerut (Iftirosi, 2020). Karakteristik morfologi dari daun sirih hijau tersebut dapat diamati secara lebih jelas pada Gambar 1.

Tanaman sirih tumbuh optimal di daerah beriklim tropis dengan ketinggian sekitar 300 hingga 1.000 meter di atas permukaan laut (mdpl). Pertumbuhannya lebih baik pada tanah yang memiliki kandungan organik tinggi serta kelembapan yang cukup. Kandungan minyak atsiri dalam daun sirih sangat dipengaruhi oleh faktor lingkungan, seperti suhu udara, tingkat kelembapan, mineral dalam tanah, serta kadar air pada media tumbuhnya (Iftirosi, 2020).

Daun sirih mengandung berbagai senyawa bioaktif yang bervariasi tergantung pada kondisi geografis dan lingkungan tempat tumbuhnya. Bagian yang paling banyak dimanfaatkan adalah daunnya, yang mengandung sekitar 4,2% minyak atsiri. Komponen utama dalam minyak atsiri sirih adalah betphenol, yang memiliki sifat antibakteri. Selain itu, daun sirih hijau juga mengandung berbagai senyawa lain seperti steroid, tannin, flavonoid, saponin, fenol, alkaloid, coumarin, dan emodins yang berperan dalam aktivitas farmakologisnya (Sadiyah et al., 2022).

Flavonoid merupakan kelompok besar senyawa polifenol yang berasal dari

tumbuhan dan tersebar luas pada berbagai jenis tanaman dengan kadar yang bervariasi. Pada dosis rendah, flavonoid dapat memberikan efek sebagai stimulan jantung (Kurniawan et al., 2021).

Secara spesifik, flavonoid dalam daun sirih hijau diklasifikasikan ke dalam beberapa kelompok struktur kimia, termasuk flavon, flavanon, flavonol, katekin, kalkon, dan antosianin (Syahrani, 2024). Melalui analisis kromatografi lapis tipis (KLT), telah teridentifikasi adanya senyawa golongan katekin pada fraksi aquadest dan golongan kalkon serta auron pada fraksi etil asetat (Deviani et al., 2024). Meskipun *quercetin* (kuersetin) sering kali digunakan sebagai standar baku dalam pengujian kuantitatif, analisis profil menunjukkan bahwa flavonoid yang terkandung dalam sirih hijau memiliki karakteristik serapan ultraviolet yang khas pada rentang panjang gelombang 200–400 nm (Syahrani, 2024).

Pelaporan kadar flavonoid total dalam *P. betle* L. secara ilmiah umumnya dinyatakan dalam satuan mg QE/g (miligram Quercetin Equivalent per gram ekstrak) atau mg EQ/g, serta dalam bentuk persentase (%) (Deviani et al., 2024; Syahrani, 2024). Kadar flavonoid total dalam ekstrak etanol 96% daun sirih hijau dilaporkan berkisar antara 1,07 mgQE/g hingga mencapai 111,400 mgQE/g, tergantung pada populasi sampel dan metode ekstraksi yang digunakan (Syahrani, 2024). Dalam bentuk persentase, kadar flavonoid total rata-rata tercatat sebesar 1,077% hingga 1,64% (Deviani et al., 2024; Kurniawan et al., 2021).

Pemberian ekstrak daun sirih (*Piper betle* L.) pada mencit jantan dapat menurunkan kualitas spermatozoa, termasuk motilitas, viabilitas, dan gerakan sperma. Hal ini disebabkan oleh kandungan senyawa kimia dalam ekstrak daun sirih seperti tannin dan diastase yang bersifat antiseptik, sehingga menghambat sekresi hormon GnRH (*Gonadotropin Releasing Hormone*) di otak. Penurunan GnRH mengganggu pelepasan FSH dan LH dari hipofisis anterior, yang akan berdampak pada berkurangnya stimulasi hormon testosteron dari sel Leydig ke sel Sertoli. Kondisi ini menghambat spermatogenesis dan menurunkan kualitas sperma (Longdong et al., 2017).

Penurunan kadar FSH dan LH menyebabkan gangguan fungsi sel Sertoli dan sel Leydig di testis. Secara molekuler, flavonoid dalam sirih dapat menghambat kerja enzim aromatase, yang memicu ketidakseimbangan konversi androgen menjadi estrogen. Meskipun hal ini dapat meningkatkan kadar testosteron secara lokal, konsentrasi testosteron yang terlalu tinggi justru memberikan umpan balik negatif (*negative feedback*) ke hipofisis, yang selanjutnya semakin menekan pelepasan FSH dan LH. Kondisi ini menghambat proses mitosis dan proliferasi spermatogonia A, serta mengganggu tahap meiosis dalam spermatogenesis (Longdong et al., 2017; Zakri et al., 2023).

Selain itu, paparan senyawa bioaktif sirih dalam dosis tinggi dapat menginduksi stres oksidatif melalui peningkatan radikal bebas (ROS) yang merusak membran sel spermatogenik. Kerusakan oksidatif ini memicu kerusakan DNA spermatozoa dan meningkatkan laju apoptosis sel germinal, yang pada akhirnya menurunkan kualitas, motilitas, dan viabilitas spermatozoa (*necrozoospermia*) (Zakri et al., 2023; Biswas et al., 2022).

1.2.2 Mencit (*Mus musculus*)

Dalam sistematika (taksonomi) hewan, kedudukan *Mus musculus* (mencit)

diklasifikasikan sebagai berikut (Khairani et al., 2024):

Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Kelas	: Mamalia
Ordo	: Rodentia
Famili	: Muridae
Genus	: <i>Mus</i>
Spesies	: <i>Mus musculus</i>

Mus musculus, atau yang lebih dikenal sebagai mencit, merupakan mamalia kecil yang sering digunakan dalam penelitian laboratorium. Sekitar 40% hingga 80% penelitian yang melibatkan hewan coba menggunakan mencit sebagai model. Hewan ini banyak dimanfaatkan dalam berbagai bidang ilmu, seperti biologi, genetika, toksikologi, patologi, histopatologi, dan disiplin ilmu lainnya (Khairani et al., 2024).

Mencit memiliki ukuran tubuh yang relatif kecil, dengan panjang sekitar 7-10 cm, tidak termasuk ekornya. Hewan ini tersebar luas di berbagai belahan dunia dan dapat beradaptasi di berbagai lingkungan. Selain itu, mencit memiliki siklus hidup yang cepat, umur yang relatif singkat, tingkat reproduksi yang tinggi, serta jumlah keturunan yang banyak. Sebagai hewan omnivora, mencit mengonsumsi berbagai jenis makanan, seperti biji-bijian, buah-buahan, serangga, dan sumber makanan lainnya (Khairani et al., 2024). Karakteristik morfologi mencit (*Mus musculus*) yang digunakan sebagai hewan model dalam penelitian ini disajikan pada Gambar 2.



Gambar 2. Mencit (Khairani et al., 2024)

Masa hidup mencit berkisar antara 1 hingga 3 tahun, dengan periode kebuntingan yang singkat, yakni sekitar 18-21 hari. Aktivitas reproduksinya cukup panjang, berkisar antara 2 hingga 14 bulan sepanjang hidupnya. Mencit mencapai kedewasaan pada usia 35 hari dan sudah dapat berkembang biak saat memasuki usia sekitar 18 minggu, baik untuk jantan maupun betina. Siklus reproduksi mencit bersifat poliestrus, artinya mereka mengalami periode birahi secara berulang dengan durasi estrus sekitar 5 hari dan berlangsung selama 12-14 jam setiap siklusnya (Khairani et al., 2024).

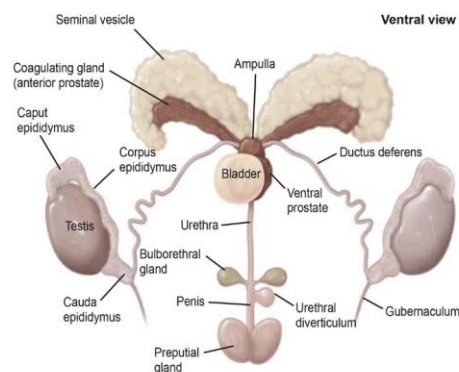
Mencit jantan dewasa memiliki berat tubuh sekitar 20-40 gram, sementara betina berkisar antara 18-35 gram. Hewan ini dapat bertahan hidup pada suhu sekitar 30°C.

Mencit termasuk hewan yang mudah dipelihara, terutama dalam jumlah besar, karena perawatannya tidak membutuhkan biaya tinggi dan relatif sederhana. Selain itu, mencit tergolong dalam kelompok rodentia atau pengerat, yang memiliki keragaman genetik tinggi serta karakteristik anatomi dan fisiologi yang khas (Khairani et al., 2024).

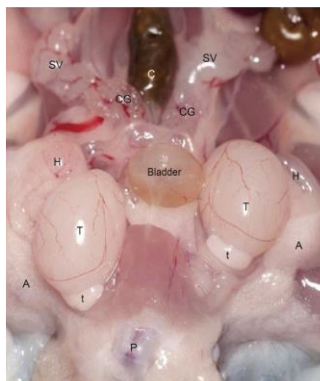
1.2.3 Sistem Reproduksi Mencit Jantan

Sistem reproduksi mencit jantan terdiri dari beberapa bagian utama, yaitu kelenjar kelamin (testis), saluran reproduksi, dan kelenjar asesori. Sebagian besar organ dalam sistem ini berpasangan, kecuali uretra dan penis yang hanya berjumlah satu. Testis pada mencit jantan berperan dalam produksi hormon testosteron, yang berfungsi untuk merangsang tahap akhir spermatogenesis serta mendukung pertumbuhan dan perkembangan organ reproduksi jantan. Selain itu, testis juga bertanggung jawab dalam menghasilkan sel sperma, yang strukturnya terdiri atas tubulus seminiferus dan jaringan stroma (Khairani et al., 2024).

Pada bagian tubulus seminiferus, terdapat sel germinatif dan sel Sertoli yang berperan dalam proses pembentukan sperma. Sementara itu, jaringan stroma mengandung berbagai elemen seperti pembuluh darah, pembuluh limfatik, serabut saraf, sel makrofag, serta sel Leydig. Hormon testosteron diproduksi oleh sel Leydig dengan stimulasi dari hormon gonadotropin, yang berperan penting dalam mengatur fungsi reproduksi mencit jantan (Khairani et al., 2024). Struktur anatomi organ reproduksi jantan pada mencit disajikan pada Gambar 3 dan 4.



Gambar 3. Anatomi regional dari sistem reproduksi mencit jantan (Treuting et al., 2018)

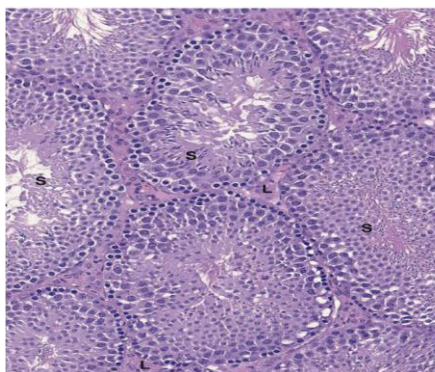


Gambar 4. Testis mencit. (A) Jaringan adiposa, (T) Testis, (H) *Caput epididymis*, (t)

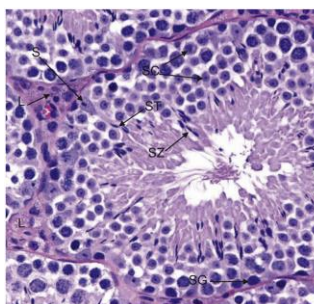
Cauda epididymis, (CG) Kelenjar pembekuan, (SV) Vesikula seminalis, (P) Penis, dan (C) Usus besar (Treuting et al., 2018)

Pada mencit, setiap testis memiliki berat sekitar 0,06g dan berukuran sekitar 0,66cm×0,39cm×0,45cm. Pada hewan pengerat, testis berpasangan terletak di skrotum, ditutupi oleh kapsul berserat padat, tunika albuginea, dan lapisan ganda mesothelium, tunika vaginalis, yang juga melapisi permukaan bagian dalam skrotum. Hewan pengerat memiliki keunikan karena testis berkomunikasi dengan rongga perut melalui saluran inguinalis paten, yang tetap terbuka sepanjang hidup. Saluran inguinalis ditempati oleh bantalan lemak epididimis ketika testis berada di dalam skrotum. Di luar skrotum, setiap testis juga dikelilingi bantalan lemak epididimis (Treuting et al., 2018).

Secara histologis, testis merupakan kelenjar tubular majemuk yang dilapisi oleh tunika albuginea, yaitu lapisan jaringan ikat padat yang berfungsi memberikan perlindungan serta struktur bagi organ ini. Di dalam testis, terdapat tubulus seminiferus yang menjadi tempat utama berlangsungnya proses spermatogenesis. Tubulus ini tersusun atas beberapa jenis sel, termasuk Sel Sertoli yang berperan dalam mendukung perkembangan sel germinal, serta berbagai tahap perkembangan spermatogenik, mulai dari spermatogonia, spermatosit, hingga spermatid. Selain itu, terdapat juga jaringan interstisial yang mengandung sel Leydig, yang bertugas dalam produksi hormon testosteron (Treuting et al., 2018). Gambaran histologi testis serta susunan sel spermatogenik dalam tubulus seminiferus dapat dilihat pada Gambar 5 dan 6.



Gambar 5. Histologi testis mencit. (S) Tubulus seminiferus dan (L) Sel Leydig (Treuting et al., 2018)



Gambar 6. Histologi tubulus seminiferus. (SG) Spermatogonia, (SC) Spermatosit, (ST) Spermatid, (SZ) Spermatozoa, (S) Sel Sertoli, (L) Sel Leydig (Treuting et al., 2018)

Spermatogenesis merupakan proses kompleks yang terjadi di dalam tubulus seminiferus dan melibatkan transformasi sel germinal menjadi spermatozoa yang matang. Proses ini terjadi dalam siklus yang berlangsung sekitar 8,8 hari pada mencit dan membutuhkan waktu sekitar 35 hari untuk menyelesaikan seluruh tahap perkembangan spermatogenik (Treuting et al., 2018).

Pada kondisi normal, gambaran histologi testis mencit menunjukkan struktur sel spermatogenik yang tersusun dengan rapat. Sel-sel ini mengalami perkembangan bertahap dari lapisan membran basalis menuju lumen tubulus seminiferus, yang mencakup spermatogonium, spermatosit, dan spermatid. Lumen tubulus seminiferus tampak terisi oleh spermatozoa yang berada dalam berbagai tahap perkembangan, baik yang masih melekat pada Sel Sertoli maupun yang telah menyelesaikan proses spermiogenesis dan siap dilepaskan ke dalam sistem reproduksi jantan (Harlis dan Septiana, 2017).

1.2.4 Parameter Hematologi

Pemeriksaan parameter hematologi merupakan salah satu indikator penting dalam uji toksisitas karena dapat mengungkapkan kelainan pada proses metabolisme tubuh dan profil darah secara cepat serta terukur (Irfayanti et al., 2023; Rohma et al., 2024). Penilaian terhadap komponen darah seperti sel darah merah (RBC), sel darah putih (WBC), dan trombosit (PLT) memberikan informasi esensial mengenai tingkat keamanan atau efek toksik dari suatu bahan, termasuk ekstrak tanaman, terhadap sistem biologi makhluk hidup (Irfayanti et al., 2023; Arifin et al., 2019). Dalam penelitian mengenai ekstrak daun sirih (*Piper betle* L.), parameter hematologi menjadi sangat relevan karena tanaman ini mengandung berbagai senyawa bioaktif seperti flavonoid, alkaloid, dan saponin yang dapat memengaruhi fungsi fisiologis dan keseimbangan homeostatis tubuh hewan uji (Rohma et al., 2024).

Sel darah merah atau eritrosit (RBC) secara fisiologis berfungsi sebagai pembawa oksigen ke seluruh jaringan tubuh (Arifin et al., 2019). Perubahan jumlah eritrosit dapat menjadi indikasi adanya respon toksik atau aktivitas biologis dari senyawa tertentu; misalnya, kandungan flavonoid dalam ekstrak tanaman dapat meningkatkan proses pembentukan eritrosit (eritropoiesis) di sumsum tulang melalui aktivitas antioksidannya. Di sisi lain, keberadaan senyawa seperti saponin dalam dosis tinggi berpotensi menyebabkan toksisitas berupa hemolisis atau kerusakan membran sel darah merah (Irfayanti et al., 2023). Nilai normal eritrosit pada mencit umumnya berkisar antara 6,50 hingga 10,10 juta/ μ L, sehingga penurunan atau peningkatan yang signifikan di luar rentang tersebut dapat mencerminkan tingkat toksisitas subakut maupun kronis dari bahan yang diuji (Arifin et al., 2019).

Parameter sel darah putih atau leukosit (WBC) berperan utama dalam sistem pertahanan tubuh terhadap benda asing atau mikroorganisme (Arifin et al., 2019; Irfayanti et al., 2023). Peningkatan jumlah leukosit (leukositosis) sering kali merupakan respon inflamasi terhadap paparan zat kimia atau ekstrak yang dianggap sebagai benda asing oleh tubuh. Sebaliknya, penurunan jumlah leukosit (leukopenia) dapat terjadi akibat stres berkepanjangan atau kerusakan pada sumsum tulang (Irfayanti et al., 2023). Dalam pengujian toksisitas pada mencit, rentang normal leukosit berada pada angka 2,6 hingga 10,1 ribu/mL, dan peningkatan yang tidak terkontrol melampaui batas ini dapat menjadi sinyal adanya efek toksik dari durasi pemberian bahan uji (Arifin et al., 2019).

Trombosit (PLT) atau platelet memegang peranan vital dalam sistem hemostasis untuk menghentikan pendarahan melalui proses pembekuan darah (Arifin et al., 2019; Irfayanti et al., 2023). Perubahan jumlah trombosit dapat dipengaruhi oleh senyawa tanin dan flavonoid yang mampu meningkatkan jumlah megakariosit di sumsum tulang, sehingga memicu peningkatan kadar trombosit (Irfayanti et al., 2023). Evaluasi terhadap parameter eritrosit, leukosit, dan trombosit secara komprehensif ini memungkinkan peneliti untuk menentukan apakah pemberian ekstrak daun sirih (*Piper betle* L.) memberikan pengaruh buruk terhadap kesehatan sistemik mencit atau justru memberikan efek protektif melalui kandungan metabolit sekundernya (Irfayanti et al., 2023; Rohma et al., 2024).

1.3 Tujuan dan Manfaat

1.3.1 Tujuan Penelitian

Berdasarkan latar belakang yang telah dipaparkan, maka dapat diambil tujuan penelitian sebagai berikut:

1. Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak daun sirih (*Piper betle* L.) terhadap struktur histopatologi testis dan parameter hematologi mencit (*Mus musculus*).
2. Mengetahui dosis ekstrak daun sirih (*Piper betle* L.) yang paling berpotensi mengganggu reproduksi berdasarkan perubahan histopatologi testis dan parameter hematologi mencit (*Mus musculus*).

1.3.2 Manfaat Penelitian

1. Manfaat bagi Khalayak Umum
Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang efek ekstrak daun sirih (*Piper betle* L.) terhadap kesehatan reproduksi jantan, khususnya histopatologi testis dan parameter hematologi. Serta dapat meningkatkan kesadaran masyarakat dan menjadi referensi bagi industri herbal dalam pengembangan produk yang lebih aman.
2. Manfaat Akademis
Penelitian ini diharapkan akan menyediakan data ilmiah mengenai pengaruh ekstrak daun sirih terhadap testis dan parameter hematologi mencit (*Mus musculus*), yang dapat menjadi referensi dalam bidang andrologi, farmakologi, dan reproduksi. Temuan ini juga mendukung riset lanjutan serta pengembangan terapi berbasis bahan alami.

BAB II METODOLOGI PENELITIAN

2.1 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilakukan pada bulan September-November 2025 di Laboratorium Fitokimia Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin dan Laboratorium Terpadu Rumah Sakit Hewan Pendidikan Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin.

2.2 Alat dan Bahan

Alat yang dibutuhkan dalam penelitian ini adalah alat bedah minor, ayakan, baskom, batang pengaduk, blender, botol kaca berwarna gelap, corong kaca, *cover glass*, gelas kimia, gelas ukur, gunting, inkubator, kertas saring, mikroskop, mikrotom, *object glass*, pipet tetes, pot sampel, rak tempat pengeringan, *refrigerator*, *rotary evaporator*, *syringe* 1 cc, timbangan digital, *tissue cassette*, toples kaca bertutup, dan *waterbath*.

Bahan yang dibutuhkan dalam penelitian ini adalah air bersih, akuades, alkohol 70%, alkohol 80%, alkohol 90%, alkohol 96%, *aluminium foil*, daun sirih hijau (*Piper betle* L.) segar, entelan, etanol 70%, eter, formalin 10%, larutan PBS (*Phosphate Buffered Saline*), parafin, pewarnaan *Hematoxylin-Eosin* (HE), dan *xylol*.

2.3 Metode Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik dengan pendekatan kuantitatif, yang bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak daun sirih terhadap struktur histopatologi testis mencit secara terkontrol.

Populasi dalam penelitian ini adalah seluruh mencit jantan (*Mus musculus* L.) yang sehat secara klinis, berumur antara 8 hingga 12 minggu, dan memiliki berat badan minimal 20 gram. Populasi ini dipilih karena mencit pada rentang usia dan bobot tersebut telah memasuki fase dewasa muda yang optimal untuk evaluasi fungsi dan struktur testis, khususnya dalam studi toksikologi dan histopatologi.

Sampel penelitian ini ditentukan menggunakan rumus Federer sebagai berikut:

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

Keterangan:

t = jumlah kelompok perlakuan

n = jumlah ulangan (jumlah hewan per kelompok)

Dalam penelitian ini, terdapat 3 kelompok perlakuan sehingga $t = 3$, maka:

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

$$2(n-1) \geq 15$$

$$2n - 2 \geq 15$$

$$2n \geq 17$$

$$n \geq 8.5$$

$$n \geq 9$$

Dengan demikian, jumlah minimal ulangan per kelompok adalah 9 ekor mencit, sehingga total mencit yang digunakan dalam penelitian ini adalah: 3 kelompok $\times$ 9 ekor = 27 ekor mencit. Seluruh mencit dipilih secara acak dari populasi yang memenuhi kriteria inklusi, yaitu aktif, sehat, dan memiliki berat badan minimal 20 gram. Selanjutnya, dilakukan proses aklimatisasi selama 7 hari untuk adaptasi terhadap lingkungan laboratorium.

2.4 Pelaksanaan Penelitian

2.4.1 Pembuatan Ekstrak Daun Sirih (*Piper betle L.*)

Penelitian ini dimulai dengan pengadaan sampel daun sirih hijau. Pengambilan daun dilakukan pada saat daun mencapai warna hijau sempurna, yang menandakan kadar senyawa aktif tertinggi, sehingga diharapkan menghasilkan simplisia dengan kualitas yang baik. Proses selanjutnya adalah sortasi basah, di mana daun yang telah dipetik dipisahkan dari pengotor yang menempel dan bagian-bagian yang tidak diperlukan dibuang secara manual. Pencucian dilakukan dengan air mengalir untuk menghilangkan pengotor dan mikroba yang masih menempel pada daun tanpa mengurangi kandungan senyawa aktif yang ada. Setelah pencucian, daun dikeringkan dengan cara diangin-anginkan di tempat teduh dengan suhu kamar untuk menghindari paparan langsung sinar matahari yang dapat merusak kandungan aktifnya (Rivai et al., 2017).

Setelah pengeringan, daun sirih yang sudah kering kemudian diparut atau digiling menjadi serbuk dengan derajat kehalusan tertentu untuk mempermudah proses ekstraksi. Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi, di mana serbuk simplisia dimasukkan ke dalam maserator dan dicampur dengan pelarut etanol 96% dengan perbandingan 1:10 (serbuk:pelarut). Proses ini berlangsung selama 6 jam pertama dengan pengadukan sesekali, kemudian dibiarkan selama 18 jam. Proses ekstraksi diulang dua kali dengan pelarut yang sama untuk mendapatkan hasil ekstraksi yang maksimal. Setelah proses ekstraksi selesai, maserat yang terkumpul dipisahkan melalui pengendapan, sentrifugasi, dekantasi, atau filtrasi, lalu diuapkan menggunakan penguap vakum atau dengan tekanan rendah untuk menghasilkan ekstrak kental (Rivai et al., 2017).

Menurut Rivai et al. (2017), perhitungan rendemen ekstrak dilakukan dengan menghitung perbandingan antara berat ekstrak yang diperoleh dengan berat serbuk simplisia yang digunakan, yang dihitung menggunakan rumus:

$$\text{Rendemen (\%)} = \frac{\text{Berat Ekstrak}}{\text{Berat Simplisia}} \times 100\%$$

2.4.2 Uji *In Vivo* (Perlakuan, Pembedahan dan Koleksi Organ Mencit)

Penelitian ini menggunakan 27 ekor mencit strain Balb/c jantan berumur 8-12 minggu dengan berat badan minimal 20 gram. Hewan coba dibagi menjadi tiga kelompok perlakuan (Tabel 1).

Tabel 1. Kelompok perlakuan

Kelompok	Perlakuan
Kontrol (K0)	Tidak diberikan perlakuan apapun
Perlakuan 1 (P1)	Diberikan ekstrak daun sirih dengan dosis 200mg/kgBB
Perlakuan 2 (P2)	Diberikan ekstrak daun sirih dengan dosis 400mg/kgBB

Sebelum perlakuan dimulai, mencit diaklimatisasi terlebih dahulu selama dua minggu. Selama masa aklimatisasi dan perlakuan, mencit diberikan pakan berupa pellet dan air minum secara *ad libitum* untuk memastikan kondisi kesehatan dan metabolisme hewan coba tetap terjaga (Anzila et al., 2017).

Selama 30 hari perlakuan, ekstrak diberikan setiap hari secara oral dengan frekuensi perlakuan 1 kali per hari (1x1) sesuai dengan dosis yang telah ditentukan. Setelah 30 hari perlakuan, pada hari ke-31, mencit dieksekusi dengan dislokasi leher

untuk memudahkan pengambilan organ testis. Organ testis yang diambil segera dibersihkan menggunakan larutan PBS (*Phosphate Buffered Saline*) sebanyak dua kali untuk menghilangkan sisa darah dan jaringan yang tidak diperlukan (Anzila et al., 2017).

Setelah proses pembersihan, organ testis difiksasi menggunakan formalin 10% selama waktu yang diperlukan untuk memastikan jaringan tetap terjaga. Selanjutnya, testis diproses untuk pembuatan preparat histologi dengan metode parafin. Preparat yang telah dibuat kemudian diberi pewarnaan menggunakan teknik pewarnaan *Hematoxylin-Eosin* (HE) untuk memungkinkan pengamatan morfologi jaringan testis secara mikroskopis (Anzila et al., 2017).

2.4.3 Uji Histopatologi

Sediaan histologi testis dibuat dengan menggunakan metode parafin dan teknik pewarnaan *Hematoxylin-Eosin* (HE). Langkah pertama adalah dengan merendam jaringan testis yang telah difiksasi dalam larutan alkohol bertingkat secara berturut-turut, dimulai dengan alkohol 70%, 80%, 90%, 96%, dan etanol, masing-masing selama 5 menit untuk dehidrasi jaringan. Setelah itu, jaringan direndam dalam *xyol* sebanyak dua kali untuk dehidrasinya (Pranadya et al., 2019).

Selanjutnya, jaringan testis direndam dalam parafin cair dengan suhu 60°C sebanyak dua kali selama masing-masing 2 jam untuk proses infiltrasi. Setelah proses infiltrasi selesai, jaringan tersebut dibekukan dalam bentuk blok parafin dan disimpan di dalam lemari pendingin (*refrigerator*) (Pranadya et al., 2019).

Untuk pemotongan jaringan, blok parafin yang telah dibekukan dipotong dengan menggunakan mikrotom, menghasilkan potongan jaringan dengan ketebalan sekitar 5 µm. Hasil potongan jaringan tersebut kemudian diletakkan di atas gelas objek dan dipanaskan di atas alat pemanas dengan suhu 60°C untuk mempermudah proses pewarnaan (Pranadya et al., 2019).

Pewarnaan dilakukan dengan merendam gelas objek yang berisi preparat jaringan dalam *xyol* sebanyak tiga kali, masing-masing selama 5 menit, diikuti dengan perendaman dalam etanol sebanyak dua kali, masing-masing 5 menit. Setelah itu, preparat dicuci dengan aquades selama 1 menit, kemudian direndam dalam larutan *Hematoxylin* selama 15 menit untuk mewarnai inti sel (Pranadya et al., 2019).

Proses selanjutnya adalah perendaman dalam aquades selama 1 menit, diikuti dengan alkohol + asam sebanyak 4-5 celupan, dan diakhiri dengan perendaman dalam aquades selama 15 menit. Pewarnaan lanjutan dilakukan dengan merendam preparat dalam larutan *Eosin* 1% selama 2 menit. Setelah pewarnaan, preparat dibilas dalam alkohol 96% sebanyak tiga kali masing-masing selama 3 menit dan etanol sebanyak dua kali, masing-masing selama 5 menit. Terakhir, preparat direndam dalam *xyol* sebanyak dua kali, masing-masing 5 menit untuk proses klarifikasi. Pada tahap akhir, preparat diberi perekat Entelan dan ditutup dengan gelas penutup untuk memperoleh sediaan histologi yang siap diamati di bawah mikroskop (Pranadya et al., 2019).

2.4.3.1 Skoring Johnsen

Penilaian histopatologi spermatogenesis pada penelitian ini dilakukan menggunakan metode skoring Johnsen berdasarkan pengamatan mikroskopis terhadap tubulus seminiferus testis. Preparat histopatologi dibuat dengan teknik pewarnaan Hematoksin-Eosin (HE), kemudian diamati menggunakan mikroskop cahaya pada perbesaran 400x

(Rahmawati, 2018; Adelati et al., 2016). Setiap preparat diamati pada lima lapangan pandang yang dipilih secara acak, di mana pada setiap lapangan pandang dinilai satu tubulus seminiferus. Skor diberikan pada masing-masing tubulus berdasarkan kriteria Johnsen dengan rentang nilai 1–10 sesuai gambaran sel-sel spermatogenik yang terlihat. Skor dari lima lapangan pandang dirata-ratakan sehingga diperoleh nilai skor untuk masing-masing hewan uji (Adelati et al., 2016).

Kriteria penilaian menggunakan sistem skor Johnsen yang telah dimodifikasi berdasarkan perhitungan kuantitas sel, meliputi penilaian terhadap epitel tubulus seminiferus, keberadaan dan jumlah sel spermatogonium, spermatosit, spermatid, spermatozoa, serta kondisi lumen tubulus seminiferus (Rahmawati, 2018; Adelati et al., 2016).

Tabel 2. Kriteria Skoring Johnsen (Adelati et al., 2016)

Skor	Penilaian
10	Epitel tubulus normal, spermatogenesis lengkap, lumen tubulus terbuka, sel spermatozoa ≥ 10
9	Epitel tubulus rusak, lumen tubulus tertutup, sel spermatozoa ≥ 10
8	Sel spermatozoa < 10
7	Sel spermatozoa 0, sel spermatid ≥ 10
6	Sel spermatozoa 0, sel spermatid < 10
5	Sel spermatozoa dan sel spermatid 0, sel spermatosit ≥ 5
4	Sel spermatozoa dan sel spermatid 0, sel spermatosit < 5
3	Sel spermatogenik hanya terdiri atas sel spermatogonium
2	Sel spermatogenik 0, hanya ada sel Sertoli
1	Tidak ada sel sama sekali dalam tubulus

Setelah diperoleh skor masing-masing hewan, nilai tersebut digunakan sebagai data untuk dianalisis secara statistik guna membandingkan rerata skor antar kelompok perlakuan (Kusumawati et al., 2017; Adelati et al., 2016).

2.4.4 Perhitungan Jumlah Sel Leydig

Perhitungan jumlah sel Leydig dilakukan dengan menggunakan mikroskop berperbesaran 400x. Preparat yang telah disiapkan sebelumnya melalui proses histologi akan diamati untuk menghitung jumlah sel Leydig pada jaringan testis. Pengamatan dilakukan pada setiap preparat yang mewakili masing-masing kelompok perlakuan, dengan lima kali pengulangan untuk memastikan akurasi hasil (Octavyani et al., 2022).

2.4.5 Uji Hematologi

Sebelum dilakukan pengambilan sampel darah, hewan uji terlebih dahulu diberikan anestesi menggunakan eter hingga mencapai kondisi tidak sadar, dengan tujuan meminimalkan rasa nyeri dan stres selama prosedur berlangsung. Setelah mencit berada dalam keadaan teranestesi, pengambilan darah dilakukan melalui sinus retro-orbital menggunakan *micro-hematocrit capillary tube*. Darah yang diperoleh kemudian ditampung ke dalam tabung yang mengandung antikoagulan EDTA untuk mencegah terjadinya hemolisis dan pembekuan darah (Khairani et al., 2024).

Selanjutnya, tabung EDTA digerakkan secara perlahan dengan pola membentuk angka delapan guna memastikan darah tercampur homogen dengan antikoagulan.

Sampel darah yang telah tercampur kemudian segera disimpan dalam termos pendingin untuk mempertahankan kualitas sampel dan mencegah terjadinya koagulasi sebelum analisis. Pemeriksaan parameter hematologi selanjutnya dilakukan menggunakan alat *hematology analyzer* (Khairani et al., 2024).

2.5 Pengamatan dan Pengukuran

Data mengenai jumlah sel Leydig yang diperoleh dari pengamatan akan dianalisis menggunakan uji *Kruskal-Wallis*. Ekstrak dianggap memiliki pengaruh signifikan jika nilai p lebih kecil dari 0,05 ($P < 0,05$). Sebaliknya, ekstrak tidak dianggap berpengaruh jika nilai p lebih besar dari 0,05 ($P > 0,05$). Jika hasil uji *Kruskal-Wallis* menunjukkan nilai $p < 0,05$, maka dilakukan analisis lanjutan dengan uji *Mann-Whitney* untuk mengevaluasi perbedaan yang ada antar kelompok perlakuan. Semua data yang terkumpul akan dianalisis menggunakan perangkat lunak SPSS versi 25 untuk mendapatkan hasil yang lebih akurat dan valid (Octavyani et al., 2022).

Data parameter hematologi menciit yang meliputi jumlah leukosit (WBC), eritrosit (RBC), dan trombosit (PLT) diperoleh dari hasil pemeriksaan darah menggunakan *hematology analyzer* dan dikelompokkan berdasarkan kelompok perlakuan. Data selanjutnya dianalisis secara statistik menggunakan program SPSS dengan terlebih dahulu dilakukan uji normalitas *Shapiro-Wilk*. Data yang berdistribusi normal dianalisis menggunakan uji *One Way ANOVA*, sedangkan data yang tidak berdistribusi normal dianalisis menggunakan uji *Kruskal-Wallis*. Perbedaan antar kelompok perlakuan dinyatakan bermakna apabila nilai $p < 0,05$, sedangkan nilai $p > 0,05$ menunjukkan tidak adanya perbedaan yang signifikan (Syilvia et al., 2025).