

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Efisiensi reproduksi merupakan parameter kunci dalam menilai keberhasilan sistem reproduksi hewan. Salah satu upaya untuk meningkatkan efisiensi reproduksi hewan, yaitu dengan meningkatkan kualitas spermatozoa guna menunjang kesuburan yang lebih baik. Pendekatan yang dapat digunakan dalam meningkatkan reproduksi adalah pemanfaatan herbal yang memiliki kandungan bioaktif. Berbagai senyawa bioaktif yang terkandung dalam tanaman herbal memiliki peran penting dalam mendukung dan memodulasi fungsi reproduksi hewan. Salah satu tanaman herbal yang memiliki senyawa bioaktif yang mendukung yakni buah markisa.

Buah markisa banyak ditanam di daratan tinggi di Goa, Malino Sulawesi Selatan (Hendro, 2008). Markisa merupakan sumber flavonoid yang potensial dengan kandungan yang lebih tinggi, serta mengandung antioksidan lain seperti polifenol, karotenoid, dan vitamin C. Senyawa-senyawa ini berperan dalam menjaga keseimbangan oksidatif, mendukung proses spermatogenesis, serta meningkatkan kualitas spermatozoa melalui interaksi dengan reseptor LH dan FSH yang berperan dalam biosintesis testosteron (Armin et al., 2014).

Flavonoid diketahui berperan dalam meningkatkan kualitas sperma dengan mempertahankan motilitasnya serta melindungi membran spermatozoa, sehingga meningkatkan viabilitas dan jumlah sperma. Selain itu, flavonoid juga berfungsi dalam melindungi testis dari stres oksidatif serta mencegah kerusakan DNA. Senyawa ini turut berkontribusi dalam proses spermatogenesis dengan berinteraksi dengan reseptor LH dan FSH, yang kemudian mengaktifkan biosintesis testosteron melalui sel Leydig serta mendukung proses spermatogenesis di sel Sertoli (Wijayanti dan Lestari, 2018). Dengan adanya peran tersebut, flavonoid berpotensi merangsang produksi testosteron oleh sel Leydig, yang pada akhirnya berdampak pada peningkatan jumlah sel tersebut. Lebih lanjut, flavonoid juga berperan dalam regenerasi sel Leydig dengan menetralkan radikal bebas serta mempercepat perbaikan membran sel yang mengalami kerusakan (Januarti et al., 2021).

Pemahaman mengenai struktur dan fungsi testis menjadi hal yang perlu diperhatikan. Testis merupakan organ utama dalam sistem reproduksi jantan yang tersusun atas lobulus-lobulus berisi tubulus seminiferus, tempat berlangsungnya produksi spermatozoa. Setiap tubulus terdiri dari beberapa lapisan, termasuk tunika propria, lamina basalis, serta epitelium yang mengandung sel Sertoli dan sel spermatogonium. Sel Sertoli berperan dalam mendukung perkembangan sperma, sedangkan sel spermatogonium bertanggung jawab dalam proses spermatogenesis. Di antara lobulus terdapat jaringan interstisial yang mengandung sel Leydig, yang berfungsi menghasilkan hormon testosteron. Oleh karena itu, struktur histologi testis sangat berperan dalam mendukung fungsi reproduksi dan dapat mengalami perubahan akibat berbagai faktor fisiologis maupun patologis (Lestari dan Ismudiono, 2014).

Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk memberikan efek pemberian ekstrak buah markisa terhadap spermatogenesis dan gambaran histologi testis mencit sebagai model hewan uji. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan dasar ilmiah mengenai potensi buah markisa dalam mendukung kesehatan reproduksi serta sebagai alternatif suplemen alami dalam meningkatkan kesuburan.

1.1.1 Rumusan Masalah

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

1. Bagaimana pengaruh pemberian ekstrak buah markisa berpengaruh terhadap histomorfometri testis mencit (*Mus musculus* L.)?
2. Bagaimana pengaruh berbagai dosis ekstrak buah markisa terhadap spermatogenesis pada testis mencit (*Mus musculus* L.)?

1.1.2 Tujuan Penelitian

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

3. Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak buah markisa terhadap histomorfometri testis mencit (*Mus musculus* L.).
4. Mengetahui pengaruh efek berbagai dosis ekstrak buah markisa terhadap spermatogenesis testis mencit (*Mus musculus* L.).

1.1.3 Manfaat Penelitian

Manfaat Pengembangan Ilmu

1. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan kontribusi terhadap bidang histologi dan reproduksi hewan, khususnya dalam memahami efek ekstrak buah markisa terhadap spermatogenesis. Penelitian ini juga dapat menambah wawasan mengenai potensi senyawa bioaktif dalam buah markisa yang berperan dalam sistem reproduksi. Selain itu, hasil penelitian ini dapat menjadi referensi bagi penelitian selanjutnya yang fokus pada pemanfaatan bahan alami dalam pengelolaan sistem reproduksi.
2. Manfaat Aplikasi

Penelitian ini dapat memberikan dasar ilmiah bagi pemanfaatan ekstrak buah markisa dalam kesehatan reproduksi, baik sebagai agen peningkat kualitas sperma maupun sebagai alternatif kontrasepsi alami. Informasi yang diperoleh dapat dimanfaatkan dalam industri farmasi atau herbal untuk mengembangkan produk berbasis ekstrak buah markisa.

1.1.4 Hipotesis

Berdasarkan uraian di atas, dapat diambil hipotesis penelitian bahwa pemberian ekstrak buah markisa berpengaruh terhadap spermatogenesis dan gambaran histologi testis mencit. Dosis ekstrak yang diberikan diduga dapat mempengaruhi jumlah dan perkembangan sel spermatogenik, sehingga terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol. Selain itu, terdapat kemungkinan bahwa dosis tertentu dari ekstrak buah markisa memberikan efek paling signifikan terhadap spermatogenesis mencit.

1.1.5 Keaslian Penelitian

Sejauh penelusuran pustaka penulis, publikasi penelitian mengenai bagaimana pengaruh ekstrak markisa pada mencit berdasarkan spermatogenesis dan gambaran histologi testis belum pernah dilakukan sebelumnya. Penelitian yang berkaitan dengan studi ini telah dilakukan oleh Susanti et al., (2020), dengan judul “Ekstrak *Solanum betaceum* Mampu Meningkatkan Tebal Epitel dan Diameter Tubulus Seminiferus pada Mencit (*Mus musculus*) yang Terpapar Timbal Asetat” dan penelitian yang dilakukan oleh Azzuhdi (2025), dengan judul “Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Daun Mangga (*Mangifera Indica* L.) Terhadap Indeks Spermatogenesis Tikus Wistar (*Rattus Norvegicus*) Yang Diinduksi Diet Tinggi Lemak”

1.2 Kajian Pustaka

1.2.1 Markisa

Markisa (*Passiflora sp.*) merupakan tanaman yang termasuk dalam famili Passifloraceae dan dikenal sebagai tumbuhan merambat yang dapat tumbuh hingga lebih dari 20 meter. Tanaman ini bersifat abadi atau hidup menahun dan sering dimanfaatkan dalam berbagai sektor, baik sebagai bahan pangan maupun sebagai obat tradisional (Mariamah et al., 2017).

Menurut Fonseca et al. (2022), dalam sistematika (taksonomi) kedudukan buah markisa diklasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Ordo	: Malphigiales
Famili	: Passifloraceae
Genus	: <i>Passiflora</i>
Spesies	: <i>Passiflora edulis</i>



Gambar 1. Buah Markisa (Pereira et al., 2019)

Kandungan metabolit sekunder dalam markisa berpotensi besar dalam bidang kesehatan, terutama farmasi (Mariamah et al., 2017). Buah markisa kuning mengandung flavonoid, polifenol, karotenoid, dan asam askorbat yang berperan sebagai antioksidan. Kandungan total flavonoid dilaporkan sebesar $158,037 \pm 0,602$ mg/ml, sedangkan total fenol sebesar $92,5 \pm 2,2$ µg/mg. Senyawa tersebut berperan

dalam menekan stres oksidatif melalui penetralan radikal bebas (Khairunnisa et al., 2023). Stres oksidatif yang berlebihan dapat mengganggu keseimbangan hormon dan proses spermatogenesis, sehingga keberadaan antioksidan dalam markisa diduga berpotensi membantu menjaga fungsi sistem reproduksi (Mariamah et al., 2017).

1.2.2 Mencit

Mencit (*Mus musculus*, L.) merupakan salah satu model hewan yang banyak digunakan dalam penelitian di bidang biologi dan kedokteran, terutama di laboratorium. Keunggulannya sebagai hewan uji antara lain memiliki siklus hidup yang relatif singkat, mudah dipelihara, serta ketersediaannya yang melimpah (Mboro et al., 2018). Selain itu mencit (*Mus musculus*, L.) merupakan mamalia yang memiliki karakteristik fisiologi dan biokimia yang mirip dengan manusia. Hewan ini memiliki kemampuan fisik yang unik, salah satunya adalah kemampuan melompat, di mana mencit dapat melompat secara vertikal hingga mencapai ketinggian 25 cm. Mencit sering digunakan sebagai hewan percobaan dalam penelitian karena sistem reproduksi, pernapasan, dan sirkulasi darahnya memiliki kesamaan dengan manusia. Salah satu keunggulan yang disebutkan sebagai hewan uji adalah siklus reproduksinya yang singkat serta kemampuannya menghasilkan keturunan dalam jumlah besar (Yusuf et al., 2022).

Menurut Mu'nisa et al. (2022), dalam sistematika (taksonomi), kedudukan mencit diklasifikasikan sebagai berikut:



Gambar 2. Mencit (Mu'nisa et al., 2022)

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

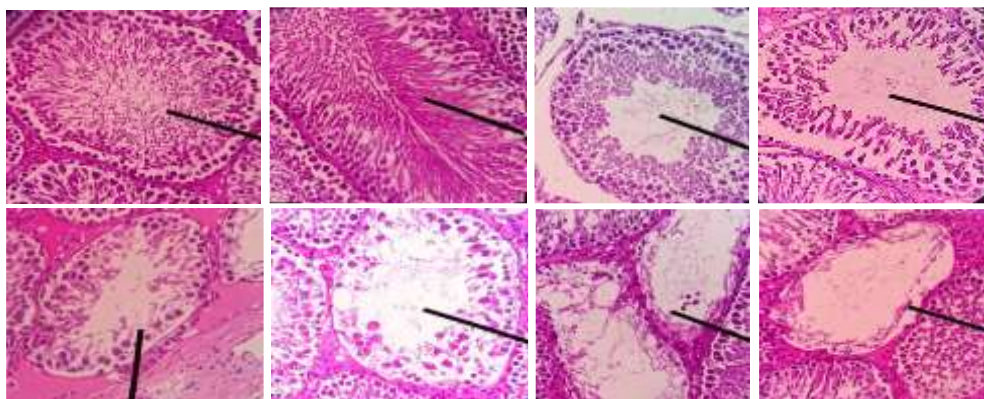
Mencit merupakan hewan omnivora yang alami, memiliki daya tahan tubuh yang baik, serta bersifat produktif dengan kemampuan berkembang biak yang tinggi. Selain ukurannya yang kecil dan sifatnya yang jinak, mencit juga mudah diperoleh dengan harga yang relatif terjangkau serta membutuhkan biaya pakan yang rendah.

Secara umum, mencit bukan hewan yang agresif, namun dalam beberapa situasi, mereka dapat menggigit jika merasa terancam atau saat seseorang mencoba menangkapnya. Selain itu, mencit memiliki kebiasaan menggali dan membuat sarang, yang berperan penting dalam membantu menjaga suhu tubuh agar tetap stabil (Rejeki et al., 2018).

Mencit jantan lebih sering digunakan dalam penelitian karena memiliki tingkat aktivitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan mencit betina. Pemilihan mencit jantan sebagai hewan uji didasarkan pada faktor kestabilan hormon, karena mencit jantan tidak memiliki estrogen dalam jumlah besar, sehingga kondisi hormonalnya lebih stabil (Yusuf et al., 2022).

1.2.3 Testis

Testis merupakan organ utama dalam sistem reproduksi jantan yang berperan dalam produksi sperma dan sekresi hormon seksual, terutama testosteron. Testis terdiri dari beberapa kompartemen utama, termasuk tubulus seminiferus, sel interstitial (Leydig), dan sel Sertoli, yang masing-masing memiliki fungsi khusus dalam mendukung proses spermatogenesis dan regulasi hormonal. Struktur testis meliputi tubulus seminiferus, tempat utama berlangsungnya spermatogenesis, serta jaringan interstitial yang mengandung sel Leydig yang bertanggung jawab dalam produksi testosteron. Di dalam tubulus seminiferus terdapat sel Sertoli yang berfungsi memberikan dukungan dan nutrisi bagi perkembangan sel sperma. Selain itu, terdapat barier darah testis (*Blood-Testis Barrier/BTB*), yang berperan dalam melindungi proses spermatogenesis dari gangguan imunologis dan faktor eksternal lainnya (Li et al., 2024).



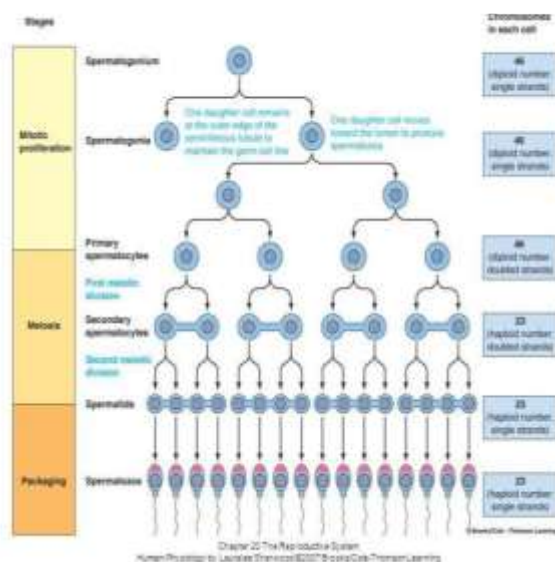
Gambar 3. Tubulus Seminiferus (Adelati et al., 2016).

Spermatogenesis merupakan proses kompleks yang berlangsung di dalam tubulus seminiferus, di mana sel germinal berkembang dari spermatogonium menjadi spermatozoa matang. Proses ini terdiri dari tiga tahap utama, yaitu mitosis spermatogonium, meiosis spermatosit, dan diferensiasi spermatid menjadi spermatozoa. Sel Sertoli berperan penting dalam mengatur lingkungan mikro untuk perkembangan sperma serta menjaga keseimbangan antara proliferasi dan diferensiasi sel germinal. Produksi sperma dan fungsi testis dikendalikan oleh sumbu

hipotalamus hipofisis gonad (sumbu HPG), yang melibatkan kerja sama beberapa hormon utama. Testosteron yang diproduksi oleh sel Leydig merupakan hormon kunci dalam spermatogenesis dan perkembangan karakteristik seksual sekunder pria. *Follicle Stimulation Hormone* (FSH) bekerja pada sel Sertoli untuk mendukung perkembangan spermatogenik, sedangkan *Luteinizing Hormone* (LH) merangsang sel Leydig dalam memproduksi testosteron. Selain itu, testis juga menghasilkan inhibin, yang diproduksi oleh sel Sertoli dan berperan dalam mengukur kadar FSH melalui mekanisme umpan balik negatif (Li et al., 2024).

1.2.4 Spermatogenesis

Spermatogenesis merupakan proses biologis kompleks yang terjadi di dalam testis dan bertujuan menghasilkan sel sperma matang. Proses ini sangat penting bagi kesuburan jantan karena memastikan produksi sel gamet yang siap untuk pembuahan. Spermatogenesis berlangsung dalam beberapa tahapan, yang mencakup proliferasi sel induk spermatogonium, diferensiasi menjadi spermatosit primer, pembelahan meiosis menjadi spermatosit sekunder dan spermatid, hingga tahap akhir yang disebut spermiogenesis, di mana spermatid mengalami perubahan morfologi menjadi sel sperma matang (Cho dan Easly, 2023).



Gambar 4. Spermatogenesis (Sanaky et al., 2024)

Faktor lingkungan, genetik, dan hormonal memiliki peran penting dalam regulasi spermatogenesis. Hormon *Luteinizing Hormone* (LH) dan *Follicle Stimulate Hormone* (FSH) yang diproduksi oleh kelenjar pituitari berperan dalam mengatur aktivitas sel Leydig dan sel Sertoli. Sel Leydig menghasilkan testosteron, hormon utama yang mengontrol perkembangan spermatogonium menjadi sperma yang matang, sementara sel Sertoli menyediakan dukungan struktural dan nutrisi bagi sel germinal yang sedang berkembang (Cho dan Easly, 2023).

Salah satu tantangan dalam studi spermatogenesis adalah memahami bagaimana berbagai faktor eksternal seperti toksin lingkungan, stres oksidatif, dan terapi medis dapat mempengaruhi proses ini. Berbagai penelitian telah mengembangkan sistem *in vitro* untuk mempelajari spermatogenesis secara lebih terkontrol, termasuk penggunaan bioreaktor, organoid testis, dan kultur jaringan eks vivo. Teknik-teknik ini bertujuan untuk meniru lingkungan testis agar dapat mengembangkan spermatid hingga tahap sperma yang fungsional (Cho dan Easley, 2023).

1.2.5 Hubungan Antara Ekstrak Buah Markisa dengan Gambaran Histologi Testis

Ekstrak buah markisa (*Passiflora edulis*) diketahui mengandung berbagai senyawa bioaktif, seperti flavonoid, alkaloid, dan saponin, yang berpotensi mendukung proses spermatogenesis pada mencit. Flavonoid berperan sebagai antioksidan kuat yang mampu melindungi sel-sel germinal di testis dari kerusakan akibat stres oksidatif, sehingga dapat meningkatkan kualitas dan kuantitas spermatozoa (Aitken dan Roman, 2008). Selain itu, senyawa alkaloid dan saponin dilaporkan berperan dalam meningkatkan kadar hormon testosteron, hormon utama yang berperan penting dalam keberlangsungan proses spermatogenesis (Yakubu et al., 2005).

Menurut Susanti et al. (2020), flavonoid bekerja dengan menurunkan aktivitas radikal bebas (*Reactive Oxygen Species/ROS*) berlebih sehingga mencegah terjadinya stres oksidatif yang dapat merusak sel-sel spermatogenik. Mekanisme ini sangat penting karena jaringan testis memiliki tingkat pembelahan sel yang tinggi sehingga rentan terhadap stres oksidatif. Kondisi stres oksidatif yang tidak terkontrol dapat menyebabkan kerusakan membran mitokondria dan memicu apoptosis sel-sel spermatogenik, yang pada akhirnya mengganggu proses spermatogenesis (Arvilla et al., 2021).

Selain menekan pembentukan radikal bebas, flavonoid juga berperan dalam mempercepat perbaikan membran sel yang rusak sehingga struktur histologi testis tetap terjaga. Perlindungan seluler tersebut secara histologis tercermin dalam peningkatan diameter tubulus seminiferus dan ketebalan epitel germinal, yang menunjukkan aktivitas proliferasi dan diferensiasi sel-sel spermatogenik yang berlangsung secara optimal (Susanti et al., 2020; Yassin et al., 2025).

Antioksidan aktif, seperti flavonoid dan vitamin E, juga diketahui berperan dalam merangsang aktivitas kelenjar hipofisis untuk meningkatkan sekresi hormon *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) dan *Luteinizing Hormone* (LH). Peningkatan kedua hormon tersebut akan menstimulasi sel Leydig dalam memproduksi testosteron, yang sangat diperlukan pada setiap tahapan spermatogenesis, mulai dari pembelahan spermatogonia hingga proses maturasi spermatid. Secara histologis, testis yang sehat ditandai dengan susunan sel-sel spermatogenik yang padat, teratur, dan berlapis sesuai tingkat perkembangannya, dari lamina basalis hingga lumen tubulus seminiferus yang terisi spermatozoa (Pranadya et al., 2019).

BAB II METODOLOGI PENELITIAN

2.1 Waktu dan Tempat Pelaksanaan Penelitian

Penelitian ini telah dilaksanakan dari bulan Mei hingga Juli 2025. Perlakuan, pembuatan preparat serta pengamatan pada mencit dilakukan di *Animal Lab* Rumah Sakit Hewan, Laboratorium Reproduksi dan Laboratorium Patologi Kedokteran Hewan Universitas Hasanuddin serta Pembuatan Ekstrak Buah Markisa dilakukan di Laboratorium Biofarmaka LPPM Universitas Hasanuddin.

2.2 Jenis Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode eksperimental dengan desain *post test only control group design*, yang melibatkan beberapa kelompok perlakuan dan satu kelompok kontrol. Mencit diberikan ekstrak buah markisa (*Passiflora edulis*) dengan dosis berbeda, lalu dilakukan pengamatan terhadap spermatogenesis dan gambaran histologi testis. Evaluasi dilakukan setelah periode perlakuan untuk menilai efek ekstrak terhadap jumlah dan kualitas sel spermatogenik serta struktur histologi testis. Desain ini bertujuan untuk membandingkan pengaruh berbagai dosis ekstrak buah markisa terhadap spermatogenesis mencit.

2.3 Populasi dan Sampel

Penelitian ini menggunakan metode *Simple Random Sampling* untuk pemilihan sampel. Hewan uji yang digunakan adalah mencit yang berasal dari salah satu peternakan mencit di sekitaran Makassar dengan berat sekitar 20-30 gram dengan umur 2-3 bulan. Sampel berasal dari populasi mencit yang tersedia, 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:

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

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

$$3n - 3 \geq 15$$

$$3n \geq 18$$

$$n \geq 6$$

Dengan demikian, setiap kelompok perlakuan membutuhkan 6 ekor mencit. Total kebutuhan sampel dihitung berdasarkan 4 kelompok perlakuan dan 1 kali pengambilan sampel, jadi total mencit yang digunakan yaitu 24 ekor mencit dimana setiap kelompoknya terdiri dari 6 ekor.

- a. K0 : Kelompok kontrol mencit yang diberikan pakan standar dan air minum sekali sehari secara *ad libitum* selama 28 hari.
- b. K1 : Kelompok mencit yang diberikan pakan dan air minum secara *ad libitum*,

serta diberikan ekstrak buah markisa sekali sehari dengan dosis 100 mg/kgBB menggunakan sonde 28 hari.

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

2.4 Alat dan Bahan

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

Bahan yang digunakan adalah buah markisa (*Passiflora edulis*) 24 ekor mencit (*Mus musculus L.*) dengan usia 2-3 bulan dan berat sekitar 20-30 gr, alkohol (70%, 80%, 90%, 95%, 100% (1), 100% (2) 100% (3)), anastesi *ketaxyla* (Ketamin+xylazine), *aquades*, buah markisa, *eosin*, etanol 70%, Formalin 10%, *handscoon*, *Hematoxylin*, kertas saring, masker bedah, NaCl 0,9%, pakan standar, paraffin, dan xylol (I, II dan III).

2.5 Prosedur Penelitian

2.5.1 Pembuatan Ekstrak Markisa

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, sehingga bagian yang diambil berupa isi dan bijinya. 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 dimasukkan ke dalam 3 wadah dimana masing-masing wadahnya berisi 184,7 gram, kemudian setiap wadah ditambahkan pelarut etanol 70% sebanyak 750mL 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 terlindungi 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. 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 Sampel

Sebelum dilakukan percobaan, mencit menjalani proses aklimatisasi selama 7 hari dalam kandang untuk memastikan kesamaan pola hidup dan asupan makanannya. Setiap mencit ditempatkan secara individual pada kandang terpisah, kemudian dilakukan pemantauan kesehatan setiap hari. Selama masa aklimatisasi, mencit diberikan pakan dan air minum secara *ad libitum* untuk memenuhi kebutuhan nutrisinya.

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

- | | | |
|----------------|--------|----------------------|
| a. Kelompok K | 6 ekor | (-) EBM |
| b. Kelompok P1 | 6 ekor | (+) EBM 100 mg/kg BB |
| c. Kelompok P2 | 6 ekor | (+) EBM 200 mg/kg BB |
| d. Kelompok P3 | 6 ekor | (+) EBM 400 mg/kg BB |

Pemberian ekstrak buah markisa dengan dosis tersebut berdasarkan dengan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Musfirah et al. (2016), bahwa ekstrak diberikan dalam tiga variasi dosis yaitu 100 mg/Kg BB, 200 mg/Kg BB, dan 400 mg/Kg BB pada mencit. Oleh karena itu, penentuan dosis ekstrak buah markisa pada penelitian ini mengacu pada penelitian tersebut, di mana dosis 100 mg/Kg BB telah digunakan sebagai dosis awal untuk melihat pengaruh terhadap proses spermatogenesis. Selain itu, pemberian dosis 200 mg/Kg BB dan 400 mg/Kg BB dalam penelitian tersebut menunjukkan hasil yang lebih baik dalam meningkatkan jumlah sel-sel spermatogenik, khususnya sel spermatosit dan spermatid, sehingga kedua dosis tersebut dipertimbangkan sebagai dosis yang memberikan efek optimal. Ekstrak buah markisa diberikan secara oral sebanyak 0,5 ml melalui sonde yang diberikan sekali sehari selama 28 hari.

2.5.3 Pembuatan Preparat Histologi

Jaringan testis disaring menggunakan larutan HCl 0,01%, kemudian diproses melalui serangkaian tahapan pembuatan preparat dengan metode parafin. Setelah itu dilakukan pewarnaan menggunakan *Hematoxylin* dan *Eosin* (H&E) untuk analisis histologi (Reni et al., 2013).

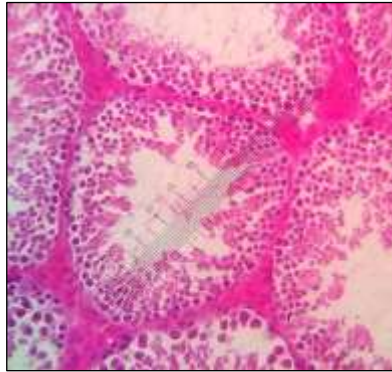
Proses pembuatan preparat histologi testis diawali dengan fiksasi jaringan. Setelah itu, jaringan dicuci dengan alkohol 70% selama satu jam, kemudian dilakukan proses dehidrasi secara bertahap menggunakan alkohol dengan konsentrasi 70%, 80%, dan 90%, dengan lama perendaman bervariasi, hingga akhirnya dibiarkan semalaman dalam alkohol 90%. Langkah berikutnya adalah perendaman dalam alkohol 96% dan alkohol absolut masing-masing selama satu jam. Untuk menjernihkan jaringan, sampel kemudian direndam dalam larutan toluol semalaman. Proses infiltrasi parafin dilakukan dengan merendam jaringan dalam campuran toluol dan parafin dalam perbandingan 1:1 selama 30 menit, lalu dilanjutkan dengan perendaman dalam parafin murni I, II, dan III selama masing-

masing 45 menit. Setelah itu tahap *embedding* dilakukan dengan menanam jaringan dalam parafin cair, kemudian perakitan hingga membentuk blok yang siap untuk disayat menggunakan mikrotom. Blok parafin yang telah berisi jaringan dipasang pada holder dengan tambahan parafin cair agar melekat, kemudian disimpan dalam kulkas. Blok yang sudah dipotong menggunakan mikrotom dengan ketebalan 6 μm , membentuk irisan pita yang kemudian ditempelkan pada kaca objek yang telah diolesi albumin dan aquades. Persiapan ini lalu diletakkan dalam *slidewarmer* selama 24 jam untuk memastikan penempelan yang kuat (Harlis dan Septiana, 2017).

Proses pewarnaan dan *pemasangan* dilakukan dengan beberapa tahapan. Pertama, *deparafinisasi* dilakukan dengan merendam kaca objek dalam xylol selama 15 menit hingga parafin larut sepenuhnya. Selanjutnya tahap *hidrasi* dilakukan dengan merendam kaca objek dalam larutan alkohol dengan konsentrasi menurun, mulai dari alkohol absolut hingga aquades, dengan perendaman masing-masing selama satu menit. Setelah itu, jaringan pewarnaan menggunakan Hematoxylin Eosin selama tujuh detik dan dibilas dengan air mengalir selama 10 menit. Proses dilanjutkan dengan perendaman dalam alkohol bertingkat (30%-70%) selama satu menit masing-masing, kemudian direndam dalam Eosin selama dua menit. Setelah pewarnaan, sampel dikembalikan dengan alkohol bertingkat hingga alkohol absolut. Tahap akhir dilakukan dengan merendam preparat dalam xylol selama 15 menit, dikeringkan di atas kertas saring kemudian ditutup dengan kaca penutup. Setelah persiapan siap, pengukuran dilakukan di bawah mikroskop untuk mendapatkan gambaran histologi testis (Harlis dan Septiana, 2017).

2.6 Pengamatan Histomorfometri

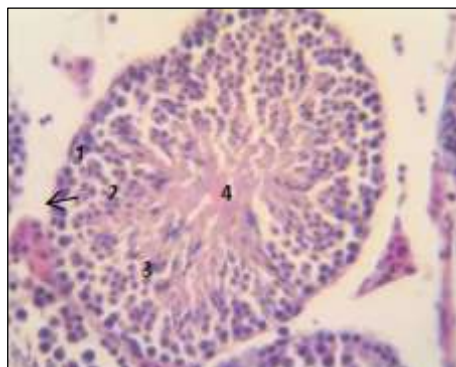
Parameter morfometri yang digunakan untuk mengevaluasi kondisi tubulus seminiferus meliputi beberapa indikator utama, yaitu diameter tubulus, tinggi epitel germinal, jumlah sel epitel germinal, serta panjang tubulus baik secara total per testis maupun panjang per gram berat testis (Abarikwu et al., 2020). Parameter yang diamati dalam penelitian ini adalah diameter tubulus seminiferus, karena menurut Abarikwu et al. (2020), diameter tubulus merupakan indikator kuantitatif yang mencerminkan aktivitas spermatogenesis dan integritas epitel germinal. Penurunan diameter tubulus dapat menunjukkan terjadinya kehilangan sel germinal serta gangguan struktur tubulus seminiferus, sehingga parameter ini dinilai sensitif dalam mendeteksi perubahan atau kerusakan testikular. Preparat testis diamati dengan menggunakan mikroskop cahaya, pengamatan meliputi sel-sel spermatogenik dari lapisan basal ke arah lumen tubulus seminiferus. Pengamatan dilakukan pada potongan melintang tubulus seminiferus yang diambil secara random. Pengukuran diameter dan tebal epitel tubulus seminiferus dilakukan dengan menggunakan mikrometer pada lensa okuler. Pengukuran diameter tubulus seminiferus menggunakan mikroskop dengan perbesaran 40 x 10, pengamatan sel-sel spermatogenik dilakukan dengan mikroskop dengan perbesaran 40 x 10 (Rahmawati, 2018).



Gambar 5. Pengukuran diameter tubulus seminiferus perbesaran 400x (Larasati et al., 2019)

2.7 Pengamatan Spermatogenesis

Secara histologis, sel-sel spermatogenik tersusun secara teratur dalam empat hingga delapan lapisan yang membentang dari lamina basalis hingga lumen tubulus seminiferus. Pengamatan struktur tersebut umumnya dilakukan menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400× pada preparat jaringan testis yang dibuat dengan metode parafin dan pewarnaan *Hematoxylin-Eosin* (H&E). Melalui teknik ini, berbagai jenis sel germinal dapat diidentifikasi berdasarkan letak dan karakteristik morfologinya, yaitu spermatogonia yang berderet di sepanjang membran basalis, spermatosit primer yang berukuran relatif besar dan sensitif terhadap gangguan, spermatid, serta spermatozoa yang berada di dekat atau di dalam lumen tubulus (Susetyarini, 2015; Ferial et al., 2020; Harlis et al., 2019; Nurliani et al., 2005).



Gambar 6. Populasi sel spermatogenik. 1. Spermatogonia, 2. Spermatosit, 3. Spermatid, 4. Spermatozoa dalam lumen dengan pembesaran 400x (Pranadya et al., 2019)

Spermatogenesis dinilai menggunakan skoring johnsen dan spermatogenic indeks menurut Afolabi et al. (2022), sesuai dengan tabel 1 dan 2.

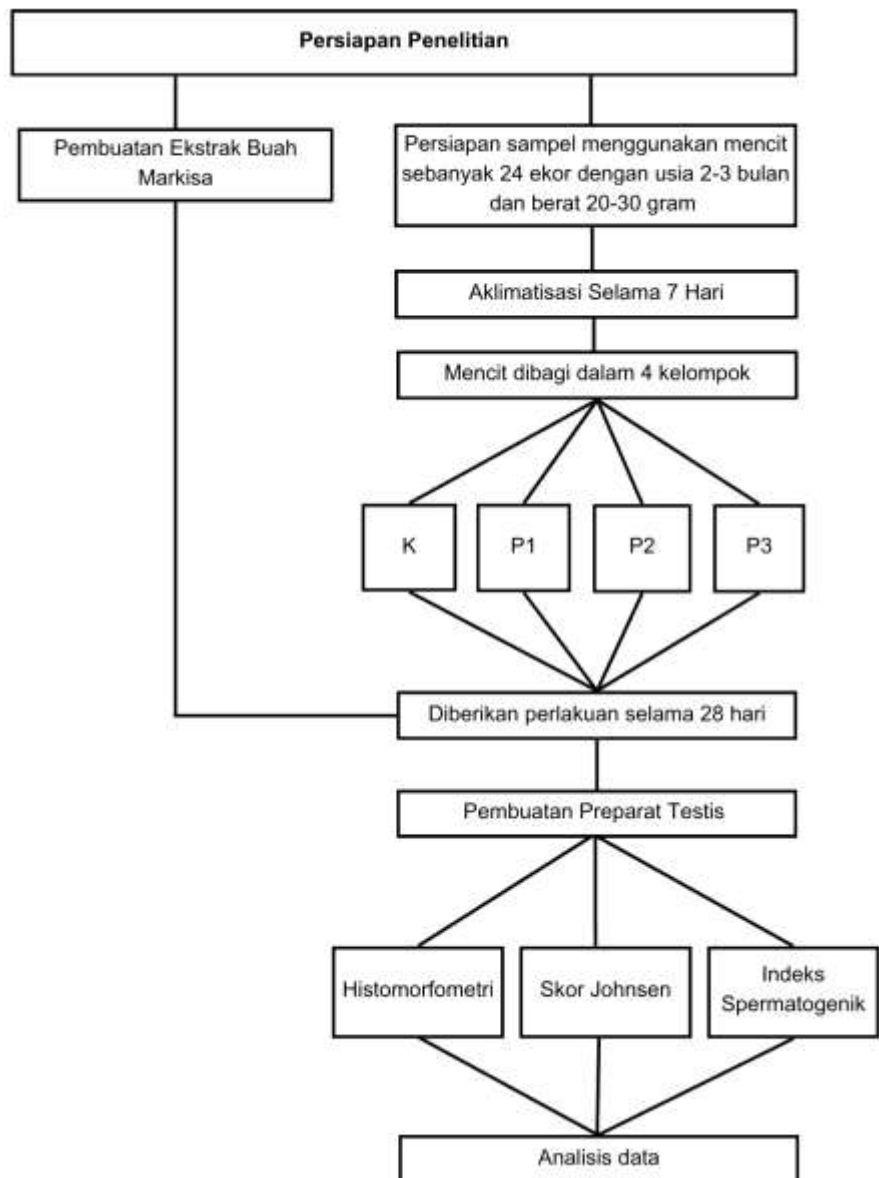
Tabel 1. Skoring Jhonsen

Skor	Kriteria Penilaian
1	Tubulus seminiferus mengalami degenerasi total, tanpa keberadaan sel germinal maupun sel Sertoli.
2	Tidak ditemukan sel germinal sama sekali, hanya sel Sertoli yang masih bertahan dalam tubulus seminiferus.
3	Sel germinal yang tersisa hanya spermatogonia tanpa adanya spermatosit, spermatid, atau spermatozoa.
4	Hanya tersisa sedikit spermatosit (kurang dari 5), tanpa keberadaan spermatid maupun spermatozoa.
5	Tidak ditemukan spermatozoa maupun spermatid, tetapi masih terdapat beberapa spermatosit dalam tubulus.
6	Jumlah spermatid yang ditemukan sangat sedikit, kurang dari 5 hingga 10 sel, dan tidak ada spermatozoa.
7	Tidak ada spermatozoa yang terlihat, tetapi masih banyak spermatid yang hadir dalam tubulus.
8	Hanya ditemukan sedikit spermatozoa dalam tubulus seminiferus, sekitar 5 hingga 10 sel.
9	Spermatozoa dalam jumlah banyak masih dapat ditemukan, tetapi epitel germinal tampak tidak beraturan.
10	Proses spermatogenesis berlangsung secara optimal dengan kehadiran banyak spermatozoa matang dalam tubulus seminiferus.

Tabel 2. Skoring Indeks Spermatogenik

Skor	Kriteria Penilaian
1	Terdapat spermatogonia, spermatosit, dan spermatid awal dengan jumlah spermatid akhir mencapai 25 per tubulus.
2	Selain spermatogonia dan spermatosit, terdapat spermatid awal (<i>round spermatid</i>), namun jumlah spermatid akhir kurang dari lima per tubulus.
3	Ditemukan sel spermatogonia beserta spermatosit dalam tubulus seminiferus.
4	Tubulus seminiferus hanya mengandung sel spermatogonia tanpa kehadiran sel germinal lainnya.

2.8 Alur Penelitian



Gambar 7. Alur Penelitian