

DISERTASI

UJIAN TERBUKA

**PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL DAUN KELOR
(*MORINGA OLEIFERA*) MENINGKATKAN
MOTILITAS PROGRESIF SPERMATOZOA DAN
MENURUNKAN *8-HYDROXYDEOXYGUANOSINE (8-
OHdG)* PADA TIKUS (*RATTUS NORVEGICUS*)
GALUR WISTAR USIA TUA**



LUH PUTU WIDIASTINI

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS UDAYANA
DENPASAR
2022**

DISERTASI

**PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL DAUN KELOR
(*MORINGA OLEIFERA*) MENINGKATKAN *MOTILITAS*
PROGRESIF SPERMATOZOA DAN MENURUNKAN *8-*
HYDROXYDEOXYGUANOSINE (8-OHdG) PADA TIKUS
(*RATTUS NORVEGICUS*) GALUR *WISTAR* USIA TUA**



**LUH PUTU WIDIASTINI
1990211001**

**PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KEDOKTERAN
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS UDAYANA
DENPASAR
2022**

**PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL DAUN KELOR
(*MORINGA OLEIFERA*) MENINGKATKAN *MOTILITAS*
PROGRESIF SPERMATOZOA DAN MENURUNKAN *8-*
HYDROXYDEOXYGUANOSINE (8-OHdG) PADA TIKUS
(*RATTUS NORVEGICUS*) GALUR *WISTAR* USIA TUA**

Disertasi ini sebagai syarat untuk Memperoleh Gelar Doktor pada Program Studi

Doktor Ilmu Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Udayana

**LUH PUTU WIDIASTINI
1990211001**

**PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KEDOKTERAN
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS UDAYANA
DENPASAR
2022**

LEMBAR PENGESAHAN

**NASKAH DISERTASI INI TELAH DISETUJUI
PADA TANGGAL: 23 NOVEMBER 2021**

Promotor



Prof. Dr. dr. I Nyoman Mangku Karmaya, M.Repro. PA (K)
NIP. 19460915 201702 1 001

Kopromotor I



Dr. dr. Bagus Komang Satriyasa, M.Repro
NIP. 196404171996011001

Kopromotor II,



Dr. dr. Wayan Bebas, M.Kes
NIP. 196212311989031021

Mengetahui

Koordinator Program Studi Doktor Ilmu Dekan Fakultas Kedokteran
Kedokteran Universitas Udayana,
Fakultas Kedokteran
Universitas Udayana,



Prof. Dr. dr. I Made Jawi, M.Kes
NIP. 19581231 198601 1 006



Dr. dr. Komang Januartha Putra Pinatih, M.Kes
NIP. 196701221996011001

PENETAPAN TIM PENGUJI

Disertasi ini telah di uji pada ujian Tertutup

Tanggal 15 September 2021

Panitia Penguji Disertasi berdasarkan Surat Tugas Dekan Fakultas Kedokteran

Universitas Udayana

Panitia Penguji Ujian Terbuka Disertasi adalah

Ketua Prof. Dr. Ir. Ida Bagus Putra Manuaba, M.Phil

Anggota

1. Prof. Dr. dr. I.Nyoman Mangku Karmaya, M.Repro, PA (K)
2. Prof. Dr.dr. Nyoman Kertia, Sp.PD-KR
3. Prof. Dr.dr. J.Alex Pangkahila, MSc., Sp.And
4. Prof. Dr. dr. I. Made Bakta, Sp. PD (KHOM)
5. Dr. dr. Bagus Komang Satriyasa, M. Repro
6. Dr. drh. Wayan Bebas, M.Kes
7. Dr. dr. AA. Ngurah Jaya Kusuma, Sp. OG (K)., MARS

ABSTRAK

PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL DAUN KELOR (*MORINGA OLEIFERA*) MENINGKATKAN *MOTILITAS PROGRESIF SPERMATOZOA* DAN MENURUNKAN *8-HYDROXYDEOXYGUANOSINE (8-OHdG)* PADA TIKUS (*RATTUS NORVEGICUS*) GALUR WISTAR USIA TUA

Proses penuaan reproduksi pada pria ditandai dengan penurunan progresif integritas fisiologis yang memicu kerusakan *Testis, epididimis* maupun organ reproduksi lainnya. Penyebab utama dalam proses ini adalah stres oksidatif, yang didefinisikan sebagai ketidak seimbangan *Reactive Oxygen Species (ROS)* dengan antioksidan. Tingkat suprafisiologis ROS dapat menurunkan *motilitas spermatozoa*, merusak *mitokondria*, dan integritas DNA yang memicu peningkatan kadar *8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG)*, sehingga menimbulkan infertilitas. Daun Kelor memiliki khasiat, manfaat dan kandungan nilai gizi yang tinggi menyebabkan kelor mendapat julukan sebagai *Miracle tree*. Kandungan antioksidan yang tinggi pada daun kelor adalah *Flavonoid* dan *Ascorbic acid (Vitamin C)* yang dapat menangkal dan melindungi sel dari serangan ROS. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pemberian ekstrak etanol daun Kelor (*Moringa Oleifera*) terhadap peningkatan *Motilitas Progresif Spermatozoa* dan penurunan *8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG)* pada Tikus (*Rattus Norvegicus*) Galur Wistar Usia Tua. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biomedik Terpadu Fakultas Kedokteran Universitas Udayana pada bulan November 2020 – April 2021. Penelitian ini merupakan true experimental dengan desain *Randomized post-test only control group design* pada 34 ekor tikus yang dibagi menjadi dua kelompok (Kelompok kontrol dan kelompok perlakuan). Data ditampilkan dalam bentuk rerata dan uji statistik menggunakan *Independent Sample T Test* pada data *Motilitas Progresif Spermatozoa* dan *Mann Whitney* pada data Kadar *8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) Spermatozoa* dengan nilai signifikansi 0.05, diperoleh hasil peningkatan *Motilitas Progresif Spermatozoa* secara bermakna pada kelompok perlakuan dibandingkan kelompok kontrol ($p < 0.05$) serta penurunan Kadar *8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) Spermatozoa* secara bermakna pada kelompok perlakuan dibandingkan kelompok kontrol ($p < 0.05$). Ekstrak etanol daun kelor (*Moringa Oleifera*) dapat meningkatkan *Motilitas Progresif Spermatozoa* serta menurunkan Kadar *8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) Spermatozoa*.

Kata kunci : Penuaan, stress oksidatif, *Motilitas Progresif Spermatozoa*, *8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG)*, Ekstrak etanol daun kelor (*Moringa Oleifera*)

ABSTRACT

ADMINISTRATION OF MORINGA OLEIFERA ETHANOL EXTRACT INCREASING PROGRESSIVE MOTILITY OF SPERMATOZOES AND DECREASING 8-HYDROXYDEOXYGUANOSINE (8-OHdG) IN RATS (RATTUS NORVEGICUS) OLD AGE WISTAR STAIN

The reproductive aging process in men is characterized by a progressive decrease in physiological integrity that triggers damage to the testes, epididymis and other reproductive organs. The main cause in this process is oxidative stress, which is defined as an imbalance of Reactive Oxygen Species (ROS) with antioxidants. Supraphysiological levels of ROS can reduce spermatozoa motility, damage mitochondria, and DNA integrity which triggers increased levels of 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG), causing infertility. Moringa leaves have properties, benefits and high nutritional value, which causes Moringa to be nicknamed the Miracle tree. The high antioxidant content in Moringa leaves is Flavonoid and Ascorbic acid (Vitamin C) which can counteract and protect cells from ROS attack. The purpose of this study was to determine the administration of Moringa (*Moringa Oleifera*) leaf ethanol extract to increase Spermatozoa Progressive Motility and decrease 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) in Old Age Wistar Strain Rats (*Rattus norvegicus*). This research was conducted at the Integrated Biomedical Laboratory, Faculty of Medicine, Udayana University in November 2020 – April 2021. This research is a true experimental design with a Randomized post-test only control group design on 34 rats which were divided into two groups (control group and treatment group). The data is displayed in the form of mean and statistical test using Independent Sample T Test on Spermatozoa Progressive Motility data and Mann Whitney on Spermatozoa 8-hydroxydeoxyguanosine levels (8-OHdG) data with a significance value of 0.05, the results obtained significantly increased Spermatozoa Progressive Motility in the treatment group compared control group ($p < 0.05$) and significantly decreased levels of 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) spermatozoa in the treatment group compared to the control group ($p < 0.05$). Moringa oleifera (*Moringa Oleifera*) leaf ethanol extract can increase Spermatozoa Progressive Motility and reduce Spermatozoa 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) levels

Keywords: Aging, oxidative stress, Spermatozoa Progressive Motility, 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG), Moringa Oleifera leaf ethanol extract

UCAPAN TERIMA KASIH

Pertama-tama perkenankanlah penulis panjatkan puji syukur kepada Ida Sang Hyang Widhi Wasa, karena atas Rahmat-Nya, penulis dapat menyelesaikan penelitian dengan judul “Pemberian Ekstrak Etanol Daun Kelor (*Moringa Oleifera*) Meningkatkan *Motilitas Progresif Spermatozoa* dan Menurunkan 8-*hydroxydeoxyguanosine* (8-OHdG) pada Tikus (*Rattus Norvegicus*) Galur *Wistar* Usia Tua”.

Pada kesempatan ini perkenankanlah penulis mengucapkan terima kasih dan penghargaan yang sebesar-besarnya kepada Promotor Prof. Dr. dr. I.Nyoman Mangku Karmaya, M.Repro, PA (K), Ko Promotor 1, Dr. dr. Bagus Komang Satriyasa, M.Repro, Ko Promotor 2, Dr. drh. Wayan Bebas, M.Kes yang dengan ketulusan hati menyediakan waktu untuk memberikan bimbingan, dorongan, semangat, dan motivasi dalam menyelesaikan disertasi ini, serta ucapan terima kasih ditujukan kepada Prof. Dr. dr. I Made Jawi, M.Kes selaku Koordinator S3 Ilmu Kedokteran yang telah memberikan kesempatan penulis untuk mengikuti program Doktor Ilmu Kedokteran di Universitas Udayana.

Penulis juga menyampaikan rasa terima kasih kepada para penguji Ujian Akhir Tahap Kedua (UJIAN TERBUKA) Prof Dr. dr. I. Nyoman Mangku Karmaya, M.Repro, PA (K), Prof. Dr.dr. Nyoman Kertia, Sp.PD-KR, Prof. Dr. dr. J. Alex Pangkahila, M.Sc., Sp.And, Prof. Dr. dr. I Made Bakta, Sp.PD., KHOM, Prof. Dr. Ir. Ida Bagus Putra Manuaba, M.Phil, Dr. dr. Bagus Komang Satriyasa, M.Repro, Dr. drh. Wayan Bebas, M.Kes., Dr. dr. AA. Ngurah Jaya Kusuma, Sp.OG (K)., MARS, , Prof. Dr. dr. I Made Jawi, M.Kes, Prof.Dr.dr.I Wayan Putu Sutirta Yasa, M.Si, Dr. dr.

I Nyoman Wande, S.Ked., Sp.PK(K), dr. I Made Winarsa Ruma, S.Ked., Ph.D, Dr. dr. Ni Made Linawati, S.Ked., M.Si, Dr. dr. Agung Wiwiek Indrayani, S.Ked., M.Kes, Dr. dr. I Made Sudarmaja, M.Kes, Dr. dr. A.A. Ngurah Subawa, M.Si yang telah memberikan banyak masukan, saran, sanggahan dan koreksi sehingga disertasi ini dapat disempurnakan.

Penulis memberikan ucapan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada Yayasan Bina Usada Bali, Ketua STIKES Bina Usada Bali beserta jajarannya yang telah memberikan kesempatan dan dukungan kepada penulis untuk mengikuti pendidikan program doktor.

Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada teman-teman S3 Kedokteran angkatan 2019 (WANEN) atas pengalaman, motivasi dan kerjasama selama mengikuti pendidikan program doktor, semoga pertemanan kita selalu terjaga. Tidak lupa penulis juga mengucapkan terimakasih kepada Dr. dr. I Nyoman Wande, S.Ked., Sp.PK(K), I Ketut Gede Adi Santika, Amd. AK, AA Wirasanthi Gayatri, Amd. AK., S.Si, Sukma, Angga, Bli Surya yang telah membantu semua pemeriksaan laboratorium untuk disertasi ini.

Ucapan terima kasih beserta doa yang tulus kepada bapak tercinta I Gede Santiada, Ibu tersayang Luh Sukrini, bapak mertua Made Trisna Usada, Ibu Mertua Ratna Setiawati. Terima kasih pula kepada suami tercinta Putu Risna Dhika Dilaga atas dukungan, motivasi, perjuangan sehingga penulis dapat menyelesaikan pendidikan ini. Penulis ucapkan terimakasih kepada kakak, ipar, ponakan, serta keluarga yang selalu memberikan doa yang tulus kepada penulis selama pendidikan.

Akhir kata penulis mengucapkan terima kasih kepada semua pihak yang tidak bisa penulis sebutkan satu persatu yang telah membantu penulis dalam penyusunan disertasi ini. Semoga Ida Sang Hyang Widhi Wasa selalu melimpahkan berkat dan rahmat-Nya kepada kita semua.

DAFTAR ISI

	Halaman
SAMPUL DALAM	ii
LEMBAR PENGESAHAN	iv
PENETAPAN TIM PENGUJI	v
ABSTRAK	vi
ABSTRACT	vii
UCAPAN TERIMA KASIH	viii
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR ARTI LAMBANG, SINGKATAN DAN ISTILAH	xviii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	8
1.3 Tujuan Penelitian.....	8
1.3.1 Tujuan Umum.....	8
1.3.2 Tujuan Khusus.....	9
1.4 Manfaat Penelitian.....	9
BAB II KAJIAN PUSTAKA	10
2.1 Infertilitas Pria.....	10
2.2 <i>Spermatogenesis</i>	13

2.3 Spermatozoa.....	17
2.4 Motilitas Spermatozoa.....	21
2.5 Penuaan.....	23
2.6 Mitokondria Spermatozoa.....	27
2.7 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) Penanda Kerusakan mtDNA.....	33
2.8 Daun Kelor (<i>Moringa Oleivera</i>)	36
2.9 CarboxyMethylCellulose (CMC)	51
2.10 Tikus Putih (<i>Rattus Norvegicus</i>) Galur Wistar.....	52
BAB III KERANGKA BERFIKIR, KONSEP, DAN HIPOTESIS	
PENELITIAN.....	62
3.1 Kerangka Berfikir.....	62
3.2 Konsep Penelitian.....	64
3.3 Hipotesis Penelitian.....	65
BAB IV METODE PENELITIAN.....	66
4.1 Rancangan Penelitian.....	66
4.2 Lokasi dan Waktu Penelitian.....	67
4.2.1 Lokasi penelitian.....	67
4.2.2 Waktu penelitian.....	67
4.3 Ruang Lingkup Penelitian.....	67
4.4 Penentuan Sumber Data.....	68
4.4.1 Populasi target.....	68
4.4.2 Populasi terjangkau.....	68

4.4.3 Sampel penelitian.....	68
4.4.4 Besar Sampel.....	69
4.4.5 Tehnik Penentuan Sampel.....	69
4.5 Variabel Penelitian.....	70
4.5.1 Klasifikasi Variabel Penelitian.....	70
4.5.2 Definisi Operasional Variabel	70
4.5.3 Hubungan Antar Variabel.....	72
4.6 Alat dan Bahan Penelitian.....	73
4.6.1 Alat Penelitian.....	73
4.6.2 Bahan Penelitian.....	73
4.7 Prosedur Penelitian.....	74
4.8 Alur Penelitian.....	80
4.9 Analisis Data.....	81
BAB V HASIL PENELITIAN.....	83
5.1 Hasil Fitokimia Daun Kelor (<i>Moringa Oleifera</i>).....	83
5.2 Karakteristik Subyek Penelitian	84
5.3 Uji Normalitas Data.....	85
5.4 Uji Homogenitas Data	85
5.5 Perbandingan <i>Motilitas Progresif Spermatozoa</i> antar Kelompok Perlakuan	86
5.6 Perbandingan Kadar <i>8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG)</i> <i>Spermatozoa</i> antar Kelompok Perlakuan.....	87
BAB VI PEMBAHASAN.....	88

6.1 Fitokimia Ekstrak Etanol Daun Kelor (<i>Moringa Oleifera</i>)..	88
6.2 Pemberian Ekstrak Etanol Daun Kelor (<i>Moringa Oleifera</i>) Meningkatkan <i>Motilitas Progresif Spermatozoa</i> pada Tikus (<i>Ratus Norvegicus</i>) Galur Wistar Usia Tua.....	89
6.3 Pemberian Ekstrak Etanol Daun Kelor (<i>Moringa Oleifera</i>) Menurunkan Kadar <i>8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG)</i> <i>Spermatozoa</i> pada Tikus (<i>Ratus Norvegicus</i>) Galur Wistar Usia Tua.....	91
6.4 Kebaharuan Penelitian (<i>Novelty</i>)	94
BAB VII SIMPULAN DAN SARAN	95
7.1 Simpulan.....	95
7.2 Saran.....	96
DAFTAR PUSTAKA	97
Lampiran	

DAFTAR TABEL

	Halaman
2.1 Hubungan Usia Manusia dan Tikus.....	60
5.1 Hasil Uji Fitokimia Ekstrak Etanol Daun Kelor (<i>Moringa Oleifera</i>) daerah Denpasar Selatan, Bali	84
5.2 Uji Normalitas Data <i>Motilitas Progresif Spermatozoa</i> dan Kadar 8- <i>hydroxydeoxyguanosine</i> (8-OHdG) <i>Spermatozoa</i> pada Masing-masing Kelompok.....	85
5.3 Uji Homogenitas Data <i>Motilitas Progresif Spermatozoa</i> dan Kadar 8- <i>hydroxydeoxyguanosine</i> (8-OHdG) <i>Spermatozoa</i> pada Masing-masing Kelompok.....	86
5.4 Uji <i>Independent Sample T Test Motilitas Progresif Spermatozoa</i>	86
5.5 Uji <i>Mann-Whitney</i> Kadar 8- <i>hydroxydeoxyguanosine</i> (8-OHdG) <i>Spermatozoa</i>	87

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Peran fisiologis dan patologis ROS dalam reproduksi pria.....	12
2.2 Penampang <i>Epitel Germinal</i> pada <i>Tubulus Seminiferous</i>	14
2.3 Biologi <i>Spermatogenesis</i> pada Tikus.....	16
2.4 Bagian <i>Spermatozoa</i>	18
2.5 Proses <i>peroksidasi lipid</i>	20
2.6 Penanda Penuaan.....	24
2.7 Mekanisme pembentukan ROS.....	26
2.8 Struktur <i>Mitokondria</i>	28
2.9 Sistem <i>fosforilasi oksidatif</i>	30
2.10 Mekanisme kerusakan DNA <i>mitokondria</i>	32
2.11 Reaksi <i>Guanosin Hidroksilasi</i> menjadi 8-OHdG Akibat Adanya ROS.....	34
2.12 Tanaman Kelor.....	37
2.13 Klasifikasi Antioksidan berdasarkan Enzimatik dan Non Enzimatik.....	40
2.14 Mekanisme <i>fenol</i> dalam menangkal radikal bebas.....	43
2.15 Mekanisme efek antioksidan <i>Flavonoid</i> terhadap ROS	44
2.16 Skema penyerapan vitamin C dan daur ulang dalam sel.....	46
2.17 Struktur <i>Carboxymethylcellulose (CMC)</i>	51
2.18 Organ Reproduksi Jantan	53
2.19 <i>Epididimis</i> pada tikus dan Manusia.....	55
2.20 Sistem Produksi <i>Spermatozoa</i> pada Saluran Reproduksi Jantan.....	57

3.1 Konsep Penelitian.....	64
4.1 Rancangan Penelitian.....	66
4.2 Hubungan Antar Variabel.....	72
4.3 Alur Penelitian.....	80

DAFTAR ARTI LAMBANG, SINGKATAN DAN ISTILAH

ATP	:	<i>Adenosine Triphosphate</i>
BTB	:	<i>Blood Testis Barrier</i>
CAT	:	<i>Catalase</i>
Ca ²⁺	:	<i>Catsper</i>
CMC	:	<i>Carboxyl Methyl Cellulose</i>
CP	:	<i>Central Pair</i>
cAMP	:	<i>Cyclic Adenosine Monophosphate</i>
CO ₂	:	<i>Karbon Dioksida</i>
DA	:	<i>Dynein Arms</i>
DEFB126	:	<i>Beta-defensin 126</i>
DNA	:	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
ETC	:	<i>Electron Transport Chain</i>
FAD +	:	<i>Flavin Adenine Dinucleotide</i>
FSH	:	<i>Follicle Stimulating Hormone</i>
FS	:	<i>Fibrous Sheath</i>
GABA	:	<i>Gamma-Aminobutyric Acid</i>
GnRH	:	<i>Gonadotrophin-Releasing Hormone</i>
GPx	:	<i>Glutathione Peroxidase</i>
G6PD	:	<i>Glukosa-6-Fosfat Dehydrogenase</i>
HO*	:	<i>Radikal Hidroksi</i>
H ₂ O ₂	:	<i>Hydrogen Peroksida</i>

IM	:	<i>Immotility</i>
CoQ	:	<i>Koenzim Q</i>
LDH	:	<i>Lactate Dehydrogenase</i>
LH	:	<i>Luteinizing Hormone</i>
MAPK	:	<i>Mitogen-Activated Protein-Kinase</i>
MDA	:	<i>Malondialdehyd</i>
MnSOD	:	<i>Mangan Superoksida Dismutase</i>
MS	:	<i>Mitochondria</i>
MP	:	<i>Microtubule Pairs</i>
MTFA	:	<i>Mitochondrial Transcription Factor Alpha</i>
mtDNA	:	<i>Mitochondrial DNA</i>
nDNA	:	<i>DNA nukleus</i>
NADH	:	<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotida</i>
NADPH	:	<i>Nicotinamide Adenine Dinukleotide Phosphate</i>
NAD ⁺	:	<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide</i>
NaOH	:	<i>Natrium Hidroksida</i>
Na ₂ CO ₃	:	<i>Sodium Carbonate</i>
NP	:	<i>Non-Progressive Motility</i>
NOS	:	<i>Sintase Oksida Nitrat</i>
Nrf2	:	<i>Nuclear Factor Erythroid 2 Relates Factor 2</i>
ODF	:	<i>Outer Dense Fibers</i>
OH ⁻	:	<i>Radikal Hidroksil</i>
OXPHOS	:	<i>Fosforilasi oksidatif</i>

O ₂ ⁻	:	<i>Anion Superoksida</i>
PLOG	:	<i>Nuclear-Encoded Polymerase Gamma</i>
PM	:	<i>Plasma Membrane</i>
Prx	:	<i>Peroxiredoxin</i>
PUFA	:	<i>Polyunsaturated Fatty Acid</i>
PR	:	<i>Progressive Motility</i>
ROS	:	<i>Reactive Oxygen Species</i>
ROO*	:	<i>Radikal Peroksida</i>
RS	:	<i>Radial Spoke</i>
SPAG11e	:	<i>Sperm-associated antigen 11</i>
SOD	:	<i>Superoksida Dismutase</i>
WHO	:	<i>World Health Organization</i>
8-OHdG	:	<i>8-hidroksideoksiguanosin</i>

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Gangguan kesuburan atau infertilitas merupakan momok bagi pasangan suami istri yang menginginkan kehadiran anak. Kejadian infertilitas dapat menimbulkan ketidakharmonisan dalam rumah tangga, tidak jarang kondisi ini menimbulkan kejadian poligami, masalah medis, masalah psikologis, sosial, ekonomi hingga dapat berakibat pada perceraian.

Infertilitas merupakan suatu kondisi dimana pasangan suami istri belum memiliki anak dalam kurun waktu 1 tahun, walaupun telah melakukan hubungan seksual sebanyak 2-3 kali seminggu tanpa menggunakan alat kontrasepsi jenis apapun (Djuwantono *et al.*, 2008). Menurut *World Health Organization* (WHO) infertilitas adalah suatu kegagalan untuk mencapai kehamilan setelah satu tahun melakukan hubungan seksual secara aktif tanpa menggunakan alat kontrasepsi (IAUI, 2015; Aziz and Agarwal, 2017; Majzoub and Jr, 2017). Infertilitas dapat bersifat primer dimana pasangan gagal untuk mendapatkan kehamilan sekurang-kurangnya dalam satu tahun berhubungan seksual secara teratur tanpa kontrasepsi dan infertilitas sekunder mengacu pada konsepsi yang tertunda pada pasien yang sebelumnya mendapatkan kehamilan (Majzoub and Jr, 2017).

Setiap tahun kejadian infertilitas terus meningkat, selama ini wanita selalu menjadi pihak yang salah dalam kasus ini. Menurut Badan Pusat Statistik (BPS) tahun 2011 menyebutkan dari total 237 juta penduduk Indonesia, terdapat

kurang lebih 39,8 juta pasangan usia subur, namun 10-15% di antaranya infertil (Munir, 2019). Penyebab infertilitas pada pasangan suami istri dapat diklasifikasikan menjadi 3 dengan proporsi, faktor perempuan 45%, faktor pria 40%, dan faktor idiopatik 15% (Lestari dan Sari, 2015). Menurut Kumar and Singh, (2018), faktor pria bertanggung jawab atas 40-50% kasus infertilitas pada pasangan (Aziz and Agarwal, 2017).

Penyebab yang mendasari infertilitas pria dikelompokkan menjadi tiga faktor (1) *pre testikular* antara lain *hypogonadisme hipogonadotropik*, penyakit *hypofisis*, gangguan *coital*, (2) *testikular* antara lain *varikokel*, *cryptogonadism*, *syndrom noonan*, *distropi myotonik*, *gonadotoksin*, *syndrome klinefelter*, penyakit sistemik, infertilitas idiopatik dan lain-lain, (3) *post-testikular* yang terdiri dari *obstruksi* saluran reproduksi pria, gangguan fungsi sperma atau *motilitas* sperma dan gangguan senggama (Al-Haija, 2011; Dimitriadis *et al.*, 2017). Menurut Jamsai and Bryan, (2011) penyebab infertilitas pria dapat secara luas diklasifikasikan menjadi empat kategori yaitu produksi sperma yang rusak, obstruksi saluran reproduksi, peradangan dan gangguan seksual. Sekitar setengah dari penyebab infertilitas pada pria disebabkan karena produksi sperma yang rusak misalnya, gangguan pada proses *spermatogenesis*, konsentrasi *Spermatozoa* rendah, *morfologi* serta *motilitas* sperma yang abnormal. Beberapa faktor risiko terjadinya infertilitas pada pria adalah obesitas, merokok, alkohol, stress, dan umur (penuaan) (Al-Haija, 2011).

Umur memegang peranan penting dalam kesuburan dimana pada umur tertentu tingkat kesuburan seorang pria akan mulai menurun secara perlahan-

lahan. Kesuburan pria diawali saat memasuki usia pubertas ditandai dengan perkembangan organ reproduksi pada umur 12 tahun. Perkembangan organ reproduksi pria mencapai keadaan stabil umur 20 tahun. Tingkat kesuburan akan bertambah sesuai dengan pertambahan umur dan akan mencapai puncaknya pada umur 25 tahun. Setelah itu akan terjadi penurunan secara perlahan-lahan, dimana keadaan ini disebabkan karena perubahan bentuk dan faal organ reproduksi (Khaidir, 2006).

Proses penuaan reproduksi ditandai dengan penurunan progresif integritas fisiologis yang memicu kerusakan *Testis*, *epididimis* maupun organ reproduksi lainnya. Penyebab utama dalam proses ini adalah stres oksidatif, yang didefinisikan sebagai ketidakseimbangan antara *reactive oxygen spesies* (ROS) dengan produksi antioksidan (Jara *et al.*, 2004; Luceri *et al.*, 2018). Tingkat fisiologis ROS diperlukan untuk mengatur proses kapasitasi sperma, reaksi acrosome, hiperaktivasi dan fusi sperma-oosit (Lee *et al.*, 2017; Fatima, 2018). Tingkat suprafisiologis ROS dapat mempengaruhi spermatogenesis, menurunkan *motilitas spermatozoa*, merusak *mitokondria* dan integritas DNA. Peningkatan ROS merujuk pada proses utama penuaan sel, dan salah satu faktor etiologi infertilitas pria. Penuaan pada pria dapat menyebabkan penurunan volume semen, *morfologi* yang abnormal dan penurunan *motilitas* sperma normal (Lucio *et al.*, 2013; Morielli and O'Flaherty, 2015).

Motilitas Spermatozoa merupakan refleksi perkembangan normal dan kematangan *Spermatozoa* dalam *epididimis*. *Motilitas* menjadi salah satu karakteristik penilaian infertilitas pria. *Spermatozoa* memiliki kemampuan

motilitas setelah melewati *epididimis* selama 18-24 jam. Kemampuan bergerak maju (*motilitas progresif*) yang diperoleh dari *epididimis* melibatkan aktivasi protein kanal Ca^{2+} *Catsper* yang berada dibagian ekor *Spermatozoa*. Protein kanal ini memungkinkan *influx* Ca^{2+} mengaktifkan *cAMP*. *Spermatozoa* normal bergerak dengan kecepatan 1 sampai 4 mm/menit (Guyton and Hall, 2014). *Motilitas Spermatozoa* yang paling baik berada pada pria sebelum menginjak usia 25 tahun dan terendah setelah menginjak usia 55 tahun. *Motilitas Spermatozoa* mengalami penurunan hingga 54 persen dari pria yang berusia antara 30 hingga 35 tahun, dengan pria di atas usia 55 tahun. Dalam pengaturan pergerakan atau *motilitas*, *Spermatozoa* membutuhkan sejumlah energi ATP (*adenosine triphosphate*) yang diproduksi oleh *mitokondria*, untuk digunakan menggerakkan *apparatus flagella* (Susmiarsih, 2010).

Mitokondria merupakan organel *sitoplasmik* yang berperan dalam menentukan hidup matinya sel. Jumlah *mitokondria* di dalam sel tergantung dari jumlah kebutuhan sel akan energi. Sel dengan kebutuhan energi yang besar mengandung banyak *mitokondria*. Pada *Spermatozoa* jumlah *mitokondria* sekitar 22-23. *Mitokondria* pada *Spermatozoa* terletak pada daerah *midpiece*, yang terdiri dari 11-13 *gira*, masing-masing *gira* terdapat 2 *mitokondria* yang tersusun secara *heliks* (Susmiarsih, 2010).

Fungsi utama *mitokondria* adalah produksi ATP, regulasi ion Ca^{2+} intraseluler, produksi *reactive oxygen species* (ROS) dan *scavenger*, regulasi *apoptosis* sel, dan aktivasi *protease* golongan *kaspase* (Ardiaria, 2019). *Mitokondria* memiliki DNA (*Deoxyribonucleic Acid*) sendiri yang disebut dengan

mtDNA. Sistem kompleks reaksi oksidasi dan reduksi dalam *mitokondria* membuat mtDNA sangat rentan terhadap stres oksidatif. mtDNA 10-100 kali lebih rentan terhadap oksidatif stress karena lokasinya dekat dengan ETC (*Electron Transport Chain*) dan kurangnya mekanisme perbaikan DNA (Rajender *et al.*, 2010)

DNA adalah suatu senyawa pembawa sifat. DNA disusun oleh *nukleotida* adenin (A), *guanin* (G), timin (T) dan sitosin (C). *Nukleotida guanin* adalah *nukleotida* yang rawan terhadap oksidasi ROS, dengan teroksidasinya *guanine* pada untai mtDNA, maka mtDNA akan kehilangan *nukleotida guanin*. Radikal *hidroksil* (OH⁻) yang terbentuk dapat menyerang posisi C-8 basa *guanin* pada DNA sehingga membentuk DNA *adduct*, *8-hydroxydeoxyguanosine* (8-OHdG). Hal ini menyebabkan kerusakan pada mtDNA yang berpotensi meningkatkan kerusakan membran *mitokondria* (Sudjarwo, 2004).

Kerusakan mtDNA *Spermatozoa* akan menyebabkan gangguan kompleks enzim respirasi, menurunkan produksi ATP, menimbulkan radikal bebas yang merusak membran plasma *Spermatozoa* sehingga menyebabkan penurunan *motilitas Spermatozoa* (Susmiarsih, 2010). Penanganan kerusakan *mitokondria* salah satunya dengan penggunaan senyawa antioksidan sebagai terapi untuk mencegah stress oksidatif sel, mempertahankan aktivitas respirasi sel dan meningkatkan produksi energi *mitokondria* (Sumit *et al.*, 2013; Avula *et al.*, 2014; Webb *et al.*, 2019).

Tubuh membutuhkan antioksidan yang berfungsi untuk mencegah radikal bebas baru, melindungi hancurnya sel-sel dalam tubuh akibat serangan radikal

bebas, menangkal radikal bebas dan mencegah terjadinya reaksi berantai sehingga tidak terjadi kerusakan yang lebih besar serta memperbaiki sel-sel dan jaringan yang rusak karena serangan radikal bebas. Tubuh mensintesis antioksidan yang disebut dengan antioksidan endogen sedangkan antioksidan yang berasal dari luar tubuh atau dari makanan dan minuman disebut dengan antioksidan eksogen (Parwata, 2015).

Indonesia memiliki kekayaan alam yang cukup melimpah sebagai sumber-sumber antioksidan eksogen yang alami. Kekayaan alam ini bermanfaat besar bagi kesehatan penduduknya, bahkan bagi penduduk dunia. Kebanyakan sumber antioksidan alami berasal dari tumbuhan, salah satunya adalah tanaman kelor (Razis, Ibrahim and Kntayya, 2014)

Tanaman Kelor (*Moringa Oleivera*) banyak mengandung berbagai molekul penghambat radikal bebas (Wahid *et al.*, 2017). Kelor mengandung 46 antioksidan kuat, senyawa ini dapat melindungi tubuh terhadap efek buruk dari radikal bebas, yang terdiri dari : vitamin A, vitamin C, vitamin E, vitamin K, vitamin B (*Choline*), vitamin B1 (*thiamin*), vitamin B2 (*riboflavin*), vitamin B3 (*niacin*), vitamin B6, *alanin*, *betakaroten*, *alfa-carotene*, *arginin*, *beta-sistoterol*, *asam caffeoylquinic*, *kampesterol*, *karotenoid*, *klorofil*, *kromium*, *delta-5-avenasterol*, *Delta-7-Avenasterol*, *glutation*, *histidin*, *asam asetat indol*, *indoleasetonitril*, *kaempferal*, *leucine*, *lutein*, *metionin*, *asam miristat*, *asam palmitat*, *prolamin*, *prolin*, *kuersetin*, *rutin*, *Selenium*, *treonin*, *triptofan*, *xantin*, *xantofil*, *Zeatin*, *zeaxanthin*, *zink* (Krisnadi, 2015).

Dr. Gary Bracey dalam Kurniasih (2013), mempublikasikan bahwa daun kelor mengandung vitamin A 10 kali lebih banyak dibandingkan wortel, vitamin B1 4 kali lebih banyak dibanding daging babi, vitamin B2 50 kali lebih banyak dibanding *sardines*, vitamin B3 50 kali lebih banyak dibandingkan kacang, vitamin E 4 kali lebih banyak dibandingkan minyak jagung, *beta carotene* 4 kali lebih banyak dibandingkan wortel, zat besi 25 kali lebih banyak dibanding bayam, *zinc* 6 kali lebih banyak dibanding almond, kalium 15 kali lebih banyak dibanding pisang, kalsium 17 kali lebih banyak dibandingkan susu, protein 9 kali lebih banyak dibanding yogurt, *asam amino* 6 lebih banyak dibanding bawang putih, *poly phenol* 2 kali lebih banyak dibanding *red wine*, serat (*dietary fiber*) 5 kali lebih banyak dibanding sayuran pada umumnya, GABA (*gamma-aminobutyric acid*) 100 kali lebih banyak dibanding beras merah.

Berdasarkan hasil uji fitokimia yang dilakukan pada daun kelor (*Moringa Oleifera*) di daerah Denpasar Selatan Bali, diketahui bahwa ekstrak etanol daun kelor (*Moringa Oleifera*) memiliki kapasitas antioksidan, antara lain kandungan *Fenolat*, *Flavonoid*, *Tannin*, *Vitamin C*, *Alkaloid* dan *Saponin*

Tikus adalah model hewan yang paling umum digunakan dalam penelitian biomedis, termasuk biologi reproduksi, karena siklus reproduksinya yang pendek dengan jumlah kelahiran yang besar dan relatif murah. Tikus secara genetik sangat mirip dengan manusia (Sengupta, 2013). Pemilihan tikus (*Rattus Norvegicus*) galur *Wistar* sebagai subyek pada penelitian ini karena memiliki rata-rata *Spermatozoa* hidup (92%) yang lebih tinggi dibandingkan dengan persentase *Spermatozoa* hidup pada Sprague-Dawley (90,7%) (Simbolon *et al.*, 2013).

Berdasarkan latar belakang tersebut, peneliti tertarik meneliti tentang Pemberian Ekstrak Etanol Daun Kelor (*Moringa Oleifera*) terhadap peningkatan *Motilitas Progresif Spermatozoa* dan penurunan *8-hydroxydeoxyguanosine* (8-OHdG) pada Tikus (*Rattus Norvegicus*) Galur *Wistar* Usia Tua.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian pada latar belakang diatas, dapat dirumuskan masalah penelitian sebagai berikut

1.2.1 Apakah pemberian ekstrak etanol daun Kelor (*Moringa Oleifera*) menyebabkan peningkatan *Motilitas Progresif Spermatozoa* pada tikus (*Rattus Norvegicus*) galur *Wistar* usia tua?

1.2.2 Apakah pemberian ekstrak etanol daun Kelor (*Moringa Oleifera*) menyebabkan penurunan *8-hydroxydeoxyguanosine* (8-OHdG) pada *Spermatozoa* tikus (*Rattus Norvegicus*) galur *Wistar* usia tua?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Membuktikan bahwa Pemberian Ekstrak Etanol Daun Kelor (*Moringa Oleifera*) meningkatkan *Motilitas Progresif Spermatozoa* dan menurunkan *8-hydroxydeoxyguanosine* (8-OhdG) pada Tikus (*Rattus Norvegicus*) Galur *Wistar* Usia Tua

1.3.2 Tujuan Khusus

1.3.2.1 Pemberian ekstrak etanol daun Kelor (*Moringa Oleifera*) meningkatkan *Motilitas Progresif Spermatozoa* pada tikus (*Rattus Norvegicus*) galur *Wistar* usia tua

1.3.2.2 Pemberian ekstrak etanol daun Kelor (*Moringa Oleifera*) menurunkan 8-*hydroxydeoxyguanosine* (8-OHdG) pada *Spermatozoa* tikus (*Rattus Norvegicus*) galur *Wistar* usia tua

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Teoritis

Hasil penelitian ini memiliki manfaat memberikan informasi ilmiah tentang mekanisme ekstrak *etanol* daun Kelor (*Moringa Oleifera*) dalam meningkatkan *Motilitas Progresif Spermatozoa* dan menurunkan kadar 8-*hydroxydeoxyguanosine* (8-OHdG) pada tikus (*Rattus Norvegicus*) galur *Wistar* usia tua.

1.4.2 Manfaat praktis

Melihat potensi ekstrak *etanol* daun Kelor (*Moringa Oleifera*) sebagai sumber antioksidan alami (antioksidan alternatif) dan perannya dalam meningkatkan *Motilitas Progresif Spermatozoa* dan menurunkan 8-*hydroxydeoxyguanosine* (8-OHdG) pada tikus (*Rattus Norvegicus*) galur *Wistar* usia tua.

BAB II

KAJIAN PUSTAKA

2.1 Infertilitas Pria

2.1.1 Pengertian

Infertilitas merupakan suatu kondisi dimana pasangan suami istri belum memiliki anak dalam kurun waktu 1 tahun, walaupun telah melakukan hubungan seksual sebanyak 2-3 kali seminggu tanpa menggunakan alat kontrasepsi jenis apapun (Djuwantono *et al.*, 2008). Menurut *World Health Organization* (WHO) infertilitas adalah suatu kegagalan untuk mencapai kehamilan setelah satu tahun melakukan hubungan seksual secara aktif tanpa menggunakan alat kontrasepsi (IAUI, 2015). Infertilitas adalah gagalnya suatu kehamilan setelah melakukan hubungan seksual secara teratur selama 6-12 bulan tanpa menggunakan kontrasepsi (Stephen J. McPhee, 2011).

2.1.2 Klasifikasi Infertilitas

Menurut Djuwantono *et al.*, (2008), secara medis infertilitas dibagi menjadi 2 jenis, yaitu

1. Infertilitas primer merupakan pasangan suami istri yang belum mampu dan belum pernah memiliki anak setelah satu tahun berhubungan seksual sebanyak 2-3 kali perminggu tanpa menggunakan alat kontrasepsi dalam bentuk apapun
2. Infertil sekunder merupakan pasangan suami istri yang telah memiliki anak sebelumnya tetapi saat ini belum mampu memiliki anak lagi setelah satu

tahun berhubungan seksual sebanyak 2-3 kali perminggu tanpa menggunakan alat kontrasepsi.

2.1.3 Faktor Penyebab Infertilitas Pria

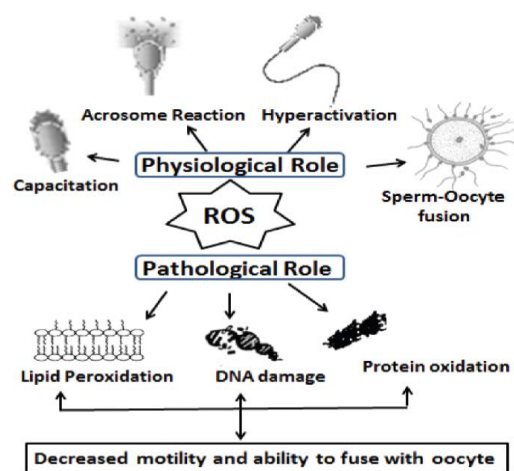
Penyebab infertilitas pria dikelompokkan menjadi 3 faktor yaitu

1. *Pra-testikular* yaitu kondisi-kondisi di luar *Testis* dan mempengaruhi proses *spermatogenesis* antara lain *hypogonadisme hipogonadotropik*, penyakit *hypofisis*, gangguan *coital*
2. *Testikular* antara lain *varikokel*, *cryptogonadism*, *sindrom noonan*, *distropi myotonik*, *gonadotoksin*, *syndrome klinefelter*, penyakit sistemik, infertilitas idiopatik dan lain-lain
3. *Post-testikular* adalah kelainan pada jalur reproduksi termasuk *epididimis*, *vas deferens*, dan *duktus ejakulatorius* yang terdiri dari *obstruksi* saluran reproduksi pria, gangguan fungsi sperma atau *motilitas* sperma dan gangguan senggama (Khaidir, 2006; Al-Haija, 2011; Dimitriadis *et al.*, 2017)

Kriteria yang digunakan oleh WHO tahun 2010, tentang fertilitas pria normal meliputi batas toleransi konsentrasi sperma terendah yang masih dikatakan normal adalah 20juta sperma/mL atau jumlah sperma total 39 juta/ejakulasi. *Morfologi* sperma menunjukkan persentasi bentuk abnormal yang ditemukan dalam semen, gangguan *morfologi* jika bentuk sperma <15% *morfologi* normal. Standar nilai viabilitas normal adalah 58%, bila sperma yang motil ditemukan <58% dari sperma yang viabel, maka kemungkinan *motilitas* sperma akan menurun karena terdapat sperma yang mati (*nekrospermia*) serta Nilai *motilitas*

normal yaitu *Progressive motility* (PR) 32% atau PR + NP = 40% (World Health Organization, 2010).

Analisis semen merupakan salah satu pemeriksaan awal yang dilakukan pada kasus infertilitas (World Health Organization, 2010). Menurut Jamsai and Bryan, (2011) Empat kategori utama kerusakan sperma mengarah ke diagnosis infertilitas pria antara lain tidak adanya sperma dalam semen (*azoospermia*), jumlah sperma yang sedikit (*oligozoospermia*), cacat *morfologi* sperma (*teratozoospermia*), dan masalah pada *motilitas* sperma (*asthenozoospermia*) (Majzoub and Jr, 2017). Menurut Henkel, Sandhu and Agarwal, (2018), Stress oksidatif terkait erat dengan berbagai patologi seperti penuaan dan infertilitas pria. Stress oksidatif didefinisikan sebagai ketidakseimbangan antara *reactive oxygen spesies* (ROS) dengan produksi antioksidan. (Jara et al., 2004; Luceri et al., 2018). Tingkat fisiologis ROS diperlukan untuk mengatur proses kapasitasi sperma, reaksi *acrosome*, hiperaktivasi dan *fusi sperma-oosit* (Lee et al., 2017; Fatima, 2018).

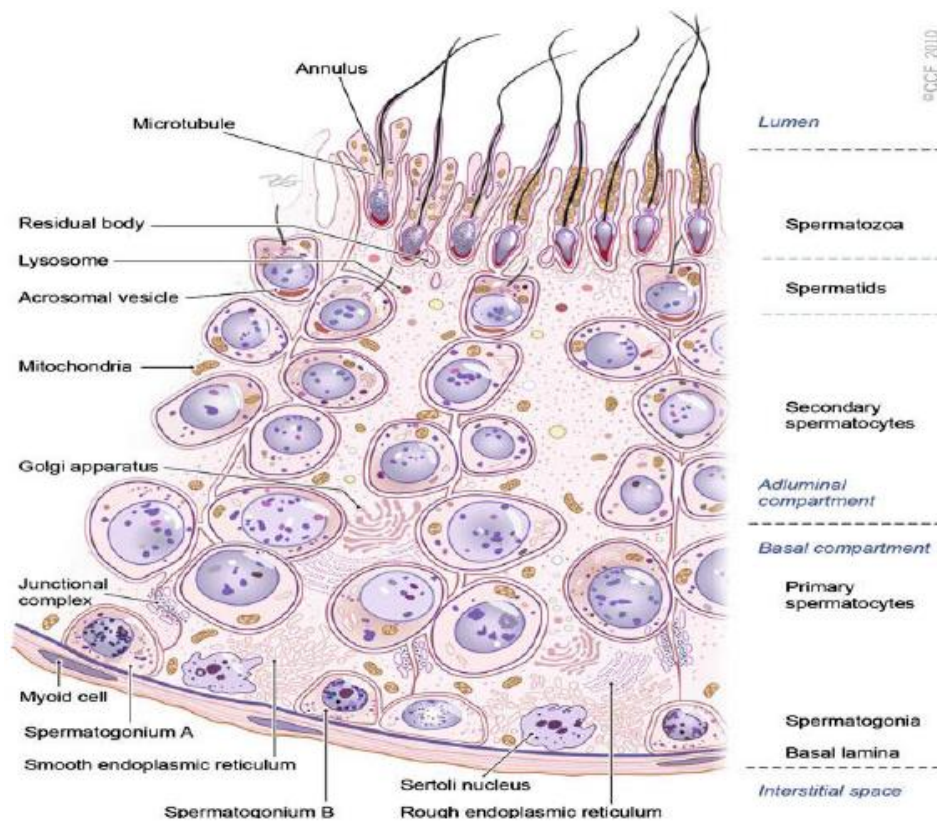


Gambar 2.1
Peran fisiologis dan patologis ROS dalam reproduksi pria (Fatima, 2018)

Tingkat suprafisiologis ROS dapat mempengaruhi spermatogenesis, menurunkan *motilitas spermatozoa*, merusak *mitokondria* dan integritas DNA. Peningkatan ROS merujuk pada proses utama penuaan sel, dan salah satu faktor etiologi infertilitas pria. Penuaan pada pria dapat menyebabkan penurunan volume semen, *morfologi* yang abnormal dan penurunan *motilitas* sperma normal (Lucio *et al.*, 2013; Morielli and O'Flaherty, 2015; Fatima, 2018)

2.2 Spermatogenesis

Spermatogenesis berasal dari kata *spermato* yang artinya benih, dan *genesis* yang berarti pembelahan. Jadi *spermatogenesis* adalah suatu proses pembentukan *Spermatozoa* (sel gamet jantan) yang terjadi pada *tubulus seminiferus* (Susilawati, 2011). *Spermatogenesis* diawali proses perkembangan sel-sel *spermatogenik* yang mengalami pembelahan beberapa kali dan akhirnya berdiferensiasi menghasilkan *Spermatozoa*. Sel-sel *spermatogenik* terdiri dari *spermatogonium*, *spermatosit primer*, *spermatosit sekunder*, dan *spermatid* yang tersebar dalam empat sampai delapan lapisan yang menempati ruangan antara *lamina basalis* dan *lumen tubulus* (Sherwood, 2015)

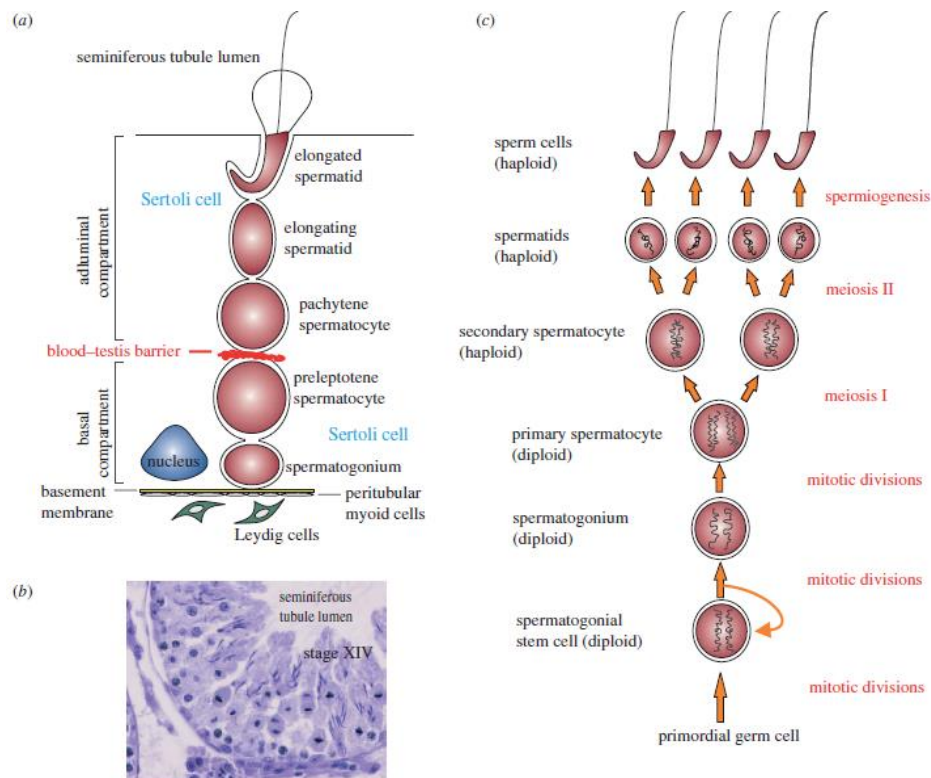


Gambar 2.2

Penampang *epitel germinal* pada *tubulus seminiferous*. Sel-sel Sertoli membagi *epitel germinal* menjadi bagian basal dan *adluminal*, melalui sel Sertoli. *Spermatozoa* yang dilepaskan ke dalam *lumen* (Sharma and Agarwal, 2011)

Tahapan dalam *spermatogenesis* adalah : (1) *proliferasi mitotik*, (2) *meiosis*, dan (3) *spermiogenesis*. Tahap pertama adalah *proliferasi mitotik* merupakan tahap *proliferasi* sel-sel induk *spermatogonia* membelah secara *mitosis* menghasilkan *spermatosit primer*. Pembelahan dari satu sel induk *spermatogonium* akan terbentuk dua sel, *spermatogonia* tipe A dan tipe B secara *mitosis*, dimana *spermatogonia* tipe A merupakan *dark cell* yang tidak aktif membelah dan bersifat stem sel, sedangkan tipe B berasal dari tipe A tetap menjadi sel induk *spermatogonium*, untuk melanjutkan proses *spermatogenesis*. Tahap kedua adalah *meiosis* terjadi pada akhir hari ke-24, *spermatosit primer*

membelah menjadi *spermatosit sekunder* yang diikuti oleh reduksi jumlah *kromosom* menjadi *spermatid*. *Meiosis* dibagi menjadi *meiosis I* dan *meiosis II* yang masing-masing mengalami fase *profase*, *metaphase*, *anaphase* dan *telofase*. Pembelahan *meiosis* tahap awal menyebabkan semua DNA bereplikasi. *Spermatosit primer* yang memiliki 46 *kromosom* terbagi menjadi dua *spermatosit sekunder*, setiap pasang *kromosom* terpisah menjadi 23 *kromosom* dan memiliki dua *kromatid*. Setelah 2-3 hari, terjadi pembelahan *meiosis* kedua, dua *kromatid* yang memiliki 23 *kromosom* terbelah pada *sentromer* membentuk dua pasang yang memiliki 23 *kromosom*, kedua pembelahan *meiosis* menghasilkan *spermatid* yang hanya membawa masing-masing 23 *kromosom*. Tahap ketiga adalah *spermiogenesis* yang merupakan proses kompleks yang meliputi perubahan *spermatid* yang bulat menjadi *Spermatozoa* matang, mampu bergerak dan membuahi *ovum*. *Spermiogenesis* dibagi menjadi empat fase yaitu fase *golgi*, fase *cap* (tertutup), fase *akrosom* dan fase *maturasi* (Sharma and Agarwal, 2011; Sadler, 2012; Guyton and Hall, 2014).



Gambar 2.3

Biologi *Spermatogenesis* pada Tikus (Cheng and Mruk, 2012)

- (a) Gambar skematis dari *epitel seminiferus* dari *tubulus seminiferus* pada *Testis* tikus dewasa, menggambarkan fitur *morfologis* sel *germinal* yang berbeda selama perkembangan dan hubungan intim mereka dengan *sel Sertoli*. *Sel leydig* yang menghasilkan *testosteron* dan *estradiol-17b* melalui *steroidogenesis* terbatas pada *interstitium*. Penghalang darah-*Testis* (BTB) yang terdiri dari persimpangan ketat, spesialisasi *ektoplasma* basal dan persimpangan *desmosome-gap* secara fisik membagi *epitel seminiferus* menjadi kompartemen *basal* dan *apikal (adluminal)*.
- (b) Penampang *tubulus* tahap XIV dari *Testis* tikus dewasa selama *meiosis* terjadi. Beberapa *spermatid* yang baru terbentuk dari *Spermatosit sekunder* di *anafase* terlihat jelas pada tahap ini.
- (c) Gambar yang menggambarkan proses yang terjadi pada sel-sel *germinal* jantan selama *Spermatogenesis*.

Spermatogenesis diatur oleh dua *gonadotropin* yang dilepaskan dari *hipofisis anterior* sebagai respons terhadap stimulasi *Gonadotrophin-releasing hormone* (GnRH): *luteinizing hormone* (LH) dan *follicle stimulating hormone* (FSH). LH menginduksi sintesis *testosteron* oleh *sel Leydig*, mempengaruhi

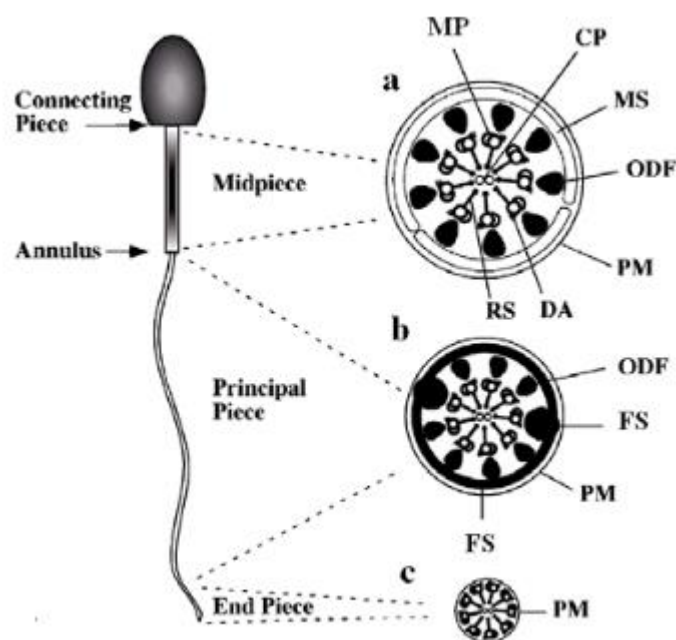
perkembangan selanjutnya dari sel *peritubular* dan *sel Sertoli*, dan kemudian *sel germinal*, sedangkan FSH secara langsung menginduksi pembelahan dan diferensiasi *sel Sertoli*, sehingga meningkatkan kapasitas *spermatogenetik testis* (Rolland, Jégou and Pineau, 2008).

Spermatogenesis memerlukan waktu 64 hari untuk pembentukan dari *spermatogonium* menjadi *Spermatozoa* matur pada manusia (Sherwood, 2015), sedangkan *spermatogonium* pada tikus membutuhkan empat siklus sampai akhirnya membentuk *Spermatozoa*, waktu yang diperlukan relative konsisten yaitu 48 -52 hari (Clouthier *et al.*, 1996; Lohmiller and Swing, 2006). Lama siklus *spermatogenic* (*spermatogonia*, *spermatosit* dan *spermatid*) pada tikus adalah 12 hari (Phillips, Gassei and Orwig, 2010; Lara *et al.*, 2016), *spermatogonium* pada tikus membutuhkan empat siklus untuk menghasilkan *spermatozoa* di *lumen tubulus*, dari *lumen tubulus seminiferus*, *spermatozoa* menuju ke *caput epididymis* membutuhkan sekitar delapan hari untuk melintasi *cauda epididymis* (Lohmiller and Swing, 2006). Suhu dapat mempengaruhi durasi *spermatogenesis* (Hess and De Franca, 2008). *Spermatogenesis* pada manusia dimulai pada usia 14 tahun, kemudian mengalami penurunan seiring dengan proses penuaan.

2.3 Spermatozoa

Hasil akhir *Spermatogenesis* adalah *Spermatozoa* matur. Strukturnya menyerupai kecebong kecil dengan panjang 0,06 mm. *Spermatozoa* yang matur terdiri atas empat bagian, yaitu (1) kepala / *head*, (2) leher / *middle piece*, (3) tubuh / *principal piece* dan (4) ekor / *end piece*. Kepala *Spermatozoa* terdiri atas

nukleus, yang mengandung informasi genetik. *Akrosom* menutupi ujung kepala *Spermatozoa*, yang dibentuk dari *apparatus golgi* serta mengandung enzim *hialuronidase* dan *protease*, yang memegang peranan penting untuk menembus *ovum*. *Sentriol* mengelompok pada leher *Spermatozoa* dan *mitokondria* tersusun berbentuk spiral pada tubuh *Spermatozoa*. Ekor memiliki struktur yang mirip seperti *silia*. Ekor mengandung dua pasang *mikrotubulus* di tengah dan sembilan *mikrotubulus* ganda yang tersusun di tepi. Mobilitas *Spermatozoa* pada ekor digerakkan oleh energi yang dihasilkan oleh *mitokondria* yang terkonsentrasi di bagian tengah sperma (Djaelani dan Sitasiwi, 2009; Guyton and Hall, 2014)



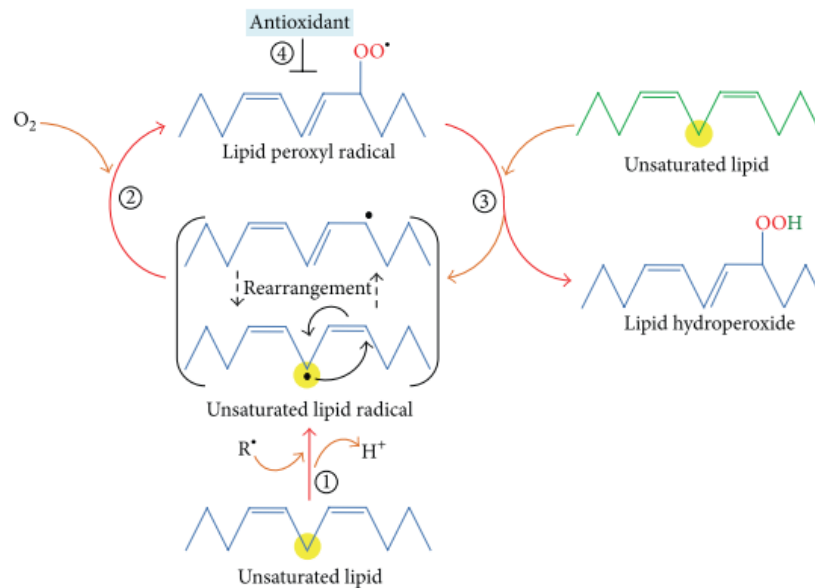
Gambar 2.4

Bagian *Spermatozoa* yang terdiri dari *head*, *middle piece*, *principal piece* and *end piece*. Keterangan CP: central pair; MS: mitochondria; ODF: outer dense fibers; PM: plasma membrane; DA: dynein arms; RS: radial spoke; MP: microtubule pairs; FS: fibrous sheath (Luconi et al., 2006)

Pematangan *Spermatozoa* terjadi di dalam *epididimis* yang melibatkan interaksi antara *Spermatozoa* dengan protein-protein yang disintesis dan

disekresikan oleh *epithelium epididimis* (Cornwall, 2009). Pematangan *Spermatozoa* dapat dilihat dari peningkatan *motilitas progresif* dan kemampuan memfertilisasi sel *ovum* (Akmal *et al.*, 2015). Untuk menjadi motil, sperma manusia membutuhkan *flagel* yang lengkap secara *morfologi*, maupun menghasilkan energi untuk menggerakkan flagel dan jalur sinyal fungsional (untuk mentransduksi sinyal eksternal menjadi sinyal internal) (Freitas, Vijayaraghavan and Fardilha, 2017).

Spermatozoa sangat rentan terhadap ROS, karena periode kondensasi *kromatin spermatozoa* sangat rentan, sel *spermatozoa* tidak memiliki mekanisme perbaikan DNA, *spermatozoa* sendiri dapat menghasilkan ROS, dengan dua cara yaitu Sistem *Oksidase Nicotinamide Adenine Dinukleotide Phosphate (NADPH)* di *membrane plasma spermatozoa* (Armstrong *et al.*, 2002) serta *Nicotinamide Adenine Dinucleotida (NADH) dependent oxido-reductase (diphorase)* di *mitokondria* (Darmawan, 2007), enzim antioksidan pada *spermatozoa* yang rendah, *spermatozoa* menghabiskan waktu yang lama dalam saluran reproduksi (Sabeti *et al.*, 2016), serta *membrane plasma spermatozoa* kaya akan asam lemak tak jenuh ganda (PUFA/ *Polyunsaturated Fatty Acid*) dalam jumlah tinggi. Proporsi PUFA yang tinggi ini menyebabkan *spermatozoa* mengalami *peroksidasi lipid* (Ayala, Muñoz and Argüelle, 2014; Ali, Martinez and Parekh, 2020; R. Dias *et al.*, 2020)



Gambar 2.5
Proses *peroksidasi lipid* (Ayala, Muñoz and Argüelle, 2014)

Dalam Inisiasi, langkah 1, prooksidan mengabstraksi *hidrogen alilik* yang membentuk radikal *lipid* yang berpusat pada karbon. Radikal karbon cenderung distabilkan oleh penataan ulang molekul untuk membentuk diena terkonjugasi. Langkah 2, Pada *fase propagasi*, radikal *lipid* bereaksi cepat dengan oksigen untuk membentuk *radikal lipid peroksi*, langkah 3 yang mengabstraksi *hidrogen* dari molekul *lipid* lain yang menghasilkan radikal *lipid* baru dan *hidroperoksida lipid*. Langkah 4, reaksi terminasi, antioksidan mendonorkan atom *hidrogen* ke spesies *radikal peroksi lipid* yang menghasilkan pembentukan produk *nonradical* (Ayala, Muñoz and Argüelle, 2014).

Radikal bebas yang banyak terbentuk dalam tubuh adalah *anion superoksida* (O_2^-). *Superoksida* ini akan diubah menjadi *hydrogen peroksida* (H_2O_2). *Hidrogen* ini dalam tahap propagasi akan diubah menjadi radikal *hidroksil* (OH^\bullet). Radikal *hidroksil* inilah yang menyebabkan terjadinya *peroksida*

lipid pada membran sel *spermatozoa* sehingga *spermatozoa* mengalami kerusakan (Parwata, 2015). O_2^- merupakan ROS dengan tingkat reaktif yang sedang dengan paruh waktu yang pendek, sedangkan OH^- waktu paruh menit ke jam, namun sangat berbahaya terhadap *spermatozoa* (R. Dias *et al.*, 2020).

ROS menghambat aktivitas beberapa enzim seperti *glukosa-6-fosfat dehydrogenase* (G6PD), yang melalui jalur *heksosa monofosfat* dalam mengontrol ketersediaan NADPH intraseluler. Penghambatan G6PD menyebabkan penurunan NADPH dan akumulasi *parallel glutathione teroksidasi* dan *glutathione tereduksi*, sehingga menyebabkan penurunan pertahanan antioksidan sperma dan *peroksida* membrane *fosfolipid* (Freitas, Vijayaraghavan and Fardilha, 2017).

Pada penelitian Mehrotra *et al.*, (2013), ditunjukkan bahwa peningkatan produksi ROS telah berkorelasi dengan penurunan *motilitas spermatozoa*, karena *peroksidasi lipid* membran *spermatozoa* mempengaruhi *fluiditas* dan mobilitas *aksonem spermatozoa*, inaktivasi atau pengurangan enzim pada *membrane*, kerusakan DNA terstruktur dan kematian sel (R. Dias *et al.*, 2020).

2.4 Motilitas Spermatozoa

Motilitas membantu transport *Spermatozoa* untuk mencapai terjadinya fertilisasi. *Spermatozoa* memiliki kemampuan *motilitas* setelah melewati *epididimis* selama 18-24 jam. Kemampuan bergerak maju (*motilitas progresif*) yang diperoleh dari *epididimis* melibatkan aktivasi protein kanal Ca^{2+} *Catsper* yang berada dibagian ekor *Spermatozoa*. Protein kanal ini memungkinkan *iflux*

Ca²⁺ mengaktifkan *cAMP*. *Spermatozoa* normal bergerak dengan kecepatan 1 sampai 4 mm/menit (Guyton and Hall, 2014).

Motilitas Spermatozoa adalah kemampuan *sperma* dalam bergerak menuju sel telur, selain itu *motilitas Spermatozoa* berfungsi dalam menembus *cumulus oophorus* dan *zona pelusida*, yang merupakan lapisan sel *ovum*. Keberhasilan fertilisasi tergantung pada efektifitas *motilitas Spermatozoa* dan kemampuan sperma dalam menembus matriks ekstraseluler yang melapisi sel *ovum*. Rendahnya *motilitas* sperma merupakan penyebab umum infertilitas pada pria (Hayati, 2011).

Motilitas dikenal sebagai prediktor yang terpenting dalam aspek fungsional *Spermatozoa*. *Motilitas* sperma merupakan refleksi perkembangan normal dan kematangan *Spermatozoa* dalam *epididimis*. Menurut *World Health Organization*, (2010), *motilitas Spermatozoa* dikelompokkan menjadi :

1. *Progressive motility* (PR) : *Spermatozoa* bergerak bebas, baik lurus maupun lingkaran besar, dalam kecepatan apapun.
2. *Non-progressive motility* (NP) : semua jenis *Spermatozoa* yang tidak memiliki kriteria *progresif*, seperti berenang dalam lingkaran kecil, ekor/*flagel* yang sulit menggerakkan kepala atau hanya ekor saja yang bergerak.
3. *Immotility* (IM) : tidak bergerak sama sekali

Nilai *motilitas* normal yaitu *Progressive motility* (PR) = 32% atau PR + NP = 40%.

Beberapa faktor yang memengaruhi *motilitas* sperma adalah berat badan, konsumsi alkohol, pekerjaan, radiasi gelombang elektromagnetik, infeksi, stress oksidatif dan umur (penuaan) (Al-Haija, 2011).

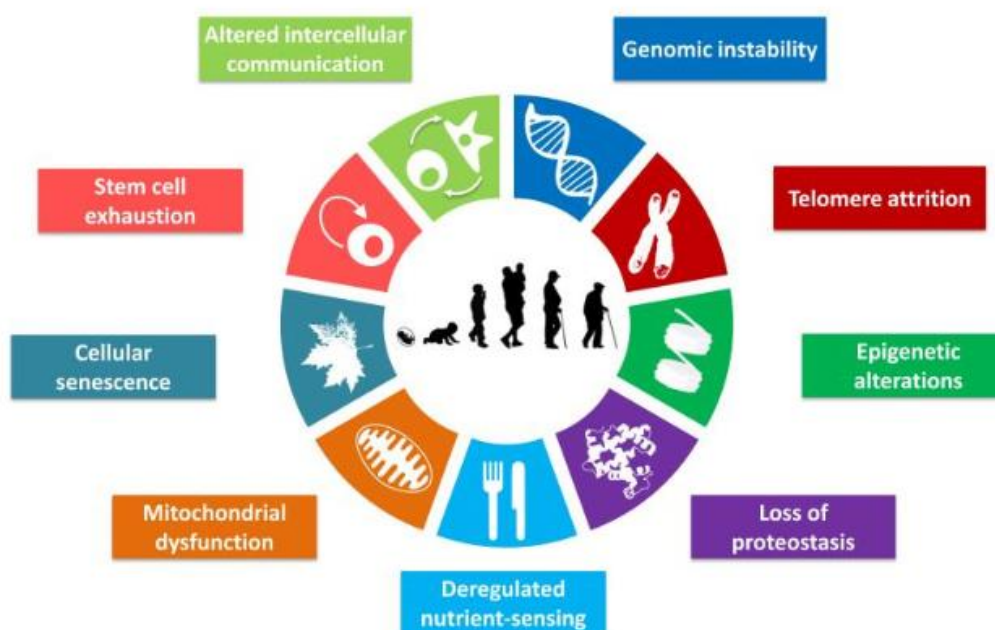
Produksi *Spermatozoa* pada pria berlangsung terus menerus, namun kuantitas maupun kualitasnya mengalami penurunan seiring bertambahnya usia (Costabile, 2013). Beberapa penelitian menyatakan penuaan pada tikus jantan dapat menginduksi penurunan ukuran *Testis*, jumlah sel *germinal*, sel *Sertoli*, maupun sel *Leydig*, serta sel *peritubular*. Berdasarkan analisis ultrastuktur, maturasi sperma pada *spermatogenesis* terhenti pada tahap *spermatogonium* dan *spermatisit* pada *Testis* serta terjadi penurunan persentase *Spermatozoa* motil pada *cauda epididimis* (Lucio *et al.*, 2013).

2.5 Penuaan

Penuaan adalah proses alami dalam organisme yang ditandai dengan penurunan fungsi biologik dari usia kronologik, menghasilkan berbagai kondisi medis yang pada akhirnya meningkatkan kerentanan individu terhadap penyakit. Penuaan tidak dapat dihindarkan dan berbeda pada setiap individu, tergantung dari susunan genetik, lingkungan dan gaya hidup (Pangkahila, 2011). Pada tingkat seluler penuaan ditandai dengan peningkatan konsentrasi radikal bebas dalam tubuh, menyebabkan kerusakan struktur *lipid* selular, protein, dan juga DNA (Jara *et al.*, 2004).

Penuaan disebabkan oleh akumulasi kerusakan sel yang diakibatkan oleh kemunduran fungsi seluler secara *progresif*. Ciri-ciri penuaan adalah

ketidakseimbangan *genom*, pemendekan *telomer*, perubahan *epigenetik*, gangguan *proteostasis*, deregulasi nutrisi, penuaan sel, kelelahan sel induk, perubahan pensinyalan antar sel dan disfungsi *mitokondria* (López-otín *et al.*, 2013; Adaes, 2019).



Gambar 2.6
Penanda Penuaan
(López-otín *et al.*, 2013)

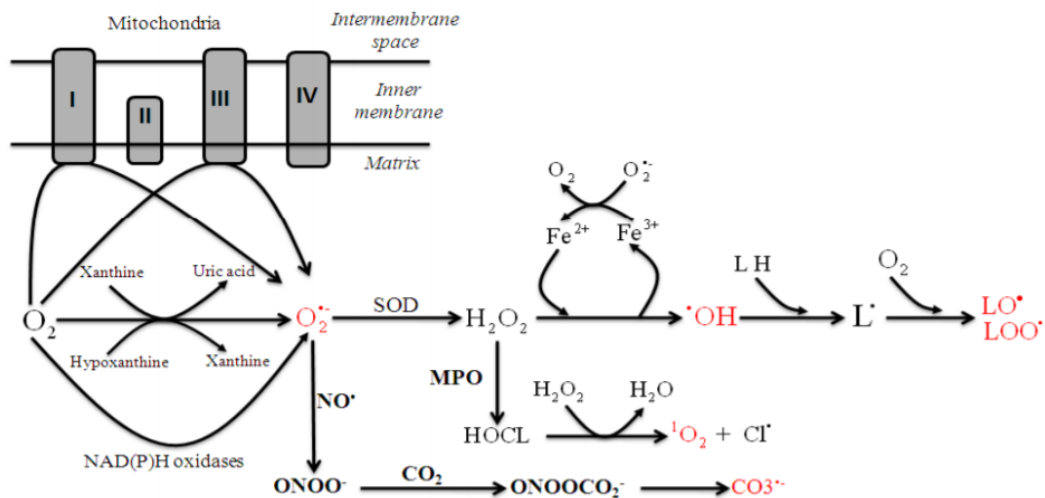
Proses penuaan reproduksi ditandai dengan penurunan bertahap di semua fungsi fisiologis organ reproduksi. Pada *Testis*, *epididimis* maupun organ reproduksi lainnya mengalami penurunan (Jara *et al.*, 2004; Luceri *et al.*, 2018). Penuaan memiliki hubungan erat dengan adanya radikal bebas dalam tubuh, yang dapat menginduksi terjadinya stres oksidatif. Stres oksidatif merupakan ketidakseimbangan antara produksi *Reactive oxygen species* (ROS) dengan sistem

antioksidan. Pembentukan ROS dapat terjadi melalui berbagai macam cara, salah satunya melalui metabolisme normal dalam tubuh.

Produksi ROS memiliki peran sentral dalam penurunan kesuburan pria terkait usia, yang mempengaruhi biomarker penuaan. Hasil penelitian mengungkapkan bahwa *spermatozoa* dari hewan yang lebih tua menghasilkan lebih banyak radikal bebas dibandingkan dengan yang lebih muda, serta aktivitas antioksidan yang lebih rendah juga (Sabeti *et al.*, 2016).

Pada saat respirasi normal, oksigen akan mengalami reduksi dengan penambahan empat elektron agar dapat menjadi air (H_2O). Perubahan ini diinduksi oleh berbagai enzim oksidatif dalam sel, dan akan dihasilkan sejumlah kecil zat toksik seperti *anion peroksida* (O_2^-), *hydrogen peroksida* (H_2O_2), dan radikal *hidroksil* (OH) (Turrens, 2003; Botham and Mayes, 2009; Bisht *et al.*, 2017; Luceri *et al.*, 2018).

Pembentukan ROS dapat terjadi pada proses metabolisme dimana terjadi kebocoran O_2 yang pada proses selanjutnya menjadi radikal O_2^- , radikal *peroksinitrit* ($ONOO^-$), OH^- , dan radikal yang lain. Radikal OH^- akan memproduksi lemak sehingga menjadi radikal baru LO^- atau LOO^- (Kunwar and Priyadarsini, 2011).



Gambar 2.7
Mekanisme pembentukan ROS (Kunwar and Priyadarsini, 2011)

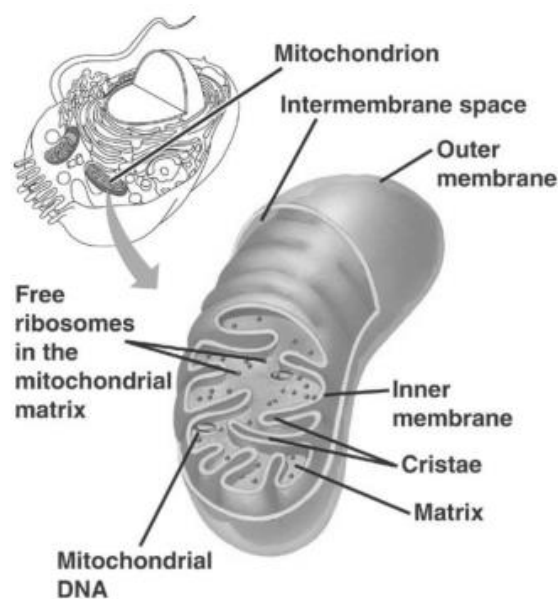
Radikal bebas adalah molekul, atom atau gugus yang memiliki 1 atau lebih elektron yang tidak berpasangan pada kulit terluarnya sehingga sangat reaktif dan radikal seperti radikal bebas turunan oksigen reaktif (*Reactive Oxygen Species* atau ROS). ROS dapat terbentuk didalam tubuh (ROS *Endogen*) dan sebagian kecil merupakan hasil paparan dari luar tubuh (ROS *eksogen*) yaitu oksigen reaktif yang berasal dari polutan lingkungan, radiasi, infeksi bakteri, jamur dan virus (Sanz and Stefanatos, 2008; Meilina, 2009; Parwata, 2015). Salah satu hipotesis konsep penuaan adalah teori stress oksidatif. Teori ini pertama kali dikemukakan oleh Denham Harman sebagai teori penuaan akibat radikal bebas. Teori ini kemudian dimodifikasi menjadi proses penuaan disebabkan oleh peran *mitokondria* yang merupakan sumber utama produksi ROS (Salmon, Richardson and Pérez, 2010).

2.6 *Mitokondria Spermatozoa*

Mitokondria merupakan organel kompleks yang bertanggungjawab atas produksi energi seluler. Jumlah *mitokondria* di dalam sel tergantung dari jumlah kebutuhan sel akan energi. Sel dengan kebutuhan energi yang besar mengandung banyak *mitokondria*. Pada *Spermatozoa* jumlah *mitokondria* sekitar 22-23. *Mitokondria* pada *Spermatozoa* terletak pada daerah *midpiece*, yang terdiri dari 11-13 *gira*, masing-masing *gira* terdapat 2 *mitokondria* yang tersusun secara *heliks*, melingkari bagian pusat *midpiece Spermatozoa*. *Mitokondria* pada *spermatozoa* memegang peranan penting terhadap fungsi *spermatozoa* (Susmiarsih, 2010).

Struktur *mitokondria* berupa kantung yang terdiri dari dua membran yaitu membran luar dan membran dalam, selain itu memiliki dua kompartemen yaitu *matriks mitokondria* (yang diselimuti langsung oleh membran dalam) dan ruang antar membran. Membran luar mengandung sejumlah protein transpor (yang disebut *porin*) dan enzim-enzim yang terlibat dalam *biosintesis lipid* dan metabolisme *mitokondria*. *Porin* ini membentuk saluran berukuran relatif besar pada lapisan *bilayer* membran luar yang memungkinkan lolosnya ion atau molekul kecil berukuran 5 kDa atau kurang. Ion atau molekul tersebut bebas memasuki ruang antar membrane namun sebagian besar tidak dapat melewati membran dalam yang bersifat *impermeable*. Membran dalam memiliki struktur melekok, melipat ke bagian *matriks mitokondria*, yang dikenal sebagai *krista*. *Krista* dalam *mitokondria* membantu dalam meningkatkan luas permukaan membran dalam, sehingga meningkatkan kemampuannya menghasilkan

adenosine triphosphate (ATP) serta membantu mempercepat komponen *matriks* mencapai membran dalam. Membran dalam dan *matriks mitokondria* terkait erat dengan aktivitas utama *mitokondria* yaitu terlibat dalam pembentukan energi, oksidasi asam lemak dan *siklus krebs*. *Matriks mitokondria* mengandung protein (sekitar 67% dari seluruh protein *mitokondria*), enzim, DNA *mitokondria* dan *ribosom* (Susmiarsih, 2010).



Gambar 2.8

Struktur *Mitokondria* (Susmiarsih, 2010)

Keterangan : *Mitokondria* diselaputi oleh dua membrane yaitu membran luar dan membran dalam. Membran dalam membentuk struktur yang melipat ke dalam disebut *krista*. *Mitokondria* memiliki dua kompartemen yaitu *matriks* dan ruang antar membran. Membran luar dapat dilalui ion atau molekul kecil, sedangkan membran dalam bersifat *impermeabel*.

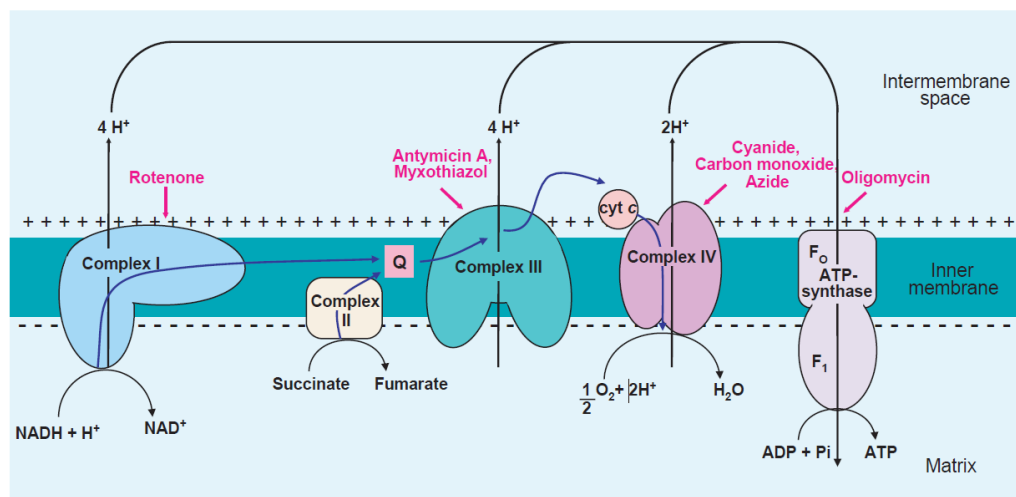
Sistem pertahanan utama *mitokondria* terhadap ROS adalah SOD 1 yang terletak di *inter-membrane space* (IMS) dan SOD 2 yang terletak pada *matriks mitokondria*. Kedua enzim ini merubah secara cepat radikal *superoksid* menjadi H_2O_2 (Yoboue, Sitia and Simmen, 2018).

Mitochondria adalah organel *semiotonom*, yang memiliki *genom* (*mitochondrial DNA*=mtDNA) dan *ribosom* sendiri. Terdapatnya *genom* di dalam *matriks*, menyebabkan *mitochondria* mampu melakukan replikasi mtDNA dan mengekspresikan gennya (*sintesis* protein) yang dikatalisis oleh enzim dan diatur oleh faktor protein yang dikode oleh DNA *nukleus* (nDNA). Replikasi mtDNA bergantung pada gen dari nDNA yang disebut *nuclear-encoded polymerase gamma* atau PLOG dan *mitochondrial transcription factor A (MTFA)* (Rajender *et al.*,2010).

Mitochondria berperan dalam oksidasi asam lemak untuk melepaskan komponen yang kaya energi dan molekul lain dalam metabolisme sel, dengan mengubah *glukosa* menjadi ATP. Selain itu, *mitochondria* juga terlibat dalam pengaturan sistem sinyal sel, *diferensiasi* sel, kematian sel dan pertumbuhan sel. Pembentukan ATP dalam *mitochondria* 13 kali lebih efisien. Jika oksigen terbatas, proses *glikolisis* untuk mensintesis ATP dapat berlangsung diluar *mitochondria* (Astawa, 2018). ATP yang dihasilkan oleh *mitochondria* digunakan untuk menggerakkan protein *dinein* penyusun *axonema flagella spermatozoa* dalam *motilitas spermatozoa* (Bebas dan Laksmi, 2013).

ATP dihasilkan dari *katabolisme* (pemecahan molekul) karbohidrat (*glukosa*), lemak (asam lemak), dan protein (*asam amino*) pada tingkat lebih rendah. Metabolisme *glukosa*, asam lemak, dan *asam amino* bertemu di *mitochondria*, di mana reaksi transfer elektron berurutan menyebabkan produksi CO₂ dan ekstraksi elektron dari makanan. Elektron ini kemudian ditransfer ke pembawa elektron, molekul *nicotinamide adenine dinucleotide*

(NAD^+ ; tergantung pada vitamin B3) dan *flavin adenine dinucleotide* (FAD^+ ; tergantung pada vitamin B2) menjadi NADH dan FADH_2 . Elektron yang berenergi tinggi bergerak dari NADH dan FADH_2 ke oksigen melalui rantai transpor elektron di lipatan atau *krista* dari membran *mitokondria* bagian dalam. Pergerakan elektron digabungkan dengan transfer *proton* (H^+) melintasi membran *mitokondria* untuk meningkatkan potensi membran yang menggerakkan *biosintesis* ATP. Proses transfer elektron dan pemompaan H^+ disebut *fosforilasi oksidatif* (sering disingkat OXPHOS) (Adaes, 2019).

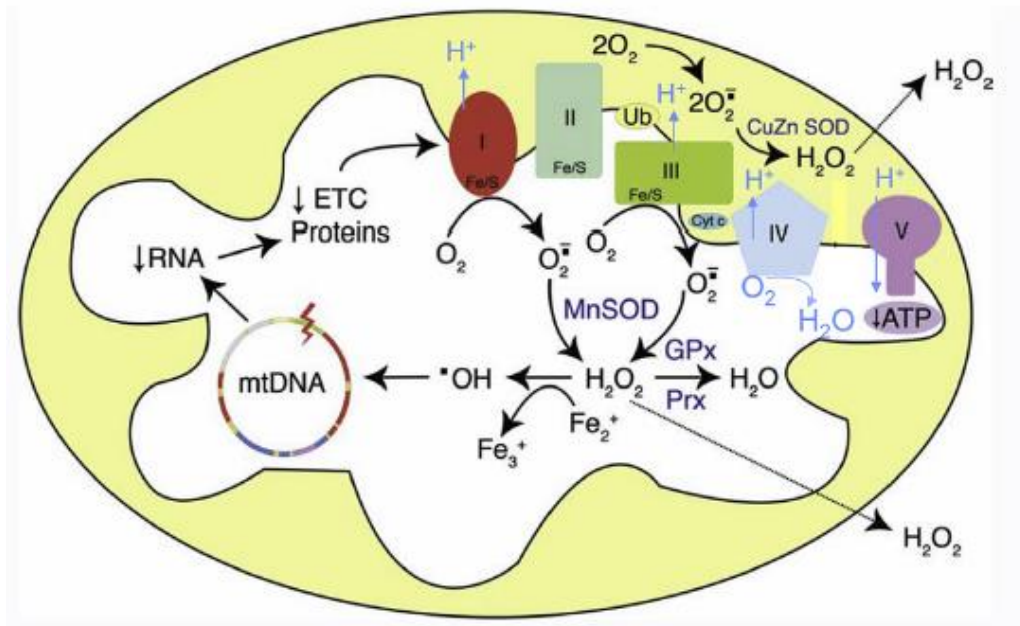


Gambar 2.9
Sistem *fosforilasi oksidatif* (Piomboni et al., 2012)

Proses *fosforilasi oksidatif* melibatkan lima kompleks enzim rantai respirasi yang bertanggung jawab dalam memproduksi ATP yaitu kompleks I (*NADH ubikuinon oksidoreduktase*), kompleks II (*suksinat ubikuinon oksidoreduktase*), kompleks III (*ubikuinon ferositokrom c oksidoreduktase*), kompleks IV (*ferositokrom c oksidase*) dan kompleks V (*ATP sintase*). Secara bersama-sama kelima kompleks tersebut membentuk rantai transpor elektron.

Elektron dari kompleks I dan II (berasal dari reaksi oksidasi NADH oleh kompleks I dan oksidasi suksinat oleh kompleks II) ditransfer ke *ubiquinon* (*koenzim Q*, CoQ), kemudian ditransfer lagi ke kompleks III tereduksi. Elektron dari kompleks III ditransfer ke *sitokrom c*, kemudian *sitokrom c* ini dioksidasi kompleks IV. Elektron yang dihasilkan kompleks IV digunakan untuk mengubah O₂ menjadi H₂O. Transfer elektron antara kompleks I, III dan IV disertai transpor *proton* dari matriks ke ruang antar membran dengan menggunakan energi bebas yang dilepaskan oleh masing-masing kompleks. Pemindahan *proton* ini mengakibatkan akumulasi *proton* pada ruang antar membran sehingga menimbulkan suatu gradien potensial *proton*. Keadaan ini dimanfaatkan oleh kompleks V untuk mensintesis ATP dari ADP dan Pi dengan menggunakan energi yang dilepaskan saat *proton* berpindah dari ruang antar membran ke matriks (Piomboni *et al.*, 2012; Adaes, 2019).

Akseptor elektron terakhir dalam rantai transpor elektron *mitokondria* adalah oksigen, yang diubah menjadi air dengan mengikat H⁺ setelah menerima elektron. Namun, oksigen tidak selalu mengikat H⁺, yang mengarah pada pembentukan *superoksida* (O₂⁻). *Superoksida* adalah Spesies Oksigen Reaktif (ROS). Keberadaan *superoksida* dapat menyebabkan stress oksidatif dalam *mitokondria*, sehingga dapat menyebabkan kerusakan mtDNA (Adaes, 2019).



Gambar 2.10

Mekanisme kerusakan DNA *mitokondria* (Van Houten, Santa-Gonzalez and Camargo, 2018)

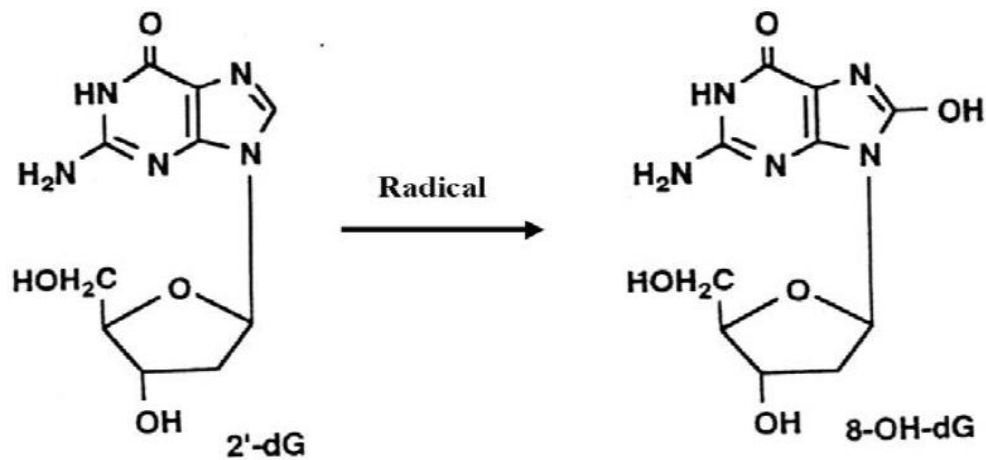
Radikal bebas *Anion superoksida* dibentuk di Kompleks I dan III diubah menjadi *hidrogen peroksida* (H_2O_2) oleh mangan *superoksida dismutase* (MnSOD) (SOD2), dan dipecah menjadi air oleh glutathione peroksidase (GPx) atau peroxiredoxin (Prx). *Mitokondria* menjadi pusat protein besi sulfur dan dengan adanya besi tereduksi (Fe^{2+}) reaksi Fenton dapat menghasilkan radikal *hidroksil* yang sangat reaktif yang dapat menyerang semua makromolekul *mitokondria* termasuk DNA yang menyebabkan hilangnya protein transpor elektron yang dikodekan oleh mtDNA dan peningkatan produksi superoksida. Di Kompleks I, III, dan IV, pergerakan elektron digabungkan dengan pergerakan *proton* ke dalam membran bagian dalam yang dihasilkan oleh Kompleks V *sintesis* ATP.

Kerusakan mtDNA *Spermatozoa* akan menyebabkan gangguan kompleks penyandi enzim respirasi, menurunkan produksi ATP, meningkatkan radikal bebas yang merusak membran plasma *Spermatozoa*. Gangguan pada *mitokondria* baik struktur maupun genomnya dapat mengganggu *motilitas spermatozoa* dan tingginya kadar 8 *Hydroxydeoxyguanosine* (8-OHdG) (Jara, Carballada and Esponda, 2004; Sudjarwo, 2004; Utami, 2009; Rajender, Rahul and Mahdi, 2010; Susmiarsih, 2010; Piomboni *et al.*, 2012).

2.7 8-Hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) Penanda Kerusakan mtDNA

Mitokondria memiliki DNA sendiri yang disebut dengan mtDNA. Sistem kompleks reaksi oksidasi dan reduksi dalam *mitokondria* membuat mtDNA sangat rentan terhadap stres oksidatif. mtDNA 10-100 kali lebih rentan terhadap oksidatif stress karena lokasinya di dekat dengan ETC (*Electron Transport Chain*) dan kurangnya mekanisme perbaikan DNA (Sudjarwo, 2004; Rajender, Rahul and Mahdi, 2010)

mtDNA disusun oleh *nukleotida adenin (A)*, *guanin (G)*, *timin (T)* dan *sitosin (C)*. *Nukleotida guanin* adalah *nukleotida* yang rawan terhadap oksidasi ROS, dengan teroksidasinya *guanine* pada untai mtDNA, maka mtDNA akan kehilangan *nukleotida guanin*. Radikal *hidroksil (OH⁻)* yang terbentuk dapat menyerang posisi C-8 basa *guanin* pada DNA sehingga membentuk DNA *adduct*, *8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG)*. Hal ini menyebabkan kerusakan pada mtDNA yang berpotensi meningkatkan kerusakan membran *mitokondria*. *8-Hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG)* merupakan suatu penanda kerusakan basa *Deoxyribonucleic Acid (DNA)* oksidatif (Pisoschi and Pop, 2015; Bebas *et al.*, 2016).



Gambar 2.11
Reaksi *Guanosin Hidroksilasi* menjadi 8-OHdG Akibat Adanya ROS
(Szymańska-Chabowska *et al.*, 2009)

Jumlah 8 *Hydroxydeoxyguanosine* (8-OHdG) pada mtDNA 10 kali lebih tinggi dari pada DNA inti, dan meningkat secara drastis pada penuaan (Tarnag *et al.*, 2000; Sudjarwo, 2004; Valavanidis, Vlahoyianni and Fiotakis, 2005; De Iuliis *et al.*, 2009; Venkatesh *et al.*, 2009; Pan, 2011; Cambi *et al.*, 2013; Hosen *et al.*, 2015; Lestari dan Sari, 2015; Parwata, 2015). Proses penuaan dikaitkan dengan peningkatan ROS dan penurunan sistem perbaikan mtDNA. MtDNA tidak memiliki *histon*, oleh sebab itu perlindungan terhadap ROS berkurang dibandingkan DNA inti. Sehingga kerusakan oksidatif stress meningkat 10-20 kali yang ditandai dengan peningkatan 8 *Hydroxydeoxyguanosine* (8-OHdG), produk oksidasi *guanosin* (Turrens, 2003).

Beberapa pemeriksaan dapat dilakukan untuk mendeteksi 8 *Hydroxydeoxyguanosine* (8-OHdG). Salah satunya adalah dengan Metode 8-*hydroxydeoxyguanosine* ELISA. 8-*hydroxydeoxyguanosine* ELISA Kit adalah uji kompetitif yang dapat digunakan untuk kuantifikasi 8 *Hydroxydeoxyguanosine* (8-

OHdG) dalam urin, kultur sel, plasma, dan matriks sampel lainnya. ELISA menggunakan pelat berlapis 8 *Hydroxydeoxyguanosine* (8-OHdG) dan antibodi terkonjugasi-HRP untuk deteksi yang memungkinkan kisaran uji 0,94 - 60 ng / mL, dengan sensitivitas 0,59 ng / mL (Author Unknown, 2013; Korkmaz, Debelec Butuner and Roggenbuck, 2018; Bioassay Tecnology Laboratory, 2020).

Jika mekanisme pertahanan antioksidan pada *Spermatozoa* terbatas, maka produksi 8 *Hydroxydeoxyguanosine* (8-OHdG) meningkat, hal ini berkaitan erat dengan terjadinya infertilitas (Cambi *et al.*, 2013; Hosen *et al.*, 2015). Senyawa antioksidan merupakan substansi yang diperlukan tubuh untuk menetralkan radikal bebas dan mencegah kerusakan yang ditimbulkan oleh radikal bebas terhadap sel normal, protein, dan lemak. Senyawa ini memiliki struktur molekul yang dapat memberikan elektronnya kepada molekul radikal bebas tanpa terganggu sama sekali fungsinya dan dapat memutus reaksi berantai dari radikal bebas (Parwata, 2015; Pisoschi and Pop, 2015).

Tubuh mensintesis antioksidan yang disebut dengan antioksidan endogen sedangkan antioksidan yang berasal dari luar tubuh atau dari makanan dan minuman disebut dengan antioksidan eksogen (Parwata, 2015). Kebanyakan sumber antioksidan alami berasal dari tumbuhan, salah satunya adalah tanaman kelor (Razis, Ibrahim and Kntayya, 2014)

2.8 Daun Kelor (*Moringa Oleifera*)

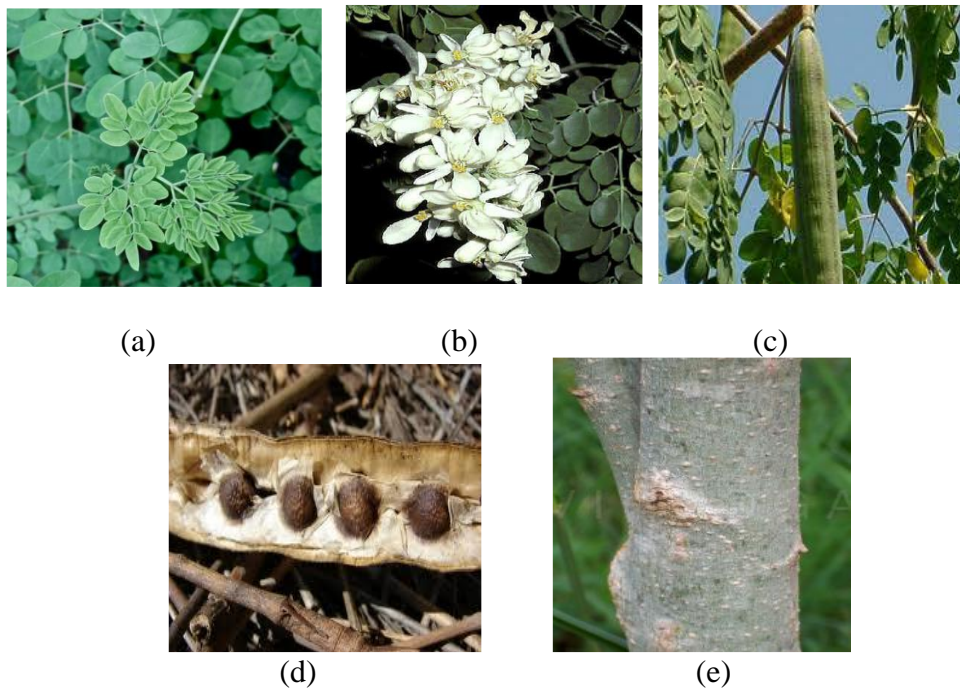
2.8.1 Daun Kelor

Kelor (*Moringa Oleifera*) merupakan tanaman yang tumbuh dengan ketinggian antara 7-11 m. Tanaman ini memiliki ciri-ciri batang kayu tegak, bulat dan bercabang, berwarna putih kotor, dan terdapat banyak sekali bintik hitam pada batangnya. Daun kelor berbentuk majemuk, bulat telur dengan tepian yang rata, mulus, berwarna hijau dengan ujung berlekuk, dan memiliki sirip pada bagian permukaannya. Bunga kelor tergolong dalam bunga majemuk yang berbentuk malai. Bunga terletak pada bagian ketiak daun, panjang 10-30 cm. ciri khusus memiliki kelopak yang berwarna putih. Buah kelor berbentuk panjang segi tiga, panjang 20-60 cm. Buah muda berwarna hijau, setelah tua berwarna coklat, bentuk biji bulat berwarna coklat kehitaman. Kelor berbuah setelah berumur 12-18 bulan. Akar tunggang, berwarna putih membesar seperti lobak (Suseno, 2013).

Pemeliharaan tanaman kelor (*Moringa Oleifera*) sangat mudah, cepat tumbuh, berbunga dan berbuah. Tanaman ini dalam tiga tahun akan menghasilkan 400-600 polong/tahun, sedangkan untuk pohon dewasa menghasilkan 1600 polong/tahun. Pemangkasan pada batang kelor dapat merangsang translokasi hormone tumbuh yang berupa *auksin* pada sekitar daerah pemangkasan sehingga merangsang pembentukan cabang baru dengan cepat (Isdiantoni dan Wati, 2017). Ekstrak daun kelor mengandung banyak senyawa yang dapat dimanfaatkan untuk obat maupun digunakan untuk merangsang pertumbuhan tanaman lain secara alami yaitu *auksin* (Warohmah, Karyanto dan Rugayah, 2018)

Klasifikasi tanaman daun kelor adalah sebagai berikut:

Kingdom : *Plantae* (tumbuhan)
Subkingdom : *Tracheobionta* (tumbuhan berpembuluh)
Divisi : *Spermatozoatophyta* (menghasilkan biji)
Kelas : *Dycotyledoneae* (berkeping dua/dikotil)
Sub Kelas : *Dilleniidae*
Ordo : *Brassicales*
Famili : *Moringaceae*
Genus : *Moringa*
Spesies : *Moringa Oleifera Lamk* (Aminah, Ramdhan dan Yanis, 2015)



Gambar 2.12
Tanaman Kelor
Kelor (a) daun, (b) bunga, (c) buah, (d) biji, (e) batang (Krisnadi, 2015)

2.8.2 Kandungan Senyawa daun kelor

Kelor diketahui mengandung lebih dari 90 jenis nutrisi berupa vitamin esensial, mineral, asam amino, anti penuaan, dan anti inflamasi. Kelor mengandung 539 senyawa yang dikenal dalam pengobatan tradisional Afrika dan India serta telah digunakan dalam pengobatan tradisional untuk mencegah lebih dari 300 penyakit (Toripah *et al.*, 2014).

Kandungan nilai gizi yang tinggi, khasiat dan manfaatnya menyebabkan kelor mendapat julukan sebagai *Miracle tree*. Namun di Indonesia sendiri pemanfaatan kelor masih belum banyak diketahui, umumnya hanya dikenal sebagai salah satu menu sayuran.

Daun kelor kaya *asam askorbat, asam amino, sterol, glukosida isoquartsetin, karoten, ramentin, kaemperol, dan kaemferitin*. Hasil analisis lain juga melaporkan daunnya juga mengandung 11.300 IU *karoten (prekursor vitamin A)*, vitamin B, 220 mg vitamin C, dan 7,4 mg vitamin E dalam /100g daun. dan kandungan antioksidan lainnya (Dhakar *et al.*, 2011; Singh *et al.*, 2012).

Dr. Gary Bracey dalam (Kurniasih, 2013) menyatakan bahwa daun kelor mengandung vitamin A 10 kali lebih banyak dibandingkan wortel, vitamin B1 4 kali lebih banyak dibanding daging babi, vitamin B2 50 kali lebih banyak dibanding sardines, vitamin B3 50 kali lebih banyak dibandingkan kacang, vitamin E 4 kali lebih banyak dibandingkan minyak jagung, *beta carotene* 4 kali lebih banyak dibandingkan wortel, zat besi 25 kali lebih banyak dibanding bayam, *zinc* 6 kali lebih banyak dibanding almond, *kalium* 15 kali lebih banyak dibanding pisang, *kalsium* 17 kali lebih banyak dibandingkan susu, protein 9 kali lebih

banyak dibanding yogurt, *asam amino* 6 lebih banyak dibanding bawang putih, *poly phenol* 2 kali lebih banyak dibanding *red wine*, serat (*dietary fiber*) 5 kali lebih banyak dibanding sayuran pada umumnya, GABA (*gamma-aminobutyric acid*) 100 kali lebih banyak dibanding beras merah (Dhakar *et al.*, 2011).

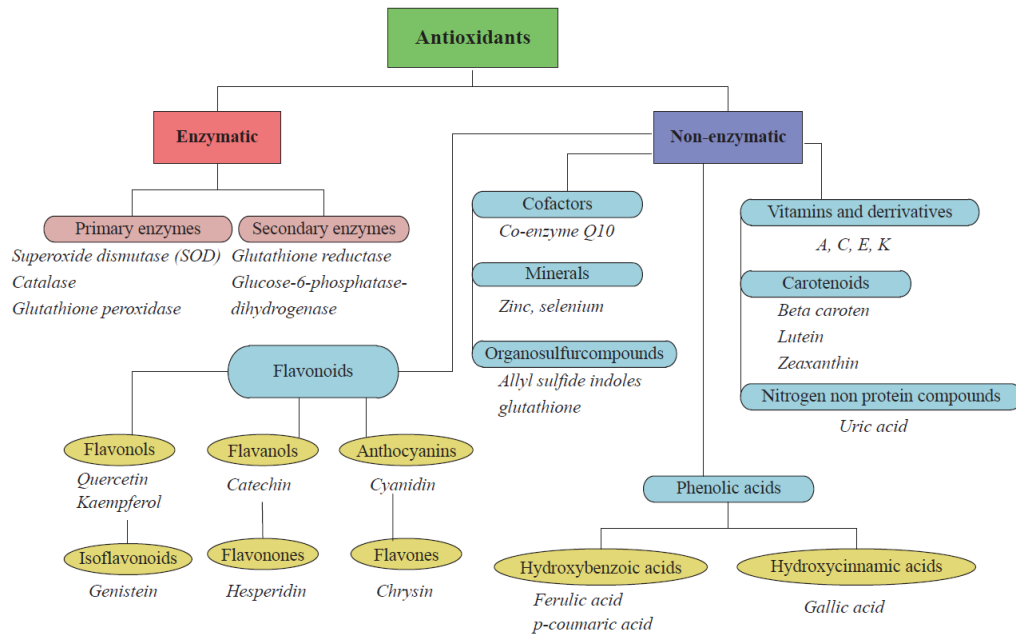
2.8.3 Antioksidan daun kelor

Antioksidan atau reduktor berfungsi untuk mencegah terjadinya oksidasi atau menetralkan senyawa yang telah teroksidasi, dengan cara menyumbangkan *hydrogen* dan atau elektron (Meilina, 2009; Henkel, Sandhu and Agarwal, 2018).

Berdasarkan fungsinya antioksidan dibagi 3 yaitu:

1. Antioksidan primer (antioksidan *endogenous*) atau antioksidan enzimatis yang berfungsi untuk mencegah radikal bebas baru. Antioksidan dalam tubuh yang terkenal adalah enzim *superoksida dismutase* (SOD) yang dapat melindungi hancurnya sel-sel dalam tubuh akibat serangan radikal bebas, *gluthation peroksidase* (GPx) dan *catalase* (CAT)
2. Antioksidan sekunder (antioksidan *eksogenous*) disebut juga dengan antioksidan non-enzimatis yang berfungsi untuk menangkal radikal bebas serta mencegah terjadinya reaksi berantai sehingga tidak terjadi kerusakan yang lebih besar, misalnya vitamin C, vitamin E, *cod liver oil*, *virgin coconut oil* dan *beta karoten*
3. Antioksidan tersier berfungsi untuk memperbaiki sel-sel dan jaringan yang rusak karena serangan radikal bebas. Kelompok antioksidan ini meliputi sistem enzim *DNA-repair* dan *metionin sulfoksida reduktase* yang berfungsi

dalam perbaikan biomolekuler yang rusak akibat reaktivitas radikal bebas dapat memperbaiki DNA (Winarsih, 2011)



Gambar 2.13
Klasifikasi Antioksidan berdasarkan Enzimatis dan Non Enzimatis
(Smetanska, 2018)

Dalam meredam dampak negatif oksidan diterapkan strategi dua lapis, yaitu: 1). Mencegah terhimpunnya senyawa-senyawa oksidan secara berlebihan; 2). Mencegah reaksi rantai berlanjut. Senyawa antioksidan memiliki berat molekul kecil, tetapi mampu menghambat/ mencegah berkembangnya reaksi oksidasi dengan cara mencegah terbentuknya radikal (Winarsih, 2011).

Tubuh memiliki beberapa mekanisme antioksidan yang dapat melindungi diri dari kerusakan sel yang disebabkan oleh radikal bebas. Enzim antioksidan *glutathione peroksidase*, *katalase* dan *superoksida dismutase* (SOD) adalah enzim yang memiliki aktivitas kerja menangkal radikal bebas. Untuk dapat bekerja sempurna dibutuhkan *mikronutrien kofaktor* seperti *Selenium*, besi, tembaga, seng

dan *mangan*. Semua *mikronutrien* ini terkandung dalam daun kelor (Krisnadi, 2015).

Kelor mengandung 46 antioksidan kuat, senyawa ini dapat melindungi tubuh terhadap efek buruk dari radikal bebas, yang terdiri dari : vitamin A, vitamin C, vitamin E, vitamin K, vitamin B (*Choline*), vitamin B1 (*thiamin*), vitamin B2 (*riboflavin*), vitamin B3 (*niacin*), vitamin B6, *alanin*, *betakaroten*, *alfa-carotene*, *arginin*, *beta-sistoterol*, *asam caffeoylquinic*, *kampesterol*, *karotenoid*, *klorofil*, *kromium*, *delta-5-avenasterol*, *Delta-7-Avenasterol*, *glutation*, *histidin*, *asam asetat indol*, *indoleasetonitril*, *kaempferal*, *leucine*, *lutein*, *metionin*, *asam miristat*, *asam palmitat*, *prolamin*, *prolin*, *kuersetin*, *rutin*, *Selenium*, *treonin*, *triptofan*, *xantin*, *xantofil*, *Zeatin*, *zeaxanthin*, *zink* (Dhakar *et al.*, 2011; Krisnadi, 2015).

Antioksidan yang terdapat di dalam daun kelor bekerja menetralkan radikal bebas sehingga mencegah kerusakan oksidatif pada sebagian besar biomolekul dan menghasilkan proteksi terhadap kerusakan oksidatif secara signifikan (Sreelatha and Padma, 2011)

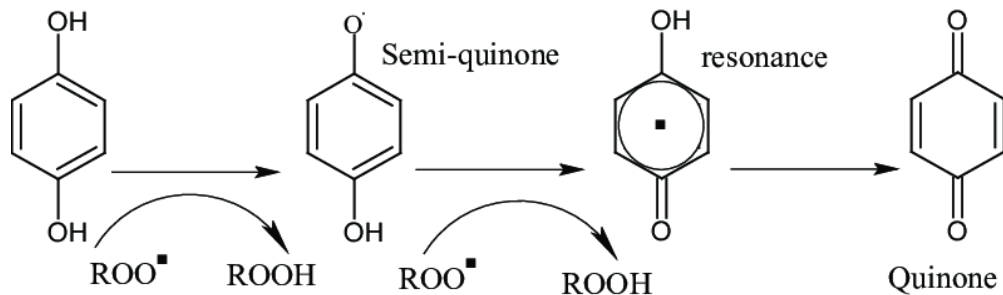
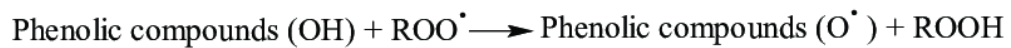
Berdasarkan beberapa hasil uji fitokimia yang dilakukan antara lain : menggunakan sampel daun kelor yang diambil di kawasan Denpasar Utara, Bali, diketahui bahwa ekstrak etanol daun kelor (*Moringa Oleifera L.*) mengandung senyawa *alkaloid*, *Flavonoid*, *Saponin*, *triterpenoid/steroid* dan *tannin* (Putra *et al.*, 2017), sample yang digunakan dari Ende menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun kelor mengandung senyawa *Flavonoid*, *Fenolat*, *triterpenoid*, *steroid*, dan *Tannin*. Kemampuan antioksidan menangkap radikal bebas DPPH dengan nilai

IC50 4.33 mg/mL (Cahyani dan Sukadana, 2017), analisis fitokimia ekstrak daun kelor yang dilakukan di Madura memperoleh hasil bahwa komponen yang ditemukan dalam ekstrak adalah *alkaloid, triterpenoid, steroid, Saponin* dan *quinon*. yang dapat dimanfaatkan sebagai antioksidan dan bahan herbal (Wasonowati *et al.*, 2019), serta Hasil analisis kandungan daun kelor di daerah Denpasar Selatan Bali memiliki kapasitas antioksidan, antara lain kandungan *Fenolat, Flavonoid, Tannin, Ascorbic acid, Alkaloid dan Saponin* (Widiastini, Karuniadi dan Tangkas, 2021)

Mekanisme kerja berdasarkan kandungan dari ekstrak etanol daun kelor antara lain :

1. *Fenol*

Senyawa fenol adalah salah satu jenis senyawa *polifenol* yang terkandung secara alami dalam tumbuhan. Senyawa ini sering dikombinasikan dengan gula sebagai *glikosida* sehingga cenderung larut dalam air (Smetanska, 2018). *Senyawa fenol* memiliki cincin *aromatic* yang mengandung *asam aromatic* yang mengandung satu atau dua *gugus hidroksi* (Chung and Shin, 2007; Zeghad *et al.*, 2019). Senyawa ini bereaksi dengan mengurai *radikal peroksida* (ROO*) (Adedapo *et al.*, 2008) dan *radikal hidroksi* (HO*), melalui transfer atom *hidrogen*, transfer elektron tunggal, transfer elektron kehilangan *proton sekuensial*, dan *chelation* logam transisi sehingga menghasilkan reaksi *fenoksi* yang lebih stabil (Lim, Lim and Tee, 2007; Zeb, 2020).

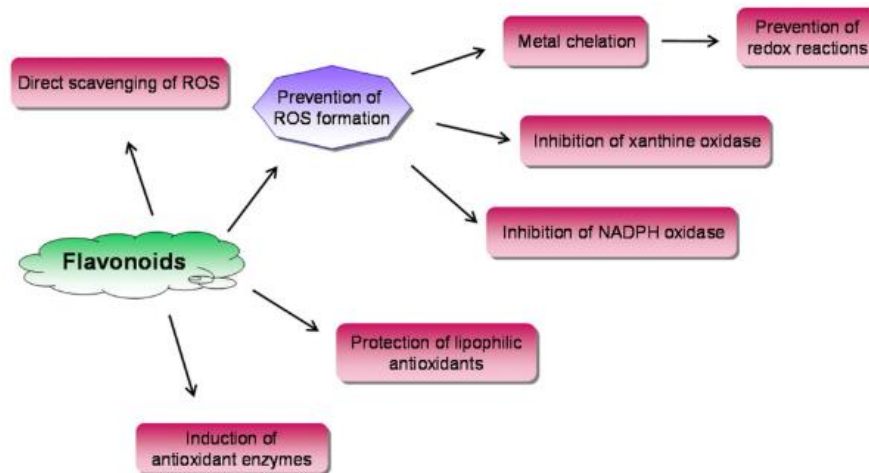


Gambar 2.14

Mekanisme *fenol* dalam menangkal radikal bebas (Smetanska, 2018)

2. *Flavonoid*

Flavonoid adalah antioksidan *eksogen* yang telah dibuktikan bermanfaat dalam mencegah kerusakan sel akibat stres oksidatif. Mekanisme kerja dari *Flavonoid* sebagai antioksidan bisa secara langsung maupun secara tidak langsung. *Flavonoid* sebagai antioksidan secara langsung adalah dengan mendonorkan ion *hidrogen* sehingga dapat menetralkan efek toksik dari radikal bebas, secara tidak langsung yaitu dengan meningkatkan ekspresi gen antioksidan *endogen* melalui beberapa mekanisme. Salah satu mekanisme peningkatan ekspresi gen antioksidan adalah melalui aktivasi *nuclear factor erythroid 2 related factor 2* (Nrf2) sehingga terjadi peningkatan gen yang berperan dalam sintesis enzim antioksidan endogen seperti misalnya gen SOD (*superoxide dismutase*) (Kusuma, 2015). Kapasitas antioksidan *Flavonoid* antara lain sebagai pemulung ROS, perlindungan antioksidan *lipofilik*, induksi antioksidan *enzyme* serta mencegah pembentukan ROS melalui *khelasi* logam dengan mencegah reaksi redoks, menghambat oksidase *xantin*, menghambat oksidase NADPH. (Akhlaghi and Bandy, 2009).



Gambar 2.15
Mekanisme efek antioksidan *Flavonoid* terhadap ROS
(Akhlaghi and Bandy, 2009)

Flavonoid dapat mempengaruhi proses *spermatogenesis* yang ditunjukkan oleh perubahan diameter *tubulus seminiferus* yang diikuti dengan tebal *epitel tubulus*. *Flavonoid* memiliki kemampuan sebagai antioksidan yang dapat menghambat OS (*Stres Oksidatif*), melawan bahaya radikal bebas dan meningkatkan proses *spermatogenesis*. Pengaruh *Flavonoid* juga dapat meningkatkan proses regenerasi dari sel, dengan cara mendestruksi radikal bebas, menyediakan substrat kompetitif untuk *lipid* tak jenuh dalam membran dan atau mempercepat mekanisme perbaikan membran sel yang rusak (Sandhar *et al.*, 2011).

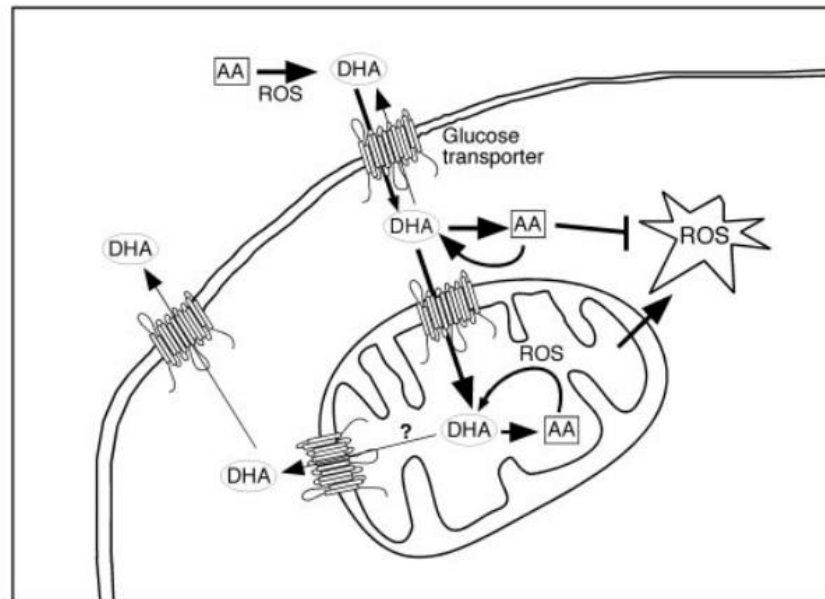
3. *Tannin*

Tannin berfungsi sebagai antioksidan (Zeghad *et al.*, 2019). Berat molekul *tannin* yang lebih tinggi dan tingkat *hidroksilasi* cincin aromatik yang tinggi, menunjukkan bahwa senyawa *tannin* memiliki potensi antioksidan tinggi. Senyawa *tannin* tersusun dari senyawa *polifenol* yang memiliki aktivitas

penangkal radikal bebas. Kemampuan *tannin* sebagai antioksidan adalah dengan mendonasikan elektron ke radikal bebas dan menghasilkan struktur radikal yang lebih stabil sehingga tidak terlalu berbahaya. Aktivitas antioksidan *tannin* juga dapat ditunjukkan melalui penghambatan enzim prooksidatif dengan menurunkan pembentukan NO melalui penghambatan *sintase oksida nitrat* (NOS) (Koleckar *et al.*, 2008; Riedl *et al.*, 2015). Namun jika konsentrasi *Tannin* berlebih dapat berefek sebagai prooksidan. *Tannin* dapat mendegradasi DNA dan berkontribusi membentuk radikal *hidroksil* (Hagerman, 2011).

4. *Ascorbic acid*

Ascorbic acid atau Vitamin C adalah salah satu vitamin yang larut dalam air yang bertindak sebagai kofaktor kunci dalam berbagai *hidroksilasi* dan proses amidase (Ahmadi *et al.*, 2016). Vitamin C berperan dalam reaksi kimia dalam tubuh sebagai pembawa elektron. Mekanisme kerja vitamin C dalam menangkal radikal bebas adalah dengan cara mendonorkan satu elektronnya, sehingga menjadi *semidehidro asam askorbat* atau radikal *askorbil*. Radikal ini lebih stabil dan dapat berinteraksi dengan radikal bebas lain sehingga menjadi radikal bebas yang tidak reaktif yang disebut dengan radikal bebas *scavenging* atau *squenching* (Padayatty and Levine, 2016). Beberapa penelitian menunjukkan bahwa vitamin C memiliki peran penting dalam mencegah *peroksida lipid* dan kerusakan DNA (Freitas, Vijayaraghavan and Fardilha, 2017).



Gambar 2.16

Skema penyerapan vitamin C dan daur ulang dalam sel.

Bentuk teroksidasi Vitamin C dalam bentuk DHA (*Asam Dehidroaskorbat*), diangkut ke *mitokondria* melalui transporter *glukosa fasilitatif 1* (Glut1) dan direduksi menjadi AA (*asam askorbat*) *mitokondria*. AA *mitokondria* memadamkan ROS, melindungi genom *mitokondria*, dan menghambat depolarisasi membran *mitokondria*. Mekanisme yang terlibat dalam penyerapan, penjejakan, dan daur ulang vitamin C di *mitokondria* tampaknya merekapitulasi metabolisme AA di kompartemen *sitosol* (Sabeti *et al.*, 2016).

5. Saponin

Senyawa *Saponin* mempunyai efek antioksidan dengan membentuk *hidroperoksida* sebagai antioksidan sekunder sehingga menghambat pembentukan *lipid peroksida* (Akhlaghi and Bandy, 2009; Chan *et al.*, 2014).

Saponin dapat meningkatkan jumlah enzim antioksidan dan menurunkan pelepasan MDA (*Malondialdehid*) dan LDH (*lactate dehydrogenase*). Aktivitas antioksidan *Saponin* dicapai dengan memulihkan *homeostasis* GSH (*Glutathione*), dapat meningkatkan kelangsungan hidup sel dengan mengaktifasi jalur pensinyalan MAPK (*Mitogen-activated Protein-*

Kinase). Oleh karena itu, *Saponin* dapat berfungsi sebagai penghambat kerusakan oksidatif seluler (Cui *et al.*, 2020).

6. *Alkaloid*

Alkaloid adalah basa *nitrogen* dengan satu atau lebih atom *nitrogen* biasanya dimasukkan ke dalam struktur *siklik*. Mekanisme *alkaloid* sebagai antioksidan adalah dengan cara mendonorkan atom H pada radikal bebas. Sehingga menunjukkan bahwa *alkaloid* sebagai antioksidan primer (Chung and Shin, 2007; Yuan *et al.*, 2012).

7. *Zeatin*

Zeatin merupakan antioksidan kuat tertinggi dengan sifat antipenuaan. *Zeatin* memperlambat proses penuaan dengan membantu menggantikan sel-sel tubuh pada tingkat yang lebih cepat dari pada usianya, sehingga memberikan penampilan yang lebih muda pada kulit. Hasil penelitian diketahui bahwa *Zeatin* bertindak melawan kerusakan yang disebabkan oleh radikal bebas selama proses penuaan sel dan melindungi sel-sel dari stres kehidupan sehari-hari (Kurniasih, 2013).

8. *Betakaroten*

Menurut penelitian yang dilakukan Al-Shaban *et al.*, (2016), membuktikan bahwa kapasitas antioksidan *beta-karoten* bermanfaat mengurangi tingkat stres oksidatif sehingga mengurangi kerusakan DNA oksidatif.

9. *Selenium*

Salah satu fungsi penting dari *Selenium* adalah sebagai antioksidan yang berperan sebagai kofaktor untuk aktivitas *glutathione peroksidase* dan

superoksida dismutase. Beberapa penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa *Selenium* memiliki efek perlindungan yang kuat terhadap kerusakan DNA bahkan pada DNA *mitokondria* (Jablonska and Vinceti, 2015; Shi *et al.*, 2015; Hao *et al.*, 2016; Karunasinghe, Zhu and Ferguson, 2016).

2.8.4 Ekstraksi daun kelor

Tanaman kelor banyak mengandung berbagai molekul penghambat radikal bebas, seperti senyawa *fenolik* (*asam fenolik, Flavonoid, kuinon, kumarin, lignin, stilbenes, tannin*), senyawa *nitrogen* (*alkaloid, smina, betalain*), vitamin, *terpenoid* (termasuk *karotenoid*) dan beberapa metabolit *endogen* lainnya yang kaya akan aktivitas antioksidan. Senyawa metabolit ini umumnya bersifat polar sehingga dalam penelitian ini digunakan pelarut polar yaitu etanol. Pelarut polar ini diharapkan dapat mencari lebih banyak senyawa yang berpotensi sebagai antioksidan.

Pembuatan ekstrak daun kelor (Cahyani dan Sukadana, 2017; Putra, Dharmayudha dan Sudimartini, 2017; Wasonowati *et al.*, 2019). Ekstrak daun kelor dibuat dengan maserasi sebanyak 50 gram daun kelor kering, dihancurkan menggunakan blender, ditambahkan pelarut etanol 96%, dimasukkan ke dalam wadah, ditutup dan dibiarkan selama dua hari terlindung dari sinar matahari. Campuran ini disaring sehingga didapat maserat. Ampas dimaserasi dengan etanol 96% menggunakan prosedur yang sama. Maserasi dilakukan sampai diperoleh maserat yang jernih. Maserat diuapkan dengan menggunakan alat penguap vakum putar (*vacuum rotary evaporator*) pada suhu 40 °C. Ekstrak daun kelor selanjutnya dilakukan

skrining fitokimia untuk mendeteksi senyawa tumbuhan berdasarkan golongannya.

1. Uji Aktivitas *Fenol*

Sample sebanyak 10 mg dilarutkan dalam volume tertentu dengan *methanol* 85% kemudian di *vortex*, saring, filtrat, *standard an filtrate* dipipet 0.4 ml + *reagen folin* 0.4 ml (*vortex*), diamkan 6 menit, ditambahkan Na_2CO_3 5% sebanyak 4.2 ml sehingga total larutan menjadi 5 ml, *vortex*, diamkan 30 menit, baca hasil *absorbansi* pada 760 nm.

2. Uji Aktivitas *Flavonoid*

Sampel sebanyak 10 mg dilarutkan dalam volume tertentu dengan *methanol* 100%, diambil 20 ul, ditambahkan 2.5 ml *aquadest*, ditambah 0.15 uL NaNO_2 5%, *vortex* dan diamkan selama 5 menit, ditambah AlCl_3 5% sebanyak 0.3 uL, diamkan selama 5 menit, ditambahkan 1 ml *natrium hidroksida* (NaOH) 1N, ditambahkan *aquades* hingga 5 ml, *vortex* hingga homogen, inkubasi selama 30 menit, baca *absorbansi* pada 510 nm.

3. Uji Aktivitas *Tannin*

Sebanyak 0.1 ml sampel dilarutkan dengan 0.5 ml *reagen Folin-Denis*, kemudian ditambahkan 1 ml larutan *Sodium carbonate* (Na_2CO_3) 0.5% dan ditambahkan *aquades* (sampai volume keseluruhan 10 ml), larutan di *vortex* kemudian didiamkan selama 30 menit, *absorbansi* diukur menggunakan *spektrofotometer* pada panjang gelombang 755 nm.

4. Uji Aktivitas Vitamin C

1-2 gr sampel ditambahkan *aquades* 5-10 ml, *vortex* kemudian disaring, *filtrate*, pipet *filtrate* sebanyak 0.3 ml (300 uL) ditambahkan reagen sebanyak 3 ml, *vortex* hingga homogen, diinkubasi dalam *waterbath* suhu 95 °C selama 90 menit, dinginkan, kemudian baca *absorbansi* pada 695 nm.

5. Uji Aktivitas Saponin

Sampel sebanyak 2,5 mL ditambahkan beberapa tetes *aquades* kemudian dikocok dengan kencang (hasil uji positif ditandai dengan timbulnya buih/busa yang bertahan lebih dari 30 detik).

6. Uji Aktivitas Alkaloid

Sampel sebanyak 3 mL ditambahkan dengan 3 mL HCl 1%, kemudian dipanaskan sambil diaduk sekitar 10 menit. Setelah itu dipipet sebanyak 1 mL ke dalam 2 tabung berbeda. Tabung I ditambahkan beberapa tetes *reagen Dragendorff* (hasil uji positif ditandai dengan timbulnya endapan berwarna jingga). Tabung II ditambahkan beberapa tetes *reagen Mayer* (hasil uji positif ditandai dengan timbulnya endapan berwarna krim kekuningan).

7. Uji Kapasitas Antioksidan

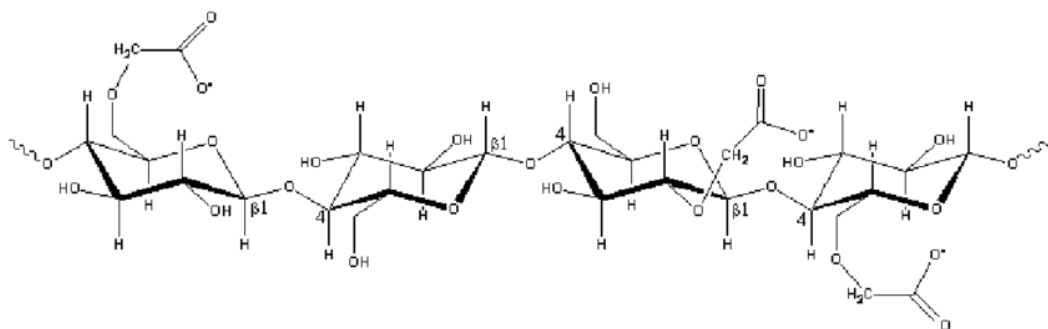
25 mg sampel kering (bubuk) diencerkan menggunakan 10 ml Metanol 100% di *vortex*, *sentrifuge* 3000 rpm selama 15 menit, di saring, *filtrate* di pipet 0.5 ml, ditambahkan 3.5 ml DPPH, *divortex*, diamkan selama 30 menit, baca *absorbansi* pada 517 nm.

Ekstrak etanol yang dihasilkan kemudian dilarutkan menggunakan *Carboxymethylcellulose* (CMC).

2.9 Carboxymethylcellulose (CMC)

CMC adalah turunan dari selulosa yang berfungsi sebagai pengental, stabilator, pembentuk gel, sebagai pengemulsi dan dalam beberapa hal dapat merekatkan penyebaran antibiotik. Selain itu CMC dapat berfungsi mengikat vitamin C yang larut dalam air sehingga kerusakan vitamin C akan semakin kecil (Puteri and Nainggolan, 2015).

Pemberian bahan penstabil CMC bersifat mudah larut dalam adonan serta mempertahankan tekstur yang halus. Penambahan CMC tidak menunjukkan perbedaan yang nyata terhadap aktifitas antioksidan. Hal ini disebabkan *carboxyl methyl cellulose* (CMC) adalah suatu zat padat jenis *ester selulosa*, turunan dari *selulosa* yang sering dipakai dalam industri makanan untuk mendapatkan tekstur yang baik (Basito, Yudhistira dan Meriza, 2018).



Gambar 2.17
Struktur *Carboxymethylcellulose* (CMC)
(Ergun, Guo and Huebner-Keese, 2016)

Dalam penelitian ini, CMC digunakan untuk melarutkan ekstrak etanol daun kelor, sehingga mudah diberikan melalui sonde kepada tikus.

Adapun pengenceran yang digunakan adalah : $0.5\% \text{ CMC} = 500 \text{ mg CMC}/100 \text{ ml aquadest}$.

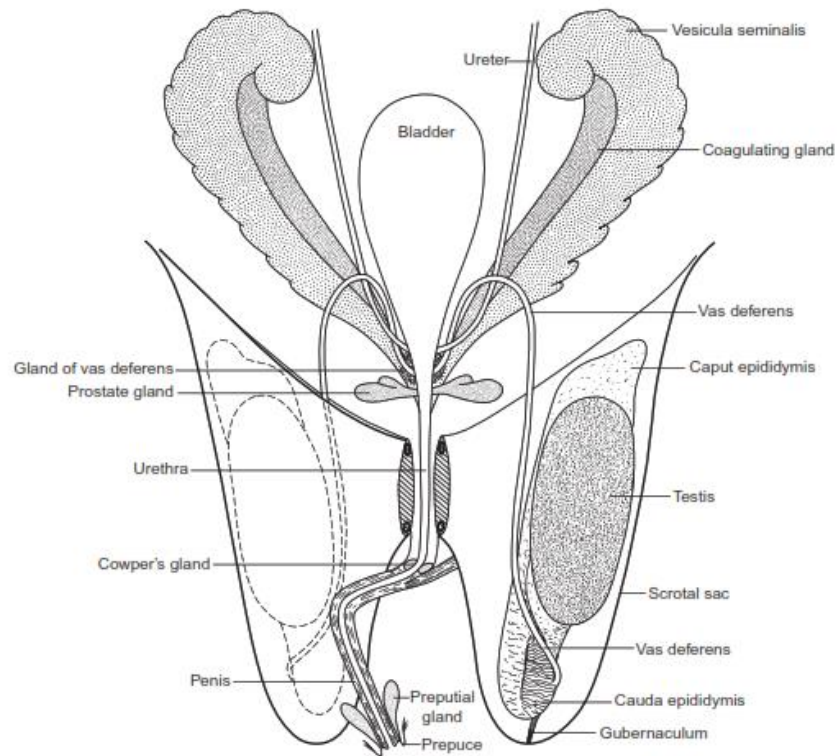
2.10 Tikus Putih (*Rattus Norvegicus*) Galur Wistar

Tikus *galur Wistar* lebih besar dibanding tikus pada umumnya yaitu dapat mencapai panjang 40 cm dari hidung sampai ujung ekornya. Tikus jantan biasanya lebih besar dibanding betina, berwarna kecoklatan kadang-kadang ada bercak hitam atau putih bahkan ada yang berwarna putih, ukuran ekor lebih panjang dari tubuhnya.

Tikus adalah hewan coba yang paling umum digunakan dalam penelitian biomedis, termasuk biologi reproduksi, karena siklus reproduksinya yang pendek dengan jumlah kelahiran yang besar dan relatif murah. Yang paling penting, tikus secara genetik sangat mirip dengan manusia. *Spermatogenesis* tikus sebanding dengan manusia. Baru-baru ini, model tikus semakin banyak digunakan untuk mengungkapkan gen yang terkait penyakit, termasuk penyebab infertilitas pria (Jamsai and Bryan, 2011). Gangguan fungsi reproduksi menjadi salah satu permasalahan mendasar baik pada manusia maupun hewan. Keberadaan hewan coba sangat dibutuhkan untuk menjawab permasalahan sesuai dengan tujuan penelitian. Penentuan umur biologis pada tikus dikorelasikan dengan manusia sebagai hewan coba dikorelasikan dengan manusia masih menjadi perdebatan. Berat badan jelas tidak dapat digunakan sebagai patokan (Sengupta, 2013).

2.10.1 Reproduksi Tikus Jantan

Sistem reproduksi tikus jantan terdiri dari *Testis*, *epididimis*, *ductus deferens*, kelenjar aksesori dan *penis*.



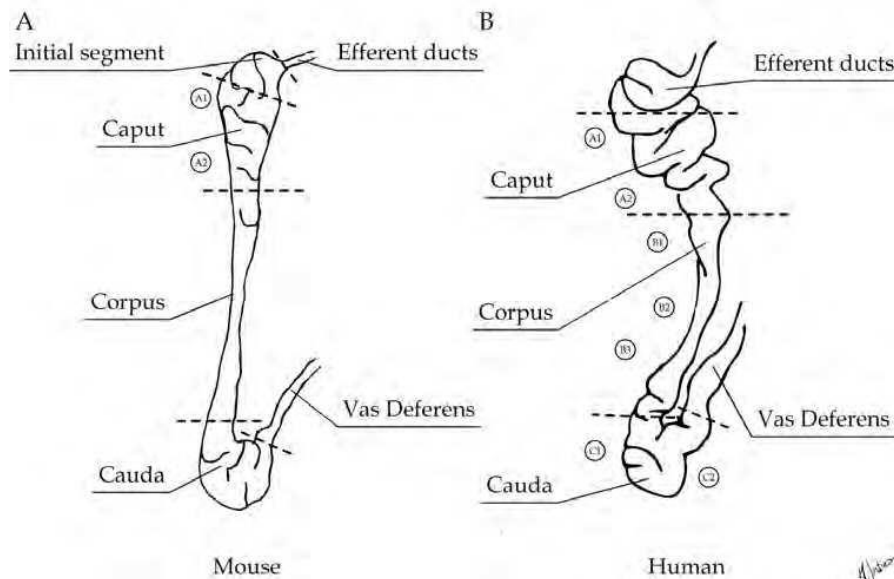
Gambar 2.18
Organ Reproduksi Jantan (Maynard and Downes, 2019)

1. *Testis*

Testis tikus berbentuk bulat telur, panjang sekitar 20 mm dan diameter 14 mm, dengan lapisan luar kolagen yang padat : *tunica albuginea*, tebal 20-40 μm . *Testis* merupakan kelenjar utama dalam sistem reproduksi jantan yang bertanggung jawab terhadap produksi *Spermatozoa* (*spermatogenesis*) dan sintesis hormon *androgen* (*steroidogenesis*). *Testis* berjumlah sepasang, terletak di *inguinal*, tersimpan dalam kantung *skrotum*. Pada mamalia, *Testis* turun dan keluar dari rongga *abdomen* (*peritoneal*) menuju posisi *ekstrakorporeal* dan akhirnya masuk ke dalam *skrotum* (*inguinoskrotal*). Proses ini dikenal sebagai *descensus testicularum* yang dikendalikan oleh *androgen*. Dengan posisi ini temperatur *Testis* menjadi lebih rendah dari pada temperatur tubuh sekitar 2–4 $^{\circ}\text{C}$) yang diperlukan untuk *spermatogenesis* (Maynard and Downes, 2019).

2. *Epididimis*

Epididimis merupakan komponen *traktus* reproduksi pria yang panjang dan berbelit, berdasarkan *histologis* dan *ultrastruktural*, *epididimis* dapat dibagi ke dalam 3 (tiga) bagian yaitu *kaput*, *korpus* dan *kauda*. Setiap bagian *epididimis* mempunyai fungsi yang spesifik. *Kaput* dan *korpus epididimis* berfungsi sebagai tempat pematangan awal dan akhir *Spermatozoa*, sedangkan bagian *kauda* berfungsi utama sebagai tempat penyimpanan *Spermatozoa* yang matang (Cornwall, 2009)



Gambar. 2.19
Epididimis pada tikus dan Manusia (Arrotéia *et al.*, 2012)

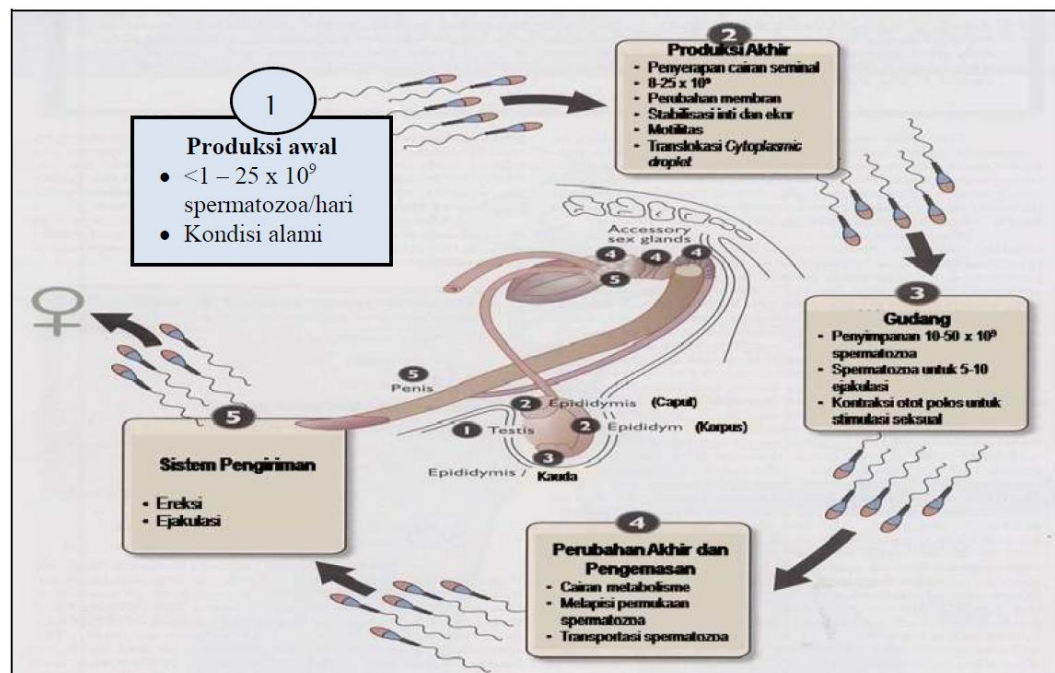
Epididimis memiliki tingkat spesialisasi yang tinggi dan berfungsi sebagai tempat transportasi, pematangan, dan penyimpanan *Spermatozoa*. *Epididymis* mamalia mempunyai 2 fungsi utama, yaitu, 1) menyediakan suatu lingkungan mikro yang unik di dalam *lumen duktus* yang berfungsi membantu *Spermatozoa* dari *testikular* yang masih belum matang menjadi sel-sel yang sepenuhnya fertil; 2) menyimpan *Spermatozoa* yang sudah fertil dan poten di dalam *kauda epididimis/vas deferens* hingga *Spermatozoa* diejakulasikan (Pamungkas, 2012). Fungsi *epididimis* pada hewan mamalia antara lain transportasi, pematangan dan penyimpanan *spermatozoa* (Bebas dan Laksmi, 2013).

Epididimis juga kaya dengan sejumlah protein atau molekul. Pematangan *Spermatozoa* di dalam *epididimis* tergantung pada sejumlah molekul yang disekresikan oleh *epithelium*. Molekul-molekul tersebut memegang peranan penting dalam meregulasi pematangan *Spermatozoa*. Molekul-molekul tersebut

adalah *CRISP1*, *SPAG11e*, *DEFB126*, *carbonyl reductase P34H*, *CD52*, dan *GPR64*. Selain itu, di dalam *epididimis* terdapat *family gen proteinase* dan *protease inhibitor* baru yang berperan penting dalam mengatur regulasi proses pematangan *Spermatozoa* (Akmal *et al.*, 2015)

Spermatozoa yang berasal dari *kauda epididimis* memiliki *motilitas*, integritas membran *plasma* dan *morfologi* yang tidak berbeda dengan *Spermatozoa* dari ejakulat baik sebelum atau setelah *kriopreservasi*. *Spermatozoa* yang berasal dari bagian *kauda epididimis* memiliki kemampuan membuahi *oosit* yang sama baiknya dengan *Spermatozoa* dari ejakulat. Hal ini karena *Spermatozoa* yang terdapat di bagian *kauda* telah melewati proses pematangan di bagian *kaput* dan *korpus epididimis*, serta sudah memiliki kemampuan bergerak (*motil*) yang sama dengan *Spermatozoa* dari ejakulat (Pamungkas, 2012)

Pada sebagian besar spesies, *Spermatozoa* tetap dapat bertahan hidup di *kauda epididimis* selama dua sampai tiga minggu. Lebih lanjut dinyatakan bahwa *Spermatozoa* dari *kauda epididimis* tetap hidup dengan kualitas yang masih baik untuk jangka waktu antara 10 – 20 jam *postmortem* (Martinez-Pastor *et al.*, 2005)



Gambar 2.20
Sistem Produksi *Spermatozoa* pada Saluran Reproduksi Jantan
(Pamungkas, 2012)

Ada tiga metode utama yang digunakan untuk memisahkan *Spermatozoa* dari *kauda epididimidis* setelah *epididimidis* dan *vas deferens* dipisahkan dari *Testis*. Metode pertama adalah *mincing* (pencincangan), dimana *kauda epididimidis* diletakkan pada medium koleksi dan setelah *mincing*, *Spermatozoa* akan bergerak menjauhi jaringan lalu dikoleksi dengan pipet. Metode ini sering digunakan dalam spesies yang berukuran kecil dimana *kauda epididimidis* sulit dimanipulasi karena ukurannya yang kecil. Metode kedua adalah *slicing* (pengirisan) atau penusukan. Bagian *kauda epididimidis* dipotong dengan pisau bedah atau ditusuk dengan jarum pada beberapa tempat, ditempatkan pada medium koleksi lalu ditekan hingga *Spermatozoa* keluar dan bergerak menjauhi jaringan *epididimidis* untuk kemudian dikoleksi dengan pipet. Kelemahan dari metode *mincing* dan *slicing* adalah *Spermatozoa* yang terkoleksi harus *disentrifugasi* dengan tujuan menghilangkan

sel-sel darah dan jaringan agar sampel tidak tercemar, sehingga menyebabkan kerusakan struktur pada *akrosom*, mengurangi *motilitas* dan menyebabkan penurunan aktivitas enzimatis dari *Spermatozoa* sehingga menurunkan tingkat fertilisasi. Metode ketiga adalah *flushing* (pembilasan) dimana *Spermatozoa* dari *epididimis* dikeluarkan seperti transportasi yang normal dengan memasukkan medium atau udara selang/jarum suntik berukuran kecil melalui *vas deferens* sehingga mendorong *Spermatozoa* keluar melalui sayatan kecil yang dibuat pada posisi *distal* dari *epididimis*. Keuntungan dari metode ini adalah mengurangi kontaminasi sehingga meningkatkan kualitas *Spermatozoa* (Pamungkas, 2012)

3. *Ductus Deferens*

Ductus deferens panjangnya 5-6 cm dari ekor *epididimis* bergabung dengan *uretra* saat melewati kelenjar *prostat*. *Ductus* melebar ketika mendekati *uretra prostat* (Maynard and Downes, 2019)

4. *Kelenjar Aksesori*

Terdapat 5 pasang kelenjar seks aksesori: kelenjar *ampullary*, *vesikula seminalis*, *kelenjar koagulasi*, *prostat*, dan *bulbouretralis* (*kelenjar Cowper*). Kelenjar-kelenjar ini menghasilkan berbagai sekret yang berperan dalam transportasi *Spermatozoa*, *buffer*, suplai *nutrien* dan *substrat metabolik* untuk kehidupan *Spermatozoa* terutama *motilitas* dan fertilitas, fungsi *lubrikasi*, dan membentuk *vaginal plug*. Sekret yang dihasilkan *accessory sex glands* bersama-sama dengan *Spermatozoa* dan *sekret epididymis* disebut *semen* (Sharp and Villano, 2012)

5. Penis

Anatomi *penis* tikus mirip dengan manusia, tetapi mengandung tulang, os *penis* atau *baculum*, dan memiliki *glans penis* yang secara anatomis lebih rumit. Os *penis* tikus panjangnya sekitar 7,5 mm dan diameternya sekitar 1 mm. *Penis* tikus yang lembek memiliki panjang 20-28 mm, 3,6 mm lebarnya dan 2,8 mm tingginya. Struktur tulang rawan tunggal yang memasok kekakuan untuk sanggama. Terdapat *penis vaskular* dengan tubuh *penis* memiliki 3 komponen ereksi: 2 *corpora cavernosa* terletak *dorsolateral* ke *uretra* dan *corpus spongiosus* yang mengelilingi *uretra* (Sharp and Villano, 2012; Maynard and Downes, 2019)

Persentase *Spermatozoa* pada tikus dipengaruhi karakteristik biologisnya. Pemilihan tikus *strain Wistar* sebagai subyek penelitian adalah karena memiliki rata-rata *Spermatozoa* hidup (92%) yang lebih tinggi dibandingkan dengan persentase *Spermatozoa* hidup pada Sprague-Dawley (90,7%) (Simbolon *et al.*, 2013).

Sebagian besar peneliti menghubungkan usia manusia dan tikus dengan cara mengetahui masa hidupnya, namun hal ini tidak dapat dilakukan pada beberapa penelitian. Sehingga fase dalam kehidupan dapat menjadi pertimbangan untuk menentukan usia yang akurat (Sengupta, 2013).

Tabel 2.1
Hubungan Usia Manusia dan Tikus

<i>Rat age versus human age : Social maturity phase</i>	
<i>Rat age (months)</i>	<i>Human age (years)</i>
6	18
12	30
18	45
24	60
30	75
36	90
42	105
45	113
48	120

(Sengupta, 2013)

Penentuan umur reproduktif pada tikus adalah dengan cara mempelajari fase-fase kehidupan dan perilakunya. 10,5 hari tikus = 1 tahun manusia. Beberapa fase tersebut antara lain adalah: rentang hidup antara 2,0–3,5 tahun, mulai disapih saat umur 3 minggu (21 hari), fase kematangan seksual atau pubertas mulai umur 6 minggu (40–60 hari), fase pradewasa saat umur 63–70 hari, fase kematangan sosial saat umur 5–6 bulan (160–180 hari), dan fase penuaan saat umur 13–24 bulan (Sengupta, 2013).

Berdasarkan pengamatan profil reproduksi dengan variabel berat dan indeks *Testis* serta *accessory sex glands*, kadar *testosteron* serum, jumlah sel-sel *spermatogenik*, serta kuantitas dan kualitas *Spermatozoa*, maka dapat disimpulkan bahwa tikus umur 4–5 minggu dikategorikan sebagai tikus muda (*young*) yang belum matang seksual (*immature*); tikus umur 6–7 minggu adalah tikus pradewasa atau dewasa awal (*subadult*) yang sistem reproduksinya telah berkembang (*puberty*) namun belum mampu kawin karena *Spermatozoa* belum motil (*infertile*); tikus umur 8–9 minggu merupakan tikus dewasa (*adult*) yang telah matang seksual dan siap kawin (*mature*) sehingga tepat dijadikan sebagai hewan

model dalam penelitian sistem reproduksi dewasa (Fitria, Mulyati dan Tiraya, 2015)

Hasil penelitian yang dilakukan oleh Luceri *et al.*, (2018), menunjukkan bahwa peningkatan ROS sistemik selama penuaan sudah terjadi pada tikus usia pertengahan 15 bulan, menghasilkan sistemik stres oksidatif, sebagaimana ditunjukkan oleh peningkatan jumlah *protein karbonil* dalam plasma hewan berumur 15 bulan.

Dalam penelitian hewan percobaan harus diperlakukan secara etis dengan menyediakan fasilitas yang diperlukan untuk kebutuhan hidup hewan coba, mengamati setiap hari untuk menilai kesehatan dan kesejahteraan, serta menggunakan metode yang tepat dalam pemeriksaan. Fasilitas yang diperlukan untuk kebutuhan hewan coba meliputi ketersediaan kandang yang memadai yang memungkinkan ruang gerak bagi hewan coba, suhu dan kelembaban relatif udara 30%-70%, ventilasi udara yang cukup, sanitasi yang baik, pakan dan air minum yang baik sesuai kebutuhan. Kesehatan dan kesejahteraan hewan coba menjadi tanggungjawab seorang dokter hewan yang dilibatkan dalam penelitian. Peneliti harus meminimalkan jumlah hewan coba yang digunakan, namun tetap memperhitungkan validitas data yang akan diperoleh. Spesies hewan coba yang dipilih harus sesuai dengan jenis penelitian yang dilakukan.

BAB III

KERANGKA BERPIKIR, KONSEP, DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Berfikir

Frekuensi infertilitas sekitar 10 – 15% dari pasangan usia subur, 45% dari kasus tersebut disebabkan oleh kelainan pada pria. Penyebab infertilitas pada pria dikelompokkan menjadi tiga yaitu tingkat *pre testikular*, *testikular*, dan *post testicular*. Faktor risiko infertilitas antara lain lingkungan, makanan, stress dan peningkatan usia (penuaan). Penuaan pada pria dapat menyebabkan penurunan volume semen, *morfologi* dan *motilitas Spermatozoa*.

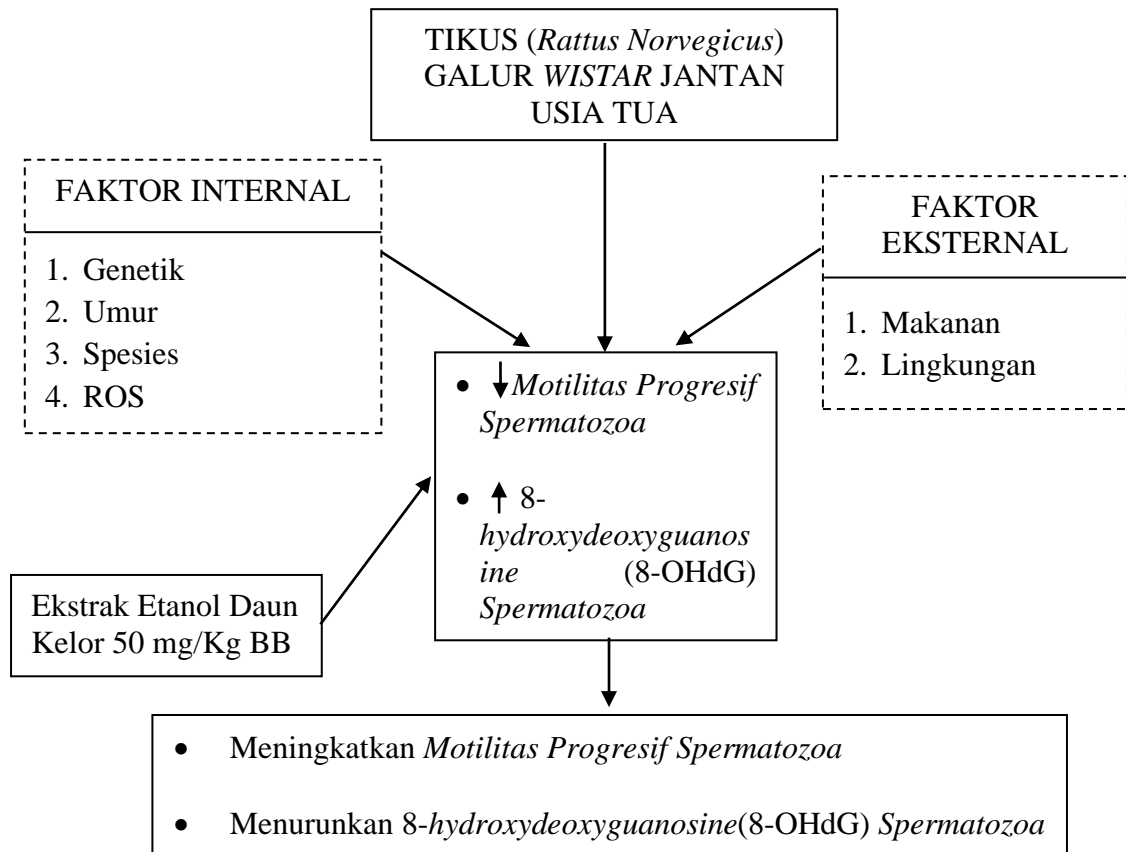
Dalam pengaturan pergerakan atau *motilitas Spermatozoa* membutuhkan sejumlah energi ATP (*adenosine triphosphate*) yang diproduksi oleh *mitokondria*, untuk digunakan menggerakkan *apparatus flagell*. *Mitokondria* memiliki DNA (*Deoxyribonucleic Acid*) sendiri yang disebut dengan mtDNA. mtDNA sangat rentan terhadap stres oksidatif karena lokasinya dekat dengan ETC (*Electron Transport Chain*) dan kurangnya mekanisme perbaikan DNA. Kerusakan mtDNA dapat ditunjukkan dari tingginya *8-hydroxydeoxyguanosine* (8-OHdG) yang merupakan marker kerusakan mtDNA. Kerusakan mtDNA *Spermatozoa* akan menyebabkan gangguan kompleks enzim respirasi, menurunkan produksi ATP, menimbulkan radikal bebas yang merusak membran plasma *Spermatozoa*.

Penanganan kerusakan mtDNA salah satunya dengan penggunaan senyawa antioksidan sebagai terapi untuk mencegah stress oksidatif sel.

Pemberian antioksidan *eksogen* diharapkan dapat mengatasi masalah ini. Salah satunya adalah pemberian ekstrak etanol daun kelor.

Daun Kelor (*Moringa Oleifera*) memiliki julukan sebagai *Miracle tree*. Tanaman ini mengandung 46 antioksidan kuat, antara lain: vitamin A, vitamin C, vitamin E, vitamin K, vitamin B1 (*thiamin*), vitamin B2 (*riboflavin*), vitamin B3 (*niacin*), vitamin B6, *Zeatin*, *zink (Zn)*, senyawa *alkaloid*, *Flavonoid*, *Fenolat*, *triterpenoid/steroid* dan *tannin*. Kandungan ini berperan penting dalam menetralsir radikal bebas, sehingga meningkatkan *Motilitas Progresif Spermatozoa* dan menurunkan *8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG)* lebih rendah pada tikus (*Rattus Norvegicus*) jantan usia tua.

3.2 Konsep Penelitian



Gambar 3.1
Konsep Penelitian

Keterangan:

□ : Diteliti

□ : Tidak diteliti

3.3 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan kerangka berfikir dan konsep penelitian maka disusun hipotesis sebagai berikut :

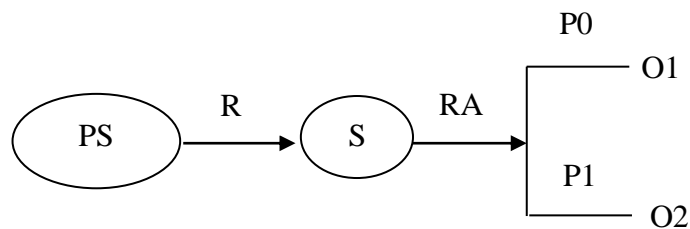
- 3.3.1 Pemberian ekstrak Etanol daun Kelor (*Moringa Oleivera*) pada tikus Putih (*Rattus Norvegicus*) jantan usia tua menyebabkan *Motilitas Progresif Spermatozoa* lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok kontrol
- 3.3.2 Pemberian ekstrak Etanol daun Kelor (*Moringa Oleivera*) pada tikus Putih (*Rattus Norvegicus*) jantan usia tua menyebabkan *8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) Spermatozoa* lebih rendah dibandingkan dengan kelompok kontrol

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan rancangan penelitian eksperimental yaitu *randomized post-test only control group design* (Pocock, 2013). Rancangan penelitian ini secara skematis dapat digambarkan sebagai berikut:



Gambar 4.1
Rancangan penelitian

Keterangan:

PS : Populasi Sampel

R : Randomisasi

S : Sampel

RA : Random Alokasi

P0 : Kelompok kontrol yang diberikan CMC 0.5% sebanyak, 0.5ml/ hari selama 30 hari.

P1 : Kelompok perlakuan yang diberikan ekstrak etanol daun Kelor sebanyak 50 mg/kg BB per hari diencerkan dengan CMC 0.5% sebanyak, 0.5ml/ hari selama 30 hari.

- O1 : Pengamatan *Motilitas Progresif Spermatozoa* dan 8-*hydroxydeoxyguanosine* (8-OHdG) pada *Spermatozoa* setelah diberikan intervensi pada kelompok kontrol
- O2 Pengamatan *Motilitas Progresif Spermatozoa* dan 8-*hydroxydeoxyguanosine* (8-OHdG) pada *Spermatozoa* setelah diberikan intervensi pada kelompok perlakuan

4.2 Lokasi dan Waktu Penelitian

4.2.1 Lokasi penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biomedik Terpadu Fakultas Kedokteran Universitas Udayana. Pemberian perlakuan pada Tikus (*Rattus Norvegicus*) *Galur Wistar* bertempat di *Laboratory Animal Unit* Bagian Farmakologi. Bahan diambil dari *Testis* dan *epididimis* tikus kemudian dikirim ke Laboratorium Bagian Histologi dan *Spermatozoa* tikus dikirim ke Laboratorium Bagian Patologi Klinik.

4.2.2 Waktu penelitian

Penelitian ini dilaksanakan selama 6 bulan yakni pada bulan November 2020 - April 2021.

4.3 Ruang Lingkup Penelitian

Ruang lingkup bidang ilmu yang diteliti adalah Ilmu Kedokteran Reproduksi dengan kajian kesehatan reproduksi pada usia tua

4.4 Penentuan Sumber Data

4.4.1 Populasi target

Populasi target dalam penelitian ini adalah seluruh tikus (*Rattus Norvegicus*) galur *Wistar* jantan usia tua yang berusia 18-19 bulan.

4.4.2 Populasi terjangkau

Tikus (*Rattus Norvegicus*) galur *Wistar* jantan usia tua yang berusia 18-19 bulan setara dengan usia 45 tahun pada manusia (Sengupta, 2013), berat badan 200-250 gram, kondisi sehat dan tidak cacat fisik. yang diperoleh dari *Laboratory Animal Unit* Bagian Farmakologi Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Udayana

4.4.3 Sampel penelitian

Sampel adalah bagian dari populasi terjangkau yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi.

4.4.3.1 Kriteria inklusi

1. Tikus jantan galur *Wistar*
2. Berat badan 200-250 gram
3. Umur tikus 18-19 bulan

4.4.3.2 Kriteria eksklusi

Tikus tampak sakit, tidak bergerak secara aktif

4.4.3.3 Kriteria *drop out*

1. Tikus yang mati saat penelitian
2. Terdapat penurunan berat badan lebih dari 10% setelah masa aklimatisasi di laboratorium

4.4.4 Besar sampel

Penelitian ini menggunakan perhitungan besar sampel untuk subyek penelitian dengan menggunakan rumus Federer (Federer, 2011; Ihwah *et al.*, 2018): $(t-1) \times (n-1) \geq 15$

Keterangan:

n = jumlah sampel

t = jumlah kelompok

Penelitian ini menggunakan 2 kelompok maka sesuai dengan rumus Federer:

$$(t-1) \times (n-1) > 15$$

$$(2-1) \times (n-1) > 15$$

$$1n \geq 15+1$$

$$1n \geq 16$$

$$n \geq 16 \approx 16 \text{ ekor}$$

Berdasarkan rumus Federer maka jumlah tikus tiap kelompok 16 ekor. Dalam Penelitian ini menggunakan 34 ekor tikus, yang dibagi menjadi 2 kelompok. Masing- masing jumlah sampel tikus yang digunakan adalah 17 ekor. Untuk menentukan sampel, peneliti menggunakan teknik Random Sampling.

4.4.5 Tehnik penentuan sampel

Tikus (*Rattus Norvegicus*) galur *Wistar* yang telah memenuhi kriteria inklusi selanjutnya dilakukan randomisasi untuk mendapatkan sampel penelitian sebanyak 34 ekor. Tikus kemudian dirandom alokasi kembali untuk menentukan sampel menjadi 2 kelompok, masing-masing kelompok 17 ekor (P0, dan P1).

4.5 Variabel Penelitian

4.5.1 Klasifikasi Variabel Penelitian

4.5.1.1 Variabel bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak etanol daun kelor 50 mg/kg BB.

4.5.1.2 Variabel tergantung

Variabel tergantung yang diamati meliputi: *Motilitas Progresif Spermatozoa* dan *8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) Spermatozoa* dari tikus (*Rattus Norvegicus*) galur Wistar.

4.5.1.3 Variabel kendali

Variabel kendali pada penelitian ini adalah : umur, berat badan, ras/ *strain*, dan lingkungan

4.5.2 Definisi Operasional Variabel

4.5.2.1 Ekstrak daun Kelor

Metabolit yang diperoleh dengan metode maserasi daun kelor mempergunakan pelarut etanol 96% yang dilakukan di Laboratorium Bioteknologi Pangan Universitas Udayana.

4.5.2.2 Dosis Ekstrak Etanol Daun Kelor

Jumlah ekstrak yang diberikan secara oral per kilogram berat badan tikus yaitu, 50 mg/kgBB per hari (Cahyani, 2019).

4.5.2.3 *Spermatozoa* tikus

Spermatozoa adalah sel gamet tikus jantan yang diambil dari bagian *kauda epididimis* setelah dilakukan *orchidectomy*

4.5.2.4 *Motilitas Progresif Spermatozoa*

Motilitas Progresif Spermatozoa adalah persentase *Spermatozoa* yang bergerak bergerak cepat dan maju lurus. Pemeriksaannya dilakukan pada enam kali lapang pandang di bawah mikroskop dengan pembesaran 400x, kemudian diklasifikasikan sehingga menghasilkan persentase *motilitas progresif spermatozoa* (*World Health Organization*, 2010).

4.5.2.5 *8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG)*

8 Hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) adalah suatu penanda kerusakan oksidatif pada DNA *mitokondria* (mtDNA).

4.5.2.6 DNA *mitokondria* (mtDNA)

mtDNA adalah suatu senyawa pembawa sifat, yang terdapat di *mitokondria*.

4.5.2.7 Umur

Umur adalah umur tikus yang ditentukan sejak kelahirannya dan ditetapkan dalam minggu dan bulan.

4.5.2.8 Berat badan

Berat badan adalah berat tikus yang diukur dengan neraca elektronik NAD, ditetapkan dalam satuan gram.

4.5.2.9 Ras/ strain *Galur Wistar*

Galur Wistar adalah strain *outbred* dari spesies *Rattus Norvegicus* memiliki tanda kepala lebar, telinga yang panjang dan panjang ekor selalu kurang dari panjang tubuhnya serta lebih aktif dari jenis lainnya.

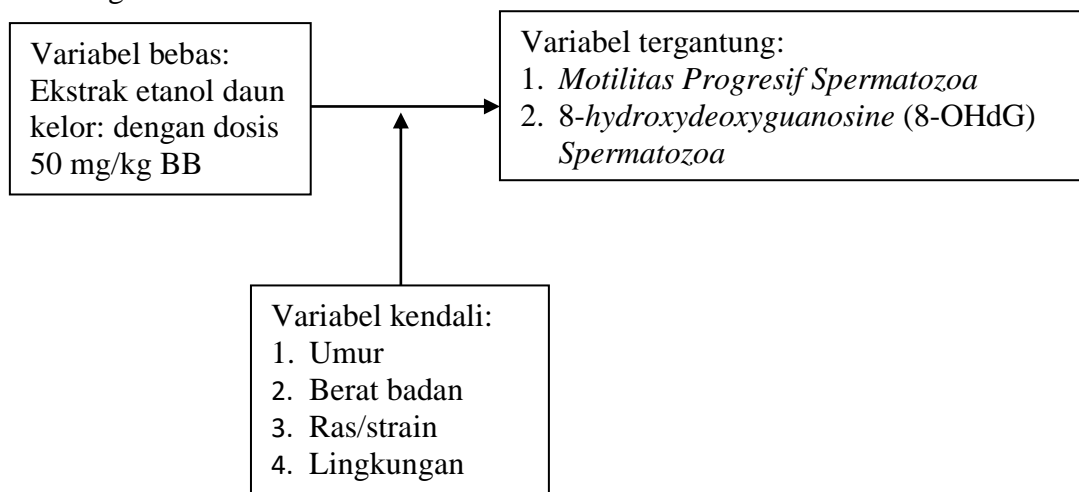
4.5.2.10 Lingkungan

Lingkungan berupa suhu, kelembaban, cahaya, dan higien dari tempat penelitian.

4.5.2.11 Pakan

Pakan pellet BRI CP511B yang di produksi oleh PT. Charoen Pokphand Indonesia dengan komposisi 21-23% protein, 40% karbohidrat, 5% lemak, 5% serat, dan 27-29% komponen lain hingga total 100% yang diberikan kepada hewan coba.

4.5.3 Hubungan Antar Variabel



Gambar 4.2.
Hubungan antara variabel

4.6 Alat dan Bahan Penelitian

4.6.1 Alat Penelitian

1. Neraca pengukur berat badan tikus AND® dengan skala gram
2. Sonde, *handscoon*, masker
3. Mikroskop cahaya Olympus® tipe CX 41 dengan kamera OptiLab®
4. Kandang dengan ukuran 40 cm x15 cm x 10 cm sebanyak 20 buah yang terbuat dari bahan berupa kotak plastik ditutupi kawat kasa dilengkapi dengan tempat pakan dan minum.

4.6.2 Bahan Penelitian

1. Tikus
Tikus jantan (*Ratus Norvegicus*) galur *Wistar* berat badan 200-250 gram umur 18-19 bulan
2. Ekstrak etanol daun kelor 50 mg/kg BB per hari selama 30 hari
3. CMC 0.5%
4. Larutan NaCl 0.9%
5. *Kit ELISA 8-hidroksi 2 deoksiganosin*
Reagent Provided
 - a. Cairan standar (128ng/ml) : 0.5ml x1
 - b. *Pre-coated ELISA Plate* : 12 * 8 well strips x1
 - c. *Standard Diluent* : 3ml x1
 - d. *Streptavidin-HRP* : 6ml x1
 - e. *Stop Solution* : 6ml x1
 - f. *Substrate Solution A* : 6ml x1

- g. *Substrate Solution B* : 6ml x1
- h. *Wash Buffer Concentrate (25x)* : 20ml x1
- i. *Sample semen* : 100 μ
- j. *User Instruction* : 1
- k. *Plate Sealer* : 2 pics
- l. *Zipper bag* : 1 pic

Bahan lain yang dibutuhkan

- a. $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ inkubator
- b. *Absorbent paper*
- c. *Precision pipettes and disposable pipette tips*
- d. *Clean tubes*
- e. *Deionized or distilled water*
- f. *Microplate reader with $450 \pm 10\text{nm}$ wavelength filter*

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Pemeliharaan tikus (*Rattus Norvegicus*) Galur Wistar

Hewan coba tikus (*Rattus Norvegicus*) galur Wistar, berat badan 200-250 gram, umur 18-19 bulan, dimasukkan kedalam kandang dan dipelihara dalam kandang individu. Tikus dipelihara dalam kandang berukuran 40 cm x 15 cm x 10 cm, satu kandang untuk dua ekor tikus. Tikus diberikan makan Pakan pellet BRI CP511B yang di produksi oleh PT. Charoen Pokphand sebanyak $\pm 12-20$ gram per hari dan minum *ad libitum*. Masa *aklimatisasi* sampel adalah 7 hari dengan 12 jam

fase terang dan 12 jam gelap pada temperatur $25 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ dan kelembaban 50-60%.

4.7.2 Pemberian perlakuan pada tikus (*Rattus Norvegicus*) Galur Wistar

Hewan coba sebelum diberikan perlakuan dilakukan *aklimatisasi* terhadap kondisi lingkungan selama 1 minggu. 34 tikus (*Rattus Norvegicus*) galur Wistar dibagi secara acak menjadi 2 kelompok yaitu kelompok perlakuan (P1) diberikan ekstrak etanol daun kelor 50 mg/kgBB per hari yang diencerkan dengan CMC 0,5% sebanyak 0,5 ml/hari selama 30 hari, dan kelompok kontrol (P0) diberikan CMC 0,5% sebanyak 0,5 ml/hari selama 30 hari. Sebelum diberikan perlakuan, seluruh hewan coba ditimbang berat badannya. Penentuan dosis didasarkan pada berat badan tikus pada saat itu.

Pemberian perlakuan kepada tikus melalui sonde, yang dilakukan pada pukul 08.00-09.00 Wita dan diberikan selama 30 hari.

4.7.3 *Euthanasia* sampel

Setelah melewati masa perlakuan, yaitu pada hari ke-30, dilakukan *Euthanasia* dengan Terminasi tikus dilakukan setelah perlakuan terakhir. Tikus diterminasi dengan anastesi terlebih dahulu menggunakan *ketamine* : *xylazine* dosis 75–100mg/kg : 5–10 mg/kg (perbandingan 10:1) secara IM, kemudian di *euthanasia* dengan metode *cervical dislocation*. *Euthanasia* metode *cervical dislocation* merupakan *euthanasia* metode fisik yang dapat digunakan pada tikus dengan berat badan = 250 gr, karena jika berat badan tikus lebih berat maka akan terdapat massa otot yang besar di area *servikal* sehingga menyulitkan *dislokasi servikal*. Selanjutnya dilakukan *open orchidectomy* dengan insisi *midline* atau *pre-*

scrotal, *Testis* diperah keluar dari tempat insisi. *Tunica vaginalis* diinsisi dan *Spermatozoatic cord* ditampilkan untuk mengidentifikasi *epididimis*. *Testis* dipisahkan dari *cauda epididimis* dan ditampung pada wadah bermedia. jasad tikus diinsenerator.

4.7.4 Pengambilan Sampel *Testis* dan Sekresi *Cauda Epididimis*

Untuk mendapatkan sampel *Testis* dan *Spermatozoa* di dalam sekresi *cauda epididimis*, dilakukan sebagai berikut: Organ *Testis* beserta *epididimis* diambil dan dietakkan ke dalam cawan petri yang berisi NaCl 0,9%. Mikroskop bedah dengan pembesaran 400 kali digunakan untuk memisahkan *epididimis* dengan cara memotong bagian proksimal *korpus epididimis* dan bagian distal *vas deferens*. Selanjutnya dimasukkan ke dalam cawan yang berisi 5 ml NaCl 0,9%, pada *epididimis* dilakukan *flushing* (pembilasan) kemudian bagian proksimal *cauda* dipotong sedikit dengan gunting, *Spermatozoa* dari *cauda epididimis* dikeluarkan seperti transportasi yang normal dengan memasukkan medium atau udara selang/jarum suntik berukuran kecil melalui *vas deferens* sehingga mendorong *Spermatozoa* keluar melalui sayatan kecil yang dibuat pada posisi distal dari *epididimis* dan tersuspensi dengan NaCl 0,9%. *Testis* dan suspensi *Spermatozoa* dari *cauda epididimis* yang telah diperoleh ditempatkan pada wadah/tabung berbeda.

4.7.5 Pemeriksaan *Motilitas Spermatozoa*

Pemeriksaan dilakukan dengan segera ketika *Spermatozoa* diambil dari *kauda epididymis*, dengan meneteskan setetes *Spermatozoa* pada gelas obyek. Tetesan diusahakan sama besarnya untuk setiap pemeriksaan. Pengamatan dilakukan dibawah mikroskop dengan perbesaran 400 kali.

- a. *Progressive motility* (PR) : *Spermatozoa* bergerak bebas, baik lurus maupun lingkaran besar, dalam kecepatan apapun.
- b. *Non-progressive motility* (NP) : semua jenis *Spermatozoa* yang tidak memiliki kriteria *progresif*, seperti berenang dalam lingkaran kecil, ekor/ *flagel* yang sulit menggerakkan kepala atau hanya ekor saja yang bergerak.
- c. *Immotility* (IM) : tidak bergerak sama sekali

Nilai *motilitas* normal yaitu *Progressive motility* (PR) = 32% atau
PR + NP = 40%.

4.7.6 Penentuan *8-hydroxydeoxyguanosine* (8-OHdG) menggunakan *ELISA 8-hidroksi 2 deoksiguanosin*

Sampel semen yang akan digunakan disimpan dalam waktu 5 hari pada suhu 2-8 ° C, kemudian dibawa ke suhu kamar sebelum memulai pengujian. Cairan semen *Centrifuge* pada 2000-3000 RPM selama 20 menit untuk mengumpulkan sampel sebelum digunakan.

Prosedur Pengujian

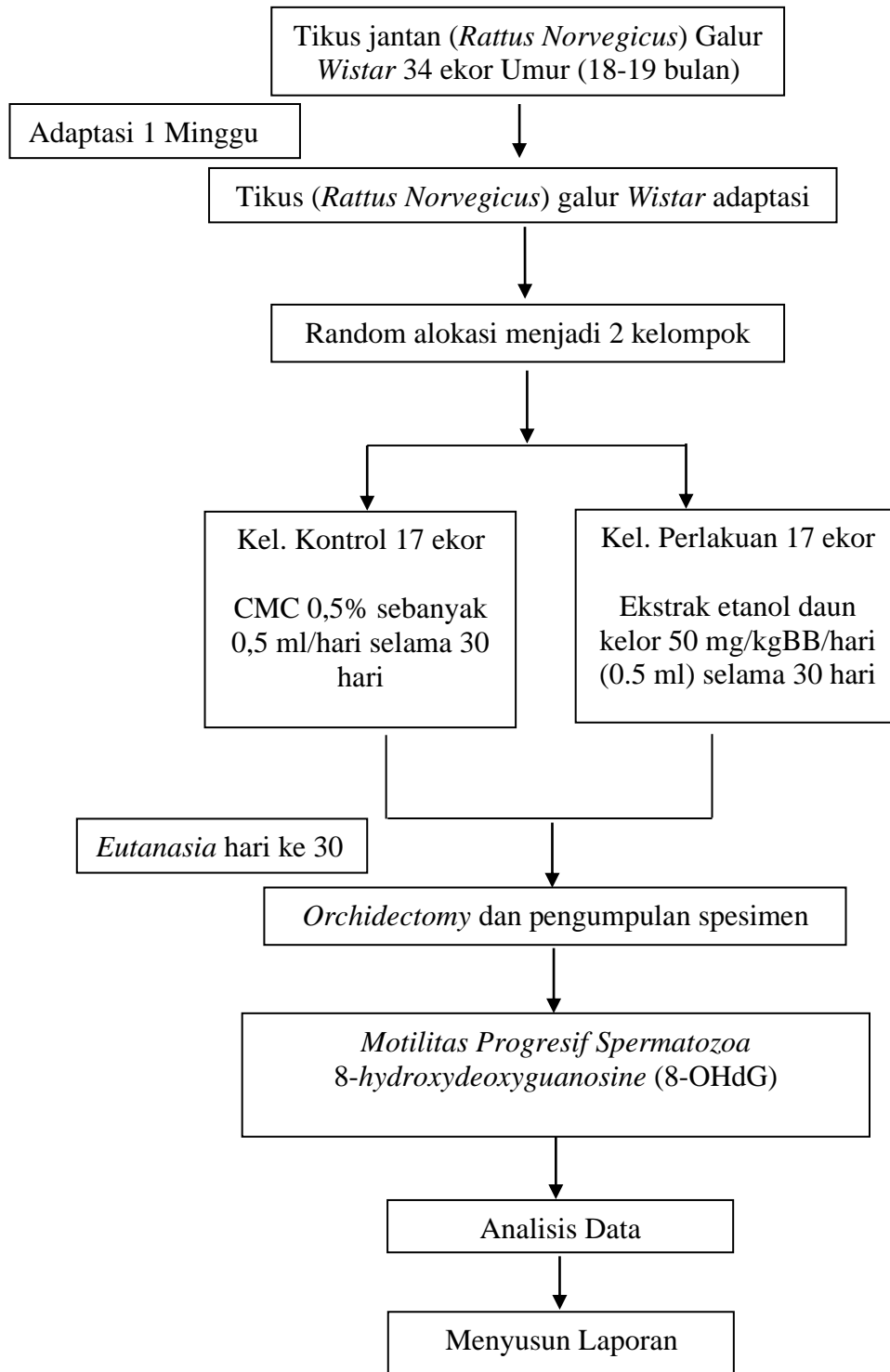
1. Persiapkan semua pereaksi, larutan standar, dan sampel sesuai petunjuk. Bawa semua reagen ke kamar suhu sebelum digunakan. Pengujian dilakukan pada suhu kamar.

2. Tentukan jumlah strip yang diperlukan untuk pengujian. Masukkan strip di frame untuk digunakan. Strip yang tidak digunakan harus disimpan pada 2-8 °C.
3. Tambahkan 50µl ke standar well. Catatan : Jangan menambahkan semen ke standar well karena larutan standar mengandung antibodi yang terbiotinilasi.
4. Tambahkan sampel 40µl ke sampel well dan kemudian tambahkan 10µl anti-8-OHDG ke sampel well, kemudian tambahkan 50µl streptavidin-HRP ke sampel well dan standar well (jangan pada control well yang kosong). Aduk merata. Tutupi piring dengan sealer. Inkubasi 60 menit pada suhu 37 ° C.
5. Lepaskan sealer dan cuci piring 5 kali dengan wash buffer. Rendam wells setidaknya dengan 0,35ml wash buffer selama 30 detik hingga 1 menit untuk setiap pencucian. Untuk pencucian otomatis, aspirasi semua wells dan cuci 5 kali dengan wash buffer, tuangkan yang banyak wash buffer ke wells. Keringkan piring dengan paper towels atau dengan bahan penyerap lainnya.
6. Tambahkan larutan substrat 50µl A ke masing-masing well lalu tambahkan larutan substrat 50µl B ke masing-masing well. inkubasi piring ditutup dengan sealer baru selama 10 menit pada suhu 37 ° C ditempat yang gelap.
7. Tambahkan 50µl *Stop Solution* ke setiap well, warna biru akan segera berubah menjadi kuning.
8. Tentukan kerapatan optik (nilai OD) masing-masing well segera mungkin menggunakan pembaca lempeng mikro set menjadi 450 nm dalam 10 menit setelah menambahkan *Stop Solution*

Perhitungan Hasil

Buat kurva standar dengan memplot OD rata-rata untuk setiap standar pada sumbu vertikal (Y) melawan konsentrasi pada sumbu horizontal (X) dan menggambar kurva paling cocok melalui titik-titik grafik. Perhitungan ini dapat dilakukan dengan paling baik dengan perangkat lunak kurva-pas berbasis computer dan garis kecocokan terbaik dapat ditentukan dengan analisis regresi. (Bioassay Tecnology Laboratory, 2020)

4.8 Alur Penelitian



Gambar 4.3
Alur penelitian

4.9 Analisis Data

Data yang telah diperoleh selama penelitian kemudian dianalisis dengan SPSS 17.0 *for windows* dengan langkah-langkah sebagai berikut :

4.9.1 Analisis deskriptif dilakukan untuk mendapatkan distribusi frekuensi dan rerata dari *Motilitas Progresif Spermatozoa* dan *8-hydroxydeoxyguanosine* (8-OHdG) sebagai marker *DNA mitokondria* pada *Spermatozoa*

4.9.2 Analisis normalitas dan Homogenitas

- a. Uji normalitas data menggunakan uji *Shaphiro Wilk*, karena data numerik dan jumlah sampel <50 dengan tingkat kemaknaan ≥ 0.05 . Data *Motilitas Progresif Spermatozoa* berdistribusi normal $p \geq 0.05$, sedangkan data kadar *8-hydroxydeoxyguanosine* (8OHdG) *Spermatozoa* berdistribusi tidak normal $p < 0.05$, kemudian data yang tidak normal di transformasi, hasilnya akhir data kadar *8-hydroxydeoxyguanosine* (8OHdG) *Spermatozoa* tetap berdistribusi tidak normal $p < 0.05$.
- b. Uji Homogenitas dilakukan dengan menggunakan *Levene`s test*. Data *Motilitas Progresif Spermatozoa* dan data kadar *8-hydroxydeoxyguanosine* (8OHdG) *Spermatozoa* dinyatakan homogen dengan $p > 0.05$.

4.9.3 Analisis komparasi

Data *Motilitas Progresif Spermatozoa* dilakukan uji analisis menggunakan *Independent Sample T Test* karena data berdistribusi normal dengan taraf kemaknaan $p < 0,05$ artinya ada perbedaan *Motilitas Progresif Spermatozoa* antara kelompok perlakuan dan kontrol.

Data kadar *8-hydroxydeoxyguanosine (8OHdG) Spermatozoa* dilakukan uji analisis menggunakan *Mann Whitney* karena data berdistribusi tidak normal dengan taraf kemaknaan $p < 0,05$ artinya ada perbedaan kadar *8-hydroxydeoxyguanosine (8OHdG) Spermatozoa* antara kelompok perlakuan dan kontrol.

BAB V

HASIL PENELITIAN

5.1 Hasil Fitokimia Daun Kelor (*Moringa Oleifera*)

Daun Kelor (*Moringa Oleifera*) didapat dari wilayah Denpasar Selatan. Ekstrak daun kelor dibuat dengan maserasi sebanyak 50gram daun kelor kering, dihancurkan menggunakan blender, ditambahkan pelarut etanol 96%, dimasukkan ke dalam wadah, ditutup dan dibiarkan selama dua hari terlindung dari sinar matahari. Campuran ini disaring sehingga didapat maserat. Ampas dimaserasi dengan etanol 96% menggunakan prosedur yang sama. Maserasi dilakukan sampai diperoleh maserat yang jernih. Maserat diuapkan dengan menggunakan alat penguap vakum putar (*vacuum rotary evaporator*) pada suhu 40 °C.

5.1.1 Uji Kapasitas Antioksidan

25 mg sampel kering (bubuk) diencerkan menggunakan 10 ml Metanol 100% di *vortex*, *sentrifuge* 3000 rpm selama 15 menit, di saring, *filtrate* di pipet 0.5 ml, ditambahkan 3.5 ml DPPH, *divortex*, diamkan selama 30 menit, baca *absorbansi* pada 517 nm.

Tabel 5.1
Hasil Uji Fitokimia Ekstrak Etanol Daun Kelor (*Moringa Oleifera*)
daerah Denpasar Selatan, Bali

No	Uji Fitokimia	Satuan	Hasil
1	Kapasitas Antioksidan	mg/L GAEAC	1812.95
2	IC ₅₀	Ppm	353.09
3	<i>Fenol</i>	mg/100 g	1556.52
4	<i>Flavonoid</i>	mg/100 g	23546.12
5	<i>Tannin</i>	mg/100 g	1300.34
6	Vit C	mg/100ml	23798.077
7	<i>Saponin</i>	-	Positif (+)
8	<i>Alkaloid</i>	-	Positif (+)

Dari table 5.1 diperoleh data bahwa kandungan ekstrak etanol daun kelor di daerah Denpasar Selatan Bali mengandung Kapasitas Antioksidan, *Fenol*, *Flavonoid*, *Tannin*, Vitamin C, *Saponin*, serta *Alkaloid*.

5.2 Karakteristik Subyek Penelitian

Sebanyak 34 ekor tikus memenuhi kriteria *eligibilitas* yaitu tikus putih (*Rattus Norvegicus*) galur *Wistar* dengan jenis kelamin jantan, umur 18-19 bulan, berat badan 200-250gram dan sehat. Rata-rata berat badan tikus yang digunakan adalah $229.35 \pm 11,4\%$. Randomisasi dilakukan terhadap seluruh tikus menggunakan metode *simple random allocation*. Peneliti dengan mata tertutup melakukan pengambilan secara acak terhadap tikus-tikus dan dimasukkan ke dalam wadah baru. Sampel terbagi menjadi 2 kelompok, yakni kelompok kontrol (P0) yang diberikan CMC 0.5% 0,5 ml/ hari, kelompok perlakuan (P1) diberikan ekstrak etanol daun kelor 50 mg/kgBB yang dilarutkan dengan CMC 0.5% 0,5 ml/ hari. Perlakuan diberikan selama 30 hari pada pagi hari.

5.3 Uji Normalitas Data

Data *Motilitas Progresif Spermatozoa* dan kadar *8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) Spermatozoa* diuji normalitasnya dengan menggunakan uji *Shapiro-Wilk*. Masing-masing data disajikan pada Tabel 5.2 berikut.

Tabel 5.2
Uji Normalitas Data *Motilitas Progresif Spermatozoa* dan Kadar *8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) Spermatozoa* pada Masing-masing Kelompok

Variable	Kelompok Subjek	Shapiro-Wilk			Keterangan
		Statistik	df	<i>p</i> *	
<i>Motilitas Progresif Spermatozoa</i>	Kontrol	0.923	17	0.16	Data
	Perlakuan	0.892	17	0.05	Berdistribusi Normal
Kadar <i>8-hydroxydeoxyguanosine 8OHdG Spermatozoa</i>	Kontrol	0.87	17	0.00	Data
	Perlakuan	0.86	17	0.51	Berdistribusi Tidak Normal

*nilai $p < 0,05$: data berdistribusi tidak normal

Berdasarkan table 5.2 diatas didapatkan bahwa hasil uji Normalitas menggunakan uji Shapiro Wilk diperoleh Data *Motilitas Progresif Spermatozoa* berdistribusi normal ($p > 0.05$) sedangkan data Kadar *8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) Spermatozoa* berdistribusi tidak normal ($p < 0.05$), kemudian data yang tidak normal dilakukan transformasi data, dengan hasil data Kadar *8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) Spermatozoa* tetap berdistribusi tidak normal ($p < 0.05$).

5.4 Uji Homogenitas Data

Data *Motilitas Progresif Spermatozoa* dan Kadar *8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) Spermatozoa* diuji homogenitas dengan

menggunakan uji *Levene's test*. Masing-masing data disajikan pada Tabel 5.3 berikut.

Tabel 5.3
Uji Homogenitas Data *Motilitas Progresif Spermatozoa* dan Kadar 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) *Spermatozoa* pada Masing-masing Kelompok

Variable	<i>Levene's test</i>		Keterangan
	Nilai F	P*	
<i>Motilitas Progresif Spermatozoa</i>	0.01	0.94	Data Homogen
Kadar 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) <i>Spermatozoa</i>	0.53	0.47	Data Homogen

*nilai $p > 0,05$: data homogen

Berdasarkan table 5.3 diatas didapatkan bahwa hasil uji Homogenitas menggunakan uji *Levene's Test* diperoleh Data *Motilitas Progresif Spermatozoa* serta Kadar 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) *Spermatozoa* menunjukkan data Homogen ($p > 0.05$).

5.5 Perbandingan *Motilitas Progresif Spermatozoa* antar Kelompok Perlakuan

Tabel 5.4
Uji *Independent Sample T Test Motilitas Progresif Spermatozoa*

Variable	<i>Independent Sample T Test</i>			
	Rerata Nilai Variable		t	P*
	Perlakuan	Kontrol		
<i>Motilitas Progresif Spermatozoa</i>	28.61±2.31%	21.63±1.80%	-9.817	0.00

*nilai $p < 0,05$: terdapat perbedaan yang signifikan

Berdasarkan table 5.4 diatas diketahui bahwa hasil Analisis komparatif data menggunakan Uji *Independent Sample T Test*, oleh karena data berdistribusi normal menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol daun

Kelor (*Moringa Oleifera*) 50 mg/kgBB pada kelompok perlakuan memiliki perbedaan yang signifikan terhadap *Motilitas Progresif Spermatozoa* pada tikus (*Ratus Norvegicus*) Galur Wistar usia tua ($p < 0.05$) dibandingkan dengan kelompok kontrol. Rerata *Motilitas Progresif Spermatozoa* pada kelompok perlakuan sebesar $28.61 \pm 2.31\%$ sedangkan pada kelompok kontrol $21.63 \pm 1.80\%$

5.6 Perbandingan Kadar 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) Spermatozoa antar Kelompok Perlakuan

Tabel 5.5
Uji Mann-Whitney Kadar 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) Spermatozoa

Variable	Rerata Nilai Variabel		Nilai Z	P*
	Perlakuan	Kontrol		
Kadar 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) Spermatozoa	$18.1 \pm 12.24\%$	$26.83 \pm 9.33\%$	-2.153	0.03

*nilai $p < 0,05$: terdapat perbedaan yang signifikan

Berdasarkan table 5.5 diatas diketahui bahwa hasil Analisis komparatif data menggunakan Uji Mann-Whitney, oleh karena data berdistribusi tidak normal menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol daun Kelor (*Moringa Oleifera*) 50 mg/kgBB pada kelompok perlakuan memiliki perbedaan yang signifikan terhadap kadar 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) Spermatozoa pada tikus (*Ratus Norvegicus*) *Motilitas Progresif Spermatozoa* usia tua ($p < 0.05$) dibandingkan dengan kelompok kontrol. Rerata Kadar 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) Spermatozoa pada kelompok perlakuan sebesar $18.1 \pm 12.24\%$ sedangkan pada kelompok kontrol $26.83 \pm 9.33\%$

BAB VI

PEMBAHASAN

6.1 Fitokimia Ekstrak Etanol Daun Kelor (*Moringa Oleifera*)

Antioksidan yang terdapat di dalam daun kelor bekerja menetralkan radikal bebas sehingga mencegah kerusakan oksidatif pada sebagian besar biomolekul dan menghasilkan proteksi terhadap kerusakan oksidatif secara signifikan (Sreelatha and Padma, 2011). Untuk mengetahui kandungan antioksidan dalam daun kelor dilakukan uji fitokimia. Skrining fitokimia atau disebut juga penapisan fitokimia merupakan uji pendahuluan dalam menentukan golongan senyawa metabolit sekunder yang mempunyai aktivitas biologi dari suatu tumbuhan. Skrining fitokimia tumbuhan dijadikan informasi awal dalam mengetahui golongan senyawa kimia yang terdapat didalam suatu tumbuhan. Dalam percobaan ini, skrining fitokimia dilakukan dengan menggunakan pereaksi-pereaksi tertentu sehingga dapat diketahui golongan senyawa kimia yang terdapat pada tumbuhan tersebut (Nainggolan *et al.*, 2019). Hasil analisis kandungan daun kelor di daerah Denpasar Selatan Bali memiliki kapasitas antioksidan, antara lain kandungan *Fenolat*, *Flavonoid*, *Tannin*, *Ascorbic acid*, *Alkaloid* dan *Saponin* (Widiastini, Karuniadi dan Tangkas, 2021)

6.2 Pemberian Ekstrak Etanol Daun Kelor (*Moringa Oleifera*) Meningkatkan *Motilitas Progresif Spermatozoa* pada Tikus (*Ratus Norvegicus*) Usia Tua

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol daun kelor (*Moringa Oleifera*) 50 mg/kg BB sebanyak 30 hari pada tikus (*Ratus Norvegicus*) usia tua (18-19 bulan) meningkatkan *motilitas* progresif secara bermakna pada kelompok perlakuan dibandingkan kelompok kontrol dengan nilai $p < 0.05$. Rerata *Motilitas Progresif Spermatozoa* pada kelompok perlakuan sebesar $28.61 \pm 2.31\%$ sedangkan pada kelompok kontrol $21.63 \pm 1.80\%$.

Progressive motility (PR) adalah *Spermatozoa* bergerak bebas, baik lurus maupun lingkaran besar, dalam kecepatan apapun (*World Health Organization*, 2010). Pergerakan *Spermatozoa* membutuhkan sejumlah energi ATP yang digunakan untuk menggerakkan *apparatus flagella* (Susmiarsih, 2010). Beberapa faktor yang memengaruhi *motilitas* sperma adalah berat badan, konsumsi alkohol, pekerjaan, radiasi gelombang elektromagnetik, infeksi, stress oksidatif, penuaan dan kerusakan DNA *mitokondria* (Ng *et al.*, 2004; Scheffler, 2008; Utami, 2009; Susmiarsih, 2010; Al-Haija, 2011).

Kadar ROS yang meningkat dapat menyebabkan kerusakan *Spermatozoa* sampai dengan kematian sel. Penuaan dapat meningkatkan akumulasi ROS sehingga mengganggu metabolisme sel, mutasi sel (Pangkahila, 2011), penurunan *motilitas Spermatozoa* serta kerusakan DNA (Ko, Jr and Agarwa, 2014), sehingga ROS sering dikaitkan dengan infertilitas dan penuaan (Henkel, Sandhu and Agarwal, 2018). Sperma dengan tingkat kerusakan oksidatif yang lebih tinggi

memiliki kapasitas antioksidan yang lebih rendah, ditemukan pada sperma dengan motilitas yang rendah (Kao *et al.*, 2008).

Antioksidan merupakan molekul yang mampu menstabilkan atau menonaktifkan radikal bebas sebelum menyerang sel, juga dapat menghambat ataupun menunda oksidasi suatu substrat. Antioksidan memiliki fungsi preventif dan protektif terhadap penyakit terkait penuaan (Salmon, Richardson and Pérez, 2010; Zalukhu, Phyma and Pinzon, 2016). Pemberian senyawa antioksidan dapat meningkatkan parameter sperma, seperti *motilitas*, konsentrasi, dan mengurangi kerusakan DNA (Martin-Hidalgo *et al.*, 2019; R. Dias *et al.*, 2020).

Kandungan antioksidan didalam daun kelor (*moringa oleifera*) yang terdiri dari *Senyawa fenol, Flavonoid, Tannin, Vitamin C, Saponin, Alkaloid* bekerja untuk menetralkan radikal bebas sehingga mencegah kerusakan oksidatif pada sebagian besar biomolekul dan memberikan perlindungan yang signifikan terhadap kerusakan oksidatif, memiliki kemampuan untuk melindungi *lipo protein* dari radikal *peroksil* sehingga meningkatkan *Motilitas Progresif Spermatozoa* hal ini sejalan dengan hasil penelitian Nayak *et al.*, (2015) bahwa pemberian *Moringa Oleifera* dapat meningkatkan kepadatan sperma, *motilitas* dan mengurangi kerusakan DNA serta secara signifikan meningkatkan tingkat *superoksida dismutase* dan *katalase* seiring dengan penurunan *peroksidasi lipid* di jaringan *Testis*. Penelitian yang dilakukan oleh (Ben Abdallah, Zribi and Ammar-Keskes, 2011), menunjukkan bahwa suplementasi dengan *Quercetin (Flavonoid)* dapat melindungi *Spermatozoa* dari kerusakan sperma yang dimediasi oleh H₂O₂ (*hydrogen peroksida*) dan meningkatkan *motilitas Spermatozoa* (Diao *et al.*,

2019). Hasil penelitian Syarifuddin *et al.*, (2017), menunjukkan bahwa daun *M.oleifera* dapat meningkatkan libido, volume semen, *motilitas* total dan *motilitas progresif* sperma Banteng Bali secara nyata. Penelitian yang dilakukan oleh Bebas, Budiasa dan Astutik, (2015), menunjukkan bahwa pemberian vitamin C, dapat mempertahankan daya hidup *spermatozoa* dan meningkatkan *motilitas spermatozoa*. Namun perlu diperhatikan, penggunaan antioksidan secara berlebihan dapat menyebabkan pro-oksidan yang disebut dengan *antioxidant paradoxs*, hal ini dapat menurunkan oksidan endogen yang penting untuk induksi jalur fisiologis, sehingga menghambat kapasitas sperma, hiperaktivasi dan reaksi *acrosomal spermatozoa* yang dapat meningkatkan berbagai kondisi patologi seperti penuaan dan infertilitas pada pria (Henkel, Sandhu and Agarwal, 2018; Ali, Martinez and Parekh, 2020). Penelitian yang dilakukan oleh Akmal *et al.*, (2006), menunjukkan bahwa suplementasi vitamin C pada pria infertil dapat meningkatkan jumlah sperma, *motilitas* sperma, dan *morfologi* sperma dan meningkatkan kualitas air mani menuju pembuahan.

6.3 Pemberian Ekstrak Etanol Daun Kelor (*Moringa Oleifera*) Menurunkan Kadar *8-hydroxydeoxyguanosine* (8-OHdG) *Spermatozoa* pada Tikus (*Ratus Norvegicus*) Usia Tua

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol daun kelor (*Moringa Oleifera*) 50 mg/kg BB sebanyak 30 hari pada tikus (*Ratus Norvegicus*) usia tua (18-19 bulan) menurunkan kadar *8-hydroxydeoxyguanosine* (8-OHdG) *Spermatozoa* secara bermakna pada kelompok perlakuan dibandingkan

kelompok kontrol dengan nilai $p < 0.05$. Rerata Kadar *8-hydroxydeoxyguanosine* (8-OHdG) *Spermatozoa* pada kelompok perlakuan sebesar $18.1 \pm 12.24\%$ sedangkan pada kelompok kontrol $26.83 \pm 9.33\%$.

8 *Hydroxydeoxyguanosine* (8-OHdG) merupakan suatu penanda kerusakan basa *Deoxyribonucleic Acid* (DNA) oksidatif. 8-OHdG pada DNA *mitokondria* (mtDNA) 10 kali lebih tinggi dari pada DNA inti dan meningkat secara drastis pada penuaan (Tarng *et al.*, 2000; Sudjarwo, 2004; Valavanidis *et al.*, 2005; De Iuliis *et al.*, 2009; Parwata, 2009; Pan, 2011; Cambi *et al.*, 2013; Hosen *et al.*, 2015; Lestari dan Sari, 2015)

Daun kelor mengandung antioksidan *Flavonoid*. Berdasarkan hasil penelitian Kanazawa *et al.*, (2006), *Flavonoid* golongan *Quercetin* dan *luteolin* secara signifikan menekan pembentukan *8-hydroxydeoxyguanosine* (8 OH-dG), sejenis dengan penelitian yang dilakukan oleh Cai, Rahn and Zhang, (1997) bahwa *Flavonoid* (*kuersetin*, *luteoin* dan *genistein*) mengais radikal bebas oksigen, Menghambat *peroksidasi lipid* dan memadamkan pembentukan 8-OHdG. Selain itu, ekstrak etanol daun kelor mengandung *Ascorbic acid* memegang antioksidan yang jauh lebih kuat dari pada yang lain dengan memasok hingga 65% dari plasma mani (Sahu CR, 2016), *Ascorbic acid* teroksidasi dalam bentuk DHA (*Asam Dehidroaskorbat*), diangkut ke *mitokondria* melalui *transporter glukosa fasilitatif 1* (Glut1) dan direduksi menjadi AA (*asam askorbat*) *mitokondria*. AA *mitokondria* memadamkan ROS, melindungi genom *mitokondria*, dan menghambat depolarisasi membran *mitokondria* (Sabeti *et al.*, 2016), Saat asupan *Ascorbic acid* meningkat, maka konsentrasinya dalam plasma

mani akan meningkat sehingga mencegah kerusakan DNA dan secara signifikan mengurangi kerusakan DNA (Green *et al.*, 1994; Ahmadi *et al.*, 2016; Sahu CR, 2016). Selain itu, penelitian yang dilakukan oleh Sram, Binkova and Rossner, (2012), menunjukkan bahwa *Ascorbic acid* tidak hanya memiliki efek pencegahan kerusakan DNA pada orang sehat, tetapi dapat mengurangi kerusakan DNA pada orang yang sakit. Berdasarkan penelitian ini, tingginya kadar *Ascorbic acid* dalam plasma (di atas 50 mol / L) mengurangi kelainan *kromosom*, yang dapat mengurangi cacat DNA dan menurunkan jumlah 8-oxodG. Penelitian yang dilakukan oleh KC, Càrcamo and Golde, (2005), vitamin C berperan sangat baik memberikan perlindungan terhadap *mitokondria* terhadap cedera oksidatif. Kandungan lain dalam ekstrak etanol daun kelor mengandung *polifenol*, berdasarkan beberapa penelitian penggunaan *polifenol* dari berbagai senyawa tanaman pada buah dan sayuran diperoleh hasil bahwa *polifenol* dapat menurunkan 8-OHdG, yang merupakan penanda kerusakan DNA (Qian *et al.*, 2012; Ko *et al.*, 2014; Rangel-Huerta *et al.*, 2015).

Dalam penelitian ini diperoleh hasil dengan kapasitas antioksidan Ekstrak Etanol Daun Kelor (*Moringa Oleifera*) dengan dosis 50 mg/kg BB mampu meningkatkan *motilitas* spermatozoa dan menurunkan pembentukan 8-OHdG pada tikus (*Ratus Norvegicus*) usia tua.

6.4 Kebaharuan Penelitian (*Novelty*)

Kebaharuan dalam penelitian ini adalah

Melalui penelitian ini, diketahui bahwa pemberian ekstrak etanol daun kelor (*Moringa Oleifera*) dengan dosis 50 mg/kg BB dapat meningkatkan *motilitas Spermatozoa* dan menurunkan *8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG)* yang merupakan marker kerusakan mtDNA pada tikus (*Ratus Norvgicus*) usia tua. Sepanjang pengetahuan peneliti, belum ada penelitian yang membuktikan peran *flavonoid* dan *ascorbid acid* yang terkandung dalam ekstrak etanol daun kelor dalam meningkatkan motilitas spermatozoa dan menurunkan *8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG)* pada tikus (*Ratus Norvgicus*) usia tua.

BAB VII

SIMPULAN DAN SARAN

7.1 Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan sebagai berikut :

1. *Motilitas Progresif Spermatozoa* secara signifikan lebih tinggi pada tikus (*Ratus Norvegicus*) Galur Wistar usia tua yang diberikan ekstrak etanol daun kelor (*Moringa Oleifera*) sebanyak 50 mg/kg BB dibandingkan dengan kontrol ($p < 0.05$).
2. Kadar *8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) Spermatozoa* secara signifikan lebih rendah pada tikus (*Ratus Norvegicus*) Galur Wistar usia tua yang diberikan ekstrak etanol daun kelor (*Moringa Oleifera*) sebanyak 50 mg/kg BB dibandingkan dengan kelompok kontrol ($p < 0.05$).

7.2 Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut pemberian ekstrak etanol daun kelor pada tikus (*ratus norvegicus*) galur *wistar* usia tua dengan memperhatikan siklus *spermatogenesis* serta efek samping ditimbulkan pada kasus infertilitas akibat penuaan.
2. Pengujian klinik dengan responden manusia sehingga ekstrak daun kelor menjadi obat herbal terstandar untuk meningkatkan kualitas *spermatozoa*, menurunkan kerusakan DNA *mitokondria* dalam kasus infertilitas akibat penuaan

DAFTAR PUSTAKA

- Adaes, S. (2019) *Mitochondria Functions For Healthy Aging : What Does The Mitochondria Do?*, *Neurohacker*. doi: 1037//0033-2909.I26.1.78.
- Adedapo, Adeolu A. Jimoh, Florence O., Koduru, S., Afolayan, Anthony J., and Masika, Patrick J. (2008) 'Antibacterial and antioxidant properties of the methanol extracts of the leaves and stems of *Calpurnia aurea*', *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 8, pp. 1–8. doi: 10.1186/1472-6882-8-53.
- Ahmadi, S., Bashiri, R., Ghadiri-Anari, A., and Nadjarzadeh, A. (2016) 'Antioxidant supplements and semen parameters: An evidence based review', *Int J Reprod BioMed*, 14(12), pp. 729–736.
- Akhlaghi, M. and Bandy, B. (2009) 'Mechanisms of flavonoid protection against myocardial ischemia-reperfusion injury', *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 46(3), pp. 309–317. doi: 10.1016/j.yjmcc.2008.12.003.
- Akmal, M., Qadri, J. Q., Al-Waili, Noori S., Thangal, S., Haq, A., and Saloom, Khelod Y. (2006) 'Improvement in human semen quality after oral supplementation of vitamin C', *Journal of Medicinal Food*, 9(3), pp. 440–442. doi: 10.1089/jmf.2006.9.440.
- Akmal, M., Masyitah, D., Hafizuddin dan Fitriani. (2015) 'Epididimis dan Perannya pada Pematangan Spermatozoa', *JESBIO*, IV(2), pp. 1–9.
- Al-Haija, R. W. M. A. (2011) 'Main Causes of Infertility among Men Treated at Razan Centers in West Bank : Retrospective study', *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 33(27), p. 5.
- Al-Shaban, S A W., Al-Wasiti, E A., Al-Salihi, A R., and Al-Aubaidy, Hayder. (2016) 'Evaluating the degree of oxidative DNA damage and apoptosis in human lymphocytes cultured in the presence of beta-carotene using comet assay, and FAS L (CD95)', *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5(3), pp. 57–66.
- Ali, M., Martinez, M. and Parekh, N. (2020) 'Are antioxidants a viable treatment option for male infertility?', *Andrologia*, 53(1), pp. 1–12. doi: 10.1111/and.13644.
- Aminah, S., Ramdhan, T. and Yanis, M. (2015) 'Kandungan Nutrisi dan Sifat Fungsional Tanaman Kelor (*Moringa oleifera*)', *Buletin Pertanian Perkotaan*, 5(2), pp. 35–44.

- Ardiaria, M. (2019) 'Disfungsi Mitokondria dan Stress Oksidatif', *Journal of Nutrition and Health*, 7(3), pp. 50–55.
- Armstrong, Jeffrey S., Bivalacqua, Trinity J., Chamulitrat, W., Sikka, S., and Hellstrom, Wayne J.G. (2002) 'A comparison of the NADPH oxidase in human sperm and white blood cells', *International Journal of Andrology*, 25(4), pp. 223–229. doi: 10.1046/j.1365-2605.2002.00351.x.
- Arrotéia, Kélen F., Garcia, Patrick V., Barbieri, Mainara F., Justino, M., Lopes P., and Luís Antonio V. (2012) 'The Epididymis: Embryology, Structure, Function And Its Role In Fertilization And Infertility', in *Embryology*. Brazil: State University of Campinas (UNICAMP), pp. 41–66. doi: 10.5772/35847.
- Astawa, M. (2018) *Dasar-dasar Patologi Molekuler: Apoptosis dan Onkogenesis*. I. Surabaya: Airlangga University Press.
- Author Unknown (2013) '8-hydroxy 2 deoxyguanosine ELISA Kit (8-OHdG) (ab201734)| Abcam'. Available at: <https://www.abcam.com/8-hydroxy-2-deoxyguanosine-elisa-kit-ab201734.html#top-486>.
- Avula, S., Parikh, S., Demarest, S., Kurz, J., and Gropman, A. (2014) 'Treatment of mitochondrial disorders', *Curr Treat Options Neurol*, 16(6), pp. 1–20. doi: 10.3233/JPN-120578.
- Ayala, A., Muñoz, M. F. and Argüelle, S. (2014) 'Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal', *Hindawi Publishing Corporation*. doi: 10.1007/978-3-211-33303-7_2.
- Aziz, N. and Agarwal, A. (2017) *The Diagnosis and Treatment of Male Infertility*, Springer. Edited by N. Aziz and A. Agarwal. Switzerland: Springer International Publishing AG 2017. doi: 10.1177/003591574503800602.
- Basito, B., Yudhistira, B. and Meriza, D. A. (2018) 'Kajian Penggunaan Bahan Penstabil CMC (Carboxyl Methyl Cellulose) dan Karagenan dalam Pembuatan Velva Buah Naga Super Merah (*Hylocereus costaricensis*)', *Jurnal Teknologi dan Industri Pertanian Indonesia*, 10(1), pp. 42–49. doi: 10.17969/jtipi.v10i1.9577.
- Bebas, W., Pemayun, T., Damriyasa, I., and Astawa, I. (2016) 'Lactose-Astaxanthin Increases Green Jungle Fowl's Sperm Motility and Reduces Sperm Dna Fragmentation During 50 Celsius Storage', *Bali Medical Journal*, 4(3), pp. 152–156. doi: 10.15562/bmj.v4i3.189.
- Bebas, W., Budiasa, M. K. dan Astutik, I. Y. (2015) 'Penambahan Vitamin C Pada Pengencer Spermatozoa Babi Landrace Yang Disimpan Pada Suhu

15 °C', *Buletin Veteriner Udayana*, 7(2), pp. 179–185.

- Bebas, W. dan Laksmi, D. N. D. I. (2013) 'Konsentrasi Spermatozoa Dan Motilitas Spermatozoa Ayam Hutan Hijau (*Gallus varius*)*', *Buletin Veteriner Udayana*, (ml).
- Ben Abdallah, F., Zribi, N. and Ammar-Keskes, L. (2011) 'Antioxidative potential of Quercetin against hydrogen peroxide induced oxidative stress in spermatozoa in vitro', *Andrologia*, 43(4), pp. 261–265. doi: 10.1111/j.1439-0272.2010.01063.x.
- Bioassay Tecnology Laboratory (2020) *Human 8-Hydroxy-desoxyguanosine ELISA Kit*, www.bt-laboratory.com. Available at: <http://www.bt-laboratory.com/product-category/elisa-kit/> (Accessed: 20 June 2020).
- Bisht, S., Faiq, M., Tolahunase, M., and Dada, R. (2017) 'Oxidative stress and male infertility', *Nature Reviews Urology*, 14(8), pp. 470–485. doi: 10.1038/nrurol.2017.69.
- Botham, K. M. and Mayes, P. A. (2009) *Harper's Illustrated biochemistry 28th edition*. Twenty-Eig, *Biochemical Education*. Twenty-Eig. London. doi: 10.1016/s0307-4412(97)80776-5.
- Cahyani, S. L. (2019) *Pemberian Ekstrak Etanol Daun Kelor (Moringa Oleifera) Menghambat Penurunan Superoksidase Dismutase, Ekspresi Reseptor Follicle Stimulating Hormon, Folikel Ovarium dan Peningkatan Apoptosis, Tikus Wistar yang Terpapar Asap Rokok (Disertasi)*. Universitas Udayana.
- Cahyani, S. L. dan Sukadana, I. M. (2017) 'Skrining Fitokimia dan Aktivitas Penangkapan Radikal Bebas DPPH Ekstrak Etanol Daun Kelor (*Moringa Oleifera*) di Ende', *jurnal poltekkes kupang*, pp. 410–416.
- Cai, Q., Rahn, R. O. and Zhang, R. (1997) 'Dietary flavonoids, quercetin, luteolin and genistein, reduce oxidative DNA damage and lipid peroxidation and quench free radicals', *Cancer Letters*, 119(1), pp. 99–107. doi: 10.1016/S0304-3835(97)00261-9.
- Cambi, M., Tamburrino, L., Marchiani, S., Olivito, B., Azzari, C., Forti, G., Baldi, E., and Murtatori, M. (2013) 'Development of a specific method to evaluate 8-hydroxy, 2-deoxyguanosine in sperm nuclei: Relationship with semen quality in a cohort of 94 subjects', *Reproduction*, 145(3), pp. 227–235. doi: 10.1530/REP-12-0404.
- Chan, Kim W., Iqbal, S., Khong, Nicholas M.H., Ooi, Der J., and Ismail, Maznah. (2014) 'Antioxidant activity of phenolics-saponins rich fraction prepared

- from defatted kenaf seed meal', *LWT - Food Science and Technology*, 56(1), pp. 181–186. doi: 10.1016/j.lwt.2013.10.028.
- Cheng, C. Y. and Mruk, D. D. (2012) 'The biology of spermatogenesis: The past, present and future', *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 365(1546), pp. 1459–1463. doi: 10.1098/rstb.2010.0024.
- Chung, H. S. and Shin, J. C. (2007) 'Characterization of antioxidant alkaloids and phenolic acids from anthocyanin-pigmented rice (*Oryza sativa* cv. Heugjinjubyeo)', *Food Chemistry*, 104(4), pp. 1670–1677. doi: 10.1016/j.foodchem.2007.03.020.
- Clouthier, David E., Avarbock, Mary R., Maika, Shanna D., Hammer, Robert E., and Brinster, Ralph L. (1996) 'Rat spermatogenesis in mouse testis', *Nature*, 381(6581), pp. 418–421. doi: 10.1038/381418a0.
- Cornwall, G. A. (2009) 'New insights into epididymal biology and function', *Human Reproduction Update*, 15(2), pp. 213–227. doi: 10.1093/humupd/dmn055.
- Costabile, R. (2013) 'Anatomy and physiology of the male reproductive system', in *Surgical and Medical Management of Male Infertility*. Cambridge: Cambridge University Press, pp. 1–10.
- Cui, Y., Liu, B., Sun, X., Li, Z., Chen, Y., Guo, Z., Liu, H., Li, D., Wang, C., Zhu, X., and Shi, Yinghua. (2020) 'Protective effects of alfalfa saponins on oxidative stress-induced apoptotic cells', *Food and Function*, 11(9), pp. 8133–8140. doi: 10.1039/d0fo01797c.
- Darmawan, H. (2007) 'Production of ROS and its effects on mitochondrial and nuclear DNA, human spermatozoa, and sperm function', 16(2), pp. 127–133.
- Dhakar, Ram C., Pooniya, Brijendra K., Gupta, M., Maurya, Sheo D., Bairwa, N., and Sanwermal. (2011) 'Moringa: The herbal gold to combat malnutrition', *Chronicles of Young Scientists*, 2(3), p. 119. doi: 10.4103/2229-5186.90887.
- De Iuliis, Geoffrey N., Thomson, Laura K., Mitchell, Lisa A., Finnie, Jane M., Koppers, Adam J., Hedges, A., Nixon, B., and Aitken, R. J. (2009) 'DNA Damage in Human Spermatozoa Is Highly Correlated with the Efficiency of Chromatin Remodeling and the Formation of 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine, a Marker of Oxidative Stress¹', *Biology of Reproduction*, 81(3), pp. 517–524. doi: 10.1095/biolreprod.109.076836.

- Diao, R., Gan, H., Tian, F., Cai, X., Zhen, W., Song, X., and Duan, Yong G. (2019) 'In vitro antioxidation effect of Quercetin on sperm function from the infertile patients with leukocytospermia', *American Journal of Reproductive Immunology*, 82(3), pp. 1–7. doi: 10.1111/aji.13155.
- Dimitriadis, F., Adonakis, G., Kaponis, A., Takenaka, C., Mamoulakis A., and Sofikitis, N. (2017) *Endocrinology of the Testis and Male Reproduction*. Greece: Springer International Publishing AG 2017. doi: 10.1007/978-3-319-29456-8.
- Djaelani, M. A. and Sitasiwi, A. J. (2009) 'Motilitas spermatozoa manusia setelah simpan beku dengan medium TES-Tris yolk citrat (TES-TYC)', *AGROECOLOGIA Bases científicas para una agricultura sustentable*, 7(2), pp. 65–83. Available at: <http://www.leisa-al.org/web/images/stories/revistapdf/vol22n2.pdf#page=30>.
- Djuwantono, T., Permadi, W., Herlianto, H., dan Halim, D. (2008) *Hanya 7 Hari Memahami Infertilitas*. I. Edited by A. Saridewi. Bandung: PT Refika Aditama.
- Ergun, R., Guo, J. and Huebner-Keese, B. (2016) 'Cellulose', *Encyclopedia of Food and Health*, pp. 694–702. doi: 10.1016/B978-0-12-384947-2.00127-6.
- Fatima, S. (2018) 'Role of Reactive Oxygen Species in Male Reproduction', *Novel Prospects in Oxidative and Nitrosative Stress*. doi: 10.5772/intechopen.74763.
- Federer, W. T. (2011) *Statistical Design and Analysis for Intercropping Experiments. Vol. II: Three or More Crops*. II, Cornell University. II. New York: Springer.
- Fitria, L., Mulyati dan Tiraya, C. M. (2015) 'Profil Reproduksi Jantan Tikus (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769) Galur Wistar Stadia Muda, Pradewasa, dan Dewasa', *Jurnal Biologi Papua*, 7(1), pp. 29–36. doi: 2086-3314.
- Freitas, M. J., Vijayaraghavan, S. and Fardilha, M. (2017) 'Signaling mechanisms in mammalian sperm motility', *Biology of Reproduction*, 96(1), pp. 2–12. doi: 10.1095/biolreprod.116.144337.
- Green, Michael H.L., Lowe, Jillian E., Waugh, Alastair P.W., Aldridge, Kay E., Cole, J., and Arlett, Colin F. (1994) 'Effect of diet and vitamin C on DNA strand breakage in freshly-isolated human white blood cells', *Mutation Research DNAGing*, 316(2), pp. 91–102. doi: 10.1016/0921-8734(94)90011-6.

- Guyton, A.C., and Hall, John (2014) *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran*. 12th edn. Edited by M. Widjajakusumah and A. Tanzil. Jakarta: EGC.
- Hagerman, A. E. (2011) *The Tannin Handbook, Department of Chemistry and Biochemistry*. Miami: Miami University.
- Hao, S., Hu, J., Song, S., Huang, Da., Xu, Ha., Qian, G., Gan, F., and Huang, K. (2016) ‘*Selenium Alleviates Aflatoxin B1-Induced Immune Toxicity through Improving Glutathione Peroxidase 1 and Selenoprotein S Expression in Primary Porcine Splenocytes*’, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, pp. 1–9. doi: 10.1021/acs.jafc.5b05621.
- Hayati, A. (2011) *Spermatologi*. Surabaya: Airlangga University Press.
- Henkel, R., Sandhu, I. S. and Agarwal, A. (2018) ‘*The excessive use of antioxidant therapy: A possible cause of male infertility?*’, *Andrologia*, 51(1), pp. 1–8. doi: 10.1111/and.13162.
- Hess, R. A. and De Franca, L. R. (2008) ‘*Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium*’, in Cheng, C. Y. (ed.) *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis*. USA, pp. 1–15. doi: 10.1007/978-0-387-09597-4_1.
- Hosen, B., Islam, R., Begum, F., Kabir, Y., and Howlader, Zakir H. (2015) ‘*Oxidative stress induced sperm DNA damage, a possible reason for male infertility*’, *Iranian Journal of Reproductive Medicine*, 13(9), pp. 525–532.
- IAUI (2015) *Panduan Penanganan Infertilitas Pria*. 2nd edn. Jakarta: Ikatan Ahli Urologi Indonesia.
- Ihwah, A., Deoranto, P., Wijana, S., and Dewi, I. A. (2018) ‘*Comparative study between Federer and Gomez method for number of replication in complete randomized design using simulation: Study of Areca Palm (Areca catechu) as organic waste for producing handicraft paper*’, *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 131(1), pp. 0–6. doi: 10.1088/1755-1315/131/1/012049.
- Jablonska, E. and Vinceti, M. (2015) ‘*Selenium and Human Health: Witnessing a Copernican Revolution?*’, *Journal of Environmental Science and Health - Part C Environmental Carcinogenesis and Ecotoxicology Reviews*, 33(3), pp. 328–368. doi: 10.1080/10590501.2015.1055163.
- Jamsai, D. and Bryan, M. K. O. (2011) ‘*Mouse models in male fertility research*’, *Asian Journal of Andrology*, 13(1), pp. 139–151. doi: 10.1038/aja.2010.101.

- Jara, M., Carballada, R. and Esponda, P. (2004) 'Age-induced apoptosis in the male genital tract of the mouse', *Reproduction*, 127(3), pp. 359–366. doi: 10.1530/rep.1.00092.
- Kanazawa, K., Uehara, M., Yanagitani, H., and Hashimoto, T. (2006) 'Bioavailable flavonoids to suppress the formation of 8-OHdG in HepG2 cells', *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 455(2), pp. 197–203. doi: 10.1016/j.abb.2006.09.003.
- Kao, Shu H., Chao, Hsiang T., Chen, Haw W., Hwang, Thomas I.S., Liao, Tien L., and Wei, Yau H. (2008) 'Increase of oxidative stress in human sperm with lower motility', *Fertility and Sterility*, 89(5), pp. 1183–1190. doi: 10.1016/j.fertnstert.2007.05.029.
- Karunasinghe, N., Zhu, S. and Ferguson, L. R. (2016) 'Benefits of selenium supplementation on leukocyte DNA integrity interact with dietary micronutrients: A short communication', *Nutrients*, 8(5), pp. 1–16. doi: 10.3390/nu8050249.
- KC, S., Càrcamo, J. M. and Golde, D. W. (2005) 'Vitamin C enters mitochondria via facilitative glucose transporter 1 (Glut1) and confers mitochondrial protection against oxidative injury', *The FASEB Journal*, 19(12), pp. 1657–1667. doi: 10.1096/fj.05-4107com.
- Khaidir, M. (2006) 'Penilaian tingkat fertilitas dan penatalaksanaannya pada pria', *Kesehatan Masyarakat*, 1(1), pp. 30–34.
- Ko, E. Y., Jr, S. S. and Agarwal, A. (2014) 'Male infertility testing: reactive oxygen species and antioxidant capacity', *Fertility and Sterility*, 102(6), pp. 1518–1527. doi: 10.1016/j.fertnstert.2014.10.020.
- Ko, Sang H., Park, Jae H., Kim, So Y., Lee, Seon W., Chun, Soon S., and Park, Eunju. (2014) 'Antioxidant effects of spinach (*Spinacia oleracea* L.) supplementation in hyperlipidemic rats', *Preventive Nutrition and Food Science*, 19(1), pp. 19–26. doi: 10.3746/pnf.2014.19.1.019.
- Koleckar, V., Kubikova, K., Rehakova, Z., Kuca, K., Jun, D., Jahodar, L., and Opletal, L. (2008) 'Condensed and Hydrolysable Tannins as Antioxidants Influencing the Health', *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 8(5), pp. 436–447. doi: 10.2174/138955708784223486.
- Korkmaz, K. S., Debelec Butuner, B. and Roggenbuck, D. (2018) 'Detection of 8-OHdG as a diagnostic biomarker', *Journal of Laboratory and Precision Medicine*, 3(5), pp. 95–95. doi: 10.21037/jlpm.2018.11.01.
- Krisnadi, A. D. (2015) *Kelor Super Nutrisi*. Blora: Pusat Informasi dan Pengembangan Tanaman Kelor Indonesia.

- Kumar, N. and Singh, A. K. (2018) '*Reactive oxygen species in seminal plasma as a cause of male infertility*', *Journal of Gynecology Obstetrics and Human Reproduction*, 47(10), pp. 565–572. doi: 10.1016/j.jogoh.2018.06.008.
- Kunwar, A. and Priyadarsini, K. . (2011) '*Free radicals, oxidative stress and importance of antioxidants in human health*', *Journal of Medical and Allied Sciences*, 1(2), pp. 53–60.
- Kurniasih (2013) *Khasiat dan Manfaat Daun Kelor Untuk Penyembuhan berbagai Penyakit*. Yogyakarta: Pustaka Baru Press.
- Kusuma, A. S. W. (2015) '*The Effect of Ethanol Extract of Soursop Leaves (Annona muricata L.) to Decreased Levels of Malondialdehyde*', *Jurnal Majority*, 4(3), pp. 14–18.
- Lara, Nathália L.M., Santos, Ivan C., Costa, Guilherme M.J., Cordeiro-Junior, Dirceu A., Almeida, Antônio C.G., Madureira, Ana P., Zanini, Marcos S., and França, Luiz R. (2016) '*Duration of spermatogenesis and daily sperm production in the rodent Proechimys guyannensis*', *Zygote*, 24(5), pp. 783–793. doi: 10.1017/S0967199416000137.
- Lee, D., Moawad, Adel R., Morielli, T., Fernandez, Maria C., and O'Flaherty, Cristian. (2017) '*Peroxiredoxins prevent oxidative stress during human sperm capacitation*', *Molecular Human Reproduction*, 23(2), pp. 106–115. doi: 10.1093/molehr/gaw081.
- Lestari, S. W. dan Sari, T. (2015) '*Fragmentasi DNA Spermatozoa: Penyebab, Deteksi, dan Implikasinya pada Infertilitas Laki-Laki*', *eJournal Kedokteran Indonesia*, 3(2). doi: 10.23886/ejki.3.5050.
- Lim, Y. Y., Lim, T. T. and Tee, J. J. (2007) '*Antioxidant properties of several tropical fruits: A comparative study*', *Food Chemistry*, 103(3), pp. 1003–1008. doi: 10.1016/j.foodchem.2006.08.038.
- Lohmiller, J. J. and Swing, S. P. (2006) *The Laboratory Rat*. second edi. Edited by M. A. Suckow, S. H. Weisbroth, and C. L. Franklin. London: Elsevier Academic Press.
- López-otín, C., Blasco, Maria A., Partridge, L., and Serrano, M. (2013) '*The Hallmarks of Aging*', *Europe PMC Funders Group*, 153(6), pp. 1–47. doi: 10.1016/j.cell.2013.05.039.The.
- Luceri, C., Bigagli, E., Femia, Angelo P., Caderni, G., Giovannelli, L., and Lodovici, Maura. (2018) '*Aging related changes in circulating reactive oxygen species (ROS) and protein carbonyls are indicative of liver*

- oxidative injury*', *Toxicology Reports*, 5(November 2017), pp. 141–145. doi: 10.1016/j.toxrep.2017.12.017.
- Lucio, Rosa A., Tlachi-López, José L., Eguibar, Jose R. and Ágmo, A. (2013) '*Sperm count and sperm motility decrease in old rats*', *Physiology and Behavior*, 110–111, pp. 73–79. doi: 10.1016/j.physbeh.2012.12.015.
- Luconi, M., Forti, G. and Baldi, E. (2006) '*Pathophysiology of sperm motility*', *Frontiers in Bioscience*, 11(2 P.1199-1590), pp. 1433–1447. doi: 10.2741/1894.
- Majzoub, A. and Jr., E. S. (2017) '*Making a Diagnosis*', in Aziz, N. and Agarwal, A. (eds) *The Diagnosis and Treatment of Male Infertility*. Liverpool: Springer International Publishing AG 2017. doi: 10.1177/003591574503800602.
- Martin-Hidalgo, D., Bragado, Maria J., Batista, Ana R., Oliveira, Pedro F., and Alves, Marco G. (2019) '*Antioxidants and male fertility: From molecular studies to clinical evidence*', *MDPI*, 8(89). doi: 10.3390/antiox8040089.
- Martinez-Pastor, F., Guerra, C., Kaabi, M., Diaz, A. R., Anel, E., Herraez, P., De Paz, P., and Anel, L. (2005) '*Decay of sperm obtained from epididymes of wild ruminants depending on postmortem time*', *Theriogenology*, 63(1), pp. 24–40. doi: 10.1016/j.theriogenology.2004.03.003.
- Maynard, R. L. and Downes, N. (2019) *Anatomy and Histology of the Laboratory Rat in Toxicology and Biomedical Research*, Elsevier. Edited by K. Washington. London: Andre Gerhard Wolff. doi: 10.1016/b978-0-12-811837-5.00027-7.
- Mehrotra, A., Katiyar, D. K., Agarwal, A., Das, V., Pant, K. K. (2013) '*Role of total antioxidant capacity and lipid peroxidation in fertile and infertile men*', *Biomedical Research (India)*, 24(3), pp. 347–352.
- Meilina (2009) '*Peranan Antioksidan pada Lanjut Usia*', in *Kepaniteraan Klinik Gerontologi Medik*. Cibubur: Fakultas Kedokteran Universitas Tarumanagara, pp. 718–735.
- Morielli, T. and O'Flaherty, C. (2015) '*Oxidative stress impairs function and increases redox protein modifications in human spermatozoa*', *Reproduction*, 149(1), pp. 113–123. doi: 10.1530/REP-14-0240.
- Munir, M. (2019) *Infertilitas, Ditjen Yankes*. Available at: <http://www.yankes.kemkes.go.id/read--infertilitas-7828.html> (Accessed: 20 April 2020).

- Nainggolan, M., Ahmad, S., Pertiwi, D., and Nugraha, Sony E. (2019) *Fitokimia*. Medan: FAKULTAS FARMASI UNIVERSITAS SUMATERA UTARA.
- Nayak, G., Vadinkar, A., Nair, S., Kalthur, S. G., D'Souza, A. S., Shetty, P. K., Mutalik, S., Shetty, M. M., Kalthur, G., and Adiga, S. K.. (2015) '*Sperm abnormalities induced by pre-pubertal exposure to cyclophosphamide are effectively mitigated by Moringa oleifera leaf extract*', *Andrologia*, 48(2), pp. 125–136. doi: 10.1111/and.12422.
- Ng, K. K., Donat, R., Chan, L., Lalak, A., Di Pierro, I. and Handelsman, D. J.. (2004) '*Sperm output of older men*', *Human Reproduction*, 19(8), pp. 1811–1815. doi: 10.1093/humrep/deh315.
- Padayatty, S. J. and Levine, M. (2016) '*Vitamin C: the known and the unknown and Goldilocks*', *Oral Diseases*, 22(6), pp. 463–493. doi: 10.1111/odi.12446.
- Pamungkas, F. (2012) '*Spermatozoa dari kauda epididimis : kriopreservasi dan pemanfaatan untuk inseminasi buatan dan fertilisasi in vitro*', *Wartazoa*, 22(4), pp. 178–186.
- Pan, Y. (2011) '*Mitochondria, reactive oxygen species, and chronological aging: A message from yeast*', *Experimental Gerontology*, 46(11), pp. 847–852. doi: 10.1016/j.exger.2011.08.007.
- Pangkahila, W. (2011) *Anti Aging Medicine: Tetap Muda dan Sehat*. 1st edn. Jakarta: Penerbit Buku Kompas.
- Parwata, O. A. (2015) *Uji Bioaktivitas : Antioksidan*. Denpasar: Universitas Udayana.
- Phillips, B. T., Gassei, K. and Orwig, K. E. (2010) '*Spermatogonial stem cell regulation and spermatogenesis*', *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 365(1546), pp. 1663–1678. doi: 10.1098/rstb.2010.0026.
- Piomboni, P., Focarelli, R., Stendardi, A., Ferramosca, A. and Zara, V.. (2012) '*The role of mitochondria in energy production for human sperm motility*', *International Journal of Andrology*, 35(2), pp. 109–124. doi: 10.1111/j.1365-2605.2011.01218.x.
- Pisoschi, A. M. and Pop, A. (2015) '*The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review*', *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97, pp. 55–74. doi: 10.1016/j.ejmech.2015.04.040.
- Pocock, S. J. (2013) *Clinical Trial a Practical Approach*. Edited by J. Wiley and Sons. New York: Toronto-Brisbane.

- Puteri, F. and Nainggolan, R. J. (2015) '*Pengaruh Konsentrasi CMC (Carboxy Methyl Cellulose) dan Lama Penyimpanan Terhadap Mutu Sorbet Sari Buah*', *Jurnal Rekayasa Pangan dan Pertanian*, 3(4), pp. 465–470.
- Putra, D. P., Dharmayudha, O. dan Sudimartini (2017) '*Identifikasi Senyawa Kimia Ekstrak Etanol Daun Kelor (Moringa oleifera L) di Bali*', *Indonesia Medicus Veterinus*, 5(5), pp. 464–473.
- Qian, G., Xue, K., Tang, L., Wang, F., Song, X., Chyu, Ming C., Pence, Barbara C., Shen, Chwan L., and Wang, Jia S. (2012) '*Mitigation of Oxidative Damage by Green Tea Polyphenols and Tai Chi Exercise in Postmenopausal Women with Osteopenia*', *PLoS ONE*, 7(10). doi: 10.1371/journal.pone.0048090.
- R. Dias, T., Martin-Hidalgo, D., M. Silva, B., F. Oliveira, P., and G. Alves, Marco. (2020) '*Endogenous and Exogenous Antioxidants As a Tool to Ameliorate Male Infertility Induced by Reactive Oxygen Species*', *Antioxidants and Redox Signaling*, 33(11), pp. 767–785. doi: 10.1089/ars.2019.7977.
- Rajender, S., Rahul, P. and Mahdi, A. A. (2010) '*Mitochondria, spermatogenesis and male infertility*', *Mitochondrion*, 10(5), pp. 419–428. doi: 10.1016/j.mito.2010.05.015.
- Rangel-Huerta, Oscar D., Aguilera, Concepcion M., Martin, Maria V., Soto, Maria J., Rico, Maria C., Vallejo, F., Tomas-Barberan, F., Perez-de-la-Cruz, Antonio J., Gil, A., and Mesa, Maria D.. (2015) '*Normal or high polyphenol concentration in orange juice affects antioxidant activity, blood pressure, and body weight in obese or overweight adults*', *Journal of Nutrition*, 145(8), pp. 1808–1816. doi: 10.3945/jn.115.213660.
- Razis, A. F. A., Ibrahim, M. D. and Kntayya, S. B. (2014) '*Health Benefits of Moringa oleifera*', *Asian Pacific journal of cancer prevention (APJCP)*, 15(20), pp. 8571–8576.
- Riedl, Ken M., Carando, S., Alessio, Helaine M., McCarthy, M., and Hagerman, Ann E.. (2015) '*Antioxidant Activity of Tannins and Tannin - Protein Complexes: Assessment in Vitro and in Vivo*', in *ACS Symposium Series*, pp. 188–200. doi: 10.1021/bk-2002-0807.ch014.
- Rolland, A. D., Jégou, B. and Pineau, C. (2008) '*Testicular Development and Spermatogenesis: Harvesting the Postgenomics Bounty*', in Cheng, C. Y. (ed.) *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis*. USA.
- Sabeti, P., Pourmasumi, S., Rahiminia, T., Akyash, F., and Talebi, Ali Reza. (2016) '*Etiologies of sperm oxidative stress*', *International Journal of*

- Reproductive BioMedicine*, 14(4), pp. 231–240. doi: 10.29252/ijrm.14.4.231.
- Sadler, T. W. (2012) *Langman's medical embryology*. 12th edn. Edited by L. Williams and Waikins. Philadelphia: Wolter Kluwer. doi: 10.1017/CBO9781107415324.004.
- Sahu CR (2016) 'Reactive Oxygen Species Turns Men Infertile but Vitamin C Prohibits - Behind the Scene', *Austin Andrology*, 1(2).
- Salmon, A. B., Richardson, A. and Pérez, V. I. (2010) 'Update on the oxidative stress theory of aging: Does oxidative stress play a role in aging or healthy aging?', *Free Radic Biol Med*, 11(5), pp. 386–392. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.12.015.
- Sandhar, Harleen K., Kumar, B., Prasher, S., Tiwari, P., Salhan, M., and Sharma, Pardeep. (2011) 'A Review of Phytochemistry and Pharmacology of Flavonoids', *Internationale Pharmaceutica Scientia*, 1(1), pp. 25–41. Available at: <http://www.ipharmsciencia.com>.
- Sanz, A. and Stefanatos, R. K. A. (2008) 'The mitochondrial free radical theory of aging', *Current Aging Science*, 1(1), pp. 10–27. doi: 10.1016/B978-0-12-394625-6.00001-5.
- Scheffler, I. E. (2008) *Mitochondria*. second. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc. Available at: <http://library1.nida.ac.th/termpaper6/sd/2554/19755.pdf>.
- Sengupta, P. (2013) 'The laboratory rat: Relating its age with human's', *International Journal of Preventive Medicine*, 4(6), pp. 624–630.
- Sharma, R. and Agarwal, A. (2011) 'Spermatogenesis', in *Sperm Chromatin: Biological and Clinical Applications in Male Infertility and Assisted Reproduction*. USA: Springer Science, pp. 19–44. doi: 10.1007/978-1-4419-6857-9.
- Sharp, P. and Villano, J. (2012) *The laboratory rat*. second, Elsevier. second. Edited by M. A. Suckow. Indiana. doi: 10.1201/b13862.
- Sherwood, L. (2015) *Fisiologi Manusia: Dari Sel ke Sistem*. 8th edn. Edited by H. Octavius, A. A. Mahode, and D. Ramadhani. Jakarta: EGC.
- Shi, D., Liao, S., Guo, S., Li, H., Yang, M., and Tang, Zhaoxin. (2015) 'Protective Effects of Selenium on Aflatoxin B1-induced Mitochondrial Permeability Transition, DNA Damage, and Histological Alterations in Duckling Liver', *Biological Trace Element Research*, 163(1–2), pp. 162–168. doi: 10.1007/s12011-014-0189-z.

- Simbolon, I. S., Lubis, T. M. and Adam, M. (2013) '*Persentase Spermatozoa Hidup Pada Tikus Wistar Dan Sprague-Dawley*', *Jurnal Medika Veterinaria*, 7(2). doi: 10.21157/j.med.vet.v7i2.2935.
- Singh, Gurvinder P., Garg, R., Bhardwaj, S., and Sharma, Sandeep K. (2012) '*Anti Inflammatory Evaluation of Leaf Extract of Moringa Oleifera*', *Journal of Pharmaceutical and Scientific Innovation*, 1(1), pp. 22–24.
- Smetanska, I. (2018) '*Sustainable Production of Polyphenols and Antioxidants by Plant In Vitro Cultures*', in *Bioprocessing of Plant In Vitro Systems*. Germany: Springer International Publishing AG 2018. doi: 10.1007/978-3-319-32004-5.
- Sram, R. J., Binkova, B. and Rossner, P. (2012) '*Vitamin C for DNA damage prevention*', *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 733(1–2), pp. 39–49. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2011.12.001.
- Sreelatha, S. and Padma, P. R. (2011) '*Modulatory effects of Moringa oleifera extracts against hydrogen peroxide-induced cytotoxicity and oxidative damage*', *Human and Experimental Toxicology*, 30(9), pp. 1359–1368. doi: 10.1177/09603271110391385.
- Stephen J. McPhee, W. F. G. (2011) *Patofisiologi Penyakit*. 5th edn. Edited by dr. F. Dany. Jakarta: EGC.
- Sudjarwo (2004) '*8-Hidroksi-deoksiganosin sebagai salah satu indikator infertilitas pria*', *Journal of Biological Researches*, 10(1), pp. 43–47. doi: 10.23869/bphjbr.10.1.20048.
- Avula, S., Parikh, S., Demarest, S., Kurz, J., and Gropman, A. (2013) '*A Modern Approach to the Treatment of Mitochondrial Disease*', *Curr Treat Options Neurol*, 11(6), pp. 414–430.
- Suseno, M. (2013) *Sehat dengan Daun : Melawan Berbagai Macam Penyakit*. Yogyakarta: Buku Pintar.
- Susilawati, T. (2011) *Spermatology*. Malang: Universitas Brawijaya Press (UB Press).
- Susmiarsih, T. (2010) '*Peran Genetik DNA Mitokondria (mtDNA) Pada Motilitas Spermatozoa*', *Majalah Kesehatan PharmaMedika*, (2), pp. 178–184.
- Syarifuddin, Nursyam A., Toleng, Abdul L., Rahardja, Djoni P., and Yusuf,

- Muhammad. (2017) '*Moringa oleifera* Leaves Sources of the Mineral Zinc (Zn) to Increase the Libido and Semen Quality of Bali Bulls', pp. 180–186.
- Szymańska-Chabowska, A., Beck, A., Poręba, R., Andrzejak, R., and Antonowicz-Juchniewicz, J.. (2009) '*Evaluation of DNA damage in people occupationally exposed to arsenic and some heavy metals*', *Polish Journal of Environmental Studies*, 18(6), pp. 1131–1139.
- Tarng, Der C., Huang, Tung P., Wei, Yau H., Liu, Tsung Y., Chen, Haw W., Wen Chen, T., and Yang, Wu C. (2000) '*8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine of leukocyte DNA as a marker of oxidative stress in chronic hemodialysis patients*', *American Journal of Kidney Diseases*, 36(5), pp. 934–944. doi: 10.1053/ajkd.2000.19086.
- Toripah, S. S., Abidjulu, J. and Frenly Wehantouw (2014) '*Aktivitas Antioksidan dan Kandungan Total Fenolik Ekstrak Daun Kelor (Moringa Oleifera Lam)*', 3(4), pp. 37–43.
- Turrens, J. F. (2003) '*Mitochondrial formation of reactive oxygen species*', *Journal of Physiology*, 552(2), pp. 335–344. doi: 10.1113/jphysiol.2003.049478.
- Utami, S. (2009) '*Etiologi Infertilitas pada Pria Akibat dari Mutasi DNA Mitokondria (mtDNA)*', *Jkm*, 9(1), pp. 85–94.
- Valavanidis, A., Vlahoyianni, T. and Fiotakis, K. (2005) '*Comparative study of the formation of oxidative damage marker 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) adduct from the nucleoside 2'-deoxyguanosine by transition metals and suspensions of particulate matter in relation to metal content and redox reactivity*', *Free Radical Research*, 39(10), pp. 1071–1081. doi: 10.1080/10715760500188671.
- Van Houten, B., Santa-Gonzalez, G. A. and Camargo, M. (2018) '*DNA repair after oxidative stress: Current challenges*', *Current Opinion in Toxicology*, 7, pp. 9–16. doi: 10.1016/j.cotox.2017.10.009.
- Venkatesh, S., Deecaraman, M., Kumar, R., Shamsi, M. B., and Dada, Rima. (2009) '*Role of reactive oxygen species in the pathogenesis of mitochondrial DNA (mtDNA) mutations in male infertility*', *Indian Journal of Medical Research*, 129(2), pp. 127–137.
- Wahid, A., Diah, M. and Rama, M. (2017) '*Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Air dan Ekstrak Etanol Daun Kelor (Moringa Oleifera LAM) Antioxidant Activity Tests of Water and Ethanol Extracts of Moringa (Moringa oleifera LAM) Leaves*', 6(May), pp. 125–131.

- Wasonowati, C., Sulistyarningsih, E., Indradewa, D., dan Kurniasih, Budiastuti. (2019) '*Analisis Fitokimia Ekstrak Daun Kelor (Moringa oleifera Lamk) di Madura*', *Prosiding SEMNASDAL (Seminar Nasional Sumber daya Lokal)*, 2(9), pp. 421–427.
- Webb, M., Sideris, D. P. and Biddle, M. (2019) '*Modulation of mitochondrial dysfunction for treatment of disease*', *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 29(11), pp. 1270–1277. doi: 10.1016/j.bmcl.2019.03.041.
- Widiastini, L. P., Karuniadi, I. G. A. M. dan Tangkas, M. (2021) '*Senyawa Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Kelor (Moringa Oleifera) di Denpasar Selatan Bali*', *Media Kesehatan Politeknik Kesehatan Makassar*, XVI(1), pp. 135–139. doi: <https://doi.org/10.32382/medkes.v16i1.2038>.
- Winarsih, H. (2011) *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas : Potensi dan Aplikasi dalam Kesehatan*. 5th edn. Yogyakarta: Kanisius.
- World Health Organization (2010) *Examination and processing of human semen*. 5th edn, *World Health*. 5th edn. Brazil. doi: 10.1038/aja.2008.57.
- Yoboue, E. D., Sitia, R. and Simmen, T. (2018) '*Redox crosstalk at endoplasmic reticulum (ER) membrane contact sites (MCS) uses toxic waste to deliver messages*', *Cell Death and Disease*, 9(3). doi: 10.1038/s41419-017-0033-4.
- Yuan, J., Yang, D., Liang, Y., Gao, W., Ren, Z., Zeng, W., Wang, B., Han, J., and Guo, D. (2012) '*Alkaloids from Areca (Betel) Nuts and Their Effects on Human Sperm Motility In Vitro*', *Journal of Food Science*, 77(4), pp. 70–78. doi: 10.1111/j.1750-3841.2012.02653.x.
- Zalukhu, M. L., Phyma, A. R. dan Pinzon, R. T. (2016) '*Proses Menua, Stres Oksidatif dan Peran Antioksidan*', *CDK Journal*, 43(10), pp. 733–736.
- Zeb, A. (2020) '*Concept, mechanism, and applications of phenolic antioxidants in foods*', *Journal of Food Biochemistry*, 44(9), pp. 1–22. doi: 10.1111/jfbc.13394.
- Zeghad, N., Ahmed, E., Belkhiri, A., Heyden, Yvan V., and Demeyer, K. (2019) '*Antioxidant activity of Vitis vinifera, Punica granatum, Citrus aurantium and Opuntia ficus indica fruits cultivated in Algeria*', *Heliyon*, 5(4), p. e01575. doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e01575.



KOMISI ETIK PENELITIAN (KEP)
 FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS UDAYANA/
 RUMAH SAKIT UMUM PUSAT SANGLAH DENPASAR

Jalan P. Serangan Denpasar Bali (80114) Telp. (0361) 227911-15 (P.227), (0361) 244534

Nomor : 127 /UN14.2.2.VII.14/LT/2021
 Lampiran : 1 lembar
 Perihal : Penyerahan *Ethical Clearance*

Kepada Yth

Luh Putu Widiastini

di-Tempat

Dengan hormat,

Bersama ini kami menyerahkan *Ethical Clearance*/Keterangan Kelaikan Etik Nomor: 100/UN14.2.2.VII.14/LT/2021, tertanggal 14 Januari 2021

Hal-hal yang perlu diperhatikan:

1. Setelah selesai penelitian wajib menyerahkan 1 (satu) copy hasil penelitiannya.
2. Jika ada perubahan yang menyangkut dengan hal penelitian tersebut mohon melaporkan Ke Komisi Etik Penelitian (KEP) FK. UNUD/RSUP Sanglah Denpasar

Demikian kami sampaikan, atas perhatian dan kerjasamanya kami ucapkan terima kasih.

Denpasar, 18-01-2021
 Komisi Etik Penelitian (KEP) FK.UNUD/
 RSUP Sanglah Denpasar.
 Ketua,

Prof. Dr. dr. I Gde Raka Widiana, Sp.PD-KGH
 NIP.195607071982111001

Tembusan :

1. Koordinator Program Studi Doktor Ilmu Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Udayana
2. Ka. Laboratory Animal Unit Departemen Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Udayana
3. Arsip,-



KOMISI ETIK PENELITIAN (KEP)
 FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS UDAYANA/
 RUMAH SAKIT UMUM PUSAT SANGLAH DENPASAR

Jalan P. Serangan Denpasar Bali (80114) Telp. (0361) 227911-15 (P.227), (0361) 244534

KETERANGAN KELAIKAN ETIK
 (ETHICAL CLEARANCE)
 No: 100/UN14.2.2.VII.14/LT/2021

Komisi Etik Penelitian Fakultas Kedokteran Universitas Udayana/Rumah Sakit Umum Pusat Sanglah Denpasar, setelah mempelajari dengan seksama rancangan penelitian yang diusulkan dengan ini menyatakan bahwa penelitian dengan judul :

**"PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL DAUN KELOR (*MORINGA OLEIFERA*)
 MENYEBABKAN *MOTILITAS PROGRESIF SPERMATOZOA* LEBIH TINGGI DAN 8-
HYDROXYDEOXYGUANOSINE (8-OHdG) LEBIH RENDAH PADA TIKUS (*RATTUS*
NORVEGICUS) GALUR *WISTAR* USIA TUA"**

Peneliti Utama : Luh Putu Widiastini

Unit/Lembaga/Tempat Penelitian : Lab. Animal Unit Departemen Farmakologi FK.UNUD

Nomor Protokol : 2020.03.1.1151

Dinyatakan **Laik Etik**. Surat Keterangan ini berlaku selama satu tahun sejak ditetapkan. Adapun jenis laporan yang harus disampaikan kepada komisi etik :

Progress report setiap..... bulan
 Final report

Denpasar, 14 Januari 2021
 Komisi Etik Penelitian
 Fakultas Kedokteran Universitas Udayana/
 Rumah Sakit Umum Pusat Sanglah Denpasar

Ketua,

 Prof. Dr. dr. I Gde Raka Widiana, Sp.PD-KGH
 NIP. 19560707198211101

HASIL UJI FITOKIA EKSTRAK ETANOL DAUN KELOR (MORINGA OLEIFERA) DENPASAR SELATAN

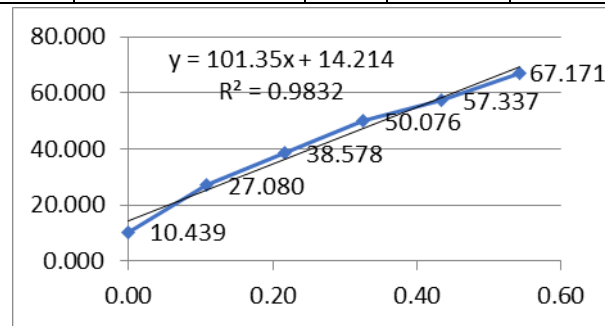
Kode	IC 50	Kaps Atioksidan	Fenol	Flavonoid	Tanin	Vit C	Saponin	Alkaloid
	Ppm	mg/L GAEAC	mg/100 g	mg/100 g	mg/100 g	mg/100ml		
Ekstrak Daun Kelor	353.09	1812.95	1556.52	23546.12	1300.34	23798.077	Positif (+)	Positif (+)

IC 50

Kode	W spl		Kon. Spl mg/mL	Kons. Volume Dipipet (uL) mg/mL					
	g	mg		0	20	40	60	80	100
Ekstrak Kelor	0.01360	13.6	2.72	0.00	0.11	0.22	0.33	0.44	0.54

Ekstrak Kelor

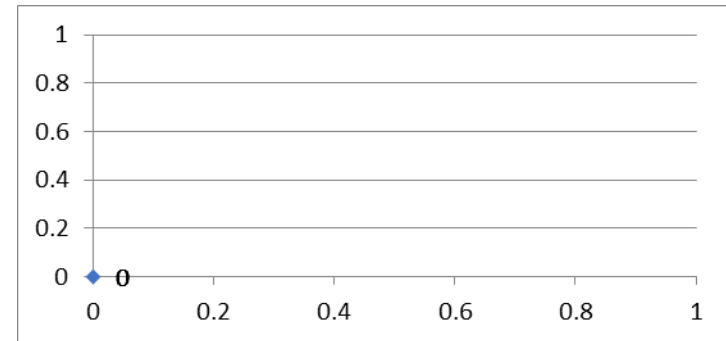
Kons mg/mL	Abs	IC %
0.00	0.592	10.439
0.11	0.482	27.080
0.22	0.406	38.578
0.33	0.330	50.076
0.44	0.282	57.337
0.54	0.217	67.171



y =	101.35	x	14.214	IC 50%	Ekstrak Kelor	0.35	mg/mL	353.0932	ppm
-----	--------	---	--------	--------	---------------	-------------	-------	-----------------	-----

Kapasitas Antioksidan

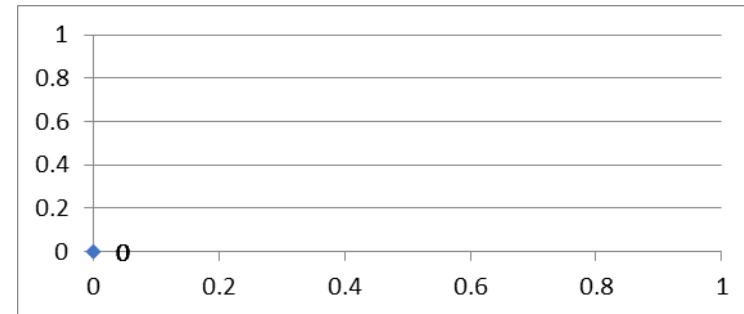
STOK STANDAR		100	ppm	
ASAM GALAT		SPETROFOTOMETRI		
DIPIPET		DIJADIKAN	KONS	ABS
uL	mL	mL	mg/L	
0	0	0.5	0	0.560
10	0.001	0.5	0.2	0.481
20	0.002	0.5	0.4	0.435
30	0.003	0.5	0.6	0.355
50	0.005	0.5	1	0.207



	w (g)		mg	abs	x (mg/L)		fp	kdr (mg/mL)	
Sampel								%	mg/L GAEAC
Ekstrak Kelor	0.01360	2.720	13.6	0.217	0.986	0.00	5	0.1813	1,812.95

Fenol

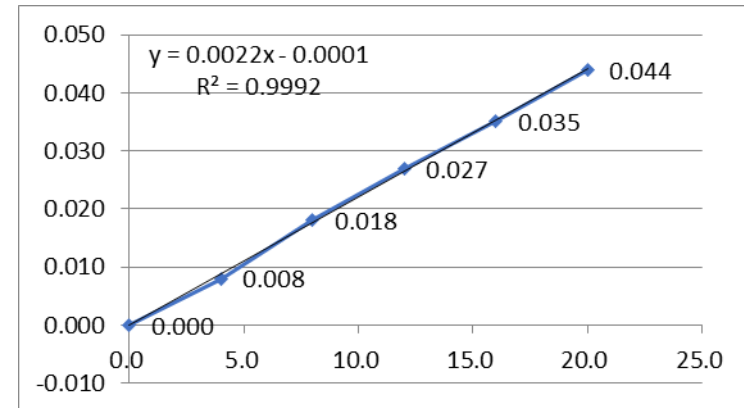
STOK STANDAR ASAM GALAT		100 ppm SPETROFOTOMETRI		
DIPIPET		DIJADIKAN	KONS	ABS
uL	mL	mL	mg/L	1
0	0.00	0.4	0.0	0.000
10	0.01	0.4	2.5	0.057
20	0.02	0.4	5.0	0.127
40	0.04	0.4	10.0	0.289
60	0.06	0.4	15.0	0.471
80	0.08	0.4	20.0	0.641
100	0.1	0.4	25.0	0.815



Kode	Berat sampel		Kons Spl	Abs	Kons (x)		fp	Kadar FENOL GAE	
spl	g	mg	mg/5 mL		mg/L	mg/mL	100/400	%	mg/100 g
Ekstrak Kelor	0.01360	13.60	2.7200	0.327	10.5843	0.0106	4	1.5565	1,556.52

Flavonoid

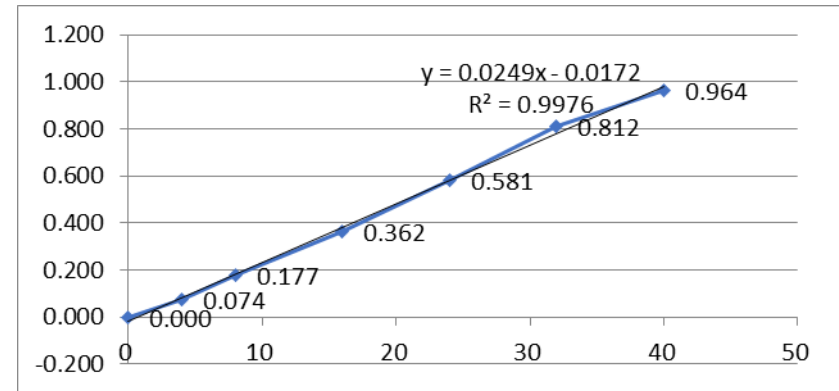
STOK STANDAR QUARSETIN		100 ppm SPETROFOTOMETRI		
DIPIPET		DIJADIKAN	KONS	ABS
uL	mL	mL	mg/L	
0	0.00	5.0	0.0	0.000
20	0.02	5.0	4.0	0.008
40	0.04	5.0	8.0	0.018
60	0.06	5.0	12.0	0.027
80	0.08	5.0	16.0	0.035
100	0.10	5.0	20.0	0.044



Kode	Berat sampel		Kons Spl	Abs	Kons (x)		fp	Kadar Flavonoid		
	g	mg			mg/L	mg/mL		%	mg/100 g	
Ekstrak Kelor	0.0136	13.60	2.720	0.141	64.0455	0.064045	50/500	10	23.5461	23546.12

Tannin

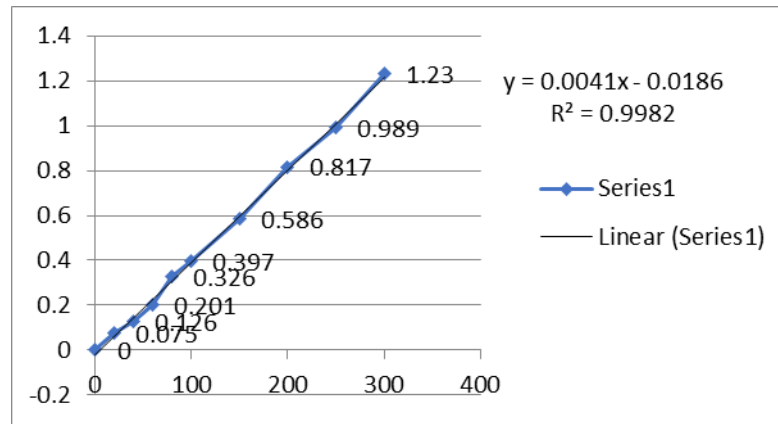
STOK STANDAR ASAM TANAT		100 ppm SPETROFOTOMETRI		
DIPIPET		DIJADIKA N	KONS	ABS
uL	mL	mL	mg/L	1
0	0.00	0.25	0	0.000
10	0.01	0.25	4	0.074
20	0.02	0.25	8	0.177
40	0.04	0.25	16	0.362
60	0.06	0.25	24	0.581
80	0.08	0.25	32	0.812
100	0.10	0.25	40	0.964



Kode	Berat sampel		Kons Spl mg/5 mL	Abs	Kons (x)		fp	Kadar TANIN TAE	
	g	mg			mg/L	mg/mL		%	mg/100 g
Ekstrak Kelor	0.0111	11.10	2.22	0.736	28.87	0.02886 7	1	1.3003	1300.34

Vitamin C

konsentrasi	absorbansi
0	0
20	0.075
40	0.126
60	0.201
80	0.326
100	0.397
150	0.586
200	0.817
250	0.989
300	1.230



Sampel	w (g)	Kons Spl mg/5 mL	mg	abs	x (mg/L)	x(mg/mL)	fp	kdr		
								%	mg/L	mg/100ml
Ekstrak Kelor	0.0104	2.0800	10.4	0.252	66.000	0.07	7.5	23.7981	237,980.8	23,798.1

PERHITUNGAN MOTILITAS SPERMATOZOA KONTROL

KO 1	A	B	C	D	KO 5				
1	26	24	33	17	1	18	22	29	31
2	24	22	28	26	2	22	11	31	36
3	17	19	37	27	3	9	26	35	30
4	26	29	31	14	4	23	31	20	26
5	19	21	33	27	5	25	20	16	39
6	21	25	30	24	6	22	19	15	44
	133	140	192	135		119	129	146	206
	22.17	23.33	32.00	22.50		19.83	21.50	24.33	34.33
KO 2					KO 6				
1	13	26	25	36	1	17	12	39	32
2	25	22	34	19	2	24	17	36	23
3	7	21	31	41	3	20	23	33	24
4	21	26	22	31	4	29	8	33	30
5	25	19	26	30	5	21	23	15	41
6	26	21	22	31	6	24	24	20	32
	117	135	160	188		135	107	176	182
	19.50	22.50	26.67	31.33		22.50	17.83	29.33	30.33
KO 3					KO 7				
1	22	19	32	27	1	22	25	35	18
2	22	21	36	21	2	20	18	29	33
3	7	14	11	68	3	20	22	27	31
4	26	22	27	25	4	21	11	23	45
5	21	26	33	20	5	26	33	15	26
6	23	16	19	42	6	24	31	18	27
	121	118	158	203		133	140	147	180
	20.17	19.67	26.33	33.83		22.17	23.33	24.50	30.00
KO 4					KO 8				
1	22	23	27	28	1	25	18	23	34
2	19	22	34	25	2	24	26	36	14
3	21	24	32	23	3	21	28	33	18
4	25	22	28	25	4	21	34	20	25
5	21	27	25	27	5	25	14	22	39
6	25	22	23	30	6	18	18	24	40
	133	140	169	158		134	138	158	170
	22.17	23.33	28.17	26.33		22.33	23.00	26.33	28.33

KO 9					KO 13				
1	19	22	39	20	1	21	25	32	22
2	23	23	32	22	2	22	28	30	20
3	25	17	34	24	3	29	22	33	16
4	16	27	30	27	4	21	49	18	12
5	17	18	32	33	5	19	45	22	14
6	15	15	46	24	6	25	44	26	5
	115	122	213	150		137	213	161	89
	19.17	20.33	35.50	25.00		22.83	35.50	26.83	14.83
KO 10					KO 14				
1	26	20	31	23	1	21	26	31	22
2	21	21	35	23	2	23	21	29	27
3	21	27	34	18	3	24	23	31	22
4	14	28	32	26	4	21	48	21	10
5	12	20	36	32	5	19	40	27	14
6	22	24	34	20		36	40	11	13
	116	140	202	142		144	198	150	108
	19.3333	23.3333	33.6667	23.6667		24.00	33.00	25.00	18.00
KO 11					KO 15				
	A	B	C	D	1	29	24	27	20
1	21	21	28	30	2	21	28	35	16
2	22	25	31	22	3	25	29	31	15
3	24	23	32	21	4	25	39	29	7
4	23	22	32	23	5	24	28	32	16
5	14	26	42	18	6	26	22	29	23
6	19	29	31	21		150	170	183	97
	123	146	196	135		25.00	28.33	30.50	16.17
	20.50	24.33	32.67	22.50					
KO 12					KO16				
1	21	27	30	22	1	24	27	29	20
2	23	22	29	26	2	21	12	35	32
3	20	24	27	29	3	25	25	30	20
4	20	37	31	12	4	26	18	32	24
5	22	35	29	14	5	12	34	27	27
6	31	42	15	12	6	33	12	35	20
	137	187	161	115		141	128	188	143
	22.83	31.17	26.83	19.17		23.50	21.33	31.33	23.83

KO 17

1	21	28	29	22
2	12	7	36	45
3	26	25	31	18
4	26	2	31	41
5	21	24	36	19
6	12	29	31	28
	118	115	194	173
	19.67	19.17	32.33	28.83

KETERANGAN :

- A SPERMATOZOA BERGERAK KE DEPAN
- B SPEMATOZOA BERGERAK CEPAT TIDAK BERATURAN
- C SPERMATOZOA BERGERAK DI TEMPAT
- D SPERMATOZOA TIDAK BERGERAK

Analisis *Motilitas Spermatozoa*

Case Processing Summary						
	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
Motilitas Progresif Kelompok Perlakuan	17	50.0%	17	50.0%	34	100.0%
Motilitas Progresif kelompok Kontrol	17	50.0%	17	50.0%	34	100.0%

Descriptives

			Statistic	Std. Error
Motilitas Progresif Kelompok Perlakuan	Mean		28.6084	.56131
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	27.4185	
		Upper Bound	29.7984	
	5% Trimmed Mean		28.7966	
	Median		28.6700	
	Variance		5.356	
	Std. Deviation		2.31435	
	Minimum		22.00	
	Maximum		31.83	
	Range		9.83	
	Interquartile Range		2.25	
	Skewness		-1.345	.550
	Kurtosis		3.314	1.063
	Motilitas Progresif kelompok Kontrol	Mean		21.6278
95% Confidence Interval for Mean		Lower Bound	20.7025	
		Upper Bound	22.5532	
5% Trimmed Mean			21.5770	
Median			22.1700	
Variance			3.239	
Std. Deviation			1.79975	
Minimum			19.17	
Maximum			25.00	
Range			5.83	
Interquartile Range			3.08	
Skewness			.107	.550
Kurtosis			-1.101	1.063

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Motilitas Progresif Kelompok Perlakuan	.190	17	.106	.892	17	.050
Motilitas Progresif kelompok Kontrol	.207	17	.052	.923	17	.165

a. Lilliefors Significance Correction

Test of Homogeneity of Variances

Motilitas Progresif

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.006	1	32	.939

T-Test

Group Statistics

	Kelompok	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Motilitas Progresif	Perlakuan	17	28.6084	2.31435	.56131
	Kontrol	17	21.6278	1.79975	.43650

Independent Samples Test

	Levene's Test for Equality of Variances	t-test for Equality of Means								
		F	Sig.	t	df	Sig. (2- tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
Motilitas Progresif	Equal variances assumed	.006	.939	9.817	32	.000	6.98059	.71106	5.53221	8.42897
	Equal variances not assumed			9.817	30. 170	.000	6.98059	.71106	5.52875	8.43242



KEMENTERIAN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN

UNIVERSITAS UDAYANA

FAKULTAS KEDOKTERAN

DEPARTEMEN PATOLOGI KLINIS

RSUP Sanglah, Jl. Diponegoro, Denpasar 80114 Tel./Fax. : 0361-227911 ext :204

Rat 8-OHdG

Penelitian Widia

No	No Sampel	Absorbans	kadar 8-OHdG (ng/ml)
1	K1	0.340	0.84
2	K2	1.632	19.84
3	K3	1.635	19.98
4	K4	1.747	25.21
5	K5	1.756	25.63
6	K6	1.828	29.00
7	K7	1.982	36.19
8	K8	1.986	36.37
9	K9	1.894	32.08
10	K10	1.602	18.44
11	K11	1.660	21.15
12	K12	1.701	23.07
13	K13	1.978	36.00
14	K14	1.792	27.32
15	K15	1.964	35.35
16	K16	1.993	36.70
17	K17	1.917	33.15

No	No Sampel	Absorbans	kadar 8-OHdG (ng/ml)
18	P1	1.699	22.97
19	P2	1.630	19.75
20	P3	1.851	30.07
21	P4	1.884	31.61
22	P5	1.435	11.70
23	P6	1.878	31.33
24	P7	0.603	1.38
25	P8	0.654	1.49
26	P9	0.229	0.54
27	P10	1.031	7.54
28	P11	1.617	19.14
29	P12	1.843	29.70
30	P13	1.790	27.22
31	P14	1.893	32.03
32	P15	0.433	1.03
33	P16	1.821	28.67
34	P17	1.435	11.70

	Absorbans	Kadar(ng/ml)
Blank	0.056	0
STOK	1.721	24
ST 5	1.464	12
ST 4	0.882	6
ST 3	0.676	3
ST 2	0.660	1.5
ST 1	0.297	0.75

Denpasar, 12 Maret 2021
 Ka. Departemen Patologi Klinis
 Fakultas Kedokteran
 Universitas Udayana

Dr. dr. I Nyoman Wande, Sp.PK(K)
 Nip 19791116212003

Kadar 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) Spermatozoa

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
8OHdG Perlakuan	17	50.0%	17	50.0%	34	100.0%
8OHdG Kontrol	17	50.0%	17	50.0%	34	100.0%

Descriptives

			Statistic	Std. Error
8OHdG Perlakuan	Mean		18.1065	2.96996
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	11.8104	
		Upper Bound	24.4025	
	5% Trimmed Mean		18.3089	
	Median		19.7500	
	Variance		149.951	
	Std. Deviation		12.24545	
	Minimum		.54	
	Maximum		32.03	
	Range		31.49	
	Interquartile Range		25.37	
	Skewness		-.331	.550
	Kurtosis		-1.591	1.063
	Mean		26.8341	2.26330
8OHdG Kontrol	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	22.0361	
		Upper Bound	31.6321	
	5% Trimmed Mean		27.7301	
	Median		27.3200	
	Variance		87.083	
	Std. Deviation		9.33181	
	Minimum		.84	
	Maximum		36.70	
	Range		35.86	
	Interquartile Range		15.11	
	Skewness		-1.279	.550
	Kurtosis		2.429	1.063

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
8OHdG Perlakuan	.183	17	.132	.861	17	.016
8OHdG Kontrol	.145	17	.200*	.872	17	.023

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Test of Homogeneity of Variances

Uji 8OHdG

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3.714	1	32	.063

Mann-Whitney Test

Ranks

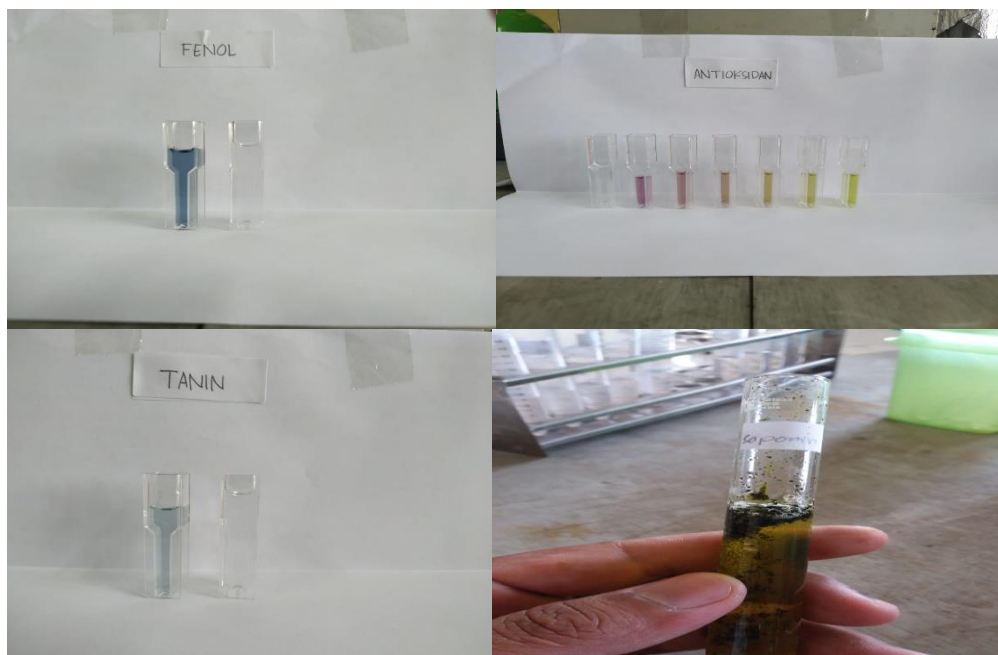
	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Uji 8OHdG	Perlakuan	17	13.82	235.00
	Kontrol	17	21.18	360.00
	Total	34		

Test Statistics^a

	Uji 8OHdG
Mann-Whitney U	82.000
Wilcoxon W	235.000
Z	-2.153
Asymp. Sig. (2-tailed)	.031
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.031 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

FOTO PENELITIAN**Ekstrak Etanol Daun Kelor (Moringa Oleifera)****Uji Fitokimia Ekstrak Etanol Daun Kelor (Moringa Oleifera)**

**PEMELIHARAAN TIKUS, PEMBERIAN EKSTRAK DAN PENGUJIAN
TIKUS DALAM KANDANG**



TIKUS DITIMBANG



**KELOMPOK PERLAKUAN DI BERI EKSTRAK ETANOL DAUN
KELOR (MORINGA OLEIFERA) 50 MG/KG BB 0.5 CC**



KELOMPOK KONTROL DI BERI CMC 0.5%, 0.5 CC



TIKUS DI ANASTESI

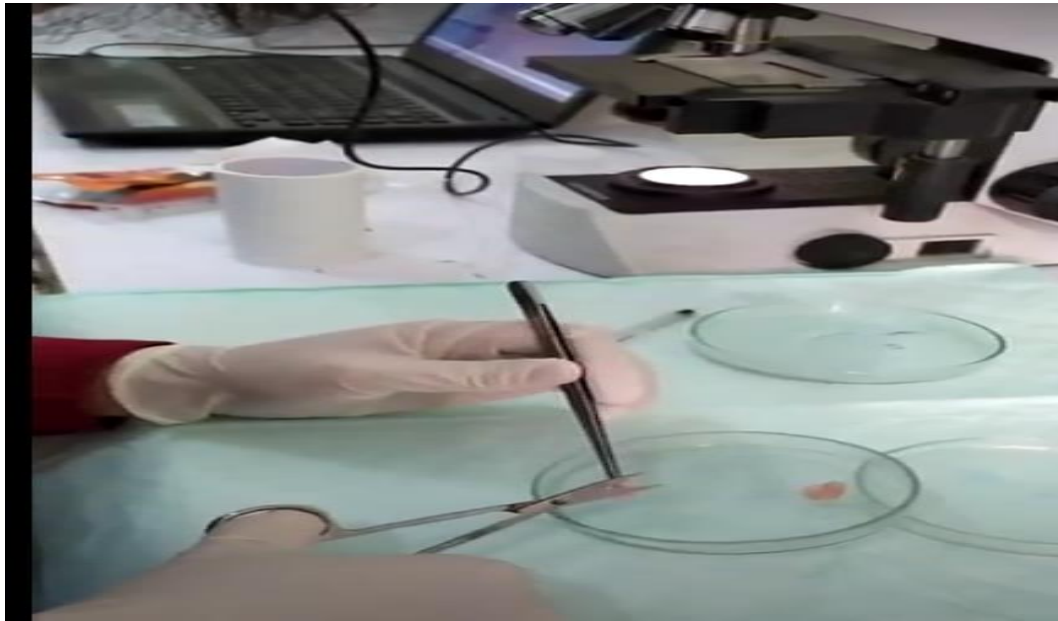


TIKUS DI CERVICAL DISLOCATION

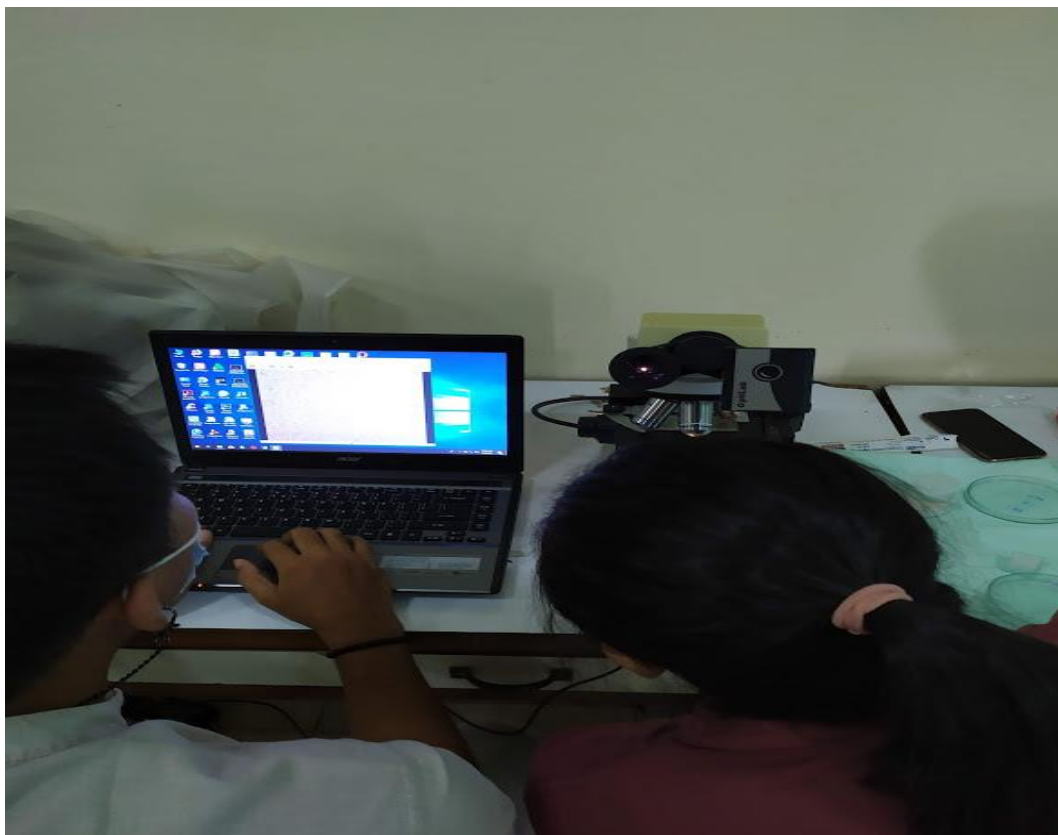


PEMBEDAHAN TIKUS**PENGAMBILAN CAUDA EPIDIDIMIS**

PENGAMBILAN SPERMATOZOA



ANALISIS MOTILITAS SPERMATOZOA



PEMERIKSAAN 80HDG SPERMATOZOA