

Pengaruh Ekstrak Etanol 96% Akar Saluang Belum (*Luvunga Sarmentosa*) Terhadap Integritas Membran Spermatozoa *In Vitro*

Effect of Ethanol Extract of Saluang Belum (*Luvunga Sarmentosa*) on Spermatozoa Membrane Integrity *In Vitro*

Silvani Permatasari¹

Zoelva Oktaviannur^{2*}

Septi Handayani¹

Nawan³

Dewi Klarita Furtuna³

¹Departemen Biokimia dan Biologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Palangka Raya, Kota Palangka Raya, Kalimantan Tengah, Indonesia

²Program Studi Kedokteran, Fakultas Kedokteran, Universitas Palangka Raya, Kota Palangka Raya, Kalimantan Tengah, Indonesia

³Departemen Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Palangka Raya, Kota Palangka Raya, Kalimantan Tengah, Indonesia

*email: zoelva14@gmail.com

Abstrak

Akar Saluang Belum (*Luvunga sarmentosa*) mengandung antioksidan yang dapat mencegah kerusakan sel akibat radikal bebas. Pengujian efek senyawa terhadap spermatozoa untuk menilai kemampuan viabilitas dapat dilakukan melalui analisis integritas membran dengan pendekatan *in vitro*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak etanol 96% Saluang Belum (*Luvunga sarmentosa*) terhadap integritas membran spermatozoa secara *in vitro*. Penelitian spermatozoa manusia *in vitro* yang dicuci dan ditambahkan medium BWVW kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam dengan ekstrak etanol 96% akar saluang belum pada perlakuan konsentrasi, 100 ng/mL, 200 ng/mL, 400 ng/mL, 800 ng/mL serta kelompok kontrol (hanya BWVW). Integritas membran dinilai pada masing-masing 100 μ L yang telah ditambahkan 1 mL HOST (*Hypo-osmotic swelling test*) di inkubasi 37°C selama 30 menit dan diamati menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x untuk melihat integritas membran spermatozoa dari ekor yang menggebu. Hasil penelitian menunjukkan bahwa senyawa yang terdapat di dalam ekstrak etanol 96% akar Saluang Belum (*Luvunga Sarmentosa*) adalah terpenoid, flavonoid, steroid, fenolik dan alkaloid. Jumlah viabilitas sperma meningkat secara signifikan dari konsentrasi 100 ng/mL ($68 \pm 3,99$), 200 ng/mL ($72,2 \pm 4,26$), 400 ng/mL ($77 \pm 4,76$), dan 800 ng/mL ($80 \pm 4,87$). Meningkat jika dibandingkan dengan kontrol ($63 \pm 3,81$). Ekstrak etanol 96% akar Saluang Belum (*Luvunga sarmentosa*) yang diberikan secara *in vitro* memiliki pengaruh untuk meningkatkan integritas membran spermatozoa.

Kata Kunci:

Ekstrak Etanol
Saluang Belum
Integritas Membran
Spermatozoa

Keywords:

Ethanol Extract
Saluang Belum Root
Spermatozoa Membrane
Integrity

Abstract

Good sperm quality is characterized by adequate number, motility and viability. Saluang Belum root contains antioxidants that can prevent cell damage due to free radicals. To observe the effect of compounds on spermatozoa to assess viability can be done through membrane integrity analysis with an *in vitro* approach. This study aims to determine the effect of 96% ethanol extract of Saluang Belum (*Luvunga sarmentosa*) on spermatozoa membrane integrity *in vitro*. Human sperm cleaned and added with BWVW medium, then incubated at 37°C within 1 hour with 96% ethanol extract of Saluang Belum roots in the concentration treatment, 100 ng/mL, 200 ng/mL, 400 ng/mL, 800 ng/mL. Membrane integrity of sperm was assessed after incubated with HOST (*Hypo-osmotic swelling test*) solution for 30 minutes and observed using a light microscope with a magnification of 400x to analyzed sperm tail swelling. In the first group (concentration 100 ng/ml), the membrane integrity value was 68 ± 3.99 (%), the second treatment (concentration 200 ng/ml) was 72.2 ± 4.26 (%), the third treatment concentration (400 ng/ml) was 77 ± 4.76 (%) and the fourth treatment concentration (800 ng/ml) was 80 ± 4.87 (%), and the control group was 63 ± 3.81 (%). The 96% ethanol extract of Saluang Belum root (*Luvunga sarmentosa*) has the effect of improving spermatozoa membrane integrity.



PENDAHULUAN

Spermatozoa adalah sel yang terdiri dari kepala sperma dan ekor sperma. Fungsi utama sperma adalah untuk melakukan fertilisasi. Proses spermatozoa menuju tempat fertilisasi yang dapat terjadi diukur dengan kualitas sperma yang baik. (Melani Cintia Dewi *et al*, 2022) Sebagai dasar analisis spermatozoa yang berkualitas adalah spermatozoa dengan jumlah, motilitas, dan viabilitas baik. (Brenda C, 2022) Kualitas sperma yang buruk merupakan penyebab utama infertilitas pada pria. Faktor-faktor yang mempengaruhi kualitas sperma yaitu gaya hidup seperti makanan rendah nutrisi, kebiasaan merokok, alkohol, obat-obatan, Serta faktor lingkungan seperti polutan yang mengakibatkan kualitas sperma buruk dan mampu menurunkan konsentrasi dan motilitas spermatozoa hingga 50%. (Puspitaningrum *et al.*, 2022)

Preservasi merupakan penerapan teknologi reproduksi khususnya IVF (*in vitro fertilisasi*) menggunakan semen cair atau beku yang diperoleh dari hasil donor spermatozoa. Penyimpanan spermatozoa telah sejak lama digunakan dalam praktik klinis reproduksi berbantu, yang tujuan utamanya yaitu saat proses penyimpanan semen dapat menjaga viabilitas. (Fabozzi *et al*, 2016) Proses preservasi dapat merusak sperma dengan berbagai cara seperti kerusakan ultra struktural, stres oksidatif dan osmotik. Hal ini mengubah konfigurasi lipid dan protein, mengurangi gerakan dan daya hidup sperma serta menyebabkan cedera pada mitokondria dan ekor spermatozoa. Selain itu, proses ini juga meningkatkan fragmentasi DNA sperma, yang mengakibatkan penurunan kualitas sperma setelah dibekukan dan dicairkan. Spermatozoa terdiri dari beberapa membran, seperti membran plasma, membran mitokondria, dan membran akrosomal. Membran-membran ini sebagai pelindung fisiologi yang tetap utuh supaya memastikan daya hidup sperma, terutama setelah proses preservasi. (Khan *et al*, 2021)

Pembekuan merupakan suatu fenomena pengeringan fisik terkait dengan perubahan fase dalam lipid dan merubah kondisi membran. Pada keadaan pembekuan membran terjadi perubahan temperatur menunjukkan peristiwa beberapa fase kondisi membran yaitu sebelum, selama dan setelah pembekuan semen dimana terbentuk kristal-kristal, terjadi penumpukan elektrolit dan bahan terlarut lainnya di dalam larutan atau di dalam sel. Kristal sel intraseluler dapat merusak sperma secara mekanik. Konsentrasi elektrolit yang berlebihan akan melarutkan selubung lipoprotein dinding sel sperma pada waktu thawing, permeabilitas membran sel akan berubah dan menyebabkan kematian sel. Proses pencairan menghasilkan tingkat ROS (*Reactive Oxygen Species*) yang tinggi dan merusak sel sperma, mengubah potensi reproduksi sperma dan mengurangi kemampuan untuk pembuahan. Selain itu, ketidakseimbangan ROS berdampak penurunan viabilitas sperma, disfungsi mitokondria, dan kerusakan DNA, antara lain. Disfungsi mitokondria menghasilkan peroksidasi lipid dan penurunan Potensial membran mitokondria, yang mana sebagai prediktor kapasitas fertilisasi sperma. Kerusakan sperma akibat stres oksidatif yang tinggi berdampak negatif pada keberhasilan ART (*Assisted Reproductive Technology*) dan berhubungan dengan tingkat kehamilan yang rendah. Oleh karena itu, diperlukan intervensi untuk mengurangi kerusakan akibat proses kriopreservasi dan meningkatkan kualitas sperma setelah dibekukan. (Kumar *et al.*, 2019)

Upaya untuk menjaga kualitas sperma pada saat kondisi stres oksidatif adalah dengan pemberian antioksidan. Antioksidan merupakan jenis senyawa alami dengan mudah didapatkan pada kandungan tanaman herbal. Antioksidan seperti alkaloid, flavonoid, terpenoid dan senyawa fenolik dapat secara langsung mereduksi, menangkal, menekan reaksi ROS dan memperbaiki kerusakan akibat dari efek radikal bebas. Menurut penelitian Derbak *et al* (2021) efek kandungan alkaloid terbukti meningkatkan kualitas sperma domba. Alkaloid

bisa melindungi sperma dengan meningkatkan ketahanan integritas membran sperma domba. Penelitian selanjutnya harus dilakukan untuk memahami mekanisme biologis dan biokimia yang mendasari efek menguntungkan tersebut. (Derbak et al, 2021) Menurut penelitian Sari et al pada tahun (2023) flavonoid termasuk antioksidan yang mengontrol peroksidasi lipid dengan menghalangi oksidasi. Senyawa flavonoid menyediakan donor hidrogen dan mengikat radikal lipid menjadi radikal lipid yang stabil dan akhirnya menghentikan reaksi berantai peroksidasi lipid, sehingga meningkatkan viabilitas dan motilitas pada sperma tikus. (Sari et al, 2023)

Senyawa-senyawa antioksidan tersebut terdapat pada tanaman herbal salah satunya adalah Saluang Belum (*Luvunga sarmentosa*). Saluang belum adalah tanaman endemik di masyarakat Kalimantan Tengah. Pada umumnya masyarakat mengolah tanaman herbal ini menjadi bahan konsumsi contohnya sebagai obat atau ramuan tradisional untuk meningkatkan kesuburan pria. (Noh et al., 2020) Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Islamiati et al pada tahun 2022 melalui uji skrining fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak etanol 70% akar Saluang Belum (*Luvunga sarmentosa*) secara empiris mengandung steroid dan flavonoid. (Islamiati et al., 2022) Pemberian ekstrak etanol 70% akar Saluang Belum (*Luvunga sarmentosa*) dapat meningkatkan kualitas sperma yang diukur dari jumlah dan motilitas sperma pada mencit. (Musfirah et al., 2016) Penelitian ekstrak saluang belum ini belum banyak dilakukan kepada manusia sehingga peneliti tertarik untuk melakukan eksperimen mengenai pengaruh ekstrak etanol 96% Saluang Belum (*Luvunga sarmentosa*) terhadap membran spermatozoa menggunakan *hypo-osmotic swelling test*.

METODOLOGI

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *rotary evaporator*, *waterbath*, *inkubator*, kolom vacum tabung *eppendorf* 1,5 mL *centrifuge*, tabung falcon 15 mL, *micropipet*, tabung falcon 50 mL, *neubauer chamber*, mikroskop cahaya. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel sperma manusia, medium BWV (*Biggers, Whitten, and Whittingham*), *medium percoll* 50%, larutan hipoosmotik, etanol 96%, akar saluang belum (*Luvunga sarmentosa*), *sperm diluting fluid*.

Metode Pelaksanaan

Sebanyak 5000 gram akar Saluang Belum (*Luvunga sarmentosa*) dicuci dan dikeringkan selama tujuh hari untuk membuat simplisia dengan menggunakan blender, kemudian diayak dengan menggunakan saringan berukuran 60 mesh. Simplisia sebanyak 1000 g dimaserasi dengan etanol 96% selama 3 x 24 jam. Maserat yang diperoleh dipisahkan dengan menggunakan *rotary evaporator*.

Penelitian ini menggunakan sampel sperma dari donor dengan kriteria umur 20-30 tahun. Semen ditampung dalam wadah steril dan dibiarkan pada suhu ruangan selama 30 menit untuk proses pencairan, kemudian dicuci menggunakan gradien percol 50%. Kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 1900 rpm selama 30 menit. Supernatan dibuang, pelet dicuci dengan 3 ml medium BWV. Kemudian tabung disentrifugasi kembali dengan kecepatan 1900 rpm selama 15 menit. Supernatan dibuang, pelet murni diberikan 1 ml BWV lalu dihomogenkan. Setelah itu, konsentrasi spermatozoa diukur dengan memberikan 95 µL cairan pengencer sperma dan 5 µL spermatozoa yang telah dicuci dalam tabung 1,5 ml lalu dihomogenkan. Ambil 10 µL sampel dan letakkan di dalam ruang Neubauer. Selanjutnya, perhitungan konsentrasi perhitungan konsentrasi dilakukan di bawah mikroskop dengan

perbesaran 400x menggunakan metode analisis semen standar menurut WHO (Permatasari et al, 2023).

Spermatozoa dibagi menjadi lima kelompok, masing-masing berisi ± 10 juta sel, yaitu kontrol (tanpa perlakuan), pemberian ekstrak etanol *Luvunga sarmentosa* dengan konsentrasi 100, 200, 400, dan 800 ng/mL. Kelima kelompok tersebut kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam. Selanjutnya, dilakukan uji HOS pada sampel semen dan diamati ekor yang melengkung/menggulung pada mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Tabel 1. Hasil Pengaruh Ekstrak

Kelompok	Mean \pm SD (%)
Kontrol Negatif	63,87 \pm 3,81 ^{a,b,c,d,e}
P1 (100 ng/mL)	68,80 \pm 3,99 ^{b,c,d,e}
P2 (200 ng/mL)	72,20 \pm 4,26 ^{c,d,e}
P3 (400 ng/mL)	77,07 \pm 4,76 ^{d,e}
P4 (800 ng/mL)	80,87 \pm 4,87 ^e

Keterangan: superskrip (^{a,b,c,d,e}) menunjukkan perbedaan nyata ($p < 0.05$) \pm SD = merupakan standar deviasi data

Dari data hasil penelitian, menunjukkan adanya pengaruh ekstrak akar *Luvunga sarmentosa* terhadap integritas membran yang dilihat dari jumlah ekor sperma yang menggulung/melengkung secara *in vitro*. Hal ini dipengaruhi oleh peranan senyawa yang terdapat pada ekstrak etanol 96% akar saluang belum (*Luvunga sarmentosa*).

Berdasarkan penelitian yang dilakukan Permatasari et al (unpublished), didapatkan hasil uji fitokimia pada ekstrak akar saluang belum terdapat kandungan senyawa terpenoid, flavonoid, steroid fenolik dan alkaloid. Senyawa terpenoid memiliki peran sebagai antioksidan dengan mengurangi pembentukan radikal bebas yang dengan cara memutuskan reaksi berantai dan mengubahnya menjadi produk yang lebih stabil (Permatasari et al, 2023). Senyawa terpenoid terhadap

sperma memiliki aktivitas sebagai antioksidan dan dapat menghambat peroksidasi lipid. (Furi et al., 2020)

Mekanisme antioksidan dalam proses pengenceran/pembekuan (*thawing/ freeze*) pada penyimpanan sperma normal (preverasi), dapat digunakan untuk meminimalkan kerusakan akibat aktivitas radikal bebas. Pada penelitian sebelumnya Ozimic et al (2023), senyawa terpenoid mampu memberikan atom hidrogen kepada radikal bebas. Sehingga membran sperma tetap terjaga dari paparan ROS. Terpenoid termasuk dalam senyawa antioksidan yang kuat. (Ozimic et al, 2023)

Kandungan flavonoid dalam *Luvunga sarmentosa* memiliki peran penting dalam menekan sintesis ROS dengan menghalangi pembentukan enzim prooksidan atau menghilangkan berbagai elemen yang dapat memicu pembentukan radikal bebas. Selain itu, flavonoid dapat mencegah radikal hidroksil dengan mengikat ke *nitrat oksida* (NO), sehingga pembentukan *peroxynitrite* tidak terjadi dan kerusakan sel dapat dihindari. (Suryadinata et al, 2021) Pada penelitian sebelumnya Wirenviona et al (2021) terbukti senyawa flavonoid merupakan senyawa metabolit sekunder yang berperan sebagai antioksidan karena bermanfaat dalam mencegah kerusakan sel akibat stres oksidatif. (Wirenviona et al., 2021)

Steroid yang terkandung dalam ekstrak etanol *Luvunga sarmentosa* bertindak sebagai antioksidan yaitu dengan cara menangkap/*scavenging* ROS, misalnya superoksida, dan mengkelat logam (Fe²⁺ dan Cu²⁺) (Ayu et al., 2021). Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan Akar et al (2021) penggunaan antioksidan dapat mencegah terbentuknya oksidasi selama pembekuan sperma, mengurangi dampak buruk dari ROS, dan meningkatkan kualitas sperma setelah dicairkan (proses *thawing*). Steroid dapat meningkatkan transkripsi gen antiapoptosis, seperti Bcl-2, Bcl-XL, dan Mcl-1, yang dapat menghambat aktivasi kaspase untuk apoptosis. Steroid juga dapat menghambat ekspresi dan aktivitas gen proapoptosis, seperti Fas, FasL, Bax, Bak, dan Bok,

yang dapat memicu jalur ekstrinsik dan intrinsik apoptosis. Jalur intrinsik apoptosis dipicu oleh sinyal stres intraseluler, seperti kerusakan DNA, oksidasi, atau kekurangan nutrisi. Sinyal ini menyebabkan pelepasan sitokrom c dari mitokondria, yang kemudian berikatan dengan protein Apaf-1 dan membentuk kompleks yang disebut apoptosom. Apoptosom mengaktifkan kaspase-9, yang kemudian mengaktifkan kaspase-3 dan kaspase-7. (Akar et al., 2021) Ekstrak akar *Luvunga sarmentosa* juga mengandung fenolik yang memiliki mekanisme sebagai antioksidan yaitu melalui kemampuan dari gugus fenol untuk mengikat suatu radikal bebas dengan mendonorkan atom hidrogennya melalui proses transfer elektron. (Kisiriko et al., 2021) Pada penelitian sebelumnya Tvrdá et al. (2020) struktur fenolik dalam aksi antioksidan biologis dengan menghilangkan superoksida, oksigen tunggal, peroksida, hidrogen peroksida, dan radikal hidroksil. Fenolik penting untuk pertahanan sel normal selama stres oksidatif molekul fenolik dengan memberikan perlindungan pada sperma terhadap serangan oksidatif dan/atau kemungkinan kontaminasi bakteri, yang mengakibatkan pemeliharaan viabilitas dan aktivitas fungsional sperma mamalia yang lebih tinggi. (Tvrdá et al., 2020)

Ekstrak etanol 96% akar *Luvunga sarmentosa* mengandung alkaloid sebagai antioksidan dengan mendonorkan hidrogen atom pada objek radikal bebas (Ayu et al, 2021). Alkaloid penyerap radikal bebas merupakan mekanisme pencegahan oksidasi amin biogenik dengan menghambat *monoamine oxidase*, yang bertanggung jawab atas produksi zat beracun seperti hidrogen peroksida, yang menginduksi stres oksidatif mempertahankan kualitas sperma terkait dampak total alkaloid pada semen domba. Penelitian Rahimi-Madiseh et al (2020) alkaloid dapat melindungi sperma dari kerusakan oksidatif dan meningkatkan integritas membran sperma epididimis domba dapat bermanfaat dalam IVF (*in vitro fertilization*). Alkaloid dapat berfungsi dalam beberapa cara penyerapan langsung radikal bebas,

mencegah pembentukan radikal bebas dengan menghambat enzim-enzim spesifik yang menghasilkan radikal bebas atau menjaga integritas rantai transpor elektron mitokondria selama kondisi stres, mengaktifkan sejumlah enzim antioksidan seperti GST, GSH-Px, GR, SOD. (Rahimi-Madiseh et al., 2020) Penyimpanan sperma untuk ART (*Assisted Reproductive Technology*) menyebabkan kerusakan pada tingkat molekuler seperti fragmentasi DNA akibat proses freeze dan thawing berdampak pada kerusakan lebih lanjut ditingkat struktural yaitu pada membran spermatozoa (Rophi et al, 2021). Preservasi ini bertujuan melindungi keutuhan spermatozoa sebelum proses IVF (*In Vitro Fertilization*) yang mana sangat berdampak pada plasma membran spermatozoa sebagai prediktor kapasitas fertilisasi sperma. Kerusakan spermatozoa akibat stres oksidatif yang tinggi berdampak negatif pada keberhasilan ART yang seharusnya preservasi ini berperan dalam terlindunginya membran sperma dari ROS serta mencegah proses kematian sel. (Panjaitan, 2022)

Dengan adanya kelima senyawa tersebut, dilakukan intervensi agar mengurangi kerusakan mekanik atau kimia akibat proses preservasi pada sperma normal dan meningkatkan kualitas sperma setelah dibekukan. Berdasarkan penelitian sebelumnya Gualteri et al (2021) pemberian antioksidan dapat menjaga kualitas sperma pada saat kondisi stres oksidatif adalah dengan pemberian antioksidan, yang dapat mereduksi, menangkal, menekan reaksi ROS dan memperbaiki kerusakan akibat dari efek radikal bebas yang berdampak penurunan viabilitas sperma, disfungsi mitokondria, kerusakan DNA, dan disfungsi mitokondria menghasilkan peroksidasi yang berakibat rusaknya struktur membran spermatozoa. (Gualtieri et al., 2021)

Peningkatan jumlah ekor sperma yang melengkung/menggulung sudah dapat dilihat dari kelompok perlakuan pertama dengan konsentrasi 100

ng/ml dibandingkan dengan kelompok kontrol. Perlakuan pertama dengan konsentrasi 100 ng/ml ini merupakan konsentrasi efektif menurut farmakologi merupakan konsentrasi paling rendah namun dapat memberikan efek yang menguntungkan (Thomas & Ting, 2012). Jumlah ekor sperma yang menggulung atau melengkung terus mengalami peningkatan seiring dengan peningkatan konsentrasi ekstrak etanol yang diberikan sehingga pemberian ekstrak etanol 96% akar saluang belum (*Luvunga sarmentosa*) mempengaruhi integritas membran sperma secara *dose dependent* mengacu pada efeknya yang dapat berubah bila konsentrasi ekstrak diubah. Penelitian ini sejalan dengan penelitian Leiva-Revilla *et al* (2022) bahwa terjadi peningkatan viabilitas membran spermatozoa secara in vitro untuk perkembangan preservasi sperma normal mencegah kerusakan mekanik dan kimiawi pada saat *pross freeze* atau *thawing*. (Leiva-Revilla *et al.*, 2022)

KESIMPULAN

Ekstrak etanol 96% akar saluang belum (*Luvunga sarmentosa*) berpengaruh terhadap integritas membran spermatozoa dengan dosis efektif menurut farmakologi pada konsentrasi 100 ng/ml.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih serta penghargaan kepada pihak-pihak yang telah berpartisipasi dalam kegiatan penelitian yang dilakukan.

REFERENSI

- Akar M, Kaya C, Çevik M. 2021. Evaluation of Current Antioxidant Profile in Semen. *Journal Livestock Studies*; 61(1):37–45.
- Ayu D, Kumaradewi P, Subaidah WA, Andayani. 2021. Phytochemical Screening And Activity Test of Antioxidant Ethanol Extract of Buni Leaves (*Antidesma bunius* L. Spreng) Using DPPH Method. *Jurnal Penelitian Pendidikan IPA*; 7(2):276-280.
- Brenda C., J. H. A. 2022. Peranan Suplemen dalam Tata Laksana Infertilitas. *Cermin Dunia Kedokteran*, 49(4),193–197. <https://doi.org/10.55175/cdk.v49i4.217>
- Derbak, H., Moussaoui, M., Benberkane, A., & Ayad, A. 2021. In-vitro effect of Peganum harmala total alkaloids on spermatozoa quality and oxidative stress of epididymal ram semen. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 10(5), 232–238. <https://doi.org/10.4103/2305-0500.326721>
- Fabozzi, G., Starita, M. F., Rega, E., Alteri, A., Colicchia, A., Piscitelli, C., & Giannini, P. 2016. Evaluation of the Efficiency of Two Different Freezing Media and Two Different Protocols to Preserve Human Spermatozoa from Cryoinjury. *International Journal of Reproductive Medicine*, 2016, 1–6.
- Furi, M., Basit, N. Al, Ikhtiarudin, I., & Utami, R. 2020. Penentuan Total Fenolik, Flavonoid dan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak dan Fraksi Daun Kedabu (*Sonneratia ovata* Backer) Artikel Penelitian. 12, 48–59.
- Gualtieri, R., Kalthur, G., Barbato, V., Longobardi, S., Di Rella, F., Adiga, S. K., & Talevi, R. 2021. Sperm oxidative stress during in vitro manipulation and its effects on sperm function and embryo development. *Antioxidants*, 10 (7), 1–24.
- Islamiati, U., Nisa, H. K., Ilmi, H., Tumewu, L., Adianti, M., Wahyuni, T. S., Widyawaruyanti, A., & Hafid, A. F. 2022. Free Radical Scavenging and Analgesic Activities of 70% Ethanol Extract of *Luvunga sarmentosa* (Bl.) Kurz from Central Kalimantan. *Borneo Journal of Pharmacy*, 5(1), 63–70. <https://doi.org/10.33084/bjop.v5i1.2983>
- Khan, I. M., Cao, Z., Liu, H., Khan, A., Rahman, S. U., Khan, M. Z., Sathanawongs, A., & Zhang, Y. 2021. Impact of Cryopreservation on Spermatozoa Freeze-Thawed Traits and Relevance OMICS to Assess Sperm Cryo-Tolerance in Farm Animals. *Frontiers in Veterinary Science*, 8(February), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.609180>
- Kisiriko, M., Anastasiadi, M., Terry, L. A., Yasri, A., Beale, M. H., & Ward, J. L. 2021. Phenolics from medicinal and aromatic plants: Characterisation and potential as biostimulants and bioprotectants. *Molecules*, 26(21). <https://doi.org/10.3390/molecules26216343>
- Kumar, A., Prasad, J. K., Srivastava, N., & Ghosh, S. K. 2019. Strategies to Minimize Various Stress-Related Freeze-Thaw Damages during Conventional Cryopreservation of Mammalian Spermatozoa. *Biopreservation and*

- Biobanking*, 17(6), 603–612.
<https://doi.org/10.1089/bio.2019.0037>
- Leiva-Revilla, J., Rolón, M., Siyatpanah, A., De Lourdes Pereira, M., & Nissapatorn, V. 2022. First study of in vitro protective effect of *Lepidium meyenii* (Maca) on frozen-thawed bovine spermatozoa. *Veterinary World*, 15(6), 1481–1488.
<https://doi.org/10.14202/vetworld.2022.1481-1488>.
- Melani Cintia Dewi, N. L. P., Lindayani, I. K., & Yuni Rahyani, N. K. 2022. Gambaran Faktor-Faktor Penyebab Infertilitas Dan Tingkat Keberhasilan Program Bayi Tabung Yang Diikuti Oleh Pasangan Usia Subur. *Jurnal Ilmiah Kebidanan (The Journal Of Midwifery)*, 10(1), 1–8.
<https://doi.org/10.33992/jik.v10i1.1557>
- Musfirah, Y., Saiful Bachri, M., Nurani, L. H., Farmasi, S. T., Lestari, B., Farmasi, F., Ahmad, U., & Yogyakarta, D. 2016. Efek Ekstrak Etanol 70% Akar Saluang Balum (*Lavanga sarmentosa*, Blume kurz) Terhadap Spermatogenesis dan Gambaran Histopatologik Testis Mencit. *Jurnal Pharmascience*, 03 (02), 131–141.
<http://jps.unlam.ac.id/>
- Niken Meyliana Sari, M. Gandul Atik Yuliani, Eduardus Bimo Aksono Herupradoto, Nanik Hidayatik, Nurhusien Yimer, & Tatik Hernawati. 2023. Red dragon (*Hylocereus polyrhizus*) fruit peel extract increased the motility and viability of spermatozoa of hypercholesterolemic rats (*Rattus norvegicus*). *Ovozoa: Journal of Animal Reproduction*, 12(1), 33–41.
<https://doi.org/10.20473/ovz.v12i1.2023.33-41>
- Noh, S., Go, A., Kim, D. Bin, Park, M., Jeon, H. W., & Kim, B. 2020. Role of antioxidant natural products in management of infertility: A review of their medicinal potential. *Antioxidants*, 9(10), 1–65.
<https://doi.org/10.3390/antiox9100957>
- Ozmic, S., Ban-Frangez, H., & Stimpfel, M. 2023. Sperm Cryopreservation Today: Approaches, Efficiency, and Pitfalls. *Current Issues in Molecular Biology*, 45(6), 4716–4734.
<https://doi.org/10.3390/cimb45060300>
- Panjaitan FRG., Biomedik, M., Kedokteran, F., Islam, U., & Agung, S. 2022. Pengaruh Ekstrak *Seledri* Terhadap Kadar Sod Dan Ekspresi Caspase-3 Testis Pada Keracunan Timbal Studi *in vivo* Tikus Terpapar Timbal Asetat.
- Permatasari S, Rahmatina H, Widayati R, Eka A, I. G. 2023. Pengaruh Rebusan Akar Saluang Belum (*Lavanga sarmentosa*) terhadap jumlah spermatid pada gambaran histologis tubulus seminiferus mencit. *Jurnal Surya Medika*;9(2);69-73.
- Permatasari S, Syarpin, Pujiyanto DA. 2023. Photochemical and bioactivity examination of fractionated saluang belum root extract (*Lavanga Sarmentosa*) on in-vitro human sperm motility. *Jurnal Kedokteran dan Kesehatan Indonesia*;14(2);128-34.
- Permatasari, S. Alexandra, A.Z. Augustina, I. Handayani, S. Teresa, A. 'Pengaruh Ekstrak Etanol 96% Akar Saluang Belum Terhadap Viabilitas Spermatozoa Secara In Vitro. (Unpublished)
- Puspitaningrum, D, Rahfiludin, M. Z, Shaluhiah, Z, & Winarni, S. 2022. the Role of Health Workers and Support System Counselors for Women With Primary Infertility. *Indonesian Journal of Health Administration*, 10(2), 241–250.
<https://doi.org/10.20473/jaki.v10i2.2022.241-250>
- Rahimi-Madiseh, M., Mohammadi, M., Hassanvand, A., Ahmadi, R., Shahmohammadi, M., & Rostamzadeh, A. 2020. Assessment of the toxicity effects of nicotine on sperm and IVF and the potential protective role of silymarin—an experimental study in mice. *Middle East Fertility Society Journal*, 25(1).
<https://doi.org/10.1186/s43043-020-00025-4>
- Rophi, A. H., Rahayu, S., & Ciptadi, G. 2021. The Effect Of *Morinda Citrifolia* L. Fruit Extract Supplemented in to Diluent Tris-Egg Yolk Toward the Abnormality of Goat's Spermatozoa After Freezing at -80 C. *Journal Life Science*, 3(1), 143–153.
- Suryadinata, R. V., & Sukarno, D. A. 2021. *Antioxidant activity in red mulberries on sperm development exposed by cigarette smoke*. 10(2), 583–586.
<https://doi.org/10.15562/bmj.v10i2.2329>
- Tvrđá, E., Michalko, J., Árvay, J., Vukovic, N. L., Ivanišová, E., Ďuračka, M., Matušíková, I., & Kačániová, M. 2020. Characterization of the Omija (*Schisandra chinensis*) Extract and Its Effects on the Bovine Sperm Vitality and Oxidative Profile during in Vitro Storage. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2020.
<https://doi.org/10.1155/2020/7123780>
- Wirenviona, R., Itishom, R., Khaerunnisa, S., Riris, A. A. I. D. C., Susanti, N. F., Wahidah, N. J., & Kustantina, A. Z. 2021. *Solanum betaceum* Extract as a Protective on Spermatozoa Morphology of Mice Exposed to Lead Acetate. *Qanun Medika - Medical Journal Faculty of Medicine Muhammadiyah Surabaya*,

5(1),87.

<https://doi.org/10.30651/jqm.v5i1.4594>