

PENGARUH KOMBINASI EKSTRAK ETANOL 70% ALFALFA (*Medicago sativa* L.) DENGAN VITAMIN C TERHADAP KUALITAS SPERMATOZOA MENCIT SECARA *IN VITRO*

SKRIPSI

OLEH:

PUTRI PUJI LESTARI

NIM.220602110019



**PROGRAM STUDI BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2026**

HALAMAN JUDUL

PENGARUH KOMBINASI EKSTRAK ETANOL 70% ALFALFA (*Medicago sativa* L.) DENGAN VITAMIN C TERHADAP KUALITAS SPERMATOZOA MENCIT SECARA *IN VITRO*

SKRIPSI

**OLEH:
PUTRI PUJI LESTARI
NIM.220602110019**

**Diajukan Kepada:
Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
Untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan dalam
Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)**

**PROGRAM STUDI BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2026**

HALAMAN PERSETUJUAN
PENGARUH KOMBINASI EKSTRAK ETANOL 70% ALFALFA (*Medicago*
***sativa* L.) DENGAN VITAMIN C TERHADAP KUALITAS**
SPERMATOZOA MENCIT SECARA *IN VITRO*

SKRIPSI

OLEH:
PUTRI PUJI LESTARI
NIM.220602110019

telah diperiksa dan disetujui untuk diuji

tanggal:

Pembimbing I



Kholifah Holil, M.Si
NIP. 19751106 200912 2 002

Pembimbing II



Didik Wahyudi, M.Si
NIP. 19860102 201801 1 001

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :

Nama : Putri Puji Lestari
NIM : 220602110019
Program Studi : Biologi
Judul Skripsi : PENGARUH KOMBINASI EKSTRAK ETANOL
70% ALFALFA (*Medicago sativa* L.) DENGAN
VITAMIN C TERHADAP KUALITAS
SPERMATOZOA MENCIT SECARA IN VITRO

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji pada tanggal 17 Juni 2026 dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana pada Program Studi Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Kholifah Holil, M.Si
NIP. 19751106 200912 2 002 
Pembimbing II : Didik Wahyudi, M.Si
NIP. 19860102 201801 1 001 
Tim Penguji : Prof. Dr. drh. Bayyinatul Muchtaromah, M.Si
NIP. 19710919 200003 2 001 (Ketua) 
Fitria Nungky Harjanti, M.Sc
NIP. 19870528 202203 2 002 (Anggota) 



Ketua Program Studi Biologi


Prof. Dr. Retno Susilowati, M.Si
NIP. 19671113 199402 2 001

HALAMAN PERSEMBAHAN

Alhamdulillah rabbil'alam, segala puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT atas limpahan rahmat dan nikmat yang telah mengiringi setiap langkah dalam menyelesaikan skripsi ini. Shalawat dan salam tercurah kepada Rasulullah SAW, pemimpin umat yang senantiasa menunjukkan jalan menuju kebaikan. Sebagai bentuk penghormatan dan ungkapan terima kasih, skripsi ini penulis persembahkan kepada:

1. Bapak Suhartono dan Ibu Siti Kholisah selaku orang tua tercinta, yang senantiasa memberikan kasih sayang, doa yang tiada henti, dukungan yang tak terhingga serta menjadi sumber kekuatan terbesar dalam setiap langkah perjuangan penulis, dan kepercayaan yang telah diberikan hingga penulis mampu menyelesaikan pendidikan dan mencapai titik ini. Segala pencapaian penulis hingga berada pada titik ini tidak terlepas dari kontribusi yang mereka berikan dalam kehidupan penulis. Semoga Allah SWT senantiasa memberikan kesehatan, keberkahan, panjang umur, serta kebahagiaan tiada henti kepada Bapak dan Ibu atas segala kebaikan, doa, dan kasih sayang yang telah diberikan kepada penulis.
2. Kakak tercinta M. Hadi Suwito yang selalu mendukung dan memberikan semangat kepada penulis sehingga penulis mampu bertahan dan berjuang hingga akhir.
3. Ibu Kholifah Holil, M.Si., selaku dosen pembimbing sekaligus dosen wali, yang telah meluangkan waktu, tenaga, pikiran, serta ilmu dalam membimbing, memberikan arahan, dan motivasi kepada penulis dengan penuh kesabaran selama proses penelitian hingga penyusunan skripsi ini, sehingga penulis dapat menyelesaikan studi dengan baik.
4. Bapak Didik Wahyudi, M.Si., selaku dosen pembimbing agama, yang telah membimbing dan mengarahkan penulis dalam mengintegrasikan sains dengan nilai-nilai Islam selama proses perkuliahan dan penyusunan skripsi.
5. M. Basyaruddin, M.Si., selaku laboran terima kasih atas bantuan, arahan, kesabaran, serta ilmu yang telah diberikan selama proses penelitian berlangsung, mulai dari pelaksanaan penelitian di laboratorium hingga pengambilan data sehingga penelitian ini dapat berjalan dengan baik.
6. Teman-teman kos tercinta yaitu Aima, Farida, Andin dan Isma. Kalian bukan sekadar teman dekat, tetapi juga sudah seperti keluarga kedua bagi penulis selama menjalani masa perkuliahan dan kehidupan di kos. Terima kasih karena selalu menemani setiap proses, memberikan dukungan dan semangat, serta dengan sabar membantu penulis dalam berbagai keadaan. Kehadiran kalian memiliki arti yang sangat besar karena selalu menjadi tempat berbagi cerita, keluh kesah, maupun kebahagiaan. Kebersamaan yang telah dilalui bersama selama masa perkuliahan dan tinggal di kos menjadi kenangan yang sangat berharga dan tidak terlupakan, baik dalam suka maupun duka. Terima kasih telah selalu saling menguatkan serta menerima penulis dengan tulus, beserta segala kelebihan dan kekurangannya.
7. Teman-teman terdekat Tsuraya rembo, Yana, dan Sisil yang selalu menemani, mendukung, memberikan semangat, memberikan masukan, dan membantu

baik akademik maupun non-akademik sehingga penulis dapat menyelesaikan studi ini dengan baik.

8. Teman-teman Faza 19: bu din, sepupu nabila, resky, bude jeje, fira, dila, dan naza yang pertama kali kebersamai langkah merantau, berbagi cerita, tawa, dan perjuangan, serta tetap setia menemani hingga penulis mampu menyelesaikan skripsi ini.
9. Terkhusus kepada sahabat sekaigus partner skripsi Jihan Ihza yang telah menjadi teman seperjuangan dalam proses penyusunan skripsi ini. Terimakasih atas kebersamaan, saling mendukung, saling menguatkan, serta semangat yang tidak pernah berhenti sehingga setiap proses yang dilalui terasa lebih ringan hingga tahap akhir ini.
10. Rekan-rekan penelitian di bidang Zoologi, khususnya Shofia Azzahra, terimakasih atas semangat, kerja sama, dan canda tawa yang mengisi hari-hari di laboratorium.
11. Teman-teman biologi Raventalizm 2022 khususnya teman-teman Biologi Corsa 2022 yang banyak membantu penulis dalam perjalanan menyelesaikan studi.
12. Terakhir, penulis ingin menyampaikan rasa terima kasih kepada satu sosok gadis yang selama ini terus berjuang dalam diam tanpa mengenal lelah, seorang perempuan sederhana yang memiliki mimpi besar dan mampu bertahan hingga berada pada titik ini. Terima kasih kepada Putri Puji Lestari, selaku peneliti skripsi ini, karena telah kuat menjalani setiap proses, tantangan, dan kesulitan selama menempuh pendidikan tanpa menyerah. Semua usaha, pengorbanan, doa, serta air mata yang telah dilalui menjadi bagian dari perjalanan berharga yang patut diapresiasi. Terima kasih karena selalu belajar untuk bangkit, tetap melangkah, dan bertahan meskipun perjalanan tidak selalu mudah. Semoga pencapaian ini menjadi awal dari langkah-langkah baik berikutnya serta pengingat bahwa diri ini mampu melewati berbagai rintangan dengan penuh keteguhan.

MOTTO

فَإِنَّ مَعَ الْعُسْرِ يُسْرًا

“Maka, sesungguhnya bersama kesulitan ada kemudahan”.
(QS. Al-Insyirah:5)

“Apapun yang sedang terjadi dalam hidupmu, jangan katakan “seandainya”, tapi katakan “Qadarullah” karena semua yang terjadi adalah takdir dan takdir Allah itu selalu baik, karena Allah itu maha baik”
(Ustadz Hanan Attaki)

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Putri Puji Lestari
NIM : 220602110019
Program Studi : Biologi
Fakultas : Sains dan Teknologi
Judul Penelitian : Pengaruh Kombinasi Ekstrak Etanol 70% Alfalfa
(*Medicago sativa* L.) dengan Vitamin C Terhadap Kualitas
Spermatozoa Mencit Secara *In Vitro*

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilan data, tulisan, dan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai hasil tulisan atau pikiran saya sendiri, kecuali dengan mencantumkan sumber cuplikan pada daftar Pustaka. Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 17 Juni 2026
Yang membuat pernyataan



Putri Puji Lestari

NIM. 220602110019

PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

Skripsi ini tidak dipublikasikan namun terbuka untuk umum dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada penulis. Daftar Pustaka diperkenankan untuk dicatat, tetapi pengutipan hanya dapat dilakukan seizin penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutkannya.

PENGARUH KOMBINASI EKSTRAK ETANOL 70% ALFALFA (*Medicago sativa* L.) DENGAN VITAMIN C TERHADAP KUALITAS SPERMATOZOA MENCIT SECARA *IN VITRO*

Putri Puji Lestari, Kholifah Holil, Didik Wahyudi

Program Studi Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri
Maulana Malik Ibrahim Malang

ABSTRAK

Kombinasi ekstrak alfalfa (*Medicago sativa* L.) dengan vitamin C berpotensi untuk melindungi spermatozoa dari dampak kerusakan akibat stres oksidatif. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh kombinasi ekstrak etanol 70% alfalfa (*Medicago sativa* L.) dengan vitamin C terhadap kualitas spermatozoa mencit secara *in vitro*. Penelitian ini dilakukan secara eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial yang terdiri dari dua faktor perlakuan, yaitu faktor ekstrak etanol 70% alfalfa dengan konsentrasi (0%, 2%, dan 6%) dan faktor vitamin C dengan konsentrasi (0 g/mL, 0,2 g/mL, dan 0,3 g/mL) yang masing-masing kombinasi diulang sebanyak 3 kali. Sampel penelitian yang digunakan adalah spermatozoa mencit umur 2,5 bulan (75 hari) yang kemudian diberi kombinasi perlakuan dengan konsentrasi yang berbeda-beda. Parameter penelitian didasarkan pada motilitas dan viabilitas spermatozoa. Data yang diperoleh kemudian dianalisis secara statistik menggunakan *two-way* ANOVA. Pemberian ekstrak etanol 70% alfalfa (*Medicago sativa* L.) dan vitamin C dalam berbagai konsentrasi menunjukkan variasi persentase penurunan motilitas dan viabilitas spermatozoa mencit, meskipun seluruh perlakuan tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan berdasarkan hasil ANOVA faktorial. Penurunan motilitas terendah terdapat pada E1V2 sebesar 2,15% sedangkan viabilitas pada E1V1 sebesar 2,75%. Meskipun beberapa kelompok kombinasi menunjukkan kecenderungan lebih baik dalam mempertahankan kualitas spermatozoa, hasil analisis statistik menunjukkan bahwa faktor ekstrak, vitamin C, maupun interaksi keduanya belum memberikan pengaruh nyata terhadap motilitas dan viabilitas spermatozoa mencit (*Mus musculus*).

Kata kunci: *Medicago sativa* L., spermatozoa mencit, vitamin C

EFFECT OF THE COMBINATION OF ETHANOL EXTRACT 70% ALFALFA (*Medicago sativa* L.) WITH VITAMIN C ON THE QUALITY OF MOUSE SPERMATOZOA IN *VITRO*

Putri Puji Lestari, Kholifah Holil, Didik Wahyudi

Biology Study Program, Faculty of Science and Technology, Maulana Malik
Ibrahim State Islamic University Malang

ABSTRACT

The combination of alfalfa extract (*Medicago sativa* L.) with vitamin C has the potential to protect spermatozoa from the effects of oxidative stress damage. Therefore, this study aims to determine the effect of a combination of 70% ethanol extract of alfalfa (*Medicago sativa* L.) with vitamin C on the quality of mouse spermatozoa in *vitro*. This study was conducted experimentally using a factorial Complete Random Design (RAL) consisting of two treatment factors, namely ethanol extract factor 70% alfalfa with concentration (0%, 2%, and 6%) and vitamin C factor with concentration (0 g/mL, 0.2 g/mL, and 0.3 g/mL) each combination repeated 3 times. The study sample used was 2.5 months (75 days) of mouse spermatozoa which were then given a combination of treatments with different concentrations. The research parameters were based on the motility and viability of spermatozoa. The data obtained was then statistically analyzed using *two-way* ANOVA. Administration of 70% ethanol extract of alfalfa (*Medicago sativa* L.) and vitamin C in various concentrations showed a variation in the percentage decrease in motility and viability of mouse spermatozoa, although the entire treatment did not show a significant difference based on factorial ANOVA results. The lowest decrease in motility was found in E1V2 at 2.15% while viability in E1V1 was 2.75%. Although some combination groups showed a better tendency to maintain spermatozoa quality, the results of statistical analysis showed that the extract, vitamin C, and the interaction of the two did not have a significant effect on the motility and viability of mouse spermatozoa (*Mus musculus*).

Keywords: *Medicago sativa* L., spermatozoa mice, vitamin C

تأثير مزيج مستخلص الإيثانول 70٪ من البرسيم (*Medicago SATIVA L*) مع فيتامين C على جودة الحيوانات المنوية للفئران في المختبر

بوتري بوجي ليستاري، خليفة هوليل، ديديك واهيودي

برنامج دراسة الأحياء، كلية العلوم والتكنولوجيا، جامعة مولانا مالك إبراهيم الإسلامية، مالانغ

الملخص

مزيج مستخلص البرسيم (*Medicago sativa L*) مع فيتامين C لديه القدرة على حماية الحيوانات المنوية من تأثيرات تلف الإجهاد التأكسدي. لذلك، تهدف هذه الدراسة إلى تحديد تأثير مزيج من مستخلص 70٪ من الإيثانول من البرسيم (*Medicago sativa L*) مع فيتامين C على جودة الحيوانات المنوية للفئران في المختبر. أجريت هذه الدراسة تجريبياً باستخدام تصميم عشوائي كامل (RAL) يتكون من عاملي معالجة، وهما عامل مستخلص الإيثانول 70٪ برسيم بتركيز (0، 2٪، 6٪) وعامل فيتامين C بتركيز (0 جرام/مل، 0.2 جم/مل، و 0.3 جرام/مل) كل مزيج تكرر 3 مرات. كانت عينة الدراسة المستخدمة عبارة عن 2.5 شهر (75 يوماً) من الحيوانات المنوية للفئران، والتي تم إعطاؤها بعد ذلك مزيجاً من العلاجات بتركيزات مختلفة. استندت معايير البحث إلى حركة وقابلية بقاء الحيوانات المنوية. ثم تم تحليل البيانات التي تم الحصول عليها إحصائياً باستخدام تحليل التحليل السطحي ثنائي الاتجاه. أظهر إعطاء 70٪ من مستخلص الإيثانول من البرسيم (*Medicago sativa L*) وفيتامين C بتركيزات مختلفة تغييراً في نسبة الانخفاض في حركة وقابلية العيش في الحيوانات المنوية للفئران، رغم أن العلاج بأكمله لم يظهر فرقاً ذا دلالة إحصائية بناءً على نتائج التحليل البشري المضاد للعوامل المبكرة. أدنى انخفاض في الحركة تم العثور عليه في E1V2 بنسبة 2.15٪، بينما كانت قابلية العيش في E1V1 2.75٪. على الرغم من أن بعض المجموعات المركبة أظهرت ميلاً أفضل للحفاظ على جودة الحيوانات المنوية، أظهرت نتائج التحليل الإحصائي أن المستخلص وفيتامين C والتفاعل بين الاثنين لم يكن له تأثير كبير على حركة وقابلية بقاء الحيوانات المنوية للفئران (*Mus musculus*).

الكلمات المفتاحية: ميديكاغو ساتيفا L، فئران الحيوانات المنوية، فيتامين C

KATA PENGANTAR

Assalamualaikum Warahmatullahi Wabarakatuh

Alhamdulillah wa Syukurulillah senantiasa terpanjatkan kepada Allah SWT yang telah memberikan rahmat dan hidayah-nya sehingga penulisan skripsi yang berjudul “Pengaruh Kombinasi Ekstrak Etanol 70% Alfalfa (*Medicago sativa* L.) dengan Vitamin C Terhadap Kualitas Spermatozoa Mencit Secara *In Vitro*”. Shalawat serta salam senantiasa tercurahkan kepada junjungan Nabi Muhammad SAW, yang telah membawa umat manusia dari zaman kegelapan menuju jalan yang penuh cahaya dan kebenaran. Penulis menyampaikan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada semua pihak yang telah memberikan bantuan, dukungan, dan doa dalam penyusunan skripsi ini, khususnya kepada:

1. Prof. Dr. Hj. Ilfi Nur Diana, M. Si., CAHRM., CRMP selaku Rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Dr. Agus Mulyono, M.Kes selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Prof. Dr. Retno Susilowati, M.Si selaku Ketua Program Studi Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Kholifah Holil, M. Si selaku pembimbing yang telah memberikan bimbingan, arahan, dan masukan dalam penyusunan skripsi. Sekaligus dosen wali yang telah memberikan bimbingan kepada penulis dari awal hingga akhir studi.
5. Didik Wahyudi, M.Si selaku pembimbing agama yang telah memberikan waktu, tenaga, dan pikiran selama bimbingan integrasi Sains dan Islam sehingga skripsi ini dapat diselesaikan.
6. Prof. Dr. drh. Bayyinatul Muchtaromah, M.Si. dan Fitria Nungky Harjanti, M.Sc. selaku penguji skripsi yang telah memberikan banyak masukan.
7. Seluruh dosen dan laboran di Program Studi Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang yang telah memberikan arahan dan masukan kepada penulis dalam melakukan rencana penelitian.
8. Orang tua, kakak dan seluruh keluarga yang telah memberikan doa, dukungan dan motivasi kepada penulis.
9. Rekan penelitian alfalfa di Laboratorium Fisiologi Hewan dan seluruh teman-teman biologi angkatan 2022

Penulis menyadari bahwa karya tulis ini masih memiliki berbagai keterbatasan dan jauh dari sempurna. Meskipun demikian, penulis berharap karya tulis ini dapat memberikan manfaat bagi penulis maupun pembaca.

Malang, Juni 2026

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSETUJUAN	iii
HALAMAN PENGESAHAN	iv
HALAMAN PERSEMBAHAN	v
MOTTO	vii
PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN	viii
PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI	ix
ABSTRAK	x
ABSTRACT	xi
المخلص	xii
KATA PENGANTAR	xiii
DAFTAR ISI	xiv
DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR GAMBAR	xvii
DAFTAR LAMPIRAN	xviii
DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN	xix
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	7
1.3 Tujuan	7
1.4 Manfaat	7
1.5 Batasan Masalah	8
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	9
2.1 Alfalfa (<i>Medicago sativa</i> L.)	9
2.1.1 Deskripsi	9
2.1.2 Morfologi	9
2.1.3 Taksonomi	10
2.1.4 Kandungan dan Manfaat	11
2.2 Vitamin C	17
2.3 Mencit (<i>Mus musculus</i>)	20

2.3.1 Hewan Coba Mencit	20
2.3.2 Sistem Reproduksi Jantan.....	21
2.3.3 Spermatogenesis	24
2.3.4 Regulasi Hormonal Sistem Reproduksi Jantan.....	25
2.3.5 Spermatozoa Mencit	26
2.4 Pengaruh Ekstrak Alfalfa (<i>Medicago sativa</i> L.) dan Vitamin C terhadap Kualitas Spermatozoa	33
2.5 Ekstraksi	36
2.6 Hipotesis	38
BAB III METODE PENELITIAN	39
3.1 Rancangan Penelitian	39
3.2 Waktu dan Tempat Penelitian	40
3.3 Variabel Penelitian.....	40
3.4 Alat dan Bahan	41
3.4.1 Alat.....	41
3.4.2 Bahan.....	41
3.5 Prosedur Penelitian.....	41
3.5.1 Ekstraksi.....	41
3.5.2 Aklimatisasi dan Isolasi Organ Reproduksi.....	42
3.5.3 Vitamin C	42
3.5.4 Ekstrak Alfalfa (<i>Medicago sativa</i> L.).....	43
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	47
4.1 Pengaruh Kombinasi Ekstrak Etanol 70% Alfalfa dengan Vitamin C Terhadap Motilitas Spermatozoa Mencit.....	47
4.2 Pengaruh Kombinasi Ekstrak Etanol 70% Alfalfa dengan Vitamin C Terhadap Motilitas Spermatozoa Mencit.....	60
BAB V PENUTUP.....	72
5.1 Kesimpulan.....	72
5.2 Saran	72
DAFTAR PUSTAKA.....	73
LAMPIRAN.....	87

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
Tabel 3. 1 Perlakuan pada Penelitian.....	39
Tabel 3. 2 Perhitungan pengenceran spermatozoa.....	43
Tabel 4. 1 Rerata pengaruh ekstrak etanol 70% alfalfa dan vitamin C terhadap penurunan motilitas spermatozoa mencit.....	47
Tabel 4. 2 ANOVA penurunan motilitas spermatozoa mencit pada berbagai kombinasi perlakuan ekstrak alfalfa dan vitamin C.....	53
Tabel 4. 3 Rerata pengaruh ekstrak etanol 70% alfalfa dan vitamin C terhadap viabilitas spermatozoa mencit.....	61
Tabel 4. 4 ANOVA penurunan viabilitas spermatozoa mencit pada berbagai kombinasi perlakuan ekstrak alfalfa dan vitamin C.....	68

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
Gambar 2. 1 Tumbuhan alfalfa (<i>Medicago sativa</i> L.)	10
Gambar 2. 2 Struktur kimia flavonoid.....	14
Gambar 2. 3 Struktur kimia asam askorbat	18
Gambar 2. 4 Sistem reproduksi jantan.....	22
Gambar 2. 5 Morfologi spermatozoa.....	27
Gambar 2. 6 Mekanisme keseimbangan antara reactive oxygen species (ROS) dan antioksidan	32
Gambar 2. 7 Mekanisme stres oksidatif dan peran vitamin C sebagai antioksidan	33
Gambar 2. 8 Mekanisme peran antioksidan terhadap perlindungan spermatozoa dari stres oksidatif	34
Gambar 4. 1 Pengaruh kombinasi ekstrak etanol 70% alfalfa dan vitamin C terhadap penurunan motilitas spermatozoa mencit.....	49
Gambar 4. 2 Hasil pengamatan viabilitas spermatozoa menggunakan mikroskop cahaya pada perbesaran 400x dengan pewarna Eosin-negrosin	60
Gambar 4. 3 Pengaruh ekstrak etanol 70% alfalfa dan vitamin c terhadap viabilitas spermatozoa mencit.....	63

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
Lampiran 1. Dokumentasi Ekstraksi	87
Lampiran 2. Pembuatan Suspensi Spermatozoa dari Cauda Epididimis Mencit	87
Lampiran 3. Pengamatan Motilitas dan Viabilitas	88
Lampiran 4. Tabel Nilai Motilitas	88
Lampiran 5. Tabel Nilai Viabilitas	89
Lampiran 6. Dokumentasi Analisis Data Motilitas Spermatozoa	90
Lampiran 7. Dokumentasi Analisis Data Viabilitas Spermatozoa	91

DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN

ROS	: Reaktif Oksigen Spesies
OS	: Oksidatif Stress
WHO	: World Health Organization
SDKI	: Data Survei Demografi dan Kesehatan Indonesia
DMSO	: Dimethyl Sulfoxide
RAL	: Rancangan Acak Lengkap
ANOVA	: Analysis of Variance

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Infertilitas merupakan ketidakmampuan pasangan untuk mencapai kehamilan setelah melakukan hubungan seksual tanpa penggunaan kontrasepsi selama minimal dua belas bulan. Kondisi ini tidak hanya dipandang dari aspek biologis, melainkan berdampak signifikan juga terhadap kondisi psikologis dan sosial individu yang mengalaminya (Zegers-Hochschild *et al.*, 2017).

Infertilitas adalah suatu masalah kesehatan reproduksi yang cukup signifikan secara global, dengan perkiraan sekitar 8-12% pasangan usia subur di dunia mengalami kesulitan untuk memiliki keturunan. Menurut laporan World Health Organization (WHO) sekitar 60-80 juta pasangan terdampak infertilitas dan angkanya menunjukkan kecenderungan meningkat dari tahun ke tahun (Kumar & Singh, 2015). Data survei demografi dan kesehatan Indonesia (SDKI) di Indonesia menunjukkan bahwa tingkat kejadian infertilitas berada pada kisaran 10-15% pada pasangan usia subur. Kondisi ini menegaskan bahwa infertilitas bukan hanya persoalan pribadi, tetapi juga merupakan tantangan kesehatan masyarakat yang perlu mendapatkan perhatian lebih lanjut (Akbar, 2020).

Paparan radikal bebas dan terjadinya stres oksidatif diketahui memiliki peran penting dalam menurunkan kualitas spermatozoa seperti motilitas, viabilitas dan morfologi spermatozoa. Penelitian yang dilakukan oleh Aitken *et al.*, (2022) melaporkan bahwa tingkat stres oksidatif pada sperma pria mengalami peningkatan sekitar 20-30% dalam kurun waktu sepuluh tahun terakhir. Peningkatan tersebut diduga berkaitan dengan berbagai faktor lingkungan dan gaya hidup seperti paparan

polusi udara serta pola makan tinggi lemak. Kondisi ini menunjukkan bahwa pemberian antioksidan menjadi salah satu pendekatan yang penting untuk membantu mengurangi dampak negatif radikal bebas terhadap kualitas spermatozoa.

Kasus infertilitas pria menjadi perhatian serius dalam bidang kesehatan reproduksi di Indonesia, terutama seiring dengan perubahan gaya hidup dan meningkatnya paparan faktor lingkungan eksternal yang merugikan. Perubahan lingkungan serta paparan bahan kimia industri dan polutan lingkungan diidentifikasi berkontribusi signifikan terhadap penurunan kualitas spermatozoa secara nasional (Birowo *et al.*, 2021).

Spermatozoa adalah sel reproduksi jantan yang memiliki tingkat spesialisasi tinggi dengan struktur yang padat. Setelah terbentuk, sel ini tidak lagi mengalami pertumbuhan maupun pembelahan sel. Spermatozoa dihasilkan melalui proses spermatogenesis, yaitu rangkaian proses pembelahan sel yang meliputi mitosis dan meiosis. Melalui proses tersebut terbentuk sel haploid yang memiliki karakteristik structural dan fungsional khusus untuk mendukung perannya dalam proses pembuahan (Syauqy, 2014).

Proses terbentuknya sel reproduksi serta keteraturan mekanisme reproduksi menunjukkan kebesaran dan kekuasaan Allah SWT dalam menciptakan kehidupan. Hal ini sebagaimana dijelaskan dalam Al-Qur'an surah Al-Furqan ayat 54 sebagai berikut:

وَهُوَ الَّذِي خَلَقَ مِنَ الْمَاءِ بَشَرًا فَجَعَلَهُ نَسَبًا وَصِهْرًا وَكَانَ رَبُّكَ قَدِيرًا ﴿٥٤﴾

Artinya: “Dialah (pula) yang menciptakan manusia dari air (mani). Lalu, Dia menjadikannya (manusia itu mempunyai) keturunan dan muṣāharah (persemendaan). Tuhanmu adalah Maha Kuasa” (QS. Al-Furqan 25:54).

Menurut Asy-Syaukani (1964) dalam *Tafsir Fathul Qadir* yang diterjemahkan oleh Fachruddin & Saefullah (2008) menjelaskan bahwa Allah SWT menyebutkan suatu kondisi di antara kondisi-kondisi manusia dan air, (dan Dia [pula] yang menciptakan manusia dari air, lalu Dia jadikan manusia itu [punya] keturunan dan mushaharah). Maksud “air” disini adalah air mani, yakni menciptakan manusia dari air mani, lalu menjadikannya berketurunan dan mushaharah.

Menurut Katsir (1923) dalam Kitab *Tafsir Ibnu Katsir* yang diterjemahkan oleh Ghoffar (2005) menjelaskan bahwa Allah SWT berfirman “*Dan Dia (pula) yang menciptakan manusia dari air*” dan ayat seterusnya. Yaitu, Dia ciptakan manusia dari *nutfah* yang lemah, lalu disempurnakan dan diluruskan-Nya serta dijadikan-Nya dalam bentuk yang sempurna, laki-laki dan Perempuan sesuai dengan kehendak-Nya.

Tafsir Al-Munir karangan Az-Zuhaili (2005) yang diterjemahkan oleh Al-Kattani dkk., (2014) menjelaskan bahwa Allah-lah yang telah menciptakan manusia dari air mani (sperma) yang lemah, kemudian ia menyempurnakan kejadiannya dan menjadikan (susunan tubuhnya) seimbang. Ia kemudian menjadikannya tubuh yang sempurna, laki-laki maupun Perempuan (sesuai dengan kehendak-Nya).

Spermatozoa memegang peranan krusial dalam proses fertilisasi dan pewarisan materi genetik dari induk kepada keturunannya. Sebagai sel haploid, spermatozoa membawa setengah dari informasi genetik yang dibutuhkan untuk membentuk individu baru, sehingga kualitas dan integritas DNA spermatozoa sangat menentukan keberhasilan pembentukan makhluk hidup yang sehat (Mukminat, & Suharyati., 2014). Spermatozoa pada mamalia, termasuk mencit

(*Mus musculus*) tidak hanya berfungsi untuk membuahi sel telur, tetapi juga memastikan bahwa materi genetik yang diturunkan bebas dari mutasi atau kerusakan yang dapat mempengaruhi viabilitas keturunan (Ayesa dkk., 2025).

Keberhasilan reproduksi pada mamalia jantan khususnya mencit (*Mus musculus*) sangat ditentukan oleh kondisi struktural dan fungsional spermatozoa yang terbentuk melalui mekanisme spermatogenesis. Proses pembentukan sel sperma ini terjadi didalam tubulus semiinferus testis yang melibatkan serangkaian pembelahan sel mitosis dan meiosis untuk menghasilkan sel haploid. Regulasi proses spermatogenesis dikendalikan oleh sistem hormonal melalui pelepasan hormon GnRH, FSH, dan LH (Kolettis *et al.*, 2015).

Spermatozoa dapat mengalami kerusakan akibat paparan radikal bebas yang berlebihan sehingga memicu terjadinya stres oksidatif. Kondisi ini dapat menyebabkan penurunan kualitas spermatozoa, seperti berkurangnya motilitas, menurunnya viabilitas dan terjadinya kelainan morfologi. Kerusakan pada spermatozoa umumnya terjadi karena radikal bebas dapat merusak membran sel, protein, serta materi genetik (Nurhayati dkk., 2025). Salah satu pendekatan untuk mengatasi kerusakan spermatozoa dapat dilakukan dengan penambahan aktivitas antioksidan tinggi untuk mengurangi kerusakan akibat stres oksidatif (Leyn dkk., 2021). Hal tersebut diperkuat oleh Fajrilah dkk., (2013) bahwa senyawa antioksidan mampu mencegah kerusakan membran spermatozoa akibat ROS dengan melengkapi kekurangan elektron pada radikal bebas, sehingga reaksi peroksidasi lipid dapat dihambat.

Alfalfa (*Medicago sativa* L.) merupakan salah satu tanaman yang bermanfaat dalam mencegah terjadinya peroksidasi lipid pada membran plasma.

Tanaman alfalfa memiliki senyawa bioaktif seperti flavonoid yang terdiri dari apigenin, glikosida, luteolin dan adenosin. Kandungan flavonoid pada alfalfa memiliki aktivitas antiperadangan, antibodi, antiparasit dan antioksidan (Pahlani dkk., 2021).

Penelitian yang dilakukan oleh Susilowati dkk., (2014) memperlihatkan bahwa ekstraksi dari alfalfa memiliki kandungan flavonoid 8,13% dengan kadar kumarin 229,83 ppm serta kadar alkaloid 48,86%. Senyawa fenolik berupa kumarin maupun flavonoid merupakan senyawa yang memiliki banyak manfaat dalam aktivitas biologis seperti antibakteri, antivirus dan anti kanker. Ulfah (2014) menambahkan bahwa ekstrak etanolik alfalfa memiliki kemampuan sebagai antioksidan dengan nilai IC_{50} sebesar 59,339 $\mu\text{g/mL}$ dengan metode DPPH, yang mencerminkan kemampuan efektif dalam menangkal radikal bebas, sehingga dapat melindungi kerusakan sel sperma akibat stres oksidatif. Nilai IC_{50} ini sebanding dengan *Centella asiatica* sebesar 53,2210 $\mu\text{g/mL}$ yang dikenal memiliki aktivitas antioksidan tinggi (Harahap., 2024).

Kandungan antioksidan yang tinggi yang terdapat pada *Centella asiatica* dilaporkan mampu menjaga kualitas sperma meskipun terjadi penurunan jumlah spermatid akhir dan motilitas (Solihati dkk., 2013). Oleh karena kandungan dan nilai IC_{50} yang terdapat pada ekstrak alfalfa (*Medicago sativa* L.) sama dengan yang terdapat dalam ekstrak pegagan (*Centella asiatica*) maka alfalfa (*Medicago sativa* L.) juga dimungkinkan berpotensi untuk dimanfaatkan dalam menjaga kualitas sperma baik dalam perlakuan tunggal maupun dengan cara dikombinasikan dengan bahan lain. Salah satu bahan yang dapat digunakan untuk mengoptimalkan peran alfalfa sebagai antioksidan adalah dengan cara menambahkan vitamin C.

Vitamin C adalah antioksidan nonenzimatik yang hidrofilik, memainkan peran penting dalam melindungi spermatozoa dari stres oksidatif dengan menetralkan radikal bebas dan mengurangi peroksidasi lipid (Akhter *et al.*, 2023). Menurut Kowalczyk (2022) asam askorbat (vitamin C) merupakan senyawa yang mampu menetralkan radikal hidroksil, superoksida, dan peroksida, serta mampu melindungi semen (sperma) dari kerusakan oksidatif endogen.

Penelitian Awuy dkk., (2015) menyatakan bahwa asupan vitamin C, baik dalam bentuk suplemen maupun bahan pangan terbukti mampu memperbaiki kualitas spermatozoa pada kondisi paparan rokok. khususnya dalam meningkatkan jumlah, morfologi, dan pergerakan sel. Sejalan dengan penelitian Bebas dkk., (2015) menunjukkan bahwa penambahan vitamin C (asam askorbat) berpengaruh terhadap viabilitas dan motilitas spermatozoa babi. Konsentrasi vitamin C sebesar 0,1 mg/mL yang ditambahkan ke media pengencer terbukti paling efektif dalam menjaga viabilitas dan motilitas spermatozoa babi selama penyimpanan.

Ekstrak alfalfa (*Medicago sativa* L.) dan vitamin C keduanya berfungsi sebagai antioksidan untuk melindungi spermatozoa, tetapi mekanisme aksinya berbeda. Flavonoid akan bekerja untuk mencegah peroksidasi lipid yang menjadi penyebab reaksi oksidatif yang terjadi pada sperma, sedangkan vitamin C bekerja untuk memutus rantai reaksi peroksidasi lipid. Kandungan flavonoid pada alfalfa beraksi melalui penangkapan dan penetralan radikal bebas di sekitar lingkungan sperma, yang secara tidak langsung menghalangi proses peroksidasi lipid dengan mempertahankan kestabilan membran dan kemampuan gerak sperma (Suwignyo *et al.*, 2023). Disisi lain vitamin C (asam askorbat) aksinya langsung fokus pada lapisan membran sperma, yaitu dengan memutus rantai reaksi peroksidasi lipid

melalui pembelahan atom hidrogen, sehingga mempertahankan kelenturan membran sekaligus mencegah kerusakan oksidatif pada DNA sperma (Awuy dkk., 2021).

Berdasarkan penjelasan tersebut, peneliti bermaksud untuk mengetahui apakah kombinasi ekstrak etanol 70% alfalfa (*Medicago sativa* L.) dan vitamin C (asama askorbat) dapat meningkatkan kualitas spermatozoa, yang ditinjau melalui parameter motilitas, dan viabilitas spermatozoa.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Bagaimana pengaruh kombinasi ekstrak etanol 70% alfalfa (*Medicago sativa* L.) dengan vitamin c terhadap kualitas spermatozoa mencit secara *in vitro*?

1.3 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Untuk menganalisis pengaruh kombinasi ekstrak etanol 70% alfalfa (*Medicago sativa* L.) dengan vitamin C terhadap kualitas spermatozoa mencit secara *in vitro*.

1.4 Manfaat

Manfaat dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Manfaat Teoritis : Memberikan informasi tentang pengaruh kombinasi ekstrak etanol 70% alfalfa (*Medicago sativa* L.) dengan vitamin C terhadap kualitas spermatozoa mencit secara *in vitro*.
2. Manfaat Aplikatif : Memberikan alternatif pemanfaatan kombinasi ekstrak etanol 70% alfalfa dengan vitamin C dalam meningkatkan kualitas sperma

dengan cara menekan kerusakan akibat stres oksidatif serta memperbaiki parameter kualitas sperma, meliputi motilitas, dan viabilitas.

1.5 Batasan Masalah

Batasan masalah pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Ekstrak etanol 70% alfalfa yang digunakan yaitu konsentrasi 0%, 2%, dan 6%.
2. Vitamin C yang digunakan dalam penelitian ini adalah vitamin C sintetis (asam askorbat) 0 mg/mL, 0,2 mg/mL, dan 0,3 mg/mL.
3. Penelitian ini hanya dilakukan secara in vitro menggunakan sperma mencit (*Mus musculus*) jantan dewasa yang diperoleh dari proses isolasi organ reproduksi. Penilaian kualitas sperma dilakukan secara mikroskopis yang meliputi motilitas, dan viabilitas spermatozoa. Pengamatan dilakukan setelah perlakuan dan masa inkubasi yang telah ditentukan dalam penelitian.
4. Media sperma dalam penelitian ini menggunakan sodium chloride 0,9% infus.
5. Parameter yang diamati yaitu viabilitas, dan motilitas spermatozoa mencit (*Mus musculus*).

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Alfalfa (*Medicago sativa* L.)

2.1.1 Deskripsi

Tumbuhan adalah bagian penting dari sumber daya alam yang memiliki peran penting bagi kehidupan manusia, seperti menyediakan makanan, menghasilkan oksigen, dan berfungsi sebagai pelindung dari bencana (Anam dkk., 2021). Salah satu tumbuhan yang memiliki manfaat adalah alfalfa (*Medicago sativa* L.).

Alfalfa merupakan tanaman yang tumbuh di Iran namun dapat berkembang di daerah tropis seperti Indonesia (Sajimin, 2011). Tanaman subtropis ini banyak dikembangkan dan dibudidayakan di Amerika Serikat, Jepang, Australia, dan Korea untuk pakan ternak (Harianja dkk., 2021). Dalam Bahasa Arab, Alfalfa dikenal sebagai “Ratu Hijauan (*The Queen of Forage Crops*)” karena sangat berperan untuk menyembuhkan berbagai jenis penyakit (Susilowati dkk., 2014).

2.1.2 Morfologi

Alfalfa (*Medicago sativa* L.) merupakan tumbuhan pakan dari keluarga fabaceae yang berasal dari daerah subtropis dan memiliki potensi sebagai hijauan dengan kualitas tinggi. Alfalfa dibudidayakan lebih dari 80 negara di setiap benua di dunia. Tanaman ini mempunyai kemampuan dalam kesuburan tanah (Sayed *et al.*, 2022). Menurut Sajimin (2011) alfalfa toleran terhadap kekeringan, tetapi kurang tahan terhadap kelembapan tinggi.

Alfalfa (*Medicago sativa* L.) merupakan tanaman berakar tunggang yang dalam, dapat mencapai 4,5 meter. Pertumbuhannya bercabang membentuk rhizome.

Batangnya tumbuh mendatar dengan bagian dasar berkayu, bercabang dan dapat tumbuh menanjak hingga tegak dengan tinggi mencapai 30-120 cm. Daunnya memiliki satu tangkai (petiol) yang berbentuk tiga daun (trifoliat) dengan ukuran panjang 5-15 mm, dilengkapi bulu halus di bagian bawah permukaan dan pada tangkainya (Gambar 2.1). Adapun bunganya tersusun rapat dalam tandan yang berisi 10-35 kuntum, dengan mahkota berwarna ungu atau biru, meski sesekali ditemui varian berwarna putih. Alfalfa dapat hidup selama 8-10 tahun tergantung kondisi iklim serta lingkungan tumbuhnya (Sajimin, 2011).



Gambar 2. 1 Tumbuhan alfalfa (*Medicago sativa* L.) (Tang *et al.*, 2022).

2.1.3 Taksonomi

Klasifikasi *Medicago sativa* L. menurut Bagavathiannan & Van Acker (2009) sebagai berikut:

Kingdom : Plantae

Division : Magnoliophyta

Class : Magnoliopsida

Order : Fabales

Family : Fabaceae

Genus : *Medicago*

Species : *Medicago sativa* (Linnaeus, 1753)

2.1.4 Kandungan dan Manfaat

Keragaman dari setiap tumbuhan memiliki peran yang bermanfaat bagi seluruh makhluk hidup (Ehrlich & Mooney, 1983). Allah SWT berfirman dalam Al-Qur'an Surat Thaha ayat 53, sebagai berikut:

الَّذِي جَعَلَ لَكُمُ الْأَرْضَ مَهْدًا وَسَلَكَ لَكُمْ فِيهَا سُبُلًا وَأَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَخْرَجْنَا بِهِ أَزْوَاجًا مِّنْ نَّبَاتٍ شَتَّى ﴿٥٣﴾

Artinya: “(Dialah Tuhan) yang telah menjadikan bumi sebagai hamparan dan meratakan jalan-jalan di atasnya bagimu serta menurunkan air (hujan) dari langit.” Kemudian, Kami menumbuhkan dengannya (air hujan itu) beraneka macam tumbuh-tumbuhan” (Q.S. Thaha [20]: 53).

Ash-Shiddieqy (2000) dalam *Tafsir An-Nuur* menjelaskan bahwa Allah berfirman “*Wa anzala minas samaa-i maa-an fa akh-rajna bihi azwaajam min nabaatin syattaa*” yang bermakna “*Dan menurunkan hujan dari langit, lalu Kami (Allah) menumbuhkan tumbuhan dalam berbagai jenis dengan berpasang-pasangan*” yang menjelaskan bahwa Allah telah menurunkan hujan dari langit, dan dengan itu ditumbuhkanlah beberapa pasangan tanaman dari bermacam jenis dan berlainan rasa buahnya serta berlainan manfaatnya. Ada yang bermanfaat bagi manusia, dan ada pula yang bermanfaat bagi hewan.

Az-Zuhaili (2005) dalam *Tafsir Al-Munir* yang diterjemahkan oleh Al-Kattani (2014) menjelaskan bahwa Firman Allah “*وَأَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَخْرَجْنَا بِهِ أَزْوَاجًا*” Dan Kami menurunkan hujan dari awan, dan dengannya Kami mengeluarkan berbagai jenis tumbuhan, berupa tanaman, buah-buahan yang asam, manis, pahit, yang memiliki berbagai warna, aroma dan bentuk yang bermacam-macam, sebagian baik untuk manusia dan sebagian lainnya untuk binatang. Menurut Ath-Thabari (2008) dalam *Tafsir Ath-Thabari* yang diterjemahkan oleh

Affandi (2008) menjelaskan bahwa Allah berfirman, “Lalu Kami tumbuhkan dengan air hujan tersebut tumbuh-tumbuhan yang bermacam-macam, yaitu beelainan warna, rupa, dan rasa”.

Asy-Syaukani (1964) dalam *Tafsir Fathul Qadir* yang diterjemahkan oleh Fachruddin & Saefullah (2008) menjelaskan bahwa kata “ثَمَنِي” merupakan jamak dari “ثَمَنِيَّة” yang berarti berbagai macam jenis tumbuhan. Salah satu tumbuhan yang termasuk dalam keanekaragaman ciptaan Allah SWT adalah alfalfa (*Medicago sativa* L.), tanaman herba yang tumbuh menjalar dan banyak dijumpai di Indonesia. Alfalfa dikenal karena kandungan bioaktifnya seperti triterpenoid, flavonoid, dan saponin yang berfungsi sebagai antioksidan (Pahlani dkk., 2021).

Alfalfa dikenal sebagai tanaman dengan kandungan nutrisi yang melimpah seperti Ca (kalsium), klorofil, karoten, dan vitamin K. Selain itu, alfalfa juga kaya akan senyawa bioaktif terdiri dari saponin, sterol, flavonoid, kumarin, alkaloid, vitamin, asam amino, gula, protein, serta mineral. Selain itu, memiliki kandungan serat yang tinggi pada alfalfa berperan dalam menurunkan kadar kolesterol (Suwignyo *et al.*, 2023). Menurut Susilowati dkk., (2014) kandungan tinggi klorofil dalam alfalfa dapat membantu memperbaiki sistem kekebalan tubuh, dan menangkap radikal bebas.

Secara umum herba alfalfa banyak dimanfaatkan sebagai pakan ternak karena kandungan nutrisinya termasuk protein, lemak, serta serat kasar. Di samping itu, alfalfa juga dikenal sebagai tanaman obat yang memiliki potensi untuk mengobati berbagai jenis penyakit. Berdasarkan senyawa kimia yang dikandungnya, alfalfa memiliki berbagai manfaat kesehatan seperti antianemia, antiinflamasi, antiparasit, antioksidan, analgetik, detoksifikasi, diuretika, pelancar

ASI, pencahar, probiotik, mempercepat penyerapan nutrisi, menjaga keseimbangan pH darah, serta berfungsi sebagai tonikum. Alfalfa juga mengandung vitamin dan mineral yang bermanfaat untuk mengatasi kondisi avitaminosis dan hypoprothrombinaenic purpura, serta diketahui memiliki efek antikanker dan fungitoksik (Susilowati dkk., 2014). Sebagaimana firman Allah SWT dalam Al-Qur'an surah Luqman ayat 10:

خَلَقَ السَّمَوَاتِ بِغَيْرِ عَمَدٍ تَرَوْنَهَا وَالْأَرْضَ فِي أَوَاسِي أَنْ تَمِيدَ بِكُمْ وَبَثَّ فِيهَا مِنْ كُلِّ دَابَّةٍ وَأَنْزَلْنَا مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ ﴿١٠﴾

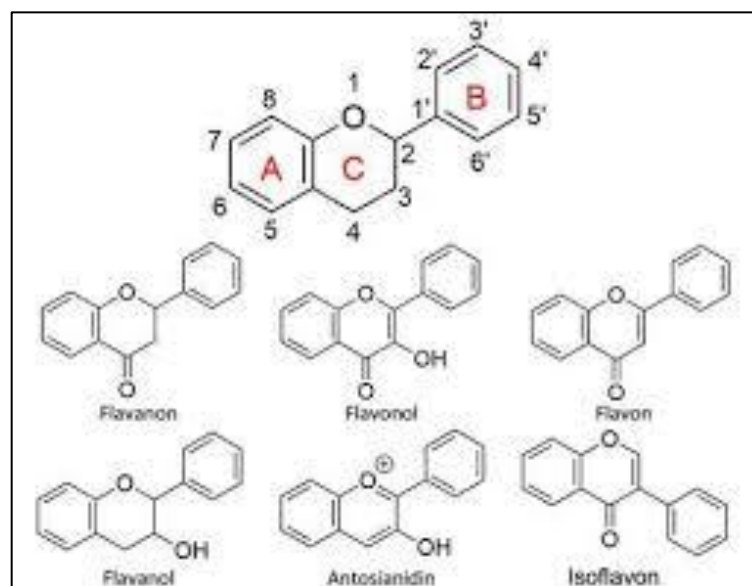
Artinya: “Dia menciptakan langit tanpa tiang (seperti) yang kamu lihat dan meletakkan di bumi gunung-gunung (yang kukuh) agar ia tidak mengguncangkanmu serta menyebarkan padanya (bumi) segala jenis makhluk bergerak. Kami (juga) menurunkan air hujan dari langit, lalu Kami menumbuhkan padanya segala pasangan yang baik” ” (Q.S. Luqman [31]: 10).

Tafsir Al-Munir karangan Az-Zuhaili (2005) yang diterjemahkan oleh Al-Kattani dkk., (2014) menjelaskan bahwa dan Kami menurunkan hujan dari awan yang hujan itu bisa menjadi sebab untuk menumbuhkan setiap jenis, macam dan varitas tumbuhan yang bagus bentuknya dan banyak manfaatnya. Ash-Shiddieqy (2000) dalam *Tafsir An-Nuur* menjelaskan bahwa Allah berfirman “*Wa anzalnaa minas samaa-I maa-an fa ambatnaa fiihaa min kulli zaujin kariim*” yang bermakna “*Kami telah menurunkan hujan dari langit, lalu Kami tumbuhkan di dalamnya segala macam pasangan yang indah*” yang menjelaskan bahwa Allah menurunkan hujan dari awan, maka menjadilah hujan itu sebagai penyebab tumbuhnya berbagai macam tanaman yang mempunyai warna yang indah dan manfaat yang banyak.

Menurut Asy-Syaukani (1964) dalam *Tafsir Fathul Qadir* yang diterjemahkan oleh Fachruddin & Saefullah (2008) menjelaskan bahwa Allah SWT berfirman “*dan Kami turunkan air hujan dari langit, lalu Kami tumbuhkan padanya*

segala macam tumbuh-tumbuhan yang baik” maksudnya adalah Kami menurunkan hujan dari langit, lalu dengan sebab penurunan hujan itu Kami tumbuhkan berbagai macam tumbuhan. Penyifatannya dengan kata كريم (*baik*) karena keindahan warnanya dan manfaatnya yang banyak. Maknanya adalah berbagai macam tumbuhan yang bermanfaat tidak ada yang mampu menumbuhkannya kecuali Tuhan Semesta alam.

Alfalfa (*Medicago sativa* L.) mengandung berbagai senyawa fitokimia bioaktif seperti alkaloid, saponin, fenol, tanin, polisakarida, dan fitoestrogen, yang menunjukkan aktivitas antioksidan, antiinflamasi, imunostimulan serta antikarsinogenik. Selain itu juga mengandung senyawa fenolik yang melimpah dan bernilai strategis, dengan potensi untuk menangkap radikal bebas (Horvat *et al.*, 2022).



Gambar 2. 2 Struktur kimia flavonoid (Ayunda & Lalita 2024).

Komponen antioksidan non-enzimatik alfalfa seperti flavonoid, fenol, dan fitoestrogen, mampu memperkuat aktivitas enzim antioksidan di hati serta ginjal, meliputi glutathion, katalase, dan SOD (Raeeszadeh *et al.*, 2021). Flavonoid

berdasarkan struktur kimianya dibedakan menjadi enam kategori utama meliputi flavanon, flavonol, flavon, flavonol, antiosianidin, dan isoflavon (Gambar 2.2). Flavonon dan flavon menjadi jenis yang paling umum ditemukan di berbagai macam buah-buahan serta biasanya berikatan secara spesifik dengan enzim baru diantara enam kategori favonoid (Ayunda & Lalita 2024). Menurut Rajalakshmi & Narasimhan (1995) flavonoid merupakan kelompok senyawa metabolit sekunder yang umum ditemukan didalam jaringan tanaman.

Flavonoid memiliki peran sebagai antioksidan. Aktivitas antioksidan ini secara tidak langsung juga berkontribusi terhadap efek antiinflamasi flavonoid. Keberadaan radikal bebas diketahui mampu memicu pelepasan berbagai mediator inflamasi. Flavonoid mampu menetralkan spesies oksigen reaktif (ROS) melalui proses bereaksi dengan senyawa reaktif. Radikal tersebut dinetralkan dan menjadi tidak aktif (Kusmita dkk., 2014). Senyawa flavonoid tidak hanya terdapat pada alfafa, melainkan juga terdapat pada berbagai tanaman lainnya yang tersebar diberbagai bagian tanaman, yaitu akar, daun, buah, batang, kulit, bunga dan biji (Trugo *et al.*, 2016; Husna dkk., 2022)

Penelitian Utami & Ducha (2023) melaporkan bahwa ekstrak kulit buah alpukat yang memiliki kandungan flavonoid $44,3 \pm 3,1$ mg/100g efektif dalam menghambat pembentukan radikal bebas. Manfaat ini timbul karena adanya flavonoid dalam ekstrak kulit alpukat yang secara aktif menghambat lonjakan produksi radikal bebas. Sabile dkk., (2016) menyebutkan pemberian suplementasi ekstrak buah mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) mampu mempertahankan motilitas spermatozoa. Manfaat positif ini berasal dari kandungan senyawa antioksidan yang tinggi dalam ekstrak buah mengkudu yang berperan menetralkan radikal bebas,

dengan mengurangi dampak kerusakan oksidatif sebagai faktor utama penurunan motilitas spermatozoa.

Permatasari dkk., (2025) menyatakan ekstrak etanol 96% akar Saluang Belum mengandung senyawa flavonoid yang berperan sebagai antioksidan. Antioksidan ini berfungsi untuk melindungi membran spermatozoa dari kerusakan oksidatif yang dapat meningkatkan motilitas atau kemampuan gerak spermatozoa. Flavonoid bereaksi dengan radikal bebas membentuk senyawa radikal yang lebih stabil dan tidak reaktif, serta mampu menetralkan radikal bebas yang lebih stabil dan tidak reaktif, serta mampu menetralkan radikal bebas secara langsung dengan mendonasikan atom hidrogen. Rizal dkk., (2021) menambahkan daun kelor kaya akan senyawa yang memiliki sifat antioksidan, termasuk flavonoid, vitamin C serta vitamin E. Komponen-komponen ini berfungsi untuk menjaga membran plasma pada sel sperma agar terlindung dari kerusakan akibat radikal bebas. Hal ini terbukti dengan pemberian ekstrak daun kelor ke dalam larutan pengencer laktosa efektif dalam meningkatkan kualitas sperma kambing peranakan boer yang disimpan pada suhu 3-5°C.

Penambahan antioksidan pada media pengencer mampu mencegah aktivitas radikal bebas yang berpotensi merusak membran spermatozoa, hal ini dapat mempertahankan viabilitas dan fertilitas. Antioksidan juga berperan sebagai penyedia energi yang mendukung kelangsungan motilitas spermatozoa (Noori 2012; Wijayanti dkk., 2023). Penelitian Bau dkk., (2025) menunjukkan bahwa komposisi pengencer tris kuning telur yang dilengkapi dengan unsur esensial seperti nutrisi, buffer, dan ekstrak jambu merah yang kaya akan antioksidan secara aktif mampu menjaga tingkat motilitas spermatozoa selama penyimpanan.

Antioksidan tersebut berperan dengan memutus rantai reaksi yang dihasilkan oleh radikal bebas. Kerusakan membran plasma dalam penyimpanan tahap penyimpanan semen berpotensi timbul akibat peroksidasi lipid, karena adanya antioksidan dari ekstrak jambu merah efektif memutus siklus reaksi tersebut dan mencegah terjadinya peroksidasi lipid melalui penangkapan *radical peroxy*.

Penelitian Elballat (2016) menyatakan bahwa komponen bioaktif seperti polifenol dan flavonoid dari bahan alami memberikan efek protektif dengan menstabilkan membran sel, menjaga aktivitas enzim antioksidan endogen, serta memperpanjang kelangsungan hidup sperma. Antioksidan dalam penelitian ini berasal dari kurkumin kunyit (*Curcuma longa*) dan asam askorbat yang bekerja secara aktif untuk menangkap radikal bebas serta menghambat peroksidasi lipid pada membrane sperma. Terbukti efektif dalam mempertahankan integritas serta fungsi spermatozoa khususnya selama proses kriopreservasi.

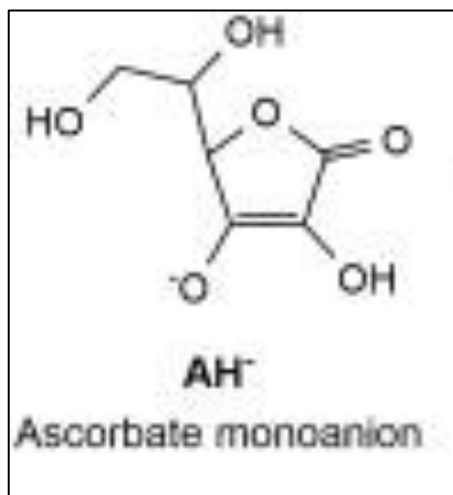
Berbagai penelitian menunjukkan bahwa ekstrak tanaman yang memiliki sifat antioksidan mampu meningkatkan motilitas dan viabilitas spermatozoa dengan cara menekan stres oksidatif. Berdasarkan hal tersebut ekstrak alfalfa (*Medicago sativa* L.) dipilih karena mengandung flavonoid yang berfungsi sebagai antioksidan alami untuk melindungi sel sperma dari kerusakan oksidatif.

2.2 Vitamin C

Asam askorbat atau vitamin C merupakan kelompok vitamin esensial yang memainkan peran penting dalam mempertahankan kesehatan tubuh, khususnya sebagai antioksidan yang menjaga sel-sel dari kerusakan yang disebabkan oleh radikal bebas. Vitamin C banyak ditemukan dalam buah dan sayur. Buah seperti

belimbing, jambu biji, kiwi dan stroberi. Sayuran antara lain brokoli, kale, dan paprika (Dosedel *et al.*, 2021).

Secara biokimia, vitamin C (asam askorbat) adalah senyawa dengan rumus kimia $C_6H_8O_6$ (Gambar 2.3) yang memiliki struktur cincin lakton enam karbon dan dapat diproduksi dari glukosa di hati sebagian besar mamalia, tetapi tidak pada manusia, primata, dan babi guinea (Njus *et al.*, 2020). Vitamin C berfungsi mencegah oksidasi senyawa lain atau berperan sebagai donor elektron (pemberi elektron). Senyawa ini tergolong sebagai senyawa antioksidan. Secara alami, vitamin C dapat mengalami proses oksidasi secara mandiri (Febrianti dkk., 2015).



Gambar 2. 3 Struktur kimia asam askorbat (Njus *et al.* 2020).

Vitamin C berperan sebagai antioksidan yang efektif menangkap oksigen di dalam sel, serta dapat menghambat proses peroksidasi lipid pada membran mitokondria yang berpotensi menimbulkan kerusakan proses glikolisis dan motilitas (Dasrul & Lubis, 2014). Menurut Arrigoni & De Tullio (2002) asam askorbat merupakan antioksidan yang efektif dalam menangkalkan radikal bebas serta spesies oksigen reaktif (ROS) lain yang muncul sebagai hasil dari proses metabolisme sel. Akbar dkk., (2013) menyebutkan asam askorbat merupakan

senyawa yang efektif dalam menetralkan radikal bebas dan menghentikan rantai reaksi oksidatif, yang mampu mencegah kerusakan peroksidasi yang berdampak pada viabilitas serta fertilitas sel sperma. Selain itu, asam askorbat juga berfungsi sebagai agen pereduksi dalam sistem oksidasi-reduksi yang terjadi didalam tubuh.

Vitamin C atau asam askorbat larut dalam air yang konsentrasinya mencapai sepuluh kali lebih tinggi di plasma semen (Majzoub & Argawal, 2018). Asam askorbat berperan sebagai penangkap berbagai jenis ROS. Senyawa ini bertindak sebagai donor elektron yang sangat kuat, bereaksi dengan superoksida, peroksida, dan radikal hidroksil untuk menghasilkan dehidroaskorbat.

Agarwal *et al.*, (2014) menyatakan bahwa vitamin C (asam askorbat) merupakan antioksidan pemutus rantai yang memainkan peran penting dalam melawan stres oksidatif (OS) dalam plasma seminal dengan menetralkan radikal bebas seperti $\text{OH}^\cdot$, $\text{O}_2^\cdot$, dan H_2O_2 di cairan ekstraseluler, dengan melindungi viabilitas dan motilitas sperma. Vitamin C hanya bertindak sebagai penangkap atau penetral radikal bebas (ROS) yang lemah pada membran sel sperma.

Penelitian Aitken *et al.*, (2012) menyatakan bahwa vitamin C merupakan salah satu *scavenger* radikal bebas molekul kecil plasma seminal yang mampu berkontribusi pada total kekuatan antioksidan 10 kali lebih tinggi daripada darah, melindungi sperma dari stres oksidatif akibat ROS mitokondria. Selain itu, penambahan vitamin C (asam askorbat) bersama katalase pada sperma yang dikriopreservasi dapat mengurangi efek negatif hidrogen peroksida, mempertahankan motilitas, viabilitas dan integritas membran. Klau dkk., (2024) menyebutkan penggunaan kombinasi vitamin C (80%) sebanyak 1,5 mL dan albumin (20%) sebesar 1000 μL menunjukkan keefektifan dalam mempertahankan viabilitas sel

spermatozoa pada spermatozoa pada manusia. Vitamin C bekerja dengan menekan lonjakan kadar ROS, sehingga melindungi DNA dan integritas sel spermatozoa dari dampak stres oksidatif. Senyawa ini bereaksi langsung dengan berbagai radikal seperti hidroksil, superoksida, dan hidrogen peroksida dengan polaritas yang tinggi.

Penelitian Septianisa dkk., (2025) mengungkapkan bahwa penambahan antioksidan dari vitamin C yang efektif menghalangi proses peroksidasi lipid, sehingga membran spermatozoa terjaga dari kerusakan. Selaras dengan pendapat Savitri dkk., (2014) bahwa vitamin C berperan aktif dalam mempertahankan kestabilan struktur membran plasma terhadap peroksidasi yang muncul saat pengolahan semen akibat paparan langsung oksigen (O₂) yang beresiko menyebabkan kematian sel spermatozoa.

Janggur dkk., (2023) melaporkan bahwa spermatozoa yang diberi sari buah tomat konsentrasi 2% dan 3% meningkatkan motilitas spermatozoa. Motilitas spermatozoa yang tinggi disebabkan oleh nutrisi dan senyawa antioksidan dalam sari buah tomat. Buah tomat kaya akan nutrisi esensial seperti vitamin C, likopen, karbohidrat, protein, dan vitamin A. Vitamin C berfungsi sebagai antioksidan yang efektif meredam efek buruk dari radikal bebas yang berlebihan selama penyimpanan sperma.

2.3 Mencit (*Mus musculus*)

2.3.1 Hewan Coba Mencit

Mencit (*Mus musculus*) merupakan hewan coba yang paling banyak digunakan dalam penelitian biomedis karena kesamaan fisiologis dan genetiknya yang tinggi dengan manusia. Penggunaan mencit sebagai model hewan coba didukung oleh siklus reproduksi yang cepat, ukuran tubuh yang kecil, serta

kemudahan dalam pemeliharaan dan modifikasi genetik. Dalam bidang reproduksi mencit sering digunakan untuk mengkaji mekanisme infertilitas, kualitas spermatozoa, serta efek berbagai perlakuan seperti stres oksidatif dan pemberian antioksidan secara in vitro (Hasanah & Masri., 2015). Keunggulan tambahan mencakup ketersediaan data referensi yang melimpah serta biaya penelitian yang lebih terjangkau daripada hewan coba lainnya. Hal ini menjadikan mencit sebagai model yang efektif dan terjangkau untuk menunjang kemajuan ilmu pengetahuan, terutama dalam bidang biologi reproduksi dan kesehatan hewan (Handajani., 2021).

Menurut Kifli dkk., (2025) klasifikasi mencit (*Mus musculus*) adalah sebagai berikut:

Kingdom : Animalia

Division : Chordata

Class : Mamalia

Order : Rodentia

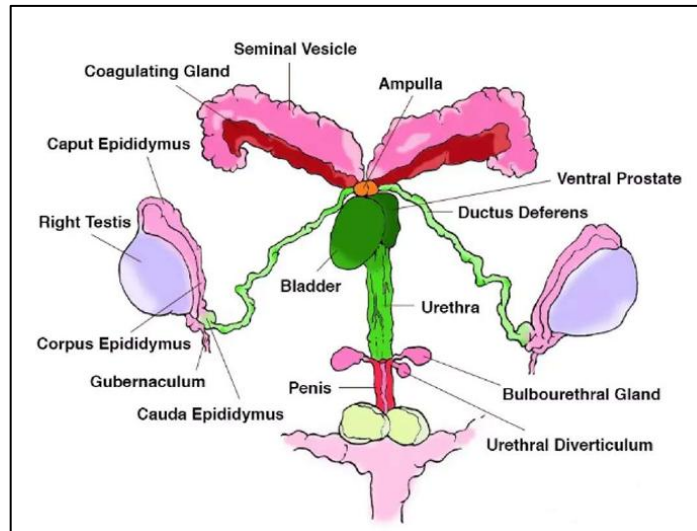
Family : Murinane

Genus : Mus

Species : *Mus musculus*(Linnaeus, 1753).

2.3.2 Sistem Reproduksi Jantan

Organ reproduksi mencit jantan secara umum terbagi menjadi tiga komponen utama yaitu kelenjar kelamin (testis), saluran reproduksi, dan kelenjar aksesori (Toor & Sikka, 2017). Menurut Nugroho (2018), Alat kelamin mencit jantan juga dibedakan menjadi alat kelamin luar yang terdiri atas penis dan skrotum, serta alat kelamin dalam yang mencakup testis, epididimis, vas deferens, dan kelenjar-kelenjar pendukung (Gambar 2.4).



Gambar 2. 4 Sistem reproduksi jantan (Nugroho, 2018).

Testis merupakan organ reproduksi primer pada hewan jantan yang berfungsi ganda, yaitu sebagai tempat produksi spermatozoa (gamet jantan) dan sebagai kelenjar endokrin penghasil hormon androgen terutama hormon testosteron. Pada mencit, testis berbentuk oval dan terletak di dalam kantung skrotum. Secara histologis, testis tersusun atas tubulus semiinferus yang dipisahkan oleh jaringan intestisial (Reni dkk., 2013). Pada dinding tubulus semiinferus terdapat sel-sel epitel germinal yang meliputi spermatogonia, spermatosit, dan spermatid, serta sel Sertoli yang berperan sebagai sel penyokong. Sementara itu, pada jaringan interstisial diantara tubulus semiinferus terdapat sel leydig beserta pembuluh darah (Lei *et al.*, 2025).

Suhu testis dijaga agar tetap beberapa derajat celcius dibawah suhu inti tubuh, hal ini merupakan syarat penting bagi berlangsungnya proses spermatogenesis secara optimal. Fungsi pengaturan suhu tersebut dilakukan oleh skrotum yang berperan sebagai termoregulator eksternal. Apabila terdapat paparan panas berlebih, kualitas spermatozoa dapat mengalami penurunan yang signifikan (Anzila dkk., 2017).

Epididimis merupakan saluran berkelok-kelok yang melekat dibagian posterior testis dan terdiri atas tiga bagian posterior testis dan terdiri atas tiga bagian anatomis, yaitu kaput (kepala), korpus (badan) dan kauda (ekor) epididimis. Kaput dan korpus epididimis berfungsi sebagai tempat pematangan spermatozoa (maturasi), sedangkan kauda epididimis berperan sebagai tempat penyimpanan spermatozoa hingga saat ejakulasi (James *et al.*, 2020). Spermatozoa ketika berada di epididimis mengalami berbagai perubahan biokimia dan morfologis yang mendukung proses pematangan sehingga mampu mencapai motilitas dan kemampuan fertilisasi yang optimal (Caballero *et al*, 2011).

Vas deferens merupakan saluran muscular yang menghubungkan kauda epididimis dengan uretra. Saluran ini berfungsi mengalirkan spermatozoa dari epididimis menuju uretra pada saat ejakulasi berlangsung. Uretra kemudian berperan sebagai saluran bersama bagi sistem ekskresi urin dan sistem reproduksi sebelum sperma dikeluarkan melalui penis (Nirnasari., 2018)

Kelenjar aksesori pada sistem reproduksi jantan mencit mencakup vesikula seminalis, kelenjar prostat, dan kelenjar bulbouretral (kelenjar cowper). Kelenjar-kelenjar ini menyekresikan berbagai komponen plasma semen yang diperlukan untuk mendukung kelangsungan hidup dan transportasi spermatozoa. Sekresi dari vesikula seminalis mengandung fruktosa dan protein yang menjadi sumber energi bagi spermatozoa, sedangkan sekresi kelenjar prostat berkontribusi menjaga pH semen agar bersifat netral hingga basa (pH 7,2 hingga 8,2) sehingga dapat menetralkan keasaman saluran reproduksi betina (Flint *et al*, 2015).

2.3.3 Spermatogenesis

Spermatogenesis adalah serangkaian proses pembelahan dan diferensiasi sel yang menghasilkan spermatozoa matang dari sel-sel spermatogonia didalam tubulus semiinferus testis. Proses ini berlangsung secara berkelanjutan setelah hewan mencapai dewasa kelamin dan berlangsung melalui tiga tahapan utama, yaitu spermatositogenesis, meiosis, dan spermiogenesis (Iqra dkk., 2023).

Pada tahap spermatositogenesis, spermatogonia mengalami serangkaian pembelahan mitosis untuk meningkatkan jumlah sel. Spermatogonia tipe A ditandai dengan inti berwarna lebih pucat, sedangkan spermatogonia tipe B memiliki inti yang tampak lebih gelap. Selanjutnya sel-sel tersebut berdiferensiasi menjadi spermatosit primer yang dapat diidentifikasi berdasarkan karakteristik kromatinnya, meliputi tahap preleptoten, leptoten, zigoten, pakiten, dan diploten. Setelah menjalani dua tahap pembelahan meiosis, spermatosit primer akan menghasilkan spermatid haploid (Arief., 2011).

Fase akhir yang dikenal sebagai spermiogenesis ditandai dengan perubahan morfologi spermatid berbentuk bulat menjadi spermatozoa matang yang memiliki struktur khas berupa kepala, leher dan ekor. Proses ini tidak melibatkan pembelahan sel melainkan berupa restrukturisasi sel yang kompleks. Diameter tubulus semiinferus serta ketebalan epitel germinal merupakan parameter histologis penting yang digunakan untuk menilai kualitas proses spermatogenesis (Rahmi & Baharun, 2023).

Menurut Khotijah (2024), Durasi spermatogenesis pada mencit berlangsung sekitar 35 hari. Kecepatan siklus spermatogenik yang relatif singkat ini menjadikan

mencit sebagai model yang ideal untuk penelitian toksikologi reproduksi dan evaluasi zat-zat yang berpotensi mempengaruhi fertilitas jantan.

2.3.4 Regulasi Hormonal Sistem Reproduksi Jantan

Regulasi sistem reproduksi jantan dikendalikan oleh sistem hipotalamus-hipofisis-gonad (HPG axis). Hipotalamus mensekresikan gonadotropin-releasing hormon (GnRH) secara pulsatil setiap 1 hingga 3 jam, yang merangsang kelenjar hipofisis anterior untuk memproduksi dua hormon gonadotropin utama, yaitu luteneizing hormon (LH) dan folicle-stimulating hormon (FSH) (Oduwole *et al.*, 2018).

LH bekerja pada sel leydig di jaringan testis untuk merangsang produksi testoteron. Konsentrasi testoteron intratestikular diperkirakan sekitar 100 kali lebih tinggi dibandingkan kadar dalam darah perifer, dan kondisi ini merupakan prasyarat mutlak bagi berlangsungnya spermatogenesis yang normal. Testosteron kemudian bekerja melalui reseptor androgen yang terdapat pada sel sertoli dan sel miotubular peritubular untuk mendukung pematangan sel-sel germinal (Lei *et al.*, 2025).

FSH bekerja secara spesifik pada sel sertoli melalui reseptor FSHR yang terdapat pada permukaan sel tersebut. Aktivasi FSH merangsang sel sertoli untuk memproduksi berbagai molekul sinyal, nutrisi dan faktor pertumbuhan yang diperlukan untuk mendukung perkembangan spermatosit dan spermatid. Dengan demikian, spermatogenesis diatur secara tidak langsung oleh kedua gonadotropin ini melalui aksi sinergistis testoteron dan FSH pada sel sertoli (Sjafaraenan *et al.*, 2018). Pramesemara (2017) menunjukkan bahwa pemberian growth hormone pada mencit jantan tua secara signifikan meningkatkan jumlah sel spermatogonium, spermatosit primer pakiten, spermatid, sel leydig, dan sel sertoli. Hal ini

mengindikasikan adanya interaksi hormonal yang kompleks dalam regulasi spermatogenesis.

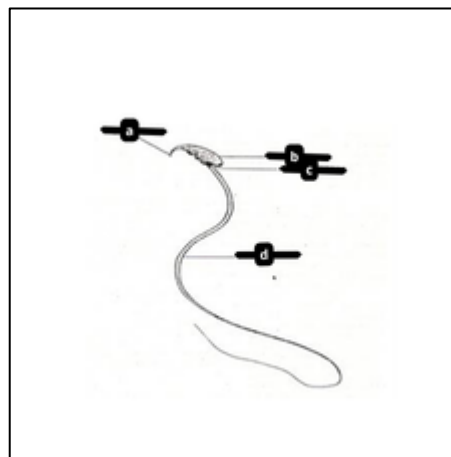
Menurut Hauger *et al* (2022), Testosteron juga berperan dalam mekanisme umpan balik negatif terhadap hipotalamus dan hipofisis. Kadar testoteron yang tinggi dalam sirkulasi darah akan menghambat sekresi GnRH dan mengurangi respons hipofisis anterior terhadap rangsangan GnRH, sehingga produksi LH dan FSH menurun. Mekanisme umpan balik ini menjaga homeostatis kadar hormon reproduksi jantan dalam batas fisiologis yang normal.

2.3.5 Spermatozoa Mencit

Spermatozoa merupakan sel gamet jantan yang dihasilkan memlaui proses spermatogenesis didalam tubulus semiinferus testis. Sel sperma ini adalah sel yang sangat terspesialisasi bersifat haploid dan dirancang secara khusus untuk membawa materi genetik paternal menuju sel telur dalam proses fertilisasi. Spermatozoa bersama plasma seminalis yaitu cairan yang disekresikan oleh kelenjar aksesori reproduksi jantan dan membentuk semen yang diejakulasikan (Susetyarini, 2015).

Fungsi utama spermatozoa adalah membuahi sel telur (oosit) sehingga terbentuk zigot yang kemudian berkembang menjadi embrio. Selain itu, spermatozoa berperan sebagai pembawa informasi genetik pria, termasuk penentuan jenis kelamin keturunan melalui kromosom seks yang dibawanya (kromosom X atau Y). Spermatozoa yang membawa kromosom Y akan menghasilkan keturunan berkelamin jantan, sedangkan spermatozoa yang membawa kromosom X menghasilkan keturunan berkelamin betina (Rahman & Pang, 2020).

Menurut Susetyarini (2018), Spermatozoa mencit seperti spermatozoa mamalia pada umumnya, terdiri atas tiga bagian utama yaitu kepala, leher dan ekor (flagellum) (Gambar 2.5). Kepala spermatozoa mencit memiliki ciri khas morfologi yang berbeda dari manusia maupun hewan lainnya. Kepala spermatozoa mencit berbentuk seperti kail (*hook-shaped*), dengan ujung anterior yang melengkung dan memanjang, bukan berbentuk oval seperti pada kebanyakan mamalia (Nurmasyitah., 2018). Menurut (Yogo, 2022), Keunikan bentuk kepala mencit ini menjadikan spermatozoa mencit sebagai model yang banyak digunakan dalam penelitian morfologi dan abnormalitas spermatozoa.



Gambar 2. 5 Morfologi spermatozoa a) akrosom, (b) kepala, (c) bagian tengah, dan (d) bagian ujung atau ekor (Susetyarini, 2018).

Kepala spermatozoa terdiri atas dua komponen utama yaitu nukleus dan akrosom. Nukleus mengandung kromosom haploid yang terkondensasi sangat padat dengan bantuan protein protamin. Kepadatan kondensasi ini berfungsi untuk melindungi integritas materi genetik selama perjalanan spermatozoa menuju sel telur (Teves & Roldan, 2022). Akrosom merupakan organel berbentuk kantong bermembran ganda yang menyelubungi dua pertiga bagian anterior nukleus. Didalam nukleus terdapat berbagai enzim hidrolitik esensial untuk proses fertilisasi,

seperti akrosin, hialuronidase, dan *Corona Penetrating Enzyme* (CPE). Enzim hialuronidase berperan dalam menembus lapisan kumulus ooforus, sementara enzim akrosin membantu penetrasi zona pelusida (Berruti & Paiardi, 2011).

Leher spermatozoa atau connecting piece merupakan segmen pendek yang menghubungkan kepala dengan ekor. Bagian leher ini terdiri atas lempeng basal yang melekat pada ujung posterior nukleus. Leher spermatozoa merupakan daerah yang rentan terhadap kerusakan mekanis dan putusnya segmen ini merupakan salah satu bentuk abnormalitas spermatozoa yang dapat ditemukan pada evaluasi morfologi (Susetyarini, 2018).

Menurut Syauqy (2014), Ekor spermatozoa terbagi atas tiga segmen, yaitu bagian tengah (midpiece), bagian utama (principal piece), dan bagian ujung (end piece). Secara keseluruhan panjang ekor spermatozoa mencapai sekitar 55 mikrometer dengan diameter yang semakin mengecil ke arah ujung. Pada bagian midpiece terdapat selubung mitokondria yang tersusun secara spiral, membentuk antara 75 hingga 100 unit mitokondria yang terkondensasi. Mitokondria pada midpiece berfungsi sebagai penghasil energi berupa ATP yang digunakan oleh spermatozoa untuk menggerakkan flagellum.

Kualitas spermatozoa mencit dinilai berdasarkan beberapa parameter antara lain motilitas, viabilitas, morfologi dan konsentrasi. Spermatozoa mencit dikatakan motil apabila kecepatan gerakannya mencapai 69 mikrometer/detik. Normalnya, setidaknya 50% spermatozoa harus memiliki motilitas untuk menjamin kemampuan fertilisasi yang memadai (Garner & Hefez., 2000).

Evaluasi spermatozoa terbagi menjadi dua kelompok utama, yakni pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis. Pemeriksaan makroskopis yaitu

penilaian yang dilakukan untuk mengamati karakteristik semen secara umum tanpa menggunakan alat, sedangkan pemeriksaan mikroskopis yaitu penilaian yang dilakukan untuk mengamati kondisi semen secara lebih rinci dengan bantuan alat yang lebih kompleks (mikroskop). Pemeriksaan makroskopis mencakup pengukuran volume, pH, aroma, dan warna semen termasuk dalam pemeriksaan makroskopis, sedangkan pemeriksaan mikroskopis mencakup penilaian motilitas, viabilitas, serta identifikasi sel normal dan abnormal (Munazaroh dkk., 2013).

Energi untuk motilitas spermatozoa berasal dari dua sumber utama yaitu metabolisme oksidatif melalui rantai transpor elektron di mitokondria, dan glikolisis yang menggunakan substrat energetik seperti fruktosa dari plasma semen. Ketersediaan ATP yang memadai adalah syarat utama bagi aktivitas (Fiqri dkk., 2014).

Viabilitas spermatozoa merupakan persentase spermatozoa yang hidup dalam populasi total sel. Penilaian viabilitas dilakukan menggunakan pewarnaan eosin-nigrosin. Spermatozoa yang hidup memiliki membran plasma yang utuh sehingga tidak menyerap zat warna, dan akan tampak dengan kepala berwarna terang atau tidak berwarna dibawah mikroskop. Sebaliknya, spermatozoa yang mati memiliki membran plasma yang rusak sehingga menyerap pewarna dan tampak dengan kepala berwarna merah-ungu (Leyn dkk., 2021).

Setiawan dkk., (2022) melaporkan bahwa pemberian ekstrak etanol akar alang-alang menyebabkan penurunan bobot kelenjar testis, vesikuloa seminalis, dan epididimis pada mencit jantan, yang pada akhirnya berdampak pada penurunan prosukdi dan kualitas spermatozoa.

Durasi paparan cahaya juga terbukti mempengaruhi morfologi dan anatomi organ reproduksi mencit jantan. Mencit jantan yang dipelihara dalam kondisi gelap memiliki ukuran skrotum dan berat testis yang lebih besar dibandingkan dengan mencit yang dipelihara dalam kondisi terang terus menerus, dengan rata-rata diameter perkembangan skrotum masing-masing 1,22 cm berbanding 1,05 cm, serta berat testis pada kondisi gelap sebesar 0,13 gram berbanding kondisi terang (Mondal *et al.*, 2022).

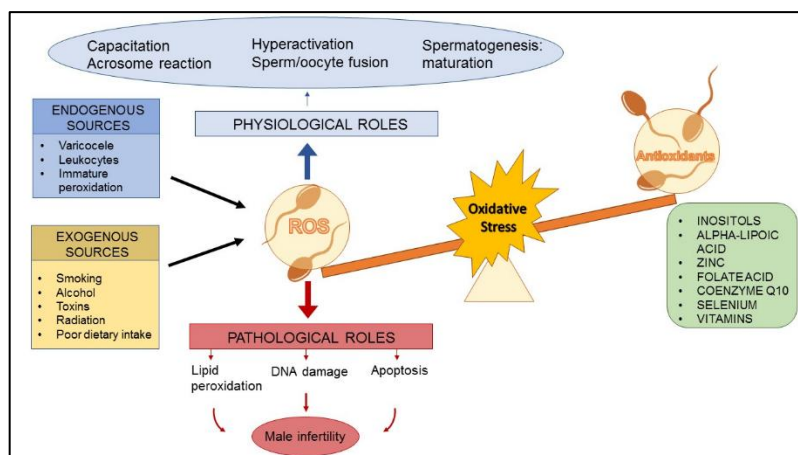
Penelitian Ducha *et al.*, (2021) menyatakan bahwa evaluasi makroskopis dan mikroskopis spermatozoa memainkan peran penting dalam menilai kualitas semen secara keseluruhan. Hal ini sebagai dasar untuk memprediksi fertilitas jantan. Selain itu, hasil pengamatan pada spermatozoa mencit menunjukkan bahwa parameter makroskopis, seperti volume dan pH serta parameter mikroskopis seperti konsentrasi spermatozoa memiliki keterkaitan dengan kualitas dan daya tahan sel untuk tetap stabil selama proses perlakuan, sehingga dapat mendukung analisis kualitas spermatozoa secara optimal.

Kualitas spermatozoa dipengaruhi oleh beberapa faktor utama, seperti nutrisi, polusi lingkungan, aktivitas fisik, dan faktor lainnya. Makanan yang kaya akan antioksidan seperti vitamin C, B2, B6, selenium, dan zinc, dapat melindungi sperma dari kerusakan akibat radikal bebas. Namun polusi udara terutama dari asap kendaraan (70%), rokok, dan industri berdampak buruk pada sperma. Aktivitas fisik berlebihan juga dapat menurunkan motilitas dan jumlah sperma hingga 50% karena produksi oksidan tinggi. Selain itu, faktor psikis, dan hormonal juga mempengaruhi spermatozoa yang sehat (Dewangga dkk., 2020).

Gangguan fungsi spermatozoa menjadi penyebab utama infertilitas, dengan stres oksidatif (OS) yang memainkan peran penting dalam patofisiologi fungsi sperma yang disebabkan oleh ketidakseimbangan antara pembentukan spesies oksigen reaktif (ROS) seperti H_2O_2 , O_2 , dan OH serta sistem pertahanan antioksidan alami tubuh. Kelebihan ROS berpotensi merusak membran sperma, terutama lipid asam lemak tak jenuh ganda (PUFA), yang memicu proses peroksidasi lipid dan mengganggu motilitas sperma. Tubuh menyediakan mekanisme antioksidan enzimatik seperti superoksida dismutase, glutathione peroksidase, dan glutathione reductase, serta antioksidan non-enzimatik seperti vitamin C, vitamin E, glutathione, karoten dan albumin untuk mengimbangi hal ini, yang berfungsi menangkap elektron bebas dari radikal tanpa menghasilkan reaktivitas berbahaya (Palani, 2018). Menurut Kowalczyk (2022) antioksidan yang dimiliki sperma sangat rendah sehingga tidak dapat melindungi sperma dari ROS yang tinggi dan juga sitoplasma memiliki enzim dengan konsentrasi kecil, hanya bisa menetralkan ROS dalam jumlah rendah.

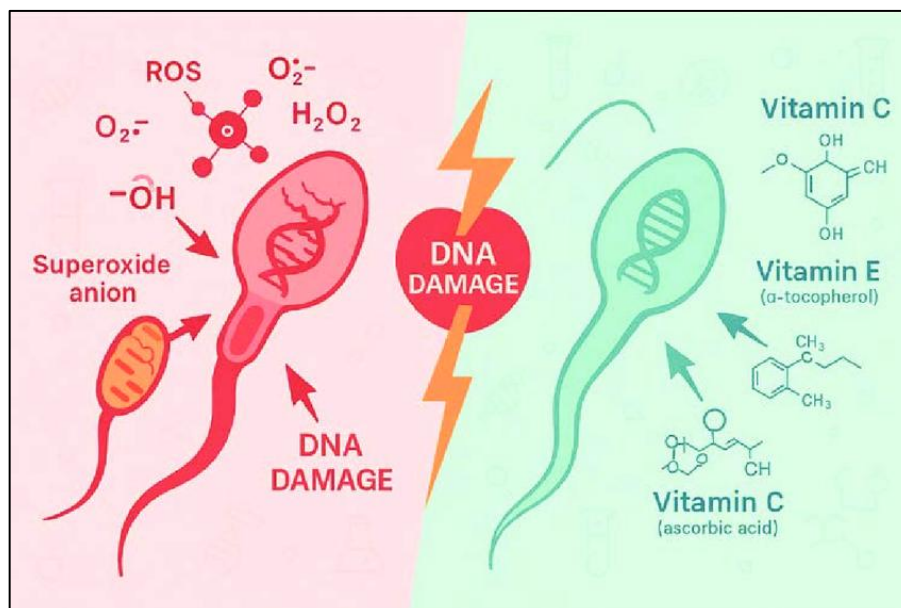
Menurut Cilio *et al.*, (2022) keseimbangan antara *Reactive Oxygen species* (ROS) dan senyawa antioksidan memegang peran penting dalam mempertahankan fungsi fisiologis sperma. ROS bisa berasal dari sumber internal seperti varikokel, leukosit, serta proses peroksidasi pada sperma yang belum matang atau dari faktor eksternal seperti asap rokok, alkohol, zat toksik, paparan radiasi, dan kebiasaan mengkonsumsi makanan yang tidak sehat. ROS esensial kadar normal untuk mendukung proses kapasitasi, reaksi akrosom, hiperaktivasi, penggabungan sperma dengan oosit serta perkembangan spermatogenesis. Akan tetapi, jika produksi ROS melebihi batas dan tidak diseimbangkan dengan antioksidan, maka stres oksidatif

akan timbul yang akan mengakibatkan kerusakan pada membran lipid, DNA sperma, serta kematian sel yang akhirnya menimbulkan infertilitas (Gambar 2.6).



Gambar 2. 6 Mekanisme keseimbangan antara reactive oxygen species (ROS) dan antioksidan (Cilio *et al.*, 2022).

Menurut Wibawa dkk., (2020) latihan fisik menyebabkan peningkatan kebutuhan energi (ATP) dan oksigen memicu aktivitas metabolisme yang menyebabkan pembentukan stres oksidatif melalui proses di mitokondria pada rantai respirasi. Proses tersebut menghasilkan *Reactive Oxygen Species* (ROS) di tingkat seluler. Apabila kadar ROS melebihi ambang batas dan tidak diseimbangkan oleh mekanisme pertahanan antioksidan, maka stres oksidatif muncul yang akan memicu oksidasi lipid pada membran sel, merusak integritas sel, serta membentuk indikator seperti *Malondialdehida* (MDA). Menurut Berean (2025) stres oksidatif dan antioksidan memiliki peran penting dalam menentukan tingkat kesuburan pria. Produksi ROS yang berlebihan dari aktivitas mitokondria dapat mengakibatkan fragmentasi DNA serta struktur spermatozoa. Sebaliknya, keberadaan antioksidan seperti glutathione, vitamin C, dan vitamin E mampu menetralkan ROS, mempertahankan kestabilan DNA, serta meningkatkan viabilitas sperma (Gambar 2.7).



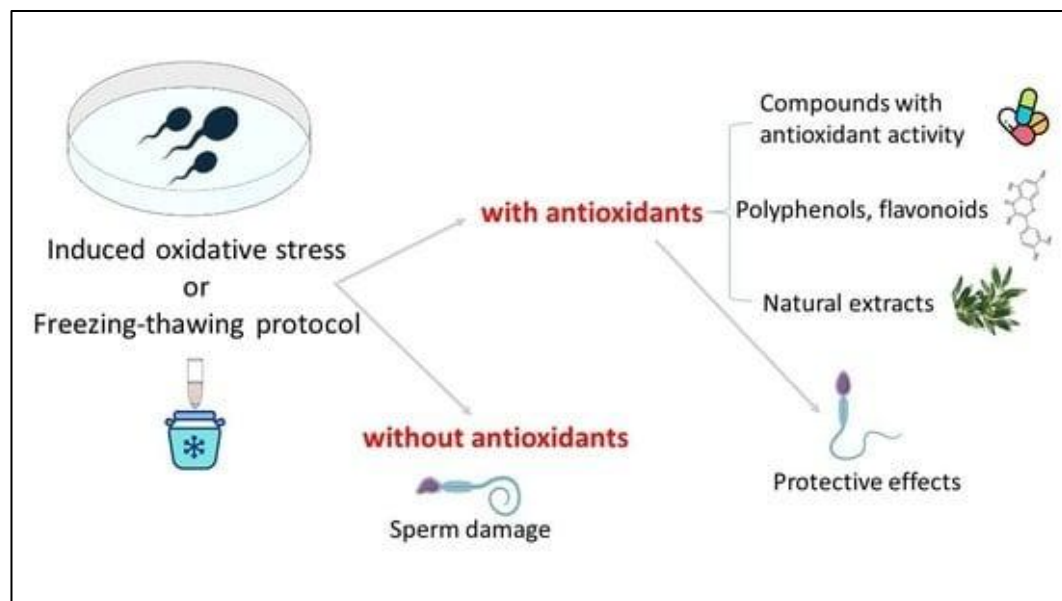
Gambar 2. 7 Mekanisme stres oksidatif dan peran vitamin C sebagai antioksidan (Berean, 2025).

Menurut Liu *et al.*, (2025) vitamin C berperan secara langsung dalam menangkal radikal bebas di fase air. Mekanisme vitamin C ini tanpa bantuan enzim antioksidan endogen, serta mendaur ulang vitamin E dari bentuk teroksidasi menjadi aktif kembali.

2.4 Pengaruh Ekstrak Alfalfa (*Medicago sativa* L.) dan Vitamin C terhadap Kualitas Spermatozoa

Menurut Moretti *et al.*, (2023) antioksidan memiliki peran penting esensial dalam melindungi spermatozoa dari efek stres oksidatif, terutama pada proses yang beresiko menyebabkan kerusakan seperti pembekuan dan pencairan semen. Proses pembekuan apabila tidak ditambahi antioksidan spermatozoa akan mengalami gangguan pada struktur dan fungsinya, seperti penurunan viabilitas, motilitas, normalitas dan kerusakan integritas DNA. Namun dengan menambahkan antioksidan seperti senyawa dengan aktivitas antioksidan, polifenol, flavonoid, atau ekstrak alami dari tumbuhan. Antioksidan tersebut memberikan efek perlindungan,

membantu menetralkan radikal bebas dan menjaga kualitas serta kelangsungan hidup spermatozoa (Gambar 2.8). Beragam jenis antioksidan alami dapat ditemukan di lingkungan, yang umumnya berasal dari berbagai sumber tumbuhan (Pandey & Rizvi, 2009). Salah satunya adalah alfalfa (*Medicago sativa* L.) yang dikenal memiliki aktivitas antioksidan tinggi.



Gambar 2. 8 Mekanisme peran antioksidan terhadap perlindungan spermatozoa dari stres oksidatif (Moretti et al., 2023).

Alfalfa (*Medicago sativa* L.) adalah salah satu tanaman yang memiliki kandungan antioksidan seperti flavonoid (Suwignyo *et al.*, 2023). Menurut Leyn dkk., (2021) pemberian antioksidan dengan konsentrasi yang sesuai dapat memberikan manfaat optimal untuk mencegah serta mengurangi proses peroksidasi lipid yang disebabkan oleh radikal bebas pada membran plasma spermatozoa, yang kaya akan asam lemak tak jenuh dan sehingga sangat rentan terhadap kerusakan. Penurunan reaksi peroksidasi lipid akan mengakibatkan penurunan tingkat kelainan spermatozoa. Flavonoid dalam ekstrak kulit buah naga berfungsi sebagai

antioksidan yang menetralkan radikal bebas, sehingga mencegah terjadinya kerusakan pada spermatozoa.

Rizal & Herdis (2010) menyatakan bahwa suplementasi antioksidan dapat menghentikan proses reaksi yang disebabkan oleh radikal bebas. Antioksidan berfungsi melalui dua mekanisme yaitu dengan menyediakan atom hidrogen serta menghambat proses autooksidasi melalui pemutusan rantai reaksi, sehingga radikal lipid dapat diubah menjadi bentuk yang lebih stabil (Safira dkk., 2025). Menurut Wang *et al.*, (2025) radikal lipid yang diubah menjadi stabil oleh antioksidan tidak akan lagi bereaksi dengan oksigen atau molekul lemak lain, yang menyebabkan tidak akan terbentuk lagi radikal baru dan kerusakan oksidatif berhenti.

Antioksidan dari ekstrak tanaman membantu meningkatkan kerja enzim antioksidan alami yang ada di dalam tubuh (Berean, 2025). Menurut Liu *et al.*, (2025) Nrf2 yang berada di dalam nukleus akan berikatan dengan ARE (*antioxidant response element*) yang kemudian mengaktifkan ekspresi berbagai enzim antioksidan seperti SOD (superoksida dismutase), GSH-Px (glutation peroksidase), CAT (katalase), NQO1 (NADPH quione oksidoreduktase), dan heme oxygenase-1. Aktivasi ini membuat sel lebih mampu melawan dan bertahan terhadap kerusakan akibat stres oksidatif.

Oleh karena, selain mengandalkan antioksidan endogen yang secara alami diproduksi tubuh, perlindungan terhadap spermatozoa juga dapat ditingkatkan melalui pemberian antioksidan dari bahan alami, seperti ekstrak alfalfa (*Medicago sativa* L.). Ekstrak alfalfa mengandung senyawa bioaktif seperti flavonoid yang berfungsi sebagai penangkap radikal bebas (ROS) serta penguat aktivitas enzim antioksidan alami tubuh. Ekstrak alami tersebut dapat dikombinasikan dengan

vitamin C (asam askorbat) untuk memperkuat efek tersebut. Vitamin C bekerja secara langsung sebagai direct scavenger dengan radikal bebas tanpa bantuan enzim. Kombinasi antara antioksidan alami dari ekstrak alfalfa dan vitamin C ini dapat memberikan perlindungan yang lebih baik terhadap kualitas spermatozoa.

Vitamin C akan melawan dan menetralkan radikal bebas termasuk yang timbul dari induksi kerusakan DNA atau produksi radikal bebas secara berlebihan (Awuy dkk., 2021). Menurut Amtiran dkk., (2020) vitamin dapat menghalangi proses peroksidasi lipid melalui pemutusan rantai reaksi atau penetralan radikal bebas dengan berinteraksi secara langsung terhadap senyawa peroksi organik. Mekanisme tersebut berperan dalam mencegah munculnya reaksi berantai serta mengurangi kerusakan oksidatif yang berpotensi menurunkan kualitas spermatozoa.

Menurut Hes *et al.*, (2019) vitamin C berperan sebagai antioksidan langsung yang menetralkan radikal bebas seperti superoksida, hidroksil, dan hidrogen peroksida. Sebagai senyawa yang larut dalam air, vitamin C bekerja di fase cair seluler dan plasma semen. Selain itu, vitamin C juga meregenerasi vitamin E dari bentuk teroksidasi menjadi bentuk aktifnya kembali, sehingga memperkuat sistem pertahanan antioksidan seluler.

2.5 Ekstraksi

Ekstraksi adalah proses pemisahan zat ekstrak dari bahan alam menggunakan pelarut sebagai media (Pawarti dkk., 2023). Menurut Aji dkk., (2017) secara umum ekstraksi dibedakan menjadi dua macam, yaitu ekstraksi padat-cair (*leaching*) dan ekstraksi cair-cair. Ekstraksi padat-cair adalah proses pemisahan solut dari padatan yang tidak dapat larut yang disebut inert. Menurut Badaring dkk.,

(2020) salah satu metode ekstraksi padat-cair yang paling umum dilakukan adalah metode maserasi.

Maserasi adalah proses perendaman bahan tumbuhan yang telah disiapkan untuk menarik komponen yang diinginkan ke dalam pelarut dengan kondisi dingin diskontinyu. Kelebihan metode ini adalah lebih praktis, memerlukan sedikit pelarut, dan tidak perlu pemanasan. Kekurangan metode maserasi ini memerlukan waktu yang cukup panjang serta ekstrak yang dihasilkan cepat rusak dan bau (Putra dkk., 2014).

Proses maserasi dipengaruhi oleh beberapa faktor, yaitu suhu, lama waktu, dan jenis pelarut yang dipakai. Pemilihan suhu yang tepat dapat meningkatkan kadar tanin dalam rendaman, namun suhu yang terlalu tinggi dan durasi ekstraksi yang berlebihan justru dapat mengurangi kadar tanin. Penggunaan pelarut yang tepat dapat meningkatkan kandungan tanin yang dihasilkan (Fakhruzy, 2020).

Menurut Fatah dkk., (2024) pemilihan pelarut yang tepat mempengaruhi konsentrasi dan efektivitas senyawa aktif yang dihasilkan. Etanol merupakan pelarut dengan sifat semipolar yang memungkinkannya untuk mengekstrak berbagai jenis senyawa dengan rentang polaritas yang luas, mulai dari senyawa yang bersifat polar hingga nonpolar (Handoyo, 2020). Menurut Hasanah & Novian (2020) pemilihan etanol 70% sebagai pelarut didasarkan pada keefektifannya dalam mengekstrak lebih banyak senyawa aktif dibandingkan dengan pelarut organik lainnya. Etanol memiliki titik didih yang rendah, yakni 79°C, sehingga hanya memerlukan energi panas yang minim untuk proses penguapan atau pemekatan. Di samping itu, etanol 70% dipilih karena sifat polarnya yang sesuai untuk melarutkan

senyawa flavonoid, yang umumnya berbentuk glikosida dengan sifat polar, sehingga memerlukan pelarut polar seperti etanol 70%.

2.6 Hipotesis

Hipotesis dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

H0: Pemanfaatan ekstrak etanol 70% alfalfa dan vitamin C sebagai sumber antioksidan tidak berpengaruh signifikan terhadap kualitas spermatozoa mencit secara *in vitro*.

H1: Pemanfaatan ekstrak etanol 70% alfalfa dan vitamin C sebagai sumber antioksidan berpengaruh signifikan terhadap kualitas spermatozoa mencit secara *in vitro*.

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen laboratorik yang dilakukan secara *in vitro* dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial, yang terdiri dari dua faktor perlakuan. Faktor pertama ekstrak etanol 70% alfalfa (E) dengan berbagai konsentrasi yaitu 0% (E0), 2% (E1) dan 6% (E2). Faktor kedua adalah vitamin C (V) dengan berbagai konsentrasi yaitu 0 g/mL (V0), 0,2 g/mL (V1), dan 0,3 g/mL (V2). Setiap kombinasi perlakuan dikombinasikan membentuk 9 perlakuan, masing-masing diulang sebanyak 3 kali, sehingga terdapat 27 satuan percobaan. Adapun desain penelitian dari beberapa perlakuan adalah sebagai berikut: (Tabel 3.1).

Tabel 3. 1 Perlakuan pada Penelitian

Ekstrak Alfalfa	Vitamin C		
	V0 (vitamin C 0 g/mL)	V1(vitamin C 0,2 g/mL)	V2 (vitamin C 0,3 g/mL)
E0 (ekstrak alfalfa 0%)	E0V0	E0V1	E0V2
E1(ekstrak alfalfa 2%)	E1V0	E1V1	E1V2
E2 (ekstrak alfalfa 6%)	E2V0	E2V1	E2V2

Keterangan:

E0V0: Ekstrak etanol 70% alfalfa konsentrasi 0% dan vitamin C konsentrasi 0 g/mL

E1V0: Ekstrak etanol 70% alfalfa konsentrasi 2% dan vitamin C konsentrasi 0 g/mL

E2V0: Ekstrak etanol 70% alfalfa konsentrasi 6% dan vitamin C konsentrasi 0 g/mL

E0V1: Ekstrak etanol 70% alfalfa konsentrasi 0% dan vitamin C konsentrasi 0,2 g/mL

E1V1: Ekstrak etanol 70% alfalfa konsentrasi 2% dan vitamin C konsentrasi 0,2 g/mL

E2V1: Ekstrak etanol 70% alfalfa konsentrasi 6% dan vitamin C konsentrasi 0,2 g/mL

E0V2: Ekstrak etanol 70% alfalfa konsentrasi 0% dan vitamin C konsentrasi 0,3 g/mL

E1V2: Ekstrak etanol 70% alfalfa konsentrasi 2% dan vitamin C konsentrasi 0,3 g/mL

E2V2: Ekstrak etanol 70% alfalfa konsentrasi 6% dan vitamin C konsentrasi 0,3g/mL

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan September hingga Desember 2025. Sampel yang digunakan dan diuji kualitasnya di Laboratorium Fisiologi Hewan sedangkan ekstraksi dilakukan di Laboratorium Fisiologi Tumbuhan Program Studi Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.3 Variabel Penelitian

Penelitian menggunakan 3 variabel, diantaranya:

1. Variabel bebas dari penelitian ini adalah konsentrasi vitamin C yang ditambahkan pada media pengencer sperma setelah paparan ekstrak alfalfa, yaitu 0 g/mL, 0,2 g/mL, dan 0,3 g/mL
2. Variabel bebas dari penelitian ini berupa konsentrasi vitamin C dan ekstrak etanol 70% alfalfa. Perlakuan vitamin C yaitu 0 g/mL, 0,2 g/mL, dan 0,3 g/mL, sedangkan perlakuan ekstrak alfalfa menggunakan konsentrasi 2% dan 6%. Konsentrasi tersebut dipilih untuk mengetahui pengaruh vitamin C dan ekstrak alfalfa terhadap viabilitas, dan motilitas spermatozoa.
3. Variabel terikat penelitian ini yaitu kualitas spermatozoa mencit (*Mus musculus*) yang diamati, meliputi viabilitas, dan motilitas.
4. Variabel kontrol penelitian ini meliputi spermatozoa mencit (*Mus musculus*) dengan umur 2,5 bulan (75 hari) pada setiap perlakuan. Selain itu, variabel kontrol juga meliputi suhu inkubasi (37°C), waktu inkubasi, serta volume sampel yang dianalisis selama penelitian.

3.4 Alat dan Bahan

3.4.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah mikroskop, mikropipet 10 μL –1000 μL , timbangan analitik, rotary evaporator, batang pengaduk kaca, corong kaca, gelas ukur, beaker glass, *buchner filtration funnel*, spuit 3 mL, set alat bedah, cawan petri, inkubator, serta erlenmeyer.

3.4.2 Bahan

Bahan-bahan dalam penelitian ini cauda epididimis mencit (*Mus musculus*), vitamin C (asam askorbat), serbuk herba alfalfa (*Medicago sativa* L.), etanol 70%, DMSO, Aquades, tip steril, tabung Eppendorf 5 μL , pipet tetes, objek glass dan cover glass, pewarna eosin–nigrosin, kertas saring whatman no. 1, kertas label, aluminium foil, serta sodium chloride 0,9% infus.

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Ekstraksi

Ekstraksi alfalfa (*Medicago sativa* L.) dilakukan dengan metode maserasi menggunakan etanol 70% sebagai pelarut dengan perbandingan pelarut dan serbuk 3:1. Alfalfa segar dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan di bawah cahaya matahari selama 2 x 24 jam, kemudian diblender hingga menjadi serbuk halus. Serbuk kering alfalfa ditimbang sebanyak 150 gram, kemudian direndam dalam 450 mL etanol 70% selama 3 x 24 jam. Setelah proses perendaman, campuran disaring menggunakan kertas saring whatman no.1 untuk memisahkan filtrat dan ampasnya. Filtrat yang diperoleh selanjutnya diuapkan dengan *rotary evaporator* hingga menghasilkan ekstrak kental (Darni dkk., 2016). Ekstrak pekat kemudian disimpan

dalam wadah tertutup rapat pada suhu 4°C untuk keperluan analisis lanjutan (Raeeszadeh *et al.*, 2021).

3.5.2 Aklimatisasi dan Isolasi Organ Reproduksi

Proses aklimatisasi dimulai dengan menyiapkan hewan coba mencit jantan dewasa sebanyak 27 ekor dengan usia 2,5 bulan (75 hari) Selanjutnya, seluruh mencit dipelihara selama 1 minggu sebelum dilakukan isolasi organ untuk menyesuaikan diri dengan lingkungan pemeliharaan yang baru. Selama proses aklimatisasi berlangsung, mencit dipelihara dalam kandang yang nyaman serta diberikan pakan dan air minum yang cukup (Ramadhan dkk., 2023).

Isolasi organ reproduksi dilakukan dengan cara hewan uji didislokasi, kemudian dilakukan pembedahan untuk mengambil spermatozoa dari cauda epididimis. Bagian cauda epididimis tersebut selanjutnya dimasukkan ke dalam cawan petri yang berisi 1,0 mL sodium chloride 0,9% infus dengan suhu sekitar 37-40°C (Ermayanti dkk., 2010). Cauda epididmis kemudian dipotong-potong menggunakan gunting kecil hingga halus dan diaduk dengan batang pengaduk kaca sehingga diperoleh suspensi spermatozoa yang homogen. Suspensi spermatozoa yang diperoleh dapat digunakan untuk analisis kualitas spermatozoa yang mencakup motilitas dan viabilitas mencit (*Mus musculus*) (Hafaz, 2017).

3.5.3 Vitamin C

Vitamin C (asam askorbat) ditambahkan ke dalam suspensi spermatozoa untuk meningkatkan kualitas spermatozoa. Vitamin C ditimbang sesuai kebutuhan, yaitu 10 mg vitamin C dilarutkan ke dalam 100 mL aquades. Ini menghasilkan larutan stok dengan konsentrasi sekitar 0,1 mg/mL (Bebas dkk., 2015). Vitamin C

ditambahkan ke dalam suspensi spermatozoa dengan konsentrasi 0 mg/mL, 0,2 mg/mL, dan 0,3 mg/mL (Pahlevy *et al.*, 2022).

3.5.4 Ekstrak Alfalfa (*Medicago sativa* L.)

Suspensi spermatozoa mencit diperoleh dari bagian cauda epididimis dengan metode swim-out menggunakan media fisiologis (Perumal *et al.*, 2024). Suspensi kemudian ditambahkan ekstrak alfalfa (*Medicago sativa* L.) yang digunakan yaitu dengan konsentrasi 0%, 2% dan 6% yang dilarutkan dengan DMSO sebanyak 1 mL (Windayanti & Hariani, 2024).

3.5.5 Inkubasi Spermatozoa dengan Ekstrak Alfalfa dan Vitamin C

Sampel sperma mencit yang telah dikoleksi selanjutnya digunakan untuk inkubasi dengan vitamin C dan ekstrak berdasarkan Hafza *et al.*, (2017) yang dimodifikasi. Suspensi spermatozoa yang telah diperoleh dari cauda epididimis kemudian ditambahkan media fisiologis (sodium chloride 0,9% infus), selanjutnya dicampur dengan ekstrak alfalfa (*Medicago sativa* L.) dan vitamin C sesuai dengan kelompok perlakuan.

Tabel 3. 2 Perhitungan pengenceran spermatozoa

Perlakuan	Volume pada ...			Total volume (µl)
	Ekstrak (µl)	Vitamin C (µl)	Suspensi sperma (µl)	
E0V0	0	0	200	200
E1V0	4	0	196	200
E2V0	12	0	188	200
E0V1	0	32	168	200
E1V1	4	32	164	200
E2V1	12	32	156	200
E0V2	0	48	152	200
E1V2	4	48	148	200
E2V2	12	48	140	200

Proses pengenceran dilakukan secara bertahap dengan dihomogenkan secara perlahan dan diinkubasi pada suhu 37°C untuk mempertahankan kondisi fisiologis untuk mencegah kerusakan sel spermatozoa akibat perubahan lingkungan yang mendadak (Perumal *et al.*, 2024). Selanjutnya pengamatan kualitas (motilitas dan viabilitas) spermatozoa dilakukan pada menit ke-0 (setelah perlakuan diberikan) dan dilanjutkan pada menit ke-30 setelah inkubasi untuk mengevaluasi perubahan parameter yang diamati sesuai dengan prosedur yang digunakan.

3.5.6 Pengamatan sampel

3.5.6.1 Motilitas

Evaluasi motilitas spermatozoa dilakukan mengacu pada metode Elisia (2022), dengan cara meneteskan 20 µL semen di atas kaca benda dan ditutup dengan kaca penutup, kemudian diamati di bawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 400×. Penilaian dilakukan dengan menghitung persentase spermatozoa hidup, yaitu spermatozoa yang bergerak maju atau progresif dari total spermatozoa yang diamati dengan nilai berkisar antara 0-100%. Perhitungan motilitas spermatozoa diperoleh sesuai rumus (Nubatonis dkk., 2024):

$$\text{Motilitas (\%)} = \frac{\text{Jumlah spermatozoa motil progresif}}{\text{Jumlah spermatozoa yang diamati}} \times 100\%$$

Penurunan motilitas spermatozoa dihitung berdasarkan selisih nilai motilitas antara pengamatan pada menit ke-0 dan menit ke-30. Nilai penurunan motilitas diperoleh dengan mengurangkan persentase motilitas pada menit ke-0 dengan persentase motilitas pada menit ke-30 untuk setiap kelompok perlakuan. Semakin besar selisih yang diperoleh menunjukkan semakin besar penurunan motilitas spermatozoa selama periode inkubasi, sedangkan selisih yang lebih kecil menunjukkan motilitas spermatozoa lebih mampu dipertahankan.

$$\text{Penurunan motilitas (\%)} = \text{Motilitas menit ke0 (\%)} - \text{Motilitas menit ke30 (\%)}$$

3.5.6.2 Viabilitas

Uji viabilitas spermatozoa dilakukan dengan metode pewarnaan eosin–nigrosin. Disiapkan larutan pewarna dengan mencampurkan eosin 1%, nigrosin 5%, dan trisodium sitrat dihidrat 3% yang dilarutkan dalam aquades, kemudian dipanaskan ringan hingga homogen, didinginkan, dan disimpan dalam tabung falcon tertutup aluminium foil pada suhu ruang. Sebanyak 10 µl semen dicampurkan dengan 10 µl larutan pewarna eosin–nigrosin dalam tabung Eppendorf dan dibiarkan selama 30 detik. Selanjutnya, 10 µl campuran tersebut ditetaskan pada kaca objek, ditutup dengan kaca penutup, lalu diamati menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400× (Kamal *et al.*, 2023). Spermatozoa hidup berwarna bening atau putih, sedangkan spermatozoa mati berwarna merah keunguan. Perhitungan viabilitas spermatozoa diperoleh sesuai rumus (Barek dkk., 2020):

$$\text{Viabilitas (\%)} = \frac{\text{Jumlah spermatozoa hidup}}{\text{Jumlah spermatozoa yang diamati}} \times 100\%$$

Penurunan viabilitas spermatozoa dihitung berdasarkan selisih nilai motilitas antara pengamatan pada menit ke-0 dan menit ke-30. Nilai penurunan viabilitas diperoleh dengan mengurangkan persentase viabilitas pada menit ke-0 dengan persentase viabilitas pada menit ke-30 untuk setiap kelompok perlakuan. Semakin besar selisih yang diperoleh menunjukkan semakin besar penurunan viabilitas spermatozoa selama periode inkubasi, sedangkan selisih yang lebih kecil menunjukkan motilitas spermatozoa lebih mampu dipertahankan.

$$\text{Penurunan viabilitas (\%)} = \text{Viabilitas menit ke0 (\%)} - \text{Viabilitas menit ke30 (\%)}$$

3.5.7 Analisis Data

Analisis data dalam penelitian ini menggunakan ANOVA faktorial. Sebelum dianalisis menggunakan ANOVA, asumsi normalitas dan homogenitas harus terpenuhi dengan uji Kolmogorof-Smirnov/Shapiro-Wilk dan uji Levene. Apabila asumsi terpenuhi, dilanjutkan analisis ANOVA dua faktor dengan tujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian Ekstrak etanol 70% alfalfa (*Medicago sativa* L.) dan vitamin C (asam askorbat). Apabila hasil ANOVA signifikan ($P < 0.05$) dilakukan uji lanjut untuk menentukan perbedaan antar perlakuan. Pemilihan uji lanjut didasarkan nilai dari hasil perhitungan Koefisien Keragaman (KK). Jika KK rendah ($< 5\%$) menunjukkan keragaman yang rendah atau sangat homogen, maka uji lanjut yang direkomendasikan adalah Uji Tukey HSD karena data bersifat homogen dan dapat mengontrol antara eror dengan power atau Duncan dengan hasilnya lebih sensitif. Jika KK sedang ($5-10\%$) homogen dan ($10-20\%$) heterogen, maka uji lanjut yang direkomendasikan adalah uji BNJ atau Tukey HSD.

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Pengaruh Kombinasi Ekstrak Etanol 70% Alfalfa dengan Vitamin C Terhadap Motilitas Spermatozoa Mencit

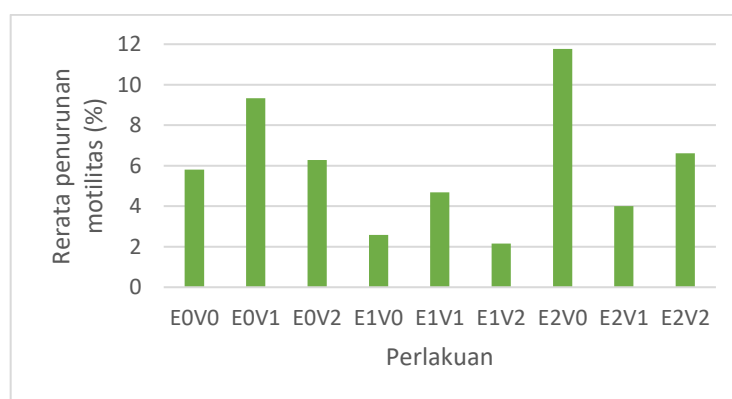
Motilitas spermatozoa merupakan salah satu parameter utama dalam menilai kualitas spermatozoa karena berkaitan langsung dengan kemampuan fertilisasi. Parameter motilitas ini merujuk pada kemampuan spermatozoa untuk bergerak secara progresif (Iqra dkk., 2023). Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan secara *in vitro* menggunakan spermatozoa mencit (*Mus musculus*), pengukuran motilitas dilakukan pada dua waktu yaitu menit ke-0 (segera setelah diberikan perlakuan) dan menit ke-30 (setelah inkubasi), untuk mengetahui pengaruh waktu inkubasi terhadap persentase penurunan motilitas spermatozoa mencit. Hasil penelitian menunjukkan bahwa persentase penurunan motilitas spermatozoa setelah inkubasi selama 30 menit menunjukkan perbedaan pada setiap kelompok perlakuan (Tabel 4.1).

Tabel 4. 1 Rerata pengaruh ekstrak etanol 70% alfalfa dan vitamin C terhadap penurunan motilitas spermatozoa mencit

Perlakuan	Rerata $\pm$ SD
E0V0	5.81 $\pm$ 8,08
E0V1	9.34 $\pm$ 3,98
E0V2	6.28 $\pm$ 11,42
E1V0	2.58 $\pm$ 6,79
E1V1	4.69 $\pm$ 4,96
E1V2	2.15 $\pm$ 10,66
E2V0	11.77 $\pm$ 7,07
E2V1	4.01 $\pm$ 7,49
E2V2	6.61 $\pm$ 2,82

Tabel 4.1 menunjukkan bahwa pemberian ekstrak maupun vitamin C, baik secara tunggal maupun kombinasi, menghasilkan persentase penurunan motilitas spermatozoa yang berbeda pada setiap perlakuan. Pemberian ekstrak tunggal menunjukkan penurunan motilitas terendah sebesar 2,58% pada konsentrasi ekstrak alfalfa 2% (E1V0). sedangkan vitamin C tunggal menunjukkan persentase penurunan sebesar 6,28% pada konsentrasi 0,3 mg/mL (E0V2). Hasil tersebut menunjukkan bahwa ekstrak alfalfa lebih efektif dibandingkan vitamin C apabila diberikan secara tunggal. Pada perlakuan kombinasi, persentase penurunan motilitas terendah diperoleh pada kelompok E1V2 (ekstrak alfalfa 2% dan vitamin C 0,3 mg/mL) sebesar 2,15%. Nilai tersebut menunjukkan bahwa efektivitas ekstrak alfalfa meningkat ketika dikombinasikan dengan vitamin C, sedangkan vitamin C memberikan hasil yang lebih baik apabila diberikan dalam bentuk kombinasi dibandingkan secara tunggal. Kondisi tersebut diduga berkaitan dengan interaksi antioksidan dari kedua bahan yang saling melengkapi. Menurut Widyaningrum dkk., (2024), flavonoid yang terkandung dalam ekstrak alfalfa diketahui dapat membantu meregenerasi vitamin C yang telah teroksidasi kembali menjadi bentuk aktif, sehingga vitamin C dapat terus mendonorkan elektron untuk menetralkan radikal bebas. Sebaliknya, vitamin C juga berperan memperkuat aktivitas antioksidan flavonoid dalam melindungi komponen spermatozoa dari kerusakan oksidatif. Interaksi tersebut memungkinkan terbentuknya sistem perlindungan antioksidan yang lebih efektif dalam menekan stres oksidatif, sehingga penurunan motilitas spermatozoa cenderung lebih rendah dibandingkan perlakuan tunggal.

Pengaruh kombinasi ekstrak etanol 70% alfalfa (*M. sativa* L.) dengan vitamin C menunjukkan adanya perbedaan persentase penurunan motilitas spermatozoa mencit pada setiap perlakuan (Gambar 4.1). Kelompok perlakuan E1V2 memiliki persentase penurunan motilitas terendah, sedangkan kelompok E2V0 menunjukkan persentase penurunan motilitas tertinggi. Perbedaan nilai penurunan motilitas tersebut menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol 70% alfalfa dan vitamin C memberikan respons yang berbeda terhadap motilitas spermatozoa mencit pada masing-masing perlakuan.



Gambar 4. 1 Pengaruh kombinasi ekstrak etanol 70% alfalfa dan vitamin C terhadap penurunan motilitas spermatozoa mencit

Perlakuan ekstrak alfalfa tanpa kombinasi vitamin C menunjukkan persentase penurunan motilitas spermatozoa yang berbeda pada setiap konsentrasi perlakuan. Kelompok E0V0 sebagai kontrol memiliki rerata penurunan motilitas sebesar 5,81%, kemudian meningkat pada E0V1 menjadi 9,34%, dan menurun kembali pada E0V2 sebesar 6,28%. Hasil tersebut menunjukkan bahwa pemberian ekstrak alfalfa secara tunggal memberikan respons yang berbeda terhadap penurunan motilitas spermatozoa, namun belum menunjukkan pola peningkatan yang konsisten seiring bertambahnya konsentrasi ekstrak.

Tanaman alfalfa (*M. sativa* L.) memiliki kandungan senyawa bioaktif seperti saponin, vitamin, mineral, flavonoid, apigenin, serta adenosin yang

memiliki aktivitas antioksidan tinggi (Parman., 2007). Kandungan senyawa bioaktif pada alfalfa berperan dalam membantu menurunkan stres oksidatif yang dapat menyebabkan kerusakan pada membran plasma dan mitokondria spermatozoa. Mitokondria memiliki fungsi penting sebagai penghasil energi berupa ATP yang diperlukan untuk mendukung pergerakan spermatozoa, sehingga terlindunginya mitokondria dari kerusakan oksidatif secara langsung berdampak pada peningkatan motilitas (Dutta *et al.*, 2019).

Mareta., (2020) menyatakan bahwa alfalfa mengandung senyawa aktif seperti flavonoid, saponin, dan vitamin yang memiliki aktivitas antioksidan, sehingga mampu menetralkan radikal bebas yang merusak molekul lipid, protein, maupun asam nukleat di sekitar sel spermatozoa. Perlindungan terhadap membran spermatozoa tersebut membantu mempertahankan struktur dan fungsi sel, sehingga kemampuan pergerakan spermatozoa dapat terjaga lebih baik dibandingkan kelompok kontrol.

Kelompok perlakuan yang hanya diberikan vitamin C, yaitu E0V1 dan E0V2, menunjukkan persentase penurunan motilitas spermatozoa masing-masing sebesar 9,34% dan 6,28%. Dibandingkan kelompok kontrol (E0V0) dengan rata-rata penurunan sebesar 5,81%, perlakuan E0V2 menunjukkan penurunan motilitas yang relatif lebih rendah dibandingkan E0V1. Hasil tersebut menunjukkan bahwa pemberian vitamin C tunggal memberikan respons yang berbeda terhadap penurunan motilitas spermatozoa pada setiap konsentrasi perlakuan. Vitamin C atau asam askorbat dikenal sebagai antioksidan larut air yang berfungsi membantu melindungi plasma semen dari paparan reactive oxygen species (ROS). Aktivitas tersebut terjadi melalui pemberian elektron kepada radikal bebas sehingga

kerusakan akibat peroksidasi lipid pada spermatozoa sapat diminimalkan. Kondisi ini mendukung terjaganya fungsi sel serta kemampuan gerak spermatozoa (Wang *et al.*, 2025).

Kadar asam askorbat yang lebih tinggi secara nyata ditemukan pada plasma semen pria fertil dibandingkan pria infertil, sehingga menunjukkan bahwa senyawa asam askorbat ini memiliki peranan penting sebagai antioksidan dalam plasma semen (Das *et al.*, 2009). Penelitian yang dilakukan oleh Moein *et al.*, (2012) menunjukkan adanya hubungan positif antara kadar asam askorbat dalam plasma semen dengan berbagai parameter kualitas spermatozoa, termasuk motilitas spermatozoa. Namun efek tersebut masih belum maksimal apabila vitamin C digunakan secara tunggal, karena aktivitasnya lebih dominan pada fase cair semen dan kurang efektif dalam melindungi komponen lipid membran spermatozoa yang bersifat hidrofobik.

Hal ini sejalan dengan pernyataan Fanaei *et al.*, (2014) bahwa penambahan vitamin C mampu meningkatkan motilitas, viabilitas dan integritas DNA spermatozo melalui penurunan kadar malondialdehid (MDA) sebagai indikator terjadinya peroksidasi lipid. Meskipun demikian, efek perbaikan yang dihasilkan cenderung lebih optimal apabila didukung oleh antioksidan lain yang bekerja pada jalur perlindungan yang berbeda.

Kombinasi antara ekstrak alfalfa dan vitamin C menunjukkan hasil yang lebih baik dibandingkan perlakuan tunggal. Kelompok E1V2 memiliki persentase penurunan motilitas spermatozoa paling rendah, yaitu sebesar 2,15%, sekaligus menjadi hasil terbaik pada penelitian ini. Hasil tersebut menunjukkan bahwa kombinasi ekstrak alfalfa dan vitamin C lebih efektif dalam mempertahankan

motilitas spermatozoa dibandingkan pemberian tunggal. Hasil ini menunjukkan adanya interaksi antara ekstrak alfalfa dan vitamin C, di mana senyawa antioksidan dari alfalfa berperan menjaga spermatozoa dari kerusakan akibat peroksidasi lipid sedangkan vitamin C membantu menetralkan ROS yang berada pada fase cair semen (Mottola *et al.*, 2022).

Mekanisme kerja yang saling melengkapi tersebut sesuai dengan pernyataan Noegroho *et al.*, (2022) yang menunjukkan bahwa kombinasi dua antioksidan dengan mekanisme kerja berbeda mampu menghasilkan efek perlindungan terhadap DNA yang lebih besar secara bertahap seiring waktu, sehingga dapat menurunkan fragmentasi DNA spermatozoa serta mengurangi stres oksidatif intraseluler. Perlindungan antioksidan yang mencakup komponen hidrofobik dan hidrofilik spermatozoa yang menjadi kunci peningkatan motilitas pada kelompok kombinasi.

Menurut Gosalves *et al.*, (2020) vitamin C merupakan antioksidan yang larut dalam air dan memiliki konsentrasi yang lebih tinggi dalam plasma seminal dibandingkan dalam serum darah, yang menunjukkan peran pentingnya dalam melindungi spermatozoa dari stres oksidatif. Secara mekanisme asam askorbat berfungsi sebagai penangkap radikal bebas, khususnya radikal peroksil dan alkoksil, sehingga mampu menghentikan reaksi berantai peroksidasi lipid pada membran spermatozoa yang kaya akan asam lemak tak jenuh ganda (PUFA), serta menjaga integritas DNA dari kerusakan akibat oksidasi (Raspa *et al.*, 2025).

Meskipun demikian, perlu dilakukan analisis lebih lanjut untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh perlakuan melalui uji ANOVA faktorial pada taraf signifikansi α 5%. Hasil analisis tersebut disajikan pada Tabel 4.2.

Tabel 4. 2 Pengaruh kombinasi ekstrak etanol 70% alfalfa (*Medicago sativa* L.) dengan vitamin c terhadap motilitas spermatozoa mencit secara *in vitro* pada α 5%

SK	DB	JK	KT	F Hitung	F 5%
Ekstrak	2	104.572	52.286	2.962	3.55
Vitamin C	2	13.178	6.589	0.373	3.55
Interaksi EV	4	113.415	28.354	1.606	2.93
Galat	18	317.778	17.654		
Total	27	1493.894			

Hasil ANOVA faktorial pada Tabel 4.2 menunjukkan bahwa faktor ekstrak tidak memberikan pengaruh nyata terhadap penurunan motilitas spermatozoa, yang ditunjukkan oleh nilai F hitung sebesar 2,962 lebih kecil dibandingkan F tabel 5% sebesar 3,55. Faktor vitamin C juga tidak menunjukkan pengaruh nyata dengan nilai F hitung sebesar 0,373. Selain itu, interaksi antara ekstrak dan vitamin C tidak memberikan pengaruh nyata karena nilai F hitung sebesar 1,606 lebih kecil dibandingkan F tabel 5% sebesar 2,93. Nilai kuadrat tengah galat sebesar 17,654 digunakan sebagai pembanding dalam pengujian signifikansi pada setiap sumber keragaman.

Hasil tersebut menunjukkan bahwa pemberian ekstrak alfalfa, vitamin C, maupun kombinasi keduanya belum mampu memberikan pengaruh nyata terhadap penurunan motilitas spermatozoa. Oleh sebab itu, analisis tidak dilanjutkan ke uji lanjut karena hasil ANOVA faktorial menunjukkan tidak adanya perbedaan yang signifikan antar perlakuan. Tidak adanya pengaruh nyata pada penelitian ini diduga disebabkan oleh beberapa faktor. Salah satunya adalah lama inkubasi yang relatif singkat, yaitu 30 menit, sehingga kerusakan spermatozoa akibat stres oksidatif belum berlangsung secara optimal dan perbedaan kemampuan antioksidan antar perlakuan belum dapat terlihat secara jelas. Menurut Agarwal et al. (2014),

kerusakan spermatozoa akibat *reactive oxygen species* (ROS) bersifat akumulatif sehingga efek perlindungan antioksidan umumnya akan lebih terlihat pada kondisi paparan oksidatif yang lebih tinggi atau waktu penyimpanan yang lebih lama.

Penggunaan NaCl fisiologis 0,9% sebagai media suspensi juga diduga menjadi salah satu faktor yang memengaruhi hasil penelitian. NaCl fisiologis berfungsi menjaga tekanan osmotik spermatozoa, namun tidak menyediakan sumber energi yang cukup untuk mendukung aktivitas metabolisme dan pergerakan spermatozoa dalam jangka waktu tertentu. Keterbatasan sumber energi tersebut dapat menyebabkan penurunan motilitas terjadi secara relatif merata pada seluruh kelompok perlakuan sehingga perbedaan antar perlakuan menjadi kurang terlihat (Nurfitrih *et al.*, 2023).

Alfalfa (*M. sativa* L.) mengandung flavonoid, isoflavon, dan saponin triterpenoid dengan aktivitas antioksidan melalui aktivasi jalur Nrf2 dan penghambatan NF-kB (Chen *et al.*, 2020). Penelitian yang dilakukan oleh Sukarjati *et al* (2018) menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun alfalfa memberikan pengaruh signifikan terhadap motilitas spermatozoa mencit. Meskipun demikian, pada konsentrasi tinggi ekstrak tersebut dapat menimbulkan efek antifertilitas. Hal ini menunjukkan respon yang berlawanan terhadap kualitas spermatozoa, dimana konsentrasi rendah cenderung memberikan efek perlindungan.

Kejadian ini dapat dijelaskan melalui konsep “*antioxidant paradox*”, yaitu kondisi dimana konsentrasi antioksidan yang terlalu tinggi justru memicu pergeseran keseimbangan redoks ke arah stres reduktif yang sama merugikan kualitas sperma seperti stres oksidatif. Argawal *et al.*, (2025) menegaskan bahwa ROS dalam kadar fisiologis sebenarnya berperan penting sebagai molekul

sinyal untuk fungsi normal spermatozoa, sehingga penekanan yang berlebihan terhadap ROS akibat pemberian antioksidan konsentrasi tinggi dapat menghambat proses biologis penting pada spermatozoa.

Kondisi serupa juga dilaporkan pada penelitian menggunakan tanaman lain yang memiliki aktivitas antioksidan seperti pegagan (*Centella asiatica*) dimana pemberian konsentrasi tinggi secara *in vivo* dapat menimbulkan efek antispermatogenik. Efek tersebut berkaitan dengan kandungan senyawa seperti saponin dan alkaloid yang pada konsentrasi tinggi dapat menghambat proses fosforilasi ATP (Yunianto *et al.*, 2010). Ketersediaan ATP sebagai sumber energi utama berperan penting dalam menunjang pergerakan flagela spermatozoa, sekaligus mempengaruhi kondisi morfologi flagela (Freitas *et al.*, 2017). ATP sebagai sumber energi diperoleh melalui jalur glikolisis anaerob yang terjadi pada bagian utama flagela, serta melalui proses fosforilasi oksidatif di mitokondria. Fosforilasi oksidatif berperan sebagai penyedia utama ATP untuk motilitas sperma, karena menghasilkan energi lebih besar dibandingkan glikolisis anaerob ketika oksigen tersedia dalam jumlah cukup (Tourmente *et al.*, 2015).

Vitamin C (asam askorbat) merupakan senyawa yang relatif tidak stabil dan mudah mengalami oksidasi menjadi dehidroaskorbat yang bersifat tidak aktif. Kondisi tersebut sangat mungkin terjadi selama proses penelitian, terutama akibat paparan suhu inkubasi dan lamanya waktu perlakuan, sehingga efektivitas vitamin C dapat menurun. Hal ini sejalan dengan data penelitian yang menunjukkan bahwa pemberian vitamin C, baik pada konsentrasi rendah maupun tinggi, belum mampu memberikan penurunan motilitas spermatozoa yang optimal. Rendahnya efektivitas tersebut diduga berkaitan dengan sifat vitamin C yang rentan mengalami degradasi

sehingga kemampuan antioksidannya dalam melindungi spermatozoa menjadi berkurang. Raspa *et al.*, (2025) menyatakan bahwa asam askorbat rentan terhadap proses oksidasi dan memiliki kestabilan yang rendah baik pada kondisi aerobik maupun anaerobik, sehingga efek perlindungannya terhadap spermatozoa bersifat sementara. Pada sistem *in vitro* dengan waktu inkubasi selama 30 menit, cadangan vitamin C dalam medium telah mengalami oksidasi, sehingga kemampuan antioksidannya tidak lagi efektif dalam melindungi spermatozoa.

Pemberian perlakuan dalam bentuk kombinasi ekstrak alfalfa dan vitamin C memerlukan konsentrai yang tepat agar mampu mendukung fungsi sel secara optimal. Konsentrasi yang terlalu rendah cenderung tidak memberikan efek signifikan, sedangkan konsentrasi yang terlalu tinggi berpotensi menimbulkan gangguan, sehingga keseimbangan konsentrasi berperan penting dalam menghasilkan respon biologis yang maksimal. Pemanfaatan tumbuhan sebagai bahan penelitian menunjukkan bahwa tanaman memiliki berbagai manfaat, termasuk sebagai sumber senyawa alami yang dapat mendukung fungsi fisiologis.

Penurunan motilitas selama proses inkubasi merupakan fenomena yang umum terjadi dalam penelitian *in vitro*. Kondisi ini dipengaruhi oleh peningkatan akumulasi spesies oksigen reaktif (ROS) yang terbentuk secara alami selama proses inkubasi, berkurangnya cadangan energi berupa ATP, serta keterbatasan kemampuan perbaikan intraseluler pada spermatozoa (Freitas *et al.*, 2017). Gualtieri *et al.*, (2021) melaporkan bahwa proses inkubasi spermatozoa sapi beku-cair selama 3 jam menyebabkan penurunan yang signifikan terhadap motilitas spermatozoa, serta meningkatkan peroksidasi lipid pada seluruh kelompok

perlakuan. Meskipun demikian kelompok yang diberikan antioksidan menunjukkan laju penurunan yang lebih lambat dibandingkan kelompok tanpa perlakuan.

Menurut Ros-Santaella & Pintus (2021) melaporkan bahwa efek dalam mempertahankan motilitas pada tahap awal tidak dapat dipertahankan dengan bertambahnya waktu inkubasi. Hal ini menunjukkan kemampuan antioksidan dalam menjaga kualitas spermatozoa memiliki keterbatasan, terutama pada kondisi *in vitro* yang tidak didukung oleh sistem fisiologis tubuh secara menyeluruh.

Kandungan senyawa fenolik alfalfa juga berperan penting dalam menangkali radikal bebas serta menjaga kestabilan struktur sel (Horvat *et al.*, 2022). Pada spermatozoa senyawa tersebut membantu melindungi sel dari kerusakan akibat proses oksidasi. Pemanfaatan ekstrak tumbuhan dalam penelitian ini menunjukkan bahwa tumbuhan memiliki potensi sebagai sumber senyawa bioaktif yang bermanfaat bagi kesehatan reproduksi. Allah berfirman dalam Al-Qur'an Surah Asy-Syu'ara' ayat 7, sebagai berikut:

﴿٧﴾ أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَمْ أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ

Artinya: “Apakah mereka tidak memperhatikan bumi, betapa banyak Kami telah menumbuhkan di sana segala jenis (tanaman) yang tumbuh baik?” (Q.S. Asy-Syu'ara' [26]: 7).

Menurut Az-Zuhaili (2005) dalam *Tafsir Al-Munir* yang diterjemahkan oleh Al-Kattani dkk., (2014) menjelaskan bahwa Allah SWT telah menciptakan dan menumbuhkan di bumi itu berbagai macam tumbuhan-tumbuhan dan buah-buahan yang banyak manfaatnya. Menurut Shihab (2002) dalam *Tafsir Al-Misbah* menjelaskan bahwa kata “كريم” antara lain digunakan untuk menggambarkan segala sesuatu yang baik bagi setiap objek yang disifatinya. Tumbuhan yang baik, paling tidak adalah yang subur dan bermanfaat.

Menurut Asy-Syaukani (1964) dalam *Tafsir Fathul Qadir* yang diterjemahkan oleh Fachruddin & Saefullah (2008) juga menjelaskan bahwa makna kata “زوج” berarti “نوع” macam atau ragam dan “كريم” berarti “محمود” atau baik. Maknanya adalah berbagai macam tumbuhan yang bermanfaat tidak ada yang mampu menumbuhkannya kecuali Tuhan Semesta alam.

Pemanfaatan tumbuhan menunjukkan bahwa berbagai jenis tanaman diciptakan Allah SWT dengan manfaat yang dapat menunjang kehidupan manusia. Tumbuhan tidak hanya memiliki keindahan bentuk dan warna, tetapi juga mengandung berbagai senyawa alami yang bermanfaat bagi tubuh maupun pengembangan ilmu pengetahuan. Kandungan antioksidan pada tumbuhan berperan dalam membantu menjaga keseimbangan sistem biologis, mendukung proses fisiologis agar berlangsung optimal, serta melindungi sel dari stres oksidatif. Sejalan dengan hal tersebut, ekstrak alfalfa sebagai salah satu sumber antioksidan alami diketahui dapat memberikan efek positif terhadap motilitas spermatozoa. Hal ini menunjukkan bahwa setiap tumbuhan yang diciptakan memiliki tujuan, manfaat, serta karakteristik yang berbeda-beda sesuai ketentuan Allah SWT, sebagaimana firman-Nya dalam Q.S. Al-Hijr ayat 19:

وَالْأَرْضَ مَدَدْنَاهَا ۖ وَالْقَيْنَا فِيهَا رَوَاسِيَ ۖ وَأَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ شَيْءٍ مَّوْزُونٍ ﴿١٩﴾

Artinya: *Kami telah menghamparkan bumi, memancangkan padanya gunung-gunung, dan menumbuhkan di sana segala sesuatu menurut ukuran(-nya).*” (Q.S. Al-Hijr [15]: 19).

Menurut Quraisy Sihab (2002) dalam *Tafsir Al-Misbah*, bahwa kalimat “وَأَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ شَيْءٍ مَّوْزُونٍ” memiliki arti Allah SWT menumbuhkembangkan di bumi ini aneka ragam tanaman untuk kelangsungan hidup dan menetapkan bagi

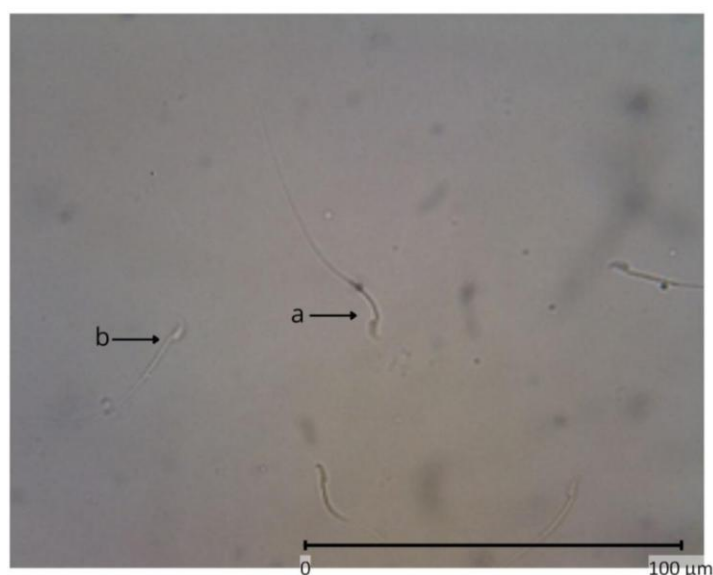
tiap-tiap masa pertumbuhan dan penuaian tertentu, sesuai dengan kuantitas dan kebutuhan makhluk hidup. Demikian juga, Allah SWT menentukan bentuknya sesuai dengan penciptaan dan habitat alamnya. Menurut Menurut Ash-Shiddieqy (2000) dalam *Tafsir An-Nuur*, bahwa “وانبتنا فيها من كل شيء موزون” memiliki makna Kami menumbuhkan di muka bumi segala jenis tumbuhan menurut ukurannya masing-masing. Maka tidak ada di muka bumi yang sangat luas itu, suatu tumbuhan tidak terukur unsur-unsurnya dan tidak mengandung faedah. Semua tumbuhan mempunyai hikmah dan mashlahat, walaupun tidak diketahui oleh kebanyakan manusia. Pengetahuan modern terus menerus menyelidiki rahasia alam tumbuhan. Menurut Sayyid dalam *Tafsir fi zilalil quran* (2001) kata “موزون” disini adalah bahwa setiap tumbuhan yang ada di bumi ditumbuhkan dalam penciptaan yang amat rapi, teliti, dan tepat. Dari tumbuhan itu dihasilkan manfaat yang disediakan Allah untuk keperluan makhluk hidup.

Berbagai jenis tumbuhan yang diciptakan Allah SWT telah ditetapkan dalam keadaan yang sesuai dengan ketentuan-Nya. Setiap tumbuhan memiliki manfaat dan fungsi biologis tertentu yang dapat menunjang kehidupan makhluk hidup, termasuk tanaman alfalfa (*M. sativa* L.) yang dikenal memiliki berbagai kandungan antioksidan alami. Keberadaan manfaat tersebut mendorong manusia untuk melakukan berbagai penelitian ilmiah guna mengetahui serta memahami peran fisiologis dari masing-masing tumbuhan. Sejalan dengan penelitian ini, alfalfa diketahui memiliki peran fisiologis sebagai sumber antioksidan alami yang dapat dimanfaatkan dalam membantu melindungi sel dari stres oksidatif.

Menurut Alharbi (2024), pemberian antioksidan dalam jumlah yang terlalu tinggi dapat menyebabkan *antioxidant paradox*, yaitu kondisi ketika antioksidan

justeru mengganggu keseimbangan redoks dan memicu stres oksidatif yang berdampak buruk terhadap kualitas spermatozoa. Pada keadaan fisiologis normal, spermatozoa memerlukan keseimbangan antara pembentukan *Reactive Oxygen Species* (ROS) dan kapasitas antioksidan agar berbagai proses biokimia di dalam sel dapat berlangsung dengan baik (Pujianto *et al.*, 2021). Keseimbangan tersebut berperan penting dalam menjaga fungsi sel serta mempertahankan kondisi fisiologis spermatozoa. Apabila keseimbangan antara ROS dan antioksidan terganggu, maka dapat terjadi kerusakan sel yang berdampak pada penurunan kualitas spermatozoa (Simanjuntak & Zulham, 2020).

4.2 Pengaruh Kombinasi Ekstrak Etanol 70% Alfalfa dengan Vitamin C Terhadap Motilitas Spermatozoa Mencit



Gambar 4. 2 Hasil pengamatan viabilitas spermatozoa menggunakan mikroskop cahaya pada perbesaran 400x dengan pewarna Eosin-negrosin (a) mati, dan (b) hidup.

Viabilitas spermatozoa diamati menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x dengan pewarnaan eosin. Spermatozoa hidup memiliki membran plasma yang masih utuh sehingga tidak menyerap zat warna dan tampak putih atau tidak berwarna. Sebaliknya, spermatozoa mati memiliki membran yang rusak

sehingga menyerap eosin dan tampak berwarna gelap (Gambar 4.3). Perbedaan warna tersebut digunakan untuk membedakan spermatozoa hidup dan mati selama pengamatan. Menurut Unitly dkk., (2022) viabilitas merupakan kemampuan spermatozoa untuk bertahan hidup. Pengamatan viabilitas dilakukan menggunakan pewarna eosin-negrosin untuk membedakan spermatozoa hidup dan mati. Spermatozoa yang masih hidup ditandai dengan kepala berwarna transparan karena membran plasmanya tetap utuh sehingga tidak menyerap pewarna. Sebaliknya, spermatozoa yang telah mati menunjukkan kepala berwarna merah keunguan akibat kerusakan membran plasma yang memungkinkan zat warna eosin-negrosin masuk ke dalam sel.

Pengamatan viabilitas spermatozoa mencit (*Mus musculus*) secara *in vitro* dilakukan dalam dua waktu, yaitu menit ke-0 dan menit ke-30 (setelah inkubasi), guna mengetahui pengaruh waktu inkubasi terhadap persentase penurunan motilitas spermatozoa mencit. Hasil penelitian menunjukkan bahwa persentase penurunan viabilitas spermatozoa setelah inkubasi selama 30 menit menunjukkan perbedaan pada setiap kelompok perlakuan (Tabel 4.1).

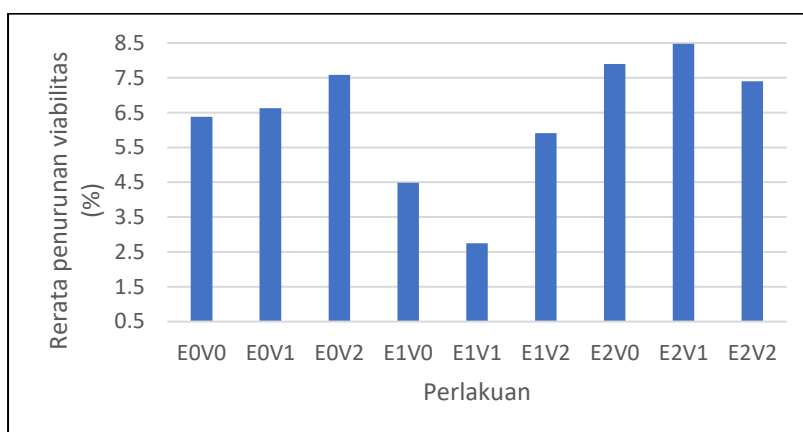
Tabel 4. 3 Rerata pengaruh ekstrak etanol 70% alfalfa dan vitamin C terhadap viabilitas spermatozoa mencit

Perlakuan	Rerata $\pm$ SD
E0V0	6.38 $\pm$ 3.98
E0V1	6.62 $\pm$ 11.42
E0V2	7.58 $\pm$ 7.49
E1V0	4.49 $\pm$ 4.96
E1V1	2.75 $\pm$ 7.07
E1V2	5.91 $\pm$ 2.82
E2V0	7.89 $\pm$ 10.66
E2V1	8.47 $\pm$ 6.79
E2V2	7.40 $\pm$ 8.08

Tabel 4.3 menunjukkan bahwa pemberian ekstrak alfalfa maupun vitamin C, baik secara tunggal maupun kombinasi, menghasilkan persentase penurunan viabilitas spermatozoa yang berbeda pada setiap perlakuan. Pemberian ekstrak alfalfa secara tunggal menunjukkan persentase penurunan viabilitas terendah sebesar 4,49% pada perlakuan E1V0 (ekstrak alfalfa 2%). Sedangkan vitamin C tunggal menunjukkan persentase penurunan terendah sebesar 6,62% pada perlakuan E0V1 (vitamin C 0,2). Hasil tersebut menunjukkan bahwa ekstrak alfalfa lebih efektif dibandingkan vitamin C apabila diberikan secara tunggal dalam mempertahankan viabilitas spermatozoa. Pada perlakuan kombinasi, persentase penurunan viabilitas terendah diperoleh pada kelompok E1V1 (ekstrak alfalfa 2% dan vitamin C 0,2 mg/mL) sebesar 2,75%. Nilai tersebut menunjukkan bahwa kombinasi ekstrak alfalfa dan vitamin C memberikan hasil yang lebih baik dibandingkan perlakuan tunggal dalam mempertahankan viabilitas spermatozoa. Menurut Widyaningrum dkk., (2024), ekstrak alfalfa lebih efektif dari vitamin C tunggal karena mengandung multi-senyawa antioksidan (flavonoid, saponin, tanin, fitoestrogen) yang bekerja secara simultan pada berbagai jalur perlindungan sel, termasuk pada lapisan membran lipid spermatozoa yang tidak dapat dilindungi oleh vitamin C saja karena sifatnya yang hanya larut air. Sedangkan kombinasi keduanya menghasilkan efektivitas tertinggi karena flavonoid alfalfa meregenerasi vitamin C yang teroksidasi sehingga vitamin C dapat terus aktif menangkal ROS, dan keduanya bersama-sama memberikan perlindungan berlapis yang sinergis terhadap viabilitas spermatozoa.

Pengaruh kombinasi ekstrak etanol 70% alfalfa (*M. sativa* L.) dengan vitamin C menunjukkan adanya perbedaan persentase penurunan viabilitas

spermatozoa mencit pada setiap perlakuan (Gambar 4.2). Kelompok perlakuan E1V1 memiliki persentase penurunan viabilitas terendah, sedangkan kelompok E2V1 menunjukkan persentase penurunan viabilitas tertinggi. Perbedaan nilai penurunan viabilitas tersebut menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol 70% alfalfa dan vitamin C memberikan respons yang berbeda terhadap viabilitas spermatozoa mencit pada masing-masing perlakuan.



Gambar 4. 3 Pengaruh ekstrak etanol 70% alfalfa dan vitamin c terhadap viabilitas spermatozoa mencit

Pemberian ekstrak alfalfa tanpa kombinasi vitamin C menunjukkan persentase penurunan viabilitas spermatozoa yang berbeda pada setiap perlakuan. Kelompok E0V0 sebagai kontrol memiliki rerata penurunan viabilitas sebesar 6,38%, kemudian meningkat pada E0V1 menjadi 6,62%, dan kembali meningkat pada E0V2 sebesar 7,58%. Hasil tersebut menunjukkan bahwa pemberian vitamin C secara tunggal memberikan respons yang berbeda terhadap penurunan viabilitas spermatozoa, namun belum menunjukkan kecenderungan penurunan viabilitas yang konsisten pada setiap peningkatan konsentrasi perlakuan.

Alfalfa (*Medicago sativa* L.) memiliki kandungan senyawa bioaktif berupa flavonoid dan fitosterol yang dapat membantu mengurangi efek radikal bebas (Nasihin & Fadhlurrohman., 2025). Senyawa bioaktif tersebut berperan dalam

membantu melindungi sel spermatozoa dari kerusakan oksidatif akibat *reactive oxygen species* (ROS). Aktivitas antioksidan tersebut dapat membantu mempertahankan kondisi dan daya hidup spermatozoa dengan mengurangi peroksidasi lipid yang terjadi pada membran sel. Membran spermatozoa yang kaya akan asam lemak tak jenuh ganda (PUFA) menjadikan sel spermatozoa lebih rentan terhadap paparan radikal bebas (Wang et al., 2025).

Mareta., (2020) menegaskan bahwa ketidakseimbangan antara jumlah radikal bebas dan antioksidan dalam tubuh dapat memicu stres oksidatif yang menyebabkan kerusakan pada lipid, protein, maupun asam nukleat sehingga dapat berakhir pada kematian sel spermatozoa. Kandungan antioksidan pada alfalfa berperan dalam membantu menekan radikal bebas, sehingga dapat mendukung peningkatan jumlah spermatozoa yang tetap hidup. Namun, pemberian alfalfa secara tunggal pada dosis tertinggi (E2V0) tampak belum mampu menghasilkan peningkatan viabilitas yang lebih tinggi. Kondisi ini diduga berkaitan dengan terbatasnya perlindungan dari senyawa tertentu tanpa adanya dukungan antioksidan larut air yang bekerja pada fase berbeda.

Kelompok perlakuan yang hanya diberikan vitamin C, yaitu E0V1 dan E0V2, menunjukkan persentase penurunan viabilitas spermatozoa masing-masing sebesar 6,62% dan 7,58%. Dibandingkan kelompok kontrol (E0V0) dengan rerata penurunan sebesar 6,38%, perlakuan E0V1 menunjukkan penurunan viabilitas yang relatif lebih rendah dibandingkan E0V2. Hasil tersebut menunjukkan bahwa pemberian vitamin C secara tunggal memberikan respons yang berbeda terhadap penurunan viabilitas spermatozoa pada setiap konsentrasi perlakuan. Vitamin C (asam askorbat) merupakan antioksidan larut air yang berperan sebagai pertahanan

utama terhadap *reactive oxygen species* (ROS) di dalam plasma semen. Vitamin C ini bekerja dengan menetralkan berbagai radikal bebas seperti superoksida, hidrogen peroksida, dan radikal hidroksil sehingga dapat membantu melindungi komponen seluler spermatozoa dari kerusakan oksidatif (Septianisa dkk., 2025). Namun, pada penelitian ini peningkatan konsentrasi vitamin C belum menunjukkan kemampuan yang optimal dalam mempertahankan viabilitas spermatozoa. Kondisi tersebut diduga berkaitan dengan sifat vitamin C yang mudah mengalami oksidasi serta aktivitasnya yang lebih dominan pada fase cair semen sehingga perlindungannya terhadap spermatozoa masih terbatas apabila diberikan secara tunggal.

Menurut Yahaq., dkk (2019) vitamin C berperan dalam menjaga kestabilan membran plasma spermatozoa terhadap peroksidasi selama proses pengolahan semen akibat kontak langsung dengan oksigen (O_2) yang dapat memicu kematian spermatozoa. Kemampuan tersebut membantu meminimalkan kerusakan membran plasma yang disebabkan oleh radikal bebas sehingga daya hidup spermatozoa dapat lebih terjaga. Menurut Das *et al.*, (2009) kadar asam askorbat yang lebih tinggi berkaitan dengan kualitas semen yang lebih baik serta memiliki hubungan positif dengan berbagai parameter spermatozoa, termasuk viabilitas. Hal ini mendukung peran vitamin C dalam membantu mempertahankan daya hidup spermatozoa melalui perlindungan membran dan DNA spermatozoa dari kerusakan maupun fragmentasi akibat stres oksidatif (Christijanti dkk., 2010).

Vitamin C memang diketahui mampu membantu mempertahankan viabilitas spermatozoa, namun penggunaannya sebagai antioksidan tunggal belum mampu memberikan hasil yang maksimal. Hal ini disebabkan karena vitamin C

bekerja terutama pada fase akuatik semen sehingga perlindungannya terhadap komponen lipid membran spermatozoa yang bersifat hidrofobik masih terbatas (Bouhadana *et al.*, 2025). Kondisi ini diduga menyebabkan peningkatan viabilitas pada kelompok perlakuan vitamin C tunggal tidak terlalu tinggi, sehingga diperlukan kombinasi dengan antioksidan lain yang bekerja melalui mekanisme berbeda untuk memberikan perlindungan yang lebih efektif terhadap spermatozoa.

Kombinasi antara ekstrak alfalfa dan vitamin C menunjukkan hasil yang lebih baik dibandingkan perlakuan tunggal. Kelompok E1V2 memiliki persentase penurunan motilitas spermatozoa paling rendah, yaitu sebesar 2,15%, sehingga menjadi perlakuan terbaik dalam mempertahankan motilitas spermatozoa pada penelitian ini. Sebaliknya, perlakuan tunggal baik ekstrak maupun vitamin C masih menunjukkan persentase penurunan motilitas yang lebih tinggi dibandingkan perlakuan kombinasi. Hasil tersebut menunjukkan bahwa kombinasi ekstrak alfalfa dan vitamin C memberikan efek yang lebih optimal dalam melindungi spermatozoa.

Kondisi ini diduga berkaitan dengan kerja antioksidan dari kedua bahan yang saling mendukung. Senyawa antioksidan pada ekstrak alfalfa berperan dalam membantu melindungi membran spermatozoa dari kerusakan akibat peroksidasi lipid, sedangkan vitamin C sebagai antioksidan larut air membantu menetralkan *reactive oxygen species* (ROS) yang berada pada fase cair semen (Mottola *et al.*, 2022). Kombinasi kedua mekanisme tersebut memungkinkan perlindungan spermatozoa berlangsung lebih baik sehingga penurunan motilitas dapat ditekan lebih rendah dibandingkan perlakuan tunggal.

Hasil penelitian tersebut sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Mondal *et al.* (2022) yang menggunakan ekstrak hidro-metanol daun *Thevetia*

peruviana pada spermatozoa manusia. Penelitian tersebut menunjukkan bahwa pemberian ekstrak dapat menurunkan viabilitas spermatozoa seiring bertambahnya lama paparan. Pada konsentrasi tinggi, seluruh spermatozoa dilaporkan menjadi tidak viabel setelah 10 menit pemberian ekstrak.

Ekstrak alfalfa (*Medicago sativa* L.) mengandung senyawa aktif seperti flavonoid dan triterpenoid yang berperan sebagai antioksidan (Darni dkk., 2016), sedangkan vitamin C (asam askorbat) bekerja sebagai antioksidan lipofilik yang melindungi membran sel dari peroksidasi lipid (Popovic *et al.*, 2015). Interaksi kedua senyawa tersebut berkontribusi dalam menjaga stabilitas membran plasma sekaligus mempertahankan aktivitas metabolisme sel spermatozoa.

Menurut Sholihin & Ducha (2024) penurunan persentase integritas dapat dicegah dengan pemberian antioksidan yang berfungsi melindungi membran sel spermatozoa. Penambahan ekstrak alfalfa (*Medicago sativa* L.) dan vitamin C (asam askorbat) sebagai sumber antioksidan dapat membantu menjaga kualitas spermatozoa. Kandungan antioksidannya dapat membantu menetralkan radikal bebas di dalam sel, sehingga dapat mencegah terjadinya peroksidasi lipid dan membantu menjaga keseimbangan kondisi sel.

Namun demikian, analisis lebih lanjut tetap diperlukan untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh perlakuan melalui uji ANOVA faktorial pada taraf signifikansi α 5%. Hasil analisis tersebut disajikan pada Tabel 4.4.

Tabel 4. 4 Pengaruh kombinasi ekstrak etanol 70% alfalfa (*Medicago sativa* L.) dengan vitamin c terhadap viabilitas spermatozoa mencit secara *in vitro* pada α 5%

SK	DB	JK	KT	F Hitung	F 5%
Ekstrak	2	59.417	29.708	1.265	3.55
Vitamin C	2	4.895	2.448	0.104	3.55
Interaksi EV	4	14.328	3.582	0.152	2.93
Galat	18	422.878	23.493		
Total	27	1603.601			

Hasil ANOVA faktorial pada Tabel 4.4 menunjukkan bahwa faktor ekstrak tidak memberikan pengaruh nyata terhadap penurunan viabilitas spermatozoa, ditunjukkan oleh nilai F hitung sebesar 1,265 yang lebih kecil dibandingkan F tabel 5% sebesar 3,55. Faktor vitamin C juga tidak menunjukkan pengaruh nyata dengan nilai F hitung sebesar 0,104. Selain itu, interaksi antara ekstrak dan vitamin C tidak memberikan pengaruh nyata karena nilai F hitung sebesar 0,152 lebih kecil dibandingkan F tabel 5% sebesar 2,93. Nilai kuadrat tengah galat sebesar 23,493 digunakan sebagai pembanding dalam pengujian signifikansi pada setiap sumber keragaman. Hasil tersebut menunjukkan bahwa pemberian ekstrak alfalfa, vitamin C, maupun kombinasi keduanya belum mampu memberikan pengaruh nyata terhadap penurunan viabilitas spermatozoa. Oleh karena itu, analisis tidak dilanjutkan ke uji lanjut karena hasil ANOVA faktorial menunjukkan tidak adanya perbedaan yang signifikan antarperlakuan.

Alfalfa (*Medicago sativa* L.) memiliki kandungan berbagai senyawa fitokimia aktif diantaranya alkaloid, saponin fenol, tanin, polisakarida, dan fitoestrogen yang memiliki aktivitas sebagai antioksidan, antiinflamasi, imunostimulan, serta antikarsinogenik. Selain itu, kandungan senyawa fenolik yang cukup tinggi juga mampu memberikan peran penting dalam menangkal radikal

bebas (Horvat *et al.*, 2022). Menurut Hes *et al.*, (2019) vitamin C berfungsi sebagai antioksidan langsung yang mampu menetralkan radikal bebas seperti superoksida, hidroksil, dan hidrogen peroksida. Karena bersifat larut dalam air vitamin C bekerja pada fase cair di dalam sel maupun plasma semen.

Ekstrak alfalfa (*Medicago sativa* L.) menunjukkan adanya penurunan viabilitas spermatozoa seiring dengan meningkatnya konsentrasi perlakuan, dimana viabilitas tertinggi diperoleh pada konsentrasi 2% dan terendah pada konsentrasi 6%. Penurunan viabilitas ini menunjukkan bahwa konsentrasi 2% merupakan kondisi optimal dalam mempertahankan viabilitas spermatozoa, sedangkan pada konsentrasi 6% mulai menunjukkan efek toksik. Hal ini sesuai dengan pernyataan Windayanti & Hariani, (2024) bahwa penambahan ekstrak semanggi air dalam pengencer tris kuning telur menunjukkan kecenderungan penurunan seiring dengan peningkatan konsentrasi ekstrak semanggi air, dimana viabilitas tertinggi ditemukan pada konsentrasi 2% sedangkan viabilitas terendah terdapat pada konsentrasi 8%. Menurut Pahlani dkk., (2021) menyatakan bahwa alfalfa mengandung berbagai senyawa diantaranya flavonoid, saponin, dan alkaloid. Kandungan saponin dan alkaloid dalam ekstrak alfalfa dapat menurunkan integritas membran spermatozoa yang tersusun atas protein dan lipid. Menurut Akbar (2010) kelebihan saponin dapat melemahkan struktur membran yang berupa lipid bilayer, sehingga elastisitas membran sel spermatozoa menurun dan proses transport aktif menjadi terganggu.

Wattimena (2006), menyatakan bahwa penurunan viabilitas spermatozoa dapat dipengaruhi oleh ketersediaan nutrisi, perubahan pH, serta umur spermatozoa selama inkubasi. Spermatozoa yang berada pada kondisi suhu tertentu dalam waktu

yang lebih lama akan mengalami penurunan daya hidup (viabilitas) akibat berkurangnya sumber energi yang dibutuhkan untuk metabolisme.

Menurut Adira dkk., (2026) selama proses inkubasi peningkatan aktivitas metabolik dapat menyebabkan terbentuknya asam laktat yang menurunkan pH medium menjadi lebih asam. Kondisi ini berpotensi merusak organel sel serta menghambat proses produksi energi. Penurunan viabilitas ini dimungkinkan disebabkan oleh meningkatnya stres oksidatif yang dapat merusak membran plasma spermatozoa, sehingga berdampak pada berkurangnya viabilitas (Walke *et al.*, 2023).

Penurunan viabilitas spermatozoa dapat terjadi akibat adanya stres osmotik yang mempengaruhi kondisi sel. Spermatozoa juga sangat rentan terhadap peroksidasi lipid karena tingginya kandungan asam lemak tak jenuh dan fosfolipid pada membran plasmanya. Mitokondria memiliki peran penting dalam menjaga keseimbangan energi melalui proses fosforilasi oksidatif dan produksi ATP. Meski demikian, jika terjadi peningkatan ROS fungsi tersebut dapat terganggu sehingga menyebabkan perubahan pada membran, seperti menurunnya selektivitas dan meningkatnya permeabilitas. Hal ini kemudian berdampak pada penurunan aktivitas spermatozoa (Yuslianti, 2018). Selain itu, kerusakan pada membran lipid dapat meningkatkan permeabilitas membran sehingga proses transport nutrisi menjadi terganggu. Kekurangan nutrisi ini pada akhirnya dapat menurunkan tingkat viabilitas spermatozoa (Julia dkk., 2019).

Sengupta *et al.*, (2024) menyatakan bahwa peningkatan produksi ROS yang melampaui kapasitas sistem antioksidan dapat menyebabkan kerusakan pada spermatozoa melalui terjadinya stres oksidatif. Pada keadaan fisiologis normal

proses biokimia pada spermatozoa berlangsung secara optimal karena adanya keseimbangan antara pembentukan ROS dan sistem antioksidan. Keseimbangan tersebut memungkinkan sel mempertahankan fungsinya serta menjaga kestabilan internal, sehingga aktivitas sel tetap berjalan dengan baik (Chianese & Pierantoni., 2021).

Viabilitas spermatozoa memiliki hubungan erat dengan motilitas dan integritas membran. Apabila membran spermatozoa mengalami kerusakan, hal ini menandakan adanya gangguan pada proses metabolisme sel. Kondisi ini dapat menyebabkan berkurangnya ketersediaan energi dan nutrisi, sehingga menurunnya viabilitas atau kematian sel (Sholihin & Ducha, 2024). Dengan adanya antioksidan ekstrak alfalfa (*Medicago sativa* L.) dan vitamin C (asam askorbat) dapat membantu mengurangi stres oksidatif pada membran sel spermatozoa. Keutuhan membran lipid spermatozoa dapat mentransport energi dan nutrisi sehingga viabilitas spermatozoa meningkat.

BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan yang didapat dari penelitian ini adalah kombinasi ekstrak etanol 70% alfalfa (*Medicago sativa* L.) dan vitamin C (asam askorbat) baik secara tunggal maupun kombinasi tidak berpengaruh terhadap motilitas dan viabilitas spermatozoa mencit (*Mus musculus*).

5.2 Saran

Saran penelitian ini sebagai berikut:

1. Perlu dilakukan penelitian lanjutan dengan penggunaan variasi konsentrasi ekstrak etanol 70% alfalfa (*Medicago sativa* L.) dan vitamin C yang lebih luas untuk memperoleh kombinasi konsentrasi yang lebih optimal dalam mempertahankan motilitas dan viabilitas spermatozoa mencit secara *in vitro*.
2. Perlu dilakukan penelitian lanjutan dengan menambahkan pengujian parameter stres oksidatif, seperti kadar malondialdehid (MDA), untuk mengetahui tingkat peroksidasi lipid membran spermatozoa serta mengevaluasi efektivitas kombinasi ekstrak alfalfa dan vitamin C dalam menghambat kerusakan oksidatif.

DAFTAR PUSTAKA

- Adira, Q. R., Khasanah, I. A. N., Sumaryadi, M. Y., Setyaningrum, A., & Nugroho, A. P. (2026). Quality of Spermatozoa Y From Sex Separation With Egg White Medium and Different Incubation Duration in Sakub Sheep. *Jurnal Ilmiah Peternakan Terpadu*, 14(1), 59-70. <https://doi.org/10.23960/jipt.v14i1.p59-70>
- Affandi, A. (2008). *Tafsir Ath-Thabari Jilid 17*. Jakarta: Pustaka Azzam.
- Affandi, A. (2008). *Tafsir Ath-Thabari Jilid 19*. Jakarta: Pustaka Azzam.
- Agarwal, A., Parekh, N., Panner Selvam, M. K., et al. (2025). *Mechanisms of oxidative stress-induced sperm dysfunction*. *Frontiers in Endocrinology*, 16, 1520835. <https://www.frontiersin.org/journals/endocrinology/articles/10.3389/fendo.2025.1520835/full>.
- Agarwal, A., Virk, G., Ong, C., & Du Plessis, S. S. (2014). Effect of oxidative stress on male reproduction. *The world journal of men's health*, 32(1), 1. <https://doi.org/10.5534/wjmh.2014.32.1.1>
- Aitken, R. J., Drevet, J. R., Moazamian, A., & Gharagozloo, P. (2022). Male infertility and oxidative stress: a focus on the underlying mechanisms. *Antioxidants*, 11(2), 306. <https://doi.org/10.3390/antiox11020306>
- Aitken, R. J., Jones, K. T., & Robertson, S. A. (2012). Reactive oxygen species and sperm function—in sickness and in health. *Journal of andrology*, 33(6), 1096-1106. <https://doi.org/10.2164/jandrol.112.016535>
- Aji, A., Bahri, S., & Tantalia, T. (2017). Pengaruh waktu ekstraksi dan konsentrasi HCl untuk pembuatan pektin dari kulit jeruk bali (*Citrus maxima*). *Jurnal Teknologi Kimia Unimal*, 6(1), 33-44. <https://doi.org/10.29103/jtku.v6i1.467>
- Aji, O. K., Sudarma, I. M. A., & Kaka, A. (2023, April). Kualitas Semen Kambing Kacang Dalam Pengencer Tris Kuning Telur Yang Di Suplementasikan Dengan Pengencer Air Kelapa Gading Muda (*Cocus nufifera*). In *Prosiding Seminar Nasional SATI* (Vol. 1, No. 1, pp. 272-280).
- Akbar, A. (2010). *Tumbuhan Dengan Kandungan Senyawa Aktif Yang Berpotensi Sebagai Bahan Antifertilitas*. Jakarta: Adabia Press
- Akbar, A. (2020). Gambaran faktor penyebab infertilitas pria di Indonesia: Meta analisis. *Jurnal Pandu Husada*, 1(2), 66-74. <https://doi.org/10.30596/jph.v1i2.4433>
- Akbar, T., Dasrul, T. L., & Thasmi, C. N. (2013). Efektifitas penambahan vitamin C dalam pengencer susu skim kuning telur terhadap kualitas spermatozoa kambing boer setelah penyimpanan dingin. *Jurnal Sains Pertanian*, 128522.
- Akhter, S., Zubair, M., Mahmood, M., Andrabi, S. M. H., Hameed, N., Ahmad, E., & Saleemi, M. K. (2023). Effects of vitamins C and E in tris citric acid glucose extender on chilled semen quality of Kail ram during different storage times. *Scientific Reports*, 13(1), 18123.
- Ambarsari, E. V., & Ducha, N. (2021). Pengaruh Albumin Telur dari Berbagai Jenis Unggas Sebagai Pengganti BSA (Bovine Serum Albumin) dalam Pengencer CEP Terhadap Kualitas Spermatozoa Kambing Peranakan Etawa (PE) Pada Suhu Penyimpanan 4-5° C. *LenteraBio: Berkala Ilmiah Biologi*, 10(2), 207-212. <https://doi.org/10.26740/lenterabio.v10n2.p207-212>

- Amtiran, D. E., Hine, T. M., & Uly, K. (2020). Pengaruh penambahan vitamin e dalam pengencer tris-kuning telur terhadap kualitas spermatozoa babi duroc. *Jurnal Peternakan Lahan Kering*, 2(4), 1111-1118.
- Anam, M. S., Yulianti, W., Safitri, S. N., Qolifah, S. N., & Rosia, R. (2021). Konservasi sumber daya alam dalam perspektif Islam. *Al-Madaris Jurnal Pendidikan Dan Studi Keislaman*, 2(1), 26-37. <https://doi.org/10.47887/amd.v2i1.19>
- Anzila, I., WM, A. P., Soewondo, A., & Rahayu, S. (2017). Pengaruh Ekstrak Ethanol Kemangi (*Ocimum canum* Sims.) terhadap Struktur Histologi Testis Mencit (*Mus musculus*) Jantan. *Biotropika: Journal of Tropical Biology*, 5(1), 22-26. <https://doi.org/10.21776/ub.biotropika.2017.005.01.4>
- Arief, Y. S. (2011). Stres dapat mengganggu proses spermatogenesis pada mencit. *Jurnal Ners*, 6(2), 169.
- Arrigoni, O., & De Tullio, M. C. (2002). Ascorbic acid: much more than just an antioxidant. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1569(1-3), 1-9. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(01\)00235-5](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(01)00235-5)
- Arsalan, M. Z., Zuhdiah, Z., & Sunusi, Z. (2022). Nilai Pendidikan Islam Dalam Al-Qur'an Surat 'Abasa. *AL-HIKMAH (Jurnal Pendidikan dan Pendidikan Agama Islam)*, 4(2), 138-149. <https://doi.org/10.36378/al-hikmah.v4i2.2319>
- Agarwal, A., Aponte-Mellado, A., Premkumar, B. J., Shaman, A., & Gupta, S. (2014). The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. *Reproductive biology and endocrinology*, 10(1), 49.
- Ash-Shiddieqy, T.M.H. (2000). *Tafsir Al-Qur'anul Majid An-Nuur Jilid 3*. Semarang: Pustaka Rizki Putra.
- Asy-Syaukani, A.M.A.M. (2008). *Tafsir Fathul Qadir Jilid 7*. Jakarta: Pustaka Azzam.
- Awuy, F. D., Purwanto, D. S., & Mewo, Y. M. (2021). Pengaruh Pemberian Vitamin C Terhadap Kualitas Spermatozoa Yang Terpapar Asap Rokok. *eBiomedik*, 9(2). <https://doi.org/10.35790/ebm.v9i2.33451>
- Ayesa, P., Ramadhan, B. F., Fitria, D., Mutia, R., Ahda, Y., & Atifah, Y. (2025). Motilitas Dan Viabilitas Spermatozoa Mencit Jantan (*Mus musculus* L.) Setelah Pemberian Ekstrak Daun Kumis Kucing (*Orthosiphon aristatus*). *Jurnal Biogenerasi*, 10(3), 1946-1954. <https://doi.org/10.30605/biogenerasi.v10i3.6781>
- Ayunda, R. D., & Lalita, S. (2024). Pemanfaatan Senyawa Flavonoid sebagai Antioksidan pada Penderita Hiperkolesterolemia: Studi Literatur. *Jurnal Kedokteran (Unram Medical Journal)*, 13(3), 177-187. <https://doi.org/10.29303/jk.v13i3.5388>
- Azizah, M., Aulia, M., & Supriyatna, A. (2023). Inventarisasi dan identifikasi jenis tumbuhan famili poaceae di sekitar Cibiru, Bandung, Jawa Barat. *Konstanta: Jurnal Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam*, 1(2), 94-104.
- Az-Zhuhaili, W. (2014). *Tafsir Al-Munir Jilid 10: Aqidah, Syari'ah, dan Manhaj*. Jakarta: Gema Insani.
- Az-Zhuhaili, W. (2014). *Tafsir Al-Munir Jilid 8: Aqidah, Syari'ah, dan Manhaj*. Jakarta: Gema Insani.
- Az-Zhuhaili, W. (2014). *Tafsir Al-Munir Jilid 9: Aqidah, Syari'ah, dan Manhaj*.

Jakarta: Gema Insani.

- Badaring, D. R., Sari, S. P. M., Nurhabiba, S., Wulan, W., & Lembang, S. A. R. (2020). Uji ekstrak daun maja (*Aegle marmelos* L.) terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. *Indonesian Journal of Fundamental Sciences*, 6(1), 16.
- Bagavathiannan, M. V., & Van Acker, R. C. (2009). The biology and ecology of feral alfalfa (L.) and its implications for novel trait confinement in North America. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 28(1-2), 69-87. <https://doi.org/10.1080/07352680902753613>
- Barek, M. E., Hine, T. M., Nalley, W. M., & Belli, H. L. (2020). Pengaruh Penambahan Sari Wortel Dalam Pengencer Sitrat Kuning Telur Terhadap Kualitas Spermatozoa Kambing Bligon (The effect of carrot juice supplementation in citrate-egg yolk extender on spermatozoa quality of bligon goat). *Jurnal Nukleus Peternakan*, 7(2), 109-117. <https://doi.org/10.35508/nukleus.v7i2.3152>
- Bau, A. E., Kune, P., Lawa, A. B., & Telupere, F. M. S. (2025). Pengaruh Penambahan Sari Buah Jambu Biji Merah Dalam Pengencer Tris Kuning Telur Terhadap Kualitas Spermatozoa Babi Duroc: Effect of Adding Red Guava Fruit Juice to Egg Yolk Tris Retailers on The Quality of Duroc Boar Spermatozoa. *Journal of Livestock and Animal Health*, 8(1), 16-22. <https://doi.org/10.32530/jlah.v8i1.87>
- Bebas, W., Budiasa, M. K., & Astutik, I. Y. (2015). Penambahan Vitamin C pada Pengencer Spermatozoa Babi Landrace yang disimpan pada Suhu 15 oC. *Buletin Veteriner Udayana*, 7(2), 179-185.
- Berean, D. I. (2025). Role of Antioxidants in Male Semen Preservation.
- Berruti, G., & Paiardi, C. (2011). Acrosome biogenesis: revisiting old questions to yield new insights. *Spermatogenesis*, 1(2), 95-98. <https://doi.org/10.4161/spmg.1.2.16820>
- Birowo, P., Deswanto, I. A., Atmoko, W., & Rasyid, N. (2021). Population variation in Y-chromosome microdeletion and its role in the evaluation of male infertility management: a systematic review. *F1000Research*, 10, 1244. <https://doi.org/10.12688/f1000research.73895.1>
- Bouhadana, D., Godin Pagé, M. H., Montjean, D., Bélanger, M. C., Benkhalifa, M., Miron, P., & Petrella, F. (2025). The role of antioxidants in male fertility: A comprehensive review of mechanisms and clinical applications. *Antioxidants*, 14(8), 1013. <https://doi.org/10.3390/antiox14081013>
- Caballero, J., Frenette, G., & Sullivan, R. (2011). Post testicular sperm maturational changes in the bull: important role of the epididymosomes and prostasomes. *Veterinary medicine international*, 2011(1), 757194. <https://doi.org/10.4061/2011/757194>
- Chianese, R., & Pierantoni, R. (2021). Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) production alters sperm quality. *Antioxidants*, 10(1), 92. <https://doi.org/10.3390/antiox10010092>
- Christijanti, W., Utami, N. R., & Iswara, A. (2010). Efek pemberian antioksidan vitamin C dan E terhadap kualitas spermatozoa tikus putih terpapar allethrin. *Biosaintifika: Journal of Biology & Biology Education*, 2(1). <https://doi.org/10.15294/biosaintifika.v2i1.1148>

- Cilio, S., Rienzo, M., Villano, G., Mirto, B. F., Giampaglia, G., Capone, F., ... & Crocetto, F. (2022). Beneficial effects of antioxidants in male infertility management: A narrative review. *Oxygen*, 2(1), 1-11. <https://doi.org/10.3390/oxygen2010001>
- Darni, J., Tjahjono, K., & Sofro, M. A. U. (2016). Pengaruh pemberian ekstrak daun Alfalfa (*Medicago sativa*) terhadap profil lipid dan kadar malondialdehid tikus hiperkolesterolemia. *Jurnal Gizi Klinik Indonesia*, 13(2), 51-58.
- Das, P., Choudhari, A. R., Dhawan, A., & Singh, R. (2009). Role of ascorbic acid in human seminal plasma against the oxidative damage to the sperms. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 24(3), 312-315.
- Dasrul, R., & Lubis, T. M. (2014). Pengaruh penambahan sari buah tomat dalam media pengencer terhadap motilitas dan viabilitas spermatozoa kambing Boer yang disimpan pada suhu 3–5 C. *Jurnal Ilmiah Peternakan*, 97324.
- Dewangga, M. W., Nasihun, T., & Isradji, I. (2020). Dampak olahraga berlebihan terhadap kualitas sperma. *Jurnal Penelitian Kesehatan "SUARA FORIKES" (Journal of Health Research "Forikes Voice")*, 12(1), 58-61. <http://dx.doi.org/10.33846/sf12115>
- Doseděl, M., Jirkovský, E., Macáková, K., Krčmová, L. K., Javorská, L., Pourová, J., ... & Oemonom. (2021). Vitamin C—sources, physiological role, kinetics, deficiency, use, toxicity, and determination. *Nutrients*, 13(2), 615. <https://doi.org/10.3390/nu13020615>
- Ducha, N., Budijastuti, W., & Rahayu, D. A. (2021). Senduro goat semen characteristics as a candidate for low temperature storage. In *E3S Web of Conferences* (Vol. 328, p. 08010). EDP Sciences. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202132808010>
- Dutta, S., Majzoub, A., & Agarwal, A. (2019). Oxidative stress and sperm function: A systematic review on evaluation and management. *Arab journal of urology*, 17(2), 87-97. <https://doi.org/10.1080/2090598X.2019.1599624>
- Ehrlich, P. R., & Mooney, H. A. (1983). Extinction, substitution, and ecosystem services. *BioScience*, 33(4), 248-254. <https://doi.org/10.2307/1309037>
- Elballat, S. E. (2016). Protective effect of curcumin and vitamin C each alone and in combination on cisplatin-induced sperm abnormalities in male albino rats. *The Journal of Basic & Applied Zoology*, 76, 52-59. <https://doi.org/10.1016/j.jobaz.2016.11.001>
- Elisia, R. (2022). Pengaruh Media Swim-up terhadap Karakteristik Spermatozoa Epididimis Kerbau: Sperma kerbau. *Jurnal Peternakan Mahaputra*, 2(2), 146-152. <https://doi.org/10.36665/jpm.v2i2.93>
- Ermayanti, N. G. A. M., Suarni, N. M. R. S., & Made, R. A. I. (2010). Kualitas Spermatozoa Mencit (*Mus musculus* L.) setelah Perlakuan Infus Kayu Amargo (*Quassia amara* Linn.) dan Pemulihannya. *Jurnal biologi*, 14(2), 45-49.
- Fajrilah, B. R., Indrayani, U. D., & Djam'an, Q. (2013). Pengaruh pemberian madu terhadap kadar malondialdehyde (MDA) plasma darah pada tikus yang diinduksi alloxan. *Sains Medica*, 5, 98-100.
- Fakhrzy, F. (2020). Optimalisasi Metode Maserasi Untuk Ekstraksi Tanin Rendemen Tinggi. *Menara Ilmu: Jurnal Penelitian dan Kajian Ilmiah*, 14(2). <https://doi.org/10.31869/mi.v14i2.1739>
- Fanaei, H., Khayat, S., Halvaei, I., Ramezani, V., Azizi, Y., Kasaeian, A., ... &

- Akrami, M. (2014). Effects of ascorbic acid on sperm motility, viability, acrosome reaction and DNA integrity in teratozoospermic samples. *Iranian journal of reproductive medicine*, 12(2), 103.
- Fatah, M. I., Muldiyana, T., & Kusnadi, K. (2024). Pengaruh Konsentrasi Pelarut Terhadap Aktivitas Antioksidan Sediaan Serum Ekstrak Kulit Buah Naga Merah (*Hylocereus Polyrhizus*). *JIFI (Jurnal Ilmiah Farmasi Imelda)*, 7(2), 61-70. <https://doi.org/10.52943/jifarmasi.v7i2.1562>
- Febrianti, N., Yunianto, I., & Dhaniaputri, R. (2015). Kandungan antioksi dan asam askorbat pada jus buah-buahan tropis. *Jurnal Bioedukatika*, 3(1), 6.
- Fiqri, M.M., Ducha, N., & Raharjo. (2014). Motilitas Spermatozoa Sapi Brahman dengan Berbagai Konsentrasi dalam Pengencer CEP-D yang Disimpan dalam Refrigerator. *Lentera Bio.* 3(3); 181-185. <http://ejournal.unesa.ac.id/index.php/lenterabio>
- Flint, M., McAlister, D. A., Agarwal, A., & du Plessis, S. S. (2015). Male accessory sex glands: structure and function. *Mammalian endocrinology and male reproductive biology*, 245-258. <https://doi.org/10.1201/b18900-10>
- Freitas, M. J., Vijayaraghavan, S., & Fardilha, M. (2017). Signaling mechanisms in mammalian sperm motility. *Biology of reproduction*, 96(1), 2-12. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.116.144337>
- Garner, D. L., & Hafez, E. S. E. (2000). Spermatozoa and seminal plasma. *Reproduction in farm animals*, 96-109. <https://doi.org/10.1002/9781119265306.ch7>
- Ghoffar, M. A. (2004). Tafsir Ibnu Katsir. Jakarta: Pustaka Imam Asy-Syafi'i
- Gosálvez, J., Ariza, M., & López-Fernández, C. (2020). Effects of ascorbic acid on sperm motility, viability, acrosome reaction and DNA integrity in teratozoospermic samples. *PMC*. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4009562/>
- 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), 1025. <https://doi.org/10.3390/antiox10071025>
- Hafaz, N. A. (2017). The effect of fasting to the quality of spermatozoa in adult male rattus norvegicus. *JKKI: Jurnal Kedokteran dan Kesehatan Indonesia*, 87-95. <https://doi.org/10.20885/JKKI.Vol8.Iss2.art3>
- Handajani, F. (2021). Metode pemilihan dan pembuatan hewan model beberapa penyakit pada penelitian eksperimental. *Sidoarjo: Zifatama Jawara*, 51-62.
- Handoyo, D. L. Y. (2020). Pengaruh lama waktu maserasi (perendaman) terhadap kekentalan ekstrak daun sirih (*Piper betle*). *Jurnal Farmasi Tinctura*, 2(1), 34-41. <https://doi.org/10.35316/tinctura.v2i1.1546>
- Harahap, S. (2024). Analisis Senyawa Bioaktif dan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Pegagan (*Centella Asiatica*) dengan Berbagai Konsentrasi Pelarut. *Jurnal Sains dan Teknologi Formosa*, 3 (2), 307-322. <https://doi.org/10.55927/fjst.v3i2.8166>
- Harianja, D. N., Karti, P. D. M. H., & Prihantoro, I. 2021. Morfologi mutan alfalfa (*Medicago sativa* L.) hasil iradiasi sinar gamma pada cekaman kering. *Jurnal Ilmu Nutrisi dan Teknologi Pakan*, 19(2): 59-65.
- Hasanah, N., & Novian, D. R. (2020). Analisis ekstrak etanol buah labu kuning (*Cucurbita moschata* D.). *Jurnal Ilmiah Farmasi*, 9(1), 54-59.

- Hasanah, U., & Masri, M. (2015). Analisis pertumbuhan mencit (*Mus musculus* L.) ICR dari hasil perkawinan inbreeding dengan pemberian pakan AD1 dan AD2. In *Prosiding Seminar Nasional Biologi* (Vol. 1, No. 1). <https://doi.org/10.24252/psb.v1i1.2130>
- Hauger, R. L., Saelzler, U. G., Pagadala, M. S., & Panizzon, M. S. (2022). The role of testosterone, the androgen receptor, and hypothalamic-pituitary-gonadal axis in depression in ageing Men. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 23(6), 1259-1273. <https://doi.org/10.1007/s11154-022-09767-0>
- Helmina, S., & Hidayah, Y. (2021). Kajian etnobotani tumbuhan obat tradisional oleh masyarakat kampung Padang kecamatan Sukamara Kabupaten Sukamara. *Jurnal Pendidikan Hayati*, 7(1).
- Heś, M., Dziedzic, K., Górecka, D., Jędrusek-Golińska, A., & Gujska, E. (2019). Aloe vera (L.) Webb.: natural sources of antioxidants—a review. *Plant Foods for Human Nutrition*, 74(3), 255-265. <https://doi.org/10.1007/s11130-019-00747-5>
- Horvat, D., Viljevac Vuletić, M., Andrić, L., Baličević, R., Kovačević Babić, M., & Tucak, M. (2022). Characterization of forage quality, phenolic profiles, and antioxidant activity in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plants*, 11(20), 2735. <https://doi.org/10.3390/plants11202735>
- Husna, P. A., Kairupan, C. F., & Lintong, P. M. (2022). Tinjauan mengenai manfaat flavonoid pada tumbuhan obat sebagai antioksidan dan antiinflamasi. *EBiomedik*, 10(1). <https://doi.org/10.35790/ebm.v10i1.38637>
- Iqra, K. N., Amelia, A. C. R., Tarigan, S. N. Z. B. R., Akbar, I. Q., Ahda, Y., & Atifah, Y. (2023). Pengaruh Pemberian Ekstrak Jahe Merah (*Zingiber Officinale* Var. Rubrum) dalam Meningkatkan Motilitas dan Morfologi Spermatozoa Mencit (*Mus Musculus* L.). *Jurnal Ilmu Kedokteran dan Kesehatan*, 10(12), 3417-3425. <http://ejournalmalahayati.ac.id/index.php/kesehatan>
- Iskandari, N. N., Madyawati, S. P., Wibawati, P. A., Suprayogi, T. W., Prastiya, R. A., & Agustono, B. (2020). Perbandingan pengencer tris kuning telur dan susu skim kuning telur terhadap persentase motilitas, viabilitas dan morta membran plasma spermatozoa kambing sapera pada penyimpanan suhu 5oC. *Jurnal Medik Veteriner*, 3(2), 196-202.
- James, E. R., Carrell, D. T., Aston, K. I., Jenkins, T. G., Yeste, M., & Salas-Huetos, A. (2020). The role of the epididymis and the contribution of epididymosomes to mammalian reproduction. *International journal of molecular sciences*, 21(15), 5377. <https://doi.org/10.3390/ijms21155377>
- Janggur, V. L., Hine, T. M., & Kune, P. (2023). Kualitas Sperma Sapi Angus Dalam Pengencer Citrate-Kuning Telur Yang Ditambahkan Sari Buah Tomat (Sperm quality of angus bulls in citrate-egg yolk extender added tomato juice). *Jurnal Nukleus Peternakan*, 10(1), 59-67. <https://doi.org/10.35508/nukleus.v10i1.8347>
- Kamal, M. M., Alam, M. E., Das, S. K., Yeasmin, M. S., Ahmed, S., Rahman, M. A., ... & Masum, M. A. (2023). Effects of glucose and trehalose on tris-citric acid-egg yolk-fructose diluents for semen cryopreservation in goat. *Journal of advanced veterinary and animal research*, 10(2), 169. <https://doi.org/10.5455/javar.2023.j666>

- Khotijah, S. (2024, August). Pengaruh Ekstrak Etanol Daun Muda Sungkai (*Peronema canescens* Jack.) Terhadap Viabilitas Dan Kecepatan Gerak Spermatozoa Mencit Jantan (*Mus musculus*). In *Prosiding Seminar Nasional Sains dan Teknologi "SainTek"* (Vol. 1, No. 2, pp. 865-876).
- Kifli, Z., IZZAH, A., & AQILA, J. (2025). Pengamatan Anatomi Dan Fisiologi Jantung Pada Mencit (*Mus Musculus*) Dan Korelasinya Terhadap Tubuh Manusia. *Inhealth: Indonesian Health Journal* Ученые: CV. Eureka Murakabi Abadi, 4(1), 8-12. <https://doi.org/10.56314/inhealth.v4i1.284>
- Klau, M. K., Winarso, H., & Pribadi, F. (2024). Efek Pemberian Suplementasi Kombinasi Vitamin C dan Albumin Terhadap Viabilitas Spermatozoa dalam Proses Sentrifugasi (Studi In Vitro). *Medical Scope Journal*, 6(2), 184-189. <https://doi.org/10.35790/msj.v6i2.52488>
- Kolettis, P. N., Purcell, M. L., Parker, W., Poston, T., & Nangia, A. K. (2015). Medical testosterone: an iatrogenic cause of male infertility and a growing problem. *Urology*, 85(5), 1068-1073. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2014.12.052>
- Kowalczyk, A. (2022). The role of the natural antioxidant mechanism in sperm cells. *Reproductive Sciences*, 29(5), 1387-1394. <https://doi.org/10.1007/s43032-021-00795-w>
- Kumar, N., & Singh, A. K. (2015). Trends of male factor infertility, an important cause of infertility: A review of literature. *Journal of human reproductive sciences*, 8(4), 191-196. DOI: 10.4103/0974-1208.170370
- Kusmita, L., Setyani, W., & Puspitaningrum, I. (2014). Uji Efek Antiinflamasi Fraksi Etil Asetat Ekstrak Alfafa (*Medicago sativa*) pada Tikus Putih Jantan yang Diinduksi Karagenin. *Jurnal Ilmu Farmasi dan Farmasi Klinik*, 47-54.
- Lasandrang, F. S. (2021). Studi Produktivitas Kambing Pada Peternakan Rakyat Di Kabupaten Tolitoli. *Jurnal Peternakan Nusantara*, 7(2). <https://doi.org/10.30997/jpn.v7i2.4572>
- Lei, T., Yang, Y., & Yang, W. X. (2025). Luteinizing hormone regulates testosterone production, leydig cell proliferation, differentiation, and circadian rhythm during spermatogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(8), 3548. <https://doi.org/10.3390/ijms26083548>
- Leyn, M. F., Belli, H., Nalley, W. M., Kune, P., & Hine, T. M. (2021). Kualitas Spermatozoa Kambing Bligon Dalam Pengencer Tris-Kuning Telur Dengan Penambahan Berbagai Level Ekstrak Kulit Buah Naga (Spermatozoa quality of bligon goat in tris-egg yolk diluent added with various levels of dragon fruit peel extract). *Jurnal Nukleus Peternakan*, 8(1), 23-32. <https://doi.org/10.35508/nukleus.v8i1.4230>
- Liu, X., Zeng, T., Zhang, E., Bin, C., Liu, Q., Wu, K., ... & Wei, S. (2025). Plant-based bioactives and oxidative stress in reproduction: anti-inflammatory and metabolic protection mechanisms. *Frontiers in Nutrition*, 12, 1650347. <https://doi.org/10.3389/fnut.2025.1650347>
- Majzoub, A., & Agarwal, A. (2018). Systematic review of antioxidant types and doses in male infertility: Benefits on semen parameters, advanced sperm function, assisted reproduction and live-birth rate. *Arab journal of urology*, 16(1), 113-124. <https://doi.org/10.1016/j.aju.2017.11.013>

- Mareta, C. A. (2020). Efektifitas pegagan (*Centella asiatica*) sebagai antioksidan. *Jurnal Medika Hutama*, 2(01 Oktober), 390-394. <https://www.jurnalmedikahutama.com/index.php/JMH/article/view/99>
- Moein, M. R., Dehghani, V. O., Tabibnejad, N., & Vahidi, S. (2012). Role of ascorbic acid in human seminal plasma against the oxidative damage to the sperms. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*, 10(4), 395-396. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3453303/>
- Mondal, P., Maity, R., & Mallick, C. (2022). In vitro spermicidal effect of Thevetia Peruviana leaves on human spermatozoa. *Andrologia*, 54(2), e14323. <https://doi.org/10.1111/and.14323>
- Moretti, E., Signorini, C., Corsaro, R., Giamalidi, M., & Collodel, G. (2023). Human sperm as an in vitro model to assess the efficacy of antioxidant supplements during sperm handling: A narrative review. *Antioxidants*, 12(5), 1098. <https://doi.org/10.3390/antiox12051098>
- Mottola, F., Iovine, C., Carannante, M., Santonastaso, M., & Rocco, L. (2022). In vitro combination of ascorbic and ellagic acids in sperm oxidative damage inhibition. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(23), 14751. <https://doi.org/10.3390/ijms232314751>
- Mukminat, A., & Suharyati, S. (2014). Pengaruh penambahan berbagai sumber karbohidrat pada pengencer skim kuning telur terhadap kualitas semen beku sapi Bali. *Jurnal Ilmiah Peternakan Terpadu*, 2(2). <https://doi.org/10.23960/jipt.v2i2.p%25p>
- Munazaroh, A. M., Wahjuningsih, S., & Ciptadi, G. (2013). Uji kualitas spermatozoa kambing boer hasil pembekuan menggunakan mr. Frosty ® pada tingkat pengenceran andromeda® berbeda. *Ternak tropika Journal of Tropical Animal Production*, 14(2), 63-71.
- Nahak, P. L., Dethan, A. A., & Kia, K. W. (2022). Kualitas Semen Babi Landrace Dalam Pengencer Semen Sitrat-Kuning Telur Yang Ditambah Glukosa Dengan Konsentrasi Berbeda. *JAS*, 7(1), 12-15. <https://doi.org/10.32938/ja.v7i1.1593>
- Nasihin, A., & Fadhlurrohman, I. (2025). Potential of Functional Food Fortified Alfalfa (*Medicago sativa* L.) in Fermented Milk Products: A Literature Review. *Journal of Tropical Agricultural Engineering and Biosystems-Jurnal Keteknik Pertanian Tropis dan Biosistem*, 13(1), 52-63. <https://doi.org/10.21776/ub.jkptb.2025.013.01.05>
- Nirnasari, M. (2018). Pengaruh Paparan Radiasi Gelombang Elektromagnetik Wi-Fi 4G terhadap Berat Epididimis dan Morfologi Sperma Tikus Jantan Wistar. *Jurnal Keperawatan Silampari*, 2(1), 285-299.
- Njus, D., Kelley, P. M., Tu, Y. J., & Schlegel, H. B. (2020). Ascorbic acid: The chemistry underlying its antioxidant properties. *Free Radical Biology and Medicine*, 159, 37-43. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.07.013>
- Noegroho, B. S., Siregar, S., & Tampubolon, K. A. G. (2022). Antioxidant supplementation on sperm DNA fragmentation and sperm parameters: a systematic review and meta-analysis. *Turkish Journal of Urology*, 48(5), 336. <https://doi.org/10.5152/tud.2022.22058>
- Nubatonis, A., Wiguna, I. G. A., & Kolo, Y. (2024). Pengukuran Kualitas Semen dan Morfologi Spermatozoa Kambing Kacang sebagai Dasar Pembuatan Semen Beku. *Jurnal Ilmu dan Industri Peternakan*, 10(1), 39-51.

<http://dx.doi.org/10.24252/jiip.v10i1.42938>

- Nugroho, R.A. 2018. *Mengenal Mencit Sebagai Hewan Laboratorium*. Samarinda. Mulawarman University Press
- Nurhayati, L., Riwu, A. R., & Hine, T. M. (2025). Pengaruh Penambahan Ekstrak Daun Kelor Segar dalam Pengencer BTS terhadap Kualitas Spermatozoa Babi Landrace. *Jurnal Peternakan Lahan Kering*, 7(1), 38-46.
- Nurmasyitah, N. (2018). Pengaruh Medan Listrik Terhadap Gerak Acak dan Viabilitas Spermatozoa Mencit (*Mus musculus*). *JUPI (Jurnal IPA dan Pembelajaran IPA)*, 2(2), 75-82.
- Oduwole, O. O., Peltoketo, H., & Huhtaniemi, I. T. (2018). Role of follicle-stimulating hormone in spermatogenesis. *Frontiers in endocrinology*, 9, 763. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00763>
- Pahlani, E., Safitri, M., & Anggraeni, R. (2021). Formulasi dan Evaluasi Sediaan Masker Peel-Off Dari Ekstrak Etanol Herba Alfalfa (*Medicago Sativa* L.). *Jurnal Ilmiah JKA (Jurnal Kesehatan Aeromedika)*, 7(2), 1-11. <https://doi.org/10.58550/jka.v7i2.100>
- Pahlevy, J. R., Ratnani, H., Fikri, F., Restiadi, T. I., Saputro, A. L., & Agustono, B. (2022). The addition of vitamin C in tris-egg yolk extender maintained Sopera goat semen quality in 5 C storage. *Ovozoa: J Anim Reprod*, 11(1), 1-8.
- Palani, A. F. (2018). Effect of serum antioxidant levels on sperm function in infertile male. *Middle East Fertility Society Journal*, 23(1), 19-22. <https://doi.org/10.1016/j.mefs.2017.07.006>
- Pamungkas, F. A., & Krisnan, R. (2017). Pemanfaatan sari kedelai sebagai bahan pengencer pengganti kuning telur untuk kriopreservasi spermatozoa hewan. *Jurnal Litbang Pertanian*, 36(1), 21-27.
- Pandey, K. B., & Rizvi, S. I. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2(5), 270-278. <https://doi.org/10.4161/oxim.2.5.9498>
- Parman, S. (2007). Kandungan protein dan abu tanaman alfalfa (*medicago sativa* l) setelah pemupukan biorisa. *Bioma*, 9(2), 38-44.
- Pawarti, N., Iqbal, M., Ramdini, D. A., & Yuliyanda, C. (2023). Pengaruh metode ekstraksi terhadap persen rendemen dan kadar fenolik ekstrak tanaman yang berpotensi sebagai antioksidan. *Medical Profession Journal of Lampung*, 13(4), 590-593. <https://doi.org/10.53089/medula.v13i4.774>
- Permatasari, S., Tangdibali, A. Z. A., Augustina, I., Handayani, S., & Teresa, A. (2025). Pengaruh Ekstrak Etanol 96% Akar Saluang Belum Terhadap Viabilitas Spermatozoa Secara In Vitro. *Majalah Kesehatan*, 12(1), 1-7. <https://doi.org/10.21776/majalahkesehatan.2025.012.01.1>
- Perumal, P., Sunder, J., De, A. K., Nahak, A. K., Chaurasia, D. K., Balamurugan, T. C., & Bhattacharya, D. (2024). Effect of *Moringa oleifera* on semen quality profiles in endangered Teressa goat under tropical humid island ecosystem. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 13(2), 89-96.
- Popovic, L. M., Mitic, N. R., Miric, D., Bisevac, B., Miric, M., & Popovic, B. (2015). Influence of vitamin C supplementation on oxidative stress and neutrophil inflammatory response in acute and regular exercise. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2015(1), 295497. <https://doi.org/10.1155/2015/295497>

- Pramesemara, I. G. N. (2017). Pemberian growth hormone meningkatkan jumlah sel spermatogenesis, sel leydig, dan sel sertoli pada mencit (*Mus musculus*) tua. *Medicina*, 48(1), 13-18. <https://doi.org/10.15562/medicina.v48i1.17>
- Putra, A. A. B., Bogoriani, N. W., Diantariani, N. P., & Sumadewi, N. L. U. (2014). Ekstraksi zat warna alam dari bonggol tanaman pisang (*Musa paradiasciaca* L.) dengan metode maserasi, refluks, dan sokletasi. *Jurnal Kimia*, 8(1), 113-119.
- Raeeszadeh, M., Moradi, M., Ayar, P., & Akbari, A. (2021). The antioxidant effect of *Medicago sativa* L.(alfalfa) ethanolic extract against mercury chloride (HgCl₂) toxicity in rat liver and kidney: an in vitro and in vivo study. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2021(1), 8388002. <https://doi.org/10.1155/2021/8388002>
- Rahman, M. S., & Pang, M. G. (2020). New biological insights on X and Y chromosome-bearing spermatozoa. *Frontiers in cell and developmental biology*, 7, 388. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00388>
- Rahmi, A., DR, A., & Baharun, A. (2023). Pengaruh Suplementasi Ekstrak Minyak Habatussauda (*Nigella sativa*) Terhadap Reproduksi Mencit Jantan (*Mus musculus*). *Indonesian Archipelago Journal of Animal Science (IAJAS)/Jurnal Peternakan Nusantara (JPN)*, 9(1). DOI: 10.30997/jpn.v9i1.6209
- Rajalakshmi, D., & Narasimhan, S. J. F. S. (1995). Food antioxidants: sources and methods of evaluation. In *Food antioxidants* (pp. 79-172). CRC Press.
- Ramadhan, M. A., Rini, G. H., Azhahra, R. D., Zahra, N., Raissa, T. H., Meizora, B. C., & Hidayat, L. H. (2023). Uji Efektivitas Antidepresan Obat Herbal Kapsul Ekstrak Daun Pegagan (*Centella Asiatica* L.) Pada Mencit Dengan Metode Forced Swimming Test. *BIO-SAINS| Jurnal Ilmiah Biologi*, 3(1), 23-30. <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.23564679>
- Raspa, M., Paoletti, R., & Scavizzi, F. (2025). Ascorbic acid 2-glucoside improves survival, quality, and fertility of frozen-thawed C57Bl/6J and C57Bl/6N mouse spermatozoa. *Andrology*, 13(6), 1601-1614. <https://doi.org/10.1111/andr.13768>
- Reni, S., Kanedi, M., Nurcahyani, N., & Sutyarso, S. (2013). Histologi Testis Mencit (*Mus musculus* L.) Muda Dan Tua Yang Diberi Ekstrak Lada Hitam (*Piper nigrum* L.). *Jurnal Ilmiah Biologi Eksperimen dan Keanekaragaman Hayati (J-BEKH)*, 1(2), 92-95. <https://doi.org/10.23960/jbekh.v1i2.144>
- Rimi, M. A., Akter, T., Akhtar, M. M., & Khandoker, M. A. M. Y. (2023). Effect of diluters on frozen semen production of Black Bengal Goat. *Bangladesh Journal of Animal Science*, 52(4), 105-113. <https://doi.org/10.3329/bjas.v52i4.70700>
- Rizal M, & Herdis M. (2010). Peranan antioksidan dalam meningkatkan kualitas semen beku. *Jurnal Wartazoa*. 20(3):139-146.
- Rizal, M., Nisa, C., & Norliani, R. (2021). Daya hidup spermatozoa kambing peranakan boer yang dipreservasi dengan pengencer laktosa dan ekstrak daun kelor. In *Prosiding Seminar Nasional Lingkungan Lahan Basah* (Vol. 6, No. 3).
- Rohmah, M. N. (2024). Pemanfaatan dan kandungan kunyit (*Curcuma domestica*) sebagai obat dalam perspektif Islam. *Es-Syajar: Journal of Islam, Science and Technology Integration*, 2(1), 178-186.

- Ros-Santaella, J. L., & Pintus, E. (2021). Plant extracts as alternative additives for sperm preservation. *Antioxidants*, 10(5), 772. <https://doi.org/10.3390/antiox10050772>
- Sabile, S., Toleng, A. L., Yusuf, M., Firmiaty, S., & Idrus, M. (2016). Pengaruh penambahan ekstrak buah Mengkudu (*Morinda Citrifolia* Linn) dalam pengencer terhadap motilitas spermatozoa pada semen cair Sapi Bali. *Aves: Jurnal Ilmu Peternakan*, 10(2), 2-2.
- Safira, A. I., Susilowati, S., Heruprodoto, E. B. A., Rachmawati, K., & Hernawati, T. (2025). Suplementasi Ekstrak Teh Hijau dalam Pengencer Susu Skim Kuning Telur Terhadap Kualitas Spermatozoa Domba Sapudi Yang disimpan pada Suhu Dingin (5° C). *Ranah Research: Journal of Multidisciplinary Research and Development*, 7(5), 3366-3382. <https://doi.org/10.38035/rj.v7i5.1636>
- Sajimin. (2011). *Medicago sativa* L. (alfalfa) sebagai tanaman pakan ternak harapan di Indonesia. *J. Wartazoa* 2(21): 91-98.
- Savitri, D. A., & Ducha, N. (2022). Perbandingan Kualitas Spermatozoa Ikan Lele Masamo (*Clarias* sp.) Pada Media Pengencer Yang Berbeda Selama Penyimpanan Pada Suhu 4-5° C. *LenteraBio: Berkala Ilmiah Biologi*, 11(3), 545-553. <https://doi.org/10.26740/lenterabio.v11n3.p545-553>
- Savitri, F. K., & Suharyati, S. (2014). Kualitas semen beku Sapi Bali dengan penambahan berbagai konsentrasi vitamin C pada bahan pengencer skim kuning telur. *Jurnal Ilmiah Peternakan Terpadu*, 2(3). <https://doi.org/10.23960/jipt.v2i3.p%25p>
- Sayed, M. R., Alshallash, K. S., Safhi, F. A., Alatawi, A., ALshamrani, S. M., Dessoky, E. S., ... & Sultan, F. M. (2022). Genetic diversity, analysis of some agro-morphological and quality traits and utilization of plant resources of alfalfa. *Genes*, 13(9), 1521. <https://doi.org/10.3390/genes13091521>
- Sengupta, P., Pinggera, G. M., Calogero, A. E., & Agarwal, A. (2024). Oxidative stress affects sperm health and fertility—Time to apply facts learned at the bench to help the patient: Lessons for busy clinicians. *Reproductive Medicine and Biology*, 23(1), e12598. <https://doi.org/10.1002/rmb2.12598>
- Septianisa, S., Suharyati, S., Hartono, M., & Siswanto, S. (2025). Pengaruh Penambahan Vitamin C, Vitamin E dan L-Carnitine dalam Pengencer Tris Kuning Telur terhadap Kualitas Semen Cair Domba Ekor Tipis. *Jurnal Riset dan Inovasi Peternakan (Journal of Research and Innovation of Animals)*, 9(1), 195-212. <https://doi.org/10.23960/jrip.2025.9.1.195-212>
- Setiawan, D., Hiroyuki, A., Syamsunarno, M. R. A. A., Hartady, T., Lubis, A., & Widyastuti, R. (2022). Kondisi fertilitas mencit jantan yang diberi ekstrak etanol akar alang-alang (*Imperata cylindrica*). *Acta VETERINARIA Indonesiana*, 10(2), 142–147. <https://doi.org/10.29244/avi.10.2.142-147>
- Shi, S., Guo, Y., & Zhi, H. (2025). Exploring the Sustainable Utilization of Alfalfa Within the Phytomedicine Domain. *Plant, Cell & Environment*. <https://doi.org/10.1111/pce.70014>
- Shihab, M. Q. (2002). *Tafsir Al-Misbah : Pesan, Kesan dan Keserasian Al-Qur'an Volume 10*. Jakarta: Lentera Hati.
- Sjafaraenan, S., Lolodatu, H., Johannes, E., Agus, R., & Sabran, A. (2018). Profil DNA gen follicle stimulating hormone reseptor (Fshr) pada wanita akne

- dengan teknik PCR dan sekuensing DNA. *Bioma: Jurnal Biologi Makassar*, 3(1), 1-11. <https://doi.org/10.20956/bioma.v3i1.3909>
- Solihati N, Purwantara P, Supriatna I, Winarto A. (2013). Perkembangan sel sel spermatogenik dan kualitas pascapemberian ekstrak pegagan (*Centella sperma asiatica*). *JITV* 18(3): 192-201.
- Sukarjati, S., Amilah, S., & Sudjarwo, S. (2018). Toxicity of 32.2 kDa MW Escherichia coli pili adhesin isolated from infertile male semen in reproductive system. *Folia Medica Indonesiana*, 54(2), 146-154. <https://doi.org/10.20473/fmi.v54i2.8866>
- Susetyarini, E. (2018). Struktur Spermatozoa Mencit Jantan yang Diberi Tanin Daun Beluntas (*Pluchea indica*). In *Proceeding Biology Education Conference: Biology, Science, Enviromental, and Learning* (Vol. 15, No. 1, pp. 693-696).
- Susetyarini, R. E. (2015). Jumlah sel spermiogenesis tikus putih yang diberi tanin daun Beluntas (*Pluchea indica*) sebagai sumber belajar. In *Proceeding Biology Education Conference: Biology, Science, Enviromental, and Learning* (Vol. 10, No. 3, pp. 39-44).
- Susilowati, S., Nuria, M. C., & Budiarti, A. (2014). Identifikasi Kandungan Senyawa Kimia Ekstrak Etanol Herba Alfalfa (*Medicago sativa*, L). *Media Farmasi Indonesia*, 9(2).
- Suteky, T., Sutriyono, D., & MI, S. (2017). Kualitas semen produksi UPTD Bengkulu dan tingkat keberhasilan inseminasi pada sapi Bali dan peranakan Simental di Bengkulu. *Jurnal Sain Peternakan Indonesia*, 12(2), 221-229.
- Suwignyo, B., Rini, E. A., & Helmiyati, S. (2023). The profile of tropical alfalfa in Indonesia: A review. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 30(1), 103504. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2022.103504>
- Syauqy, A. (2014). Evaluasi kromatin sperma sebagai indikator kualitas sperma. *Jambi Medical Journal: Jurnal Kedokteran dan Kesehatan*, 2(1). <https://doi.org/10.22437/jmj.v2i1.2702>
- Takalani, N. B., Monageng, E. M., Mohlala, K., Monsees, T. K., Henkel, R., & Opuwari, C. S. (2023). Role of oxidative stress in male infertility. *Reproduction and Fertility*, 4(3). <https://doi.org/10.1530/RAF-23-0024>
- Tandi, J., Toding, F. A., Riani, N. P. I., & Dewi, A. (2023). Pemanfaatan Tumbuhan Sebagai Obat Diabetes Mellitus Di Desa Lampo, Kec. Banawa, Kab. Donggala. *Jurnal Pengabdian Farmasi dan Sains*, 2(1), 1-6. <https://doi.org/10.22487/jpsf.2023.v2.i1.16421>
- Tang, W., Guo, H., Baskin, C. C., Xiong, W., Yang, C., Li, Z., ... & Sun, J. (2022). Effect of light intensity on morphology, photosynthesis and carbon metabolism of alfalfa (*Medicago sativa*) seedlings. *Plants*, 11(13), 1688. <https://doi.org/10.3390/plants11131688>
- Tanii, R. Y., Dethan, A. A., & Purwantiningsih, T. I. (2022). Pengaruh pengencer ekstrak air tebu dalam sitrat-kuning telur terhadap viabilitas dan abnormalitas spermatozoa, serta pH semen sapi Bali dan kambing. *Journal of Tropical Animal Science and Technology*, 4(1), 56-65.
- Teves, M. E., & Roldan, E. R. (2022). Sperm bauplan and function and underlying processes of sperm formation and selection. *Physiological Reviews*, 102(1), 7-60. <https://doi.org/10.1152/physrev.00009.2020>

- Toor, J. S., & Sikka, S. C. (2017). Developmental and reproductive disorders—role of endocrine disruptors in testicular toxicity. In *Reproductive and developmental toxicology* (pp. 1111-1121). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804239-7.00059-7>
- Tourmente, M., Villar-Moya, P., Rial, E., & Roldan, E. R. (2015). Differences in ATP generation via glycolysis and oxidative phosphorylation and relationships with sperm motility in mouse species. *Journal of Biological Chemistry*, 290(33), 20613-20626.
- Ulfah, M. (2014). Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanolik Herba Alfalfa (*Medicago Sativa* L.) Dengan Metode Dpph (1, 1-difenil-2-pikrilhidrazil). *Jurnal Ilmu Farmasi dan Farmasi Klinik*, 11(1), 25-33.
- Unitly, A. J. A., Eddy, L., Nindatu, M., & Reasoa, J. (2022). Peningkatan motilitas dan viabilitas spermatozoa *Rattus norvegicus* terpapar asap rokok pasca diterapi sirup cengkeh. *Biologi Edukasi: Jurnal Ilmiah Pendidikan Biologi*, 14(1), 14-20.
- Utami, I. I., & Ducha, N. (2023). Penambahan ekstrak kulit buah alpukat (*Persea americana*) dalam pengencer CEP terhadap kualitas spermatozoa sapi Simmental suhu 4-5° C. *LenteraBio: Berkala Ilmiah Biologi*, 12(3), 412-422. <https://doi.org/10.26740/lenterabio.v12n3.p412-422>
- Wahyuni, H. I., Shoukat, N., & Romadhon, N. (2023). Inventarisasi Pemanfaatan Tumbuhan dan Relevansinya Sebagai Sumber Pembelajaran Ekopedagogik Berbasis Kearifan Lokal. *Didaktika Biologi: Jurnal Penelitian Pendidikan Biologi*, 7(1), 23-32.
- Walke, G., Gaurkar, S. S., Prasad, R., Lohakare, T., & Wanjari, M. (2023). The impact of oxidative stress on male reproductive function: exploring the role of antioxidant supplementation. *Cureus*, 15(7). 10.7759/cureus.42583
- Wang, Y., Fu, X., & Li, H. (2025). Mechanisms of oxidative stress-induced sperm dysfunction. *Frontiers in Endocrinology*, 16, 1520835. <https://doi.org/10.3389/fendo.2025.1520835>
- Wattimena, J. (2006). Pengaruh waktu inkubasi terhadap pola kapasitasi dan reaksi akrosom spermatozoa domba in vitro. *JITV*, 11(4), 295-301.
- Wibawa, J. C., Arifin, M. Z., & Herawati, L. (2020). Mekanisme vitamin C menurunkan stres oksidatif setelah aktivitas fisik. *JOSSAE (Journal of Sport Science and Education)*, 5(1), 57-63.
- Wijayanti, A., Suprayogi, T. W., Prastiya, R. A., Hernawati, T., Sardjito, T., Saputro, A. L., ... & Sulistyowati, D. (2023). Pengaruh Penambahan Ekstrak Teh Hijau (*Camellia sinensis*) dalam Diluter Tris Kuning Telur Terhadap Kualitas Spermatozoa Sapi Bali (*Bos sondaicus*) Setelah Pembekuan. *Jurnal Medik Veterinar*, 6(1).
- Widyaningrum, Y., Fitriya, S., & Dikman, D. M. (2024, December). Uji validasi formula pengencer spermatozoa nano-flavonoid tahan suhu ruang. In *Conference of Applied Animal Science Proceeding Series* (Vol. 5, pp. 18-27).
- Windayanti, A. E., & Hariani, D. (2024). Pengaruh Penambahan Ekstrak Semanggi Air (*Marsilea crenata*) dalam Pengencer Tris Kuning Telur terhadap Kualitas Semen Beku Kambing Kaligesing. *LenteraBio: Berkala Ilmiah Biologi*, 13(1), 105-116. <https://doi.org/10.26740/lenterabio.v13n1.p105-116>

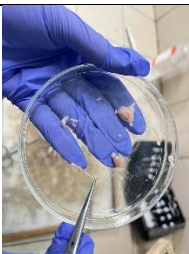
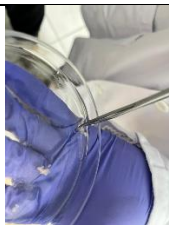
- Wurlina, W., Hariadi, M. U., Safitri, E., Susilowati, S., & Meles, D. K. (2020). The effect of crude guava leaf tannins on motility, viability, and intact plasma membrane of stored spermatozoa of Etawa crossbred goats. *Veterinary world*, 13(3), 530. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2020.530-537>
- Wysokińska, A. (2025). Animal Reproduction: Semen Quality Assessment, Volume II. *Animals*, 15(5), 709. <https://doi.org/10.3390/ani15050709>
- Yahaq, M.A., Ondho, Y.S., & Sutiyono. Pengaruh Penambahan Vitamin C dalam Pengencer Semen Sapi Limousin yang Dibekukan Terhadap Kualitas Post Thawing. *Jurnal Sain Peternakan Indonesia* <https://doi.org/10.31186/jspi.id.14.4.380-386>
- Yendraliza., Anwar, P., & Rodiallah, M. (2015). *Bioteknologi Reproduksi*. Yogyakarta: Aswaja Pressindo.
- Yogo, K. (2022). Molecular basis of the morphogenesis of sperm head and tail in mice. *Reproductive medicine and biology*, 21(1), e12466. <https://doi.org/10.1002/rmb2.12466>
- Yunianto, I., Das, S., & Mat Noor, M. (2010). Antispermatogetic and antifertility effect of Pegaga (*Centella asiatica* L) on the testis of male Sprague-Dawley rats. *Clin Ter*, 161(3), 235-239.
- Yuniarifa, C., Husaana, A., & Riza, M. (2022). Perbedaan Efek Pemberian Secara Kombinasi Dan Tunggal Ekstrak Biji Anggur (*Vitis vinifera* L.) dan Glutation Terhadap Motilitas, Jumlah, dan Morfologi Sperma Tikus Wistar Yang Diberi Paparan Asap Rokok. *Biomedika*, 14(1), 20-32. <https://doi.org/10.23917/biomedika.v14i1.13449>
- Yuslianti ER, 2018. *Pengantar Radikal Bebas dan Antioksidan*. Yogyakarta: Deepublish.
- Zakaria, M. A., Santoso, H., & Zayadi, H. (2020). Analisis Normalitas dan Abnormalitas Spermatozoa Kambing Peranakan Etawa (*Capra aegagrus hircus* L.) Sebelum dan Sesudah Fase Pembekuan: The Spermatozoa Normality and Abnormality Analysis of Etawa crossbred Goat (*Capra aegagrus hircus* L.) Before and After Freezing Phase. *Jurnal Ilmiah Biosaintropis (Bioscience-Tropic)*, 5(2), 77-83. <https://doi.org/10.33474/e-jbst.v5i2.291>
- Zaki, M., Jati, P. Z., Novita, M., & Hidayat, R. (2021). Karakteristik Morfometrik Kambing Lokal di Kecamatan Tambang dan Kecamatan Siak Hulu Kabupaten Kampar. *Journal of Engineering Science and Technology Management (JES-TM)*, 1(2), 32-36. <https://doi.org/10.31004/jestm.v1i2.44>
- Zegers-Hochschild, F., Adamson, G. D., Dyer, S., Racowsky, C., De Mouzon, J., Sokol, R., ... & Van Der Poel, S. (2017). The international glossary on infertility and fertility care, 2017. *Human reproduction*, 32(9), 1786-1801. <https://doi.org/10.1093/humrep/dex234>

LAMPIRAN

Lampiran 1. Dokumentasi Ekstraksi

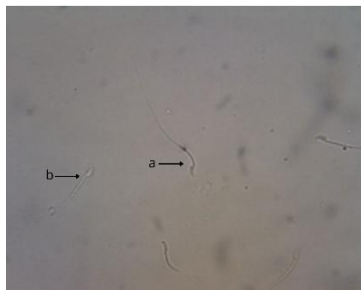
Simplisia daun alfalfa	 Penimbangan simplisia daun alfalfa	 Pembuatan ekstrak dengan maserasi	 Penyaringan ekstrak
 Pemekatan ekstrak dengan rotary evaporator	 Ekstrak daun alfalfa		

Lampiran 2. Pembuatan Suspensi Spermatozoa dari Cauda Epididimis Mencit

 Pembedahan mencit	 Pengambilan cauda epididimis mencit	 Pencacahan cauda epididimis dengan larutan sodium chloride (NaCl) 0,9%	 Suspensi spermatozoa
--	--	--	---

Lampiran 3. Pengamatan Motilitas dan Viabilitas

Viabilitas



- a. Spermatozoa mati
b. Spermatozoa hidup

Motilitas



Lampiran 4. Tabel Nilai Motilitas

Perlakuan	Waktu Inkubasi	Motilitas (%)			Rerata	Selisih rerata motilitas
		Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3		
E0V0	0 Menit	54.12	48	43.52	48.55	1.71
	30 Menit	43.65	47.18	49.67	46.83	
E0V1	0 Menit	61.06	54.55	53.54	56.38	15.61
	30 Menit	29.17	51.66	41.48	40.77	
E0V2	0 Menit	59.16	67.4	53.54	60.03	8.18
	30 Menit	58.6	51.23	45.73	51.85	
E1V0	0 Menit	55.26	54.49	46.5	52.08	2.58
	30 Menit	55	50	43.52	49.51	
E1V1	0 Menit	61	60.31	56.92	59.41	6.17
	30 Menit	57.3	58.9	43.52	53.24	
E1V2	0 Menit	61.53	66.08	60.31	62.64	2.15
	30 Menit	61.11	62.82	57.53	60.49	
E2V0	0 Menit	66.67	52.86	65.11	61.55	16.29
	30 Menit	51.28	40.98	43.52	45.26	
E2V1	0 Menit	58.47	49.45	49.17	52.36	4.01
	30 Menit	58.14	46.1	40.82	48.35	
E2V2	0 Menit	48.78	50	54.32	51.03	10.49
	30 Menit	48.57	41.23	31.82	40.54	

Lampiran 5. Tabel Nilai Viabilitas

Perlakuan	Waktu Inkubasi	Viabilitas (%)			Rerata	Selisih rerata motilitas
		Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3		
E0V0	0 Menit	58.82	55	51.49	53,15	2,75
	30 Menit	54	49.17	43	50,4	
E0V1	0 Menit	58	54.75	57	50,8	4,8
	30 Menit	44.94	52	52.94	55,6	
E0V2	0 Menit	57.32	55	54.32	54,0	4,8
	30 Menit	48	50.52	45.37	49,2	
E1V0	0 Menit	61	75	47.39	61,1	10,1
	30 Menit	60.98	46	47	51	
E1V1	0 Menit	62	60.71	57	58,6	0,3
	30 Menit	61.01	56.14	54.32	58,3	
E1V2	0 Menit	53.39	61	57	51,8	4,3
	30 Menit	51.47	50.52	51.67	56,1	
E2V0	0 Menit	59	47	55.8	49,3	1,1
	30 Menit	50.45	41.67	46	50,4	
E2V1	0 Menit	43.48	46	53.39	47,4	8,1
	30 Menit	29	45.45	43	39,3	
E2V2	0 Menit	40	42	42.86	37,8	0,1
	30 Menit	29.17	41.49	32	37,9	

Lampiran 6. Dokumentasi Analisis Data Motilitas Spermatozoa

1. Uji Normalitas

Tests of Normality							
	Ekstrak	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Data motilitas	E0	.200	9	.200 [*]	.906	9	.288
	E1	.193	9	.200 [*]	.878	9	.151
	E2	.236	9	.159	.913	9	.334
*. This is a lower bound of the true significance.							
a. Lilliefors Significance Correction							

Tests of Normality							
	Vitamin	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Data motilitas	V0	.116	9	.200 [*]	.953	9	.725
	V1	.244	9	.129	.905	9	.286
	V2	.209	9	.200 [*]	.857	9	.088
*. This is a lower bound of the true significance.							
a. Lilliefors Significance Correction							

2. Uji Homogenitas Perlakuan

Tests of Homogeneity of Variances					
		Levene	df1	df2	Sig.
		Statistic			
Data motilitas	Based on Mean	3.307	2	24	.054
	Based on Median	1.974	2	24	.161
	Based on Median and with adjusted df	1.974	2	19.433	.166
	Based on trimmed mean	3.304	2	24	.054

Tests of Homogeneity of Variances					
		Levene	df1	df2	Sig.
		Statistic			
Data motilitas	Based on Mean	.034	2	24	.966
	Based on Median	.042	2	24	.959
	Based on Median and with adjusted df	.042	2	22.348	.959
	Based on trimmed mean	.033	2	24	.968

3. Uji ANOVA uric acid

Tests of Between-Subjects Effects					
Dependent Variable: Data motilitas					
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	231.165 ^a	8	28.896	1.637	.183
Intercept	944.951	1	944.951	53.525	<.001
Ekstrak	104.572	2	52.286	2.962	.077
Vitamin	13.178	2	6.589	.373	.694
Ekstrak * Vitamin	113.415	4	28.354	1.606	.216
Error	317.778	18	17.654		
Total	1493.894	27			
Corrected Total	548.943	26			

a. R Squared = ,421 (Adjusted R Squared = ,164)

Lampiran 7. Dokumentasi Analisis Data Viabilitas Spermatozoa

1. Uji Normalitas

Tests of Normality							
	Ekstrak	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Data viabilitas	E0	.178	9	.200 [*]	.932	9	.497
	E1	.200	9	.200 [*]	.861	9	.099
	E2	.218	9	.200 [*]	.885	9	.176

*. This is a lower bound of the true significance.
a. Lilliefors Significance Correction

Tests of Normality							
	Vitamin	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Data viabilitas	V0	.146	9	.200 [*]	.952	9	.708
	V1	.270	9	.058	.855	9	.085
	V2	.246	9	.124	.870	9	.124

*. This is a lower bound of the true significance.
a. Lilliefors Significance Correction

2. Uji Homogenitas Perlakuan

Tests of Homogeneity of Variances					
		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Data viabilitas	Based on Mean	.555	2	24	.581
	Based on Median	.200	2	24	.820
	Based on Median and with adjusted df	.200	2	20.641	.820
	Based on trimmed mean	.532	2	24	.594

Tests of Homogeneity of Variances					
		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Data viabilitas	Based on Mean	.766	2	24	.476
	Based on Median	.147	2	24	.864
	Based on Median and with adjusted df	.147	2	21.470	.864
	Based on trimmed mean	.660	2	24	.526

3. Uji ANOVA Uric Acid

Tests of Between-Subjects Effects					
Dependent Variable: Data viabilitas					
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	78.640 ^a	8	9.830	.418	.895
Intercept	1102.083	1	1102.083	46.911	<.001
Ekstrak	59.417	2	29.708	1.265	.306
Vitamin	4.895	2	2.448	.104	.902
Ekstrak * Vitamin	14.328	4	3.582	.152	.959
Error	422.878	18	23.493		
Total	1603.601	27			
Corrected Total	501.517	26			

a. R Squared = .157 (Adjusted R Squared = -.218)



JURNAL BIMBINGAN SKRIPSI/TESIS/DESERTASI

IDENTITAS MAHASISWA

IP : 22060210019
Nama : PUTRI PUJI LESTARI
Jurusan : SAINS DAN TEKNOLOGI
Program : BIOLOGI
Dosen Pembimbing 1 : Kholifah Holli, M.Si
Dosen Pembimbing 2 : DIDIK WAHYUDI, S.Si., M.Si
Judul Skripsi/Tesis/Disertasi : PENGARUH KOMBINASI EKSTRAK ETANOL 70% ALFALFA (*Medicago sativa* L.) DENGAN VITAMIN C TERHADAP KUALITAS SPERMATOZOA KAMBING PERANAKAN ETAWA (*Capra aegagrus hircus*) SECARA IN VITRO

IDENTITAS BIMBINGAN

No	Tanggal Bimbingan	Nama Pembimbing	Deskripsi Proses Bimbingan	Tahun Akademik	Status
1	16 Juni 2025	Kholifah Holli, M.Si	Konsultasi Judul Penelitian	Ganjil 2025\2026	Sudah Dikoreksi
2	02 September 2025	Kholifah Holli, M.Si	Konsultasi Judul 2	Ganjil 2025\2026	Sudah Dikoreksi
3	11 September 2025	Kholifah Holli, M.Si	Konsultasi Bab 3	Ganjil 2025\2026	Sudah Dikoreksi
4	25 September 2025	Kholifah Holli, M.Si	ACC Bab 3	Ganjil 2025\2026	Sudah Dikoreksi
5	30 September 2025	DIDIK WAHYUDI, S.Si., M.Si	Bimbingan Integrasi Bab 1	Ganjil 2025\2026	Sudah Dikoreksi
6	02 Oktober 2025	DIDIK WAHYUDI, S.Si., M.Si	ACC Integrasi Bab 1	Ganjil 2025\2026	Sudah Dikoreksi
7	03 Oktober 2025	Kholifah Holli, M.Si	ACC Bab 1	Ganjil 2025\2026	Sudah Dikoreksi
8	08 Oktober 2025	DIDIK WAHYUDI, S.Si., M.Si	ACC Integrasi Bab 2	Ganjil 2025\2026	Sudah Dikoreksi
9	10 Oktober 2025	Kholifah Holli, M.Si	ACC Bab 2	Ganjil 2025\2026	Sudah Dikoreksi
10	10 April 2026	Kholifah Holli, M.Si	Bimbingan Bab 4	Genap 2025\2026	Sudah Dikoreksi
11	21 April 2026	Kholifah Holli, M.Si	Revisi Bab 4	Genap 2025\2026	Sudah Dikoreksi
12	06 Mei 2026	DIDIK WAHYUDI, S.Si., M.Si	Bimbingan Integrasi Bab 4	Genap 2025\2026	Sudah Dikoreksi
13	07 Mei 2026	DIDIK WAHYUDI, S.Si., M.Si	Revisi Integrasi Bab 4	Genap 2025\2026	Sudah Dikoreksi
14	08 Mei 2026	DIDIK WAHYUDI, S.Si., M.Si	ACC Integrasi Bab 4	Genap 2025\2026	Sudah Dikoreksi
15	18 Mei 2026	Kholifah Holli, M.Si	Bimbingan Abstrak	Genap 2025\2026	Sudah Dikoreksi
16	24 Mei 2026	Kholifah Holli, M.Si	ACC Bab 4	Genap 2025\2026	Sudah Dikoreksi
17	02 Juni 2026	Kholifah Holli, M.Si	ACC Naskah Skripsi	Genap 2025\2026	Sudah Dikoreksi

Telah disetujui
Untuk mengajukan ujian Skripsi/Tesis/Desertasi

Dosen Pembimbing 2

DIDIK WAHYUDI, S.Si., M.Si

Malang, _____

Dosen Pembimbing 1

Kholifah Holli, M.Si

Kajur \ KaProdi,



Retno Susilowati, M.Si

[Handwritten signature]



KEMENTERIAN AGAMA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
PROGRAM STUDI BIOLOGI

Jl. Gajayana No. 50 Malang 65144 Telp / Faks. (0341) 558933
Website: <http://biologi.uin-malang.ac.id> Email: biologi@uin-malang.ac.id

Form Checklist Plagiasi

Nama : Putri Puji Lestari
NIM : 220602110019
Judul : Pengaruh Kombinasi Ekstrak Etanol 70% Alfalfa (*Medicago sativa* L.) dengan Vitamin C Terhadap Kualitas Spermatozoa Mencit Secara *In Vitro*

No	Tim Check plagiasi	Skor Plagiasi	TTD
1	Azizatur Rohmah, M.Sc		
2	Berry Fakhry Hanifa, M.Sc		
3	Bayu Agung Prahardika, M.Si		
4	Tyas Nyonita Punjungsari, M.Sc		
5	Maharani Retna Duhita, M.Sc., PhD.Med.Sc	23%	



Mengetahui,
Ketua Program Studi Biologi

Prof. Dr. Retno Susilowati, M.Si
NIP. 19671113 199402 2 001