

**PENGARUH EKSTRAK ETANOL 70% ALFALFA DENGAN INDUKSI
H₂O₂ TERHADAP KUALITAS SPERMATOZOA *Mus musculus* SECARA
*IN VITRO***

SKRIPSI

OLEH:

JIHAN IHZA NABILLA

NIM.220602110095



PROGRAM STUDI BIOLOGI

FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI

UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM

MALANG

2026

HALAMAN JUDUL

**PENGARUH EKSTRAK ETANOL 70% ALFALFA DENGAN INDUKSI
H₂O₂ TERHADAP KUALITAS SPERMATOZOA *Mus musculus* SECARA
*IN VITRO***

SKRIPSI

OLEH:

JIHAN IHZA NABILLA

NIM. 220602110095

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 PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh:

Nama : Jihan Ihza Nabilla
NIM : 220602110095
Program Studi : Biologi
Fakultas : Sains dan Teknologi
Judul Penelitian : PENGARUH EKSTRAK ETANOL 70% ALFALFA
DENGAN INDUKSI H₂O₂ TERHADAP KUALITAS
SPERMATOZOA *Mus Musculus* 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

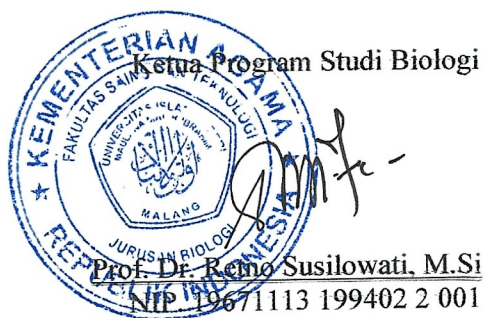

(.....)

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) 
(.....)



HALAMAN PERSEMBAHAN

Alhamdulillahirabbil'alamin, 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. Cinta pertama dan pintu surgaku, Papa Agus Santoso dan Mama Nita Kurniawati. Terima kasih atas segala doa dan dukungan yang selalu menyakinkanku dapat menyelesaikan skripsi ini. Memberikan cinta, kasih sayang, dan pengorbanan tiada henti mengiringi setiap langkah untuk menyelesaikan pendidikan ini. Terima kasih tidak pernah mengeluh dalam membesarkan dan mendidikku sampai mendapat gelar sarjana hari ini. Semoga Allah SWT senantiasa menjaga kalian sampai melihatku berhasil dengan impian yang aku inginkan, sehat selalu papaku dan mamaku.
2. Kedua saudara kandungku, Mas Bibin Alvianta dan Adik Jeviantha. Terima kasih telah menjadi bagian penting dalam perjalananku hingga sampai di titik ini. Berkontribusi dalam penyelesaian skripsi ini baik tenaga, materi, waktu, maupun dukungan yang menjadi kekuatan bagi penulis untuk terus berusaha dan tidak menyerah. Terima kasih juga telah menghiburku dengan tingkah lucumu di tengah rasa lelah dalam proses penyusunan skripsi.
3. Teman-temanku, putri, salsa, isma, yana, farida, andin, dan sisil, yang telah menjadi bagian penting penulis selama perjalanan kuliah ini. Terima kasih telah menemani, membantu, dan menguatkan penulis dalam setiap proses selama menempuh pendidikan. Tawa, cerita, dukungan, serta kebersamaan yang telah dilewati bersama selama masa perkuliahan, baik suka maupun duka menjadi kenangan yang tidak akan terlupakan. Semoga kalian dalam melanjutkan perjalanan dan meraih impian masing-masing dilancarkan, hingga nanti kita dipertemukan kembali dapat berbagi cerita dengan versi terbaik dari diri kita.
4. Salah satu teman saya, Shofia Azzahra. Terima kasih atas nasihat, arahan, serta bantuan dengan tulus tanpa pamrih, baik dalam proses akademik maupun dalam kehidupan pribadi penulis. Banyak suka dan duka yang telah dilewati bersama, hingga pada akhirnya selalu menjadi tempat pulang bagi penulis untuk berbagi cerita. Terima kasih atas bahu yang selalu bersandar, kesabaran dan ketulusan yang diberikan selama ini.
5. Teman teman Biologi Corsa, terima kasih telah menjadi bagian dari perjalanan dan dukungan bagi penulis selama menempuh pendidikan hingga memperoleh gelar ini. Terima kasih atas pengalaman yang telah diberikan bersama selama 8 semester.
6. Rekan-rekan penelitian dan seperbimbingan di bidang Zoologi yang tidak dapat disebutkan satu per satu. Terima kasih atas semangat dan dukungan selama proses penelitian. Terima kasih karena telah saling menguatkan dan mengisi hari-hari di laboratorium dengan banyak cerita dan pengalaman berharga
7. Teman-teman KKN, terima kasih atas kebersamaan yang telah dilalui Bersama. Dukungan, canda, dan tawa yang selalu diberikan kepada penulis ditengah

proses penyusunan skripsi ini. Terima kasih karena menjadi penguat bagi penulis untuk bisa sampai ditahap ini.

8. Last but not least, terima kasih untuk diri penulis sendiri, Jihan Ihza Nabilla, yang telah berjuang dan bertahan sejauh ini demi mimpi yang ingin diraih. Terima kasih selalu berusaha percaya pada setiap proses yang dilakukan, meskipun tak selalu berjalan sesuai rencana. Semua perjuangan, air mata, lelah, dan doa menjadi bukti bahwa diri ini mampu melewati semuanya dengan baik. Pesan untuk Jihan Ihza Nabilla, ingat! hari ini kamu sudah melakukan yang terbaik. Jangan pernah ragu pada proses dan pilihan yang telah diambil. Kelak, ketika mimpi dan karir yang kamu impikan terwujud, jangan lupa berterima kasih kepada diri sendiri karena telah bertahan sejauh itu. Buatlah dirimu bangga karena kamu layak Bahagia. Sekali lagi ku ucapkan, *Thank you for working hard this far. I'm proud of you, and I'll be waiting for you next story.*

MOTTO

**“Kejarlah Kemenangan Di Dunia dan Di Akhirat”
“Jangan Pernah Mengecewakan Orang-Orang yang Kamu Sayangi”**

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Jihan Ihza Nabilla
NIM : 220602110095
Program Studi : Biologi
Fakultas : Sains dan Teknologi
Judul Penelitian : PENGARUH EKSTRAK ETANOL 70% ALFALFA
DENGAN INDUKSI H_2O_2 TERHADAP KUALITAS
SPERMATOZOA *Mus Musculus* 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, 25 Juni 2026
Yang membuat pernyataan



Jihan Ihza Nabilla
NIM. 220602110095

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 EKSTRAK ETANOL 70% ALFALFA DENGAN INDUKSI H₂O₂ TERHADAP KUALITAS SPERMATOZOA *Mus musculus* SECARA *IN VITRO*

Jihan Ihza Nabilla, Kholifah Holil, Didik Wahyudi

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

ABSTRAK

Hidrogen peroksida merupakan kelompok ROS yang berperan sebagai sumber radikal bebas dan menyebabkan kerusakan oksidatif sehingga menurunkan kualitas spermatozoa. Pada kondisi tersebut, diperlukan senyawa antioksidan yang mampu menekan radikal bebas, baik secara endogen ataupun eksogen. Salah satu antioksidan alami yang berpotensi mengurangi aktivitas radikal bebas adalah ekstrak etanol 70% alfalfa. Oleh sebab itu, penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh ekstrak etanol 70% alfalfa dengan induksi H₂O₂ terhadap kualitas spermatozoa *Mus musculus* secara *in vitro*. Penelitian ini dilakukan secara eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial yang terdiri dari dua faktor perlakuan, yaitu H₂O₂ (0, 10, dan 50 µM) dan ekstrak etanol 70% alfalfa (0%, 2%, dan 6%) dengan tiga ulangan. Kualitas spermatozoa setelah pemberian ekstrak alfalfa, induksi H₂O₂, maupun kombinasi keduanya dianalisis berdasarkan parameter motilitas, viabilitas dan integritas membran setelah inkubasi 30 menit pada suhu 37 °C. Data yang diperoleh kemudian dianalisis secara statistik menggunakan *two-way* ANOVA dan dilanjutkan uji Duncan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanol 70% alfalfa maupun induksi H₂O₂ secara tunggal tidak berpengaruh terhadap motilitas dan viabilitas spermatozoa ($p > 0,05$), namun berpengaruh terhadap integritas membran spermatozoa ($p < 0,05$). Sebaliknya, terdapat interaksi antara ekstrak etanol 70% alfalfa dengan H₂O₂ terhadap viabilitas spermatozoa ($p < 0,05$), namun kedua faktor tidak berinteraksi terhadap motilitas dan integritas membran spermatozoa *Mus musculus* secara *in vitro* ($p > 0,05$). Secara keseluruhan, konsentrasi ekstrak alfalfa 2% menunjukkan pengaruh terbaik dibandingkan konsentrasi 6%. Temuan ini mengindikasikan bahwa interaksi antara ekstrak alfalfa dengan H₂O₂ dapat mengubah pola respons spermatozoa dibandingkan jika diberikan secara tunggal.

Kata kunci: Kualitas spermatozoa, *Medicago sativa* L., *Mus musculus*, ROS

THE EFFECT OF 70% ALFALFA ETHANOL EXTRACT WITH H₂O₂ INDUCTION ON THE QUALITY OF SPERMATOZOA *Mus musculus* IN *VITRO*

Jihan Ihza Nabilla, Kholifah Holil, Didik Wahyudi

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

ABSTRACT

Hydrogen peroxide is a group of ROS that acts as a source of free radicals and causes oxidative damage so as to reduce the quality of spermatozoa. In these conditions, antioxidant compounds are needed that are able to suppress free radicals, both endogenous and exogenous. One of the natural antioxidants that has the potential to reduce free radical activity is 70% alfalfa ethanol extract. Therefore, this study was conducted to determine the effect of 70% alfalfa ethanol extract with H₂O₂ induction on the quality of spermatozoa (*Mus musculus*) *in vitro*. This study was conducted experimentally using a factorial Complete Random Design (RAL) consisting of two treatment factors, namely H₂O₂ (0, 10, and 50 µM) and ethanol extract of 70% alfalfa (0%, 2%, and 6%) with three replicas. The quality of spermatozoa after alfalfa extract, H₂O₂ induction, and a combination of both were analyzed based on the parameters of motility, viability and membrane integrity after 30 minutes of incubation at 37 °C. The data obtained were then statistically analyzed using *two-way* ANOVA and continued the Duncan test. The results showed that ethanol extract of 70% alfalfa and induction of H₂O₂ alone did not affect spermatozoa motility and viability ($p>0.05$), but did affect spermatozoa membrane integrity ($p<0.05$). In contrast, there was an interaction between 70% alfalfa ethanol extract and H₂O₂ on spermatozoa viability ($p<0.05$), but the two factors did not interact on the motility and membrane integrity of *Mus musculus* spermatozoa *in vitro* ($p>0.05$). Overall, the alfalfa extract concentration of 2% showed the best effect compared to the concentration of 6%. These findings indicate that the interaction between alfalfa extract and H₂O₂ can alter the response pattern of spermatozoa compared to if administered solely.

Keywords: Spermatozoa quality, *Medicago sativa* L., *Mus musculus*, ROS,

تأثير مستخلص إيثانول البرسيم بنسبة 70٪ مع تحفيز H_2O_2 على جودة الحيوانات المنوية في *Mus musculus* المختبر

جيهان إحزا نبيلة، خليفة هوليل، ديديك وحيودي

برنامج دراسة الأحياء، كلية العلوم والتكنولوجيا

جامعة الدولة الإسلامية مولانا مالك إبراهيم

الملخص

بيروكسيد الهيدروجين هو مجموعة من ROS تعمل كمصدر للجذور الحرة وتسبب أضراراً تأكسدية لتقليل جودة الحيوانات المنوية. في هذه الحالات، تكون المركبات المضادة للأكسدة ضرورية قادرة على كبح الجذور الحرة، سواء الداخلية أو الخارجية. أحد مضادات الأكسدة الطبيعية التي لديها القدرة على تقليل نشاط الجذور الحرة هو مستخلص إيثانول البرسيم بنسبة 70٪. لذلك، أجريت هذه الدراسة لتحديد تأثير مستخلص إيثانول البرسيم بنسبة 70٪ مع تحفيز H_2O_2 على جودة حيوانات المنوية *Mus musculus* في المختبر. أجريت هذه الدراسة تجريبياً باستخدام تصميم عشوائي كامل (RAL) يتكون من عاملي معالجة، وهما H_2O_2 (0، 10، 50 ميكرومتر) ومستخلص الإيثانول بنسبة 70٪ برسيم (0٪، 2٪، 6٪) مع ثلاث نسخ مكررة. تم تحليل جودة الحيوانات المنوية بعد مستخلص البرسيم، وتحفيز H_2O_2 ، ومزيج من الاثنين بناءً على معايير الحركة، وقابلية البقاء، وسلامة الغشاء بعد 30 دقيقة من الحضنة عند 37 درجة مئوية. ثم تم تحليل البيانات التي تم الحصول عليها إحصائياً باستخدام تحليل النوفان ثنائي الاتجاه واستمر في اختبار دنكان. أظهرت النتائج أن مستخلص الإيثانول الذي يحتوي على 70٪ من البرسيم وتحفيز H_2O_2 وحده لم يؤثر على حركة الحيوانات المنوية وقابليتها للبقاء ($p > 0.05$)، لكنه أثر على سلامة غشاء الحيوانات المنوية ($p < 0.05$). على النقيض من ذلك، كان هناك تفاعل بين مستخلص الإيثانول بنسبة 70٪ من البرسيم و H_2O_2 على مدى بقاء الحيوانات المنوية ($p < 0.05$)، لكن لم يكن هناك تفاعل بين حركة وسلامة الغشاء في أغشية الحيوانات المنوية في المختبر ($p < 0.05$). بشكل عام، أظهر تركيز مستخلص البرسيم بنسبة 2٪ أفضل تأثير مقارنة بتركيز 6٪. تشير هذه النتائج إلى أن التفاعل بين مستخلص البرسيم و H_2O_2 يمكن أن يغير نمط استجابة الحيوانات المنوية مقارنة بإعطائها بشكل فردي.

الكلمات المفتاحية: جودة الحيوانات المنوية، ميديكاغو ساتيفا L، *Mus musculus*، ROS

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah wa Syukrulillah senantiasa terpanjatkan kepada Allah SWT yang telah memberikan rohmat dan hidayah-nya sehingga penulis dapat menyelesaikan Proposal penelitian skripsi yang berjudul “Pengaruh Ekstrak Etanol 70% Alfalfa dengan Induksi H₂O₂ Terhadap Kualitas Spermatozoa *Mus musculus* Secara *In Vitro*”. Shalawat serta salam semoga senantiasa tercurahkan kepada junjungan Nabi Muhammad SAW sebagai pembawa risalah yang kekal hingga akhir zaman. Penulis dengan hormat menyampaikan ucapan terima kasih kepada seluruh pihak yang memberikan kontribusi dalam penyusunan proposal. Penulis ingin menyampaikan rasa terimakasih 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 dosen pembimbing skripsi yang telah memberikan bimbingan, arahan, dan masukan dalam penyusunan proposal.
5. Didik Wahyudi, M.Si., selaku dosen pembimbing agama yang telah memberikan bimbingan, arahan, dan masukan terkait integrasi Sains dan Islam dalam kepenulisan proposal.
6. Azizatur Rahmah, M.Sc., selaku dosen wali yang telah membimbing dan memberikan motivasi sehingga penulis dapat Menyusun proposal dengan baik.
7. Kedua orang tua yang berjasa dalam hidup penulis. Terima kasih sudah selalu mendo'akan untuk kebaikan penulis, selalu memberikan kasih sayang, dukungan dan motivasi.

Penulis sadar bahwa tulisan ini masih jauh dari kata sempurna. Namun, penulis berharap tulisan ini dapat memberikan manfaat bagi diri penulis sendiri maupun para pembacanya.

Malang, Juni 2026

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iv
MOTTO	vi
PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN	vii
PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI	viii
ABSTRAK	ix
ABSTRACT	x
المخلص	xi
KATA PENGANTAR.....	xii
DAFTAR ISI.....	xiii
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR.....	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	10
1.3 Tujuan Penelitian.....	10
1.4 Manfaat Penelitian.....	10
1.5 Batasan Masalah.....	11
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	12
2.1 Alfafa (<i>Medicago sativa</i> L.)	12
2.1.1 Deskripsi	12
2.1.2 Morfologi	13
2.1.3 Kandungan dan Manfaat	14
2.2 <i>Mus musculus</i>	19
2.2.1 Hewan Coba Mencit.....	19
2.2.2 Sistem Reproduksi Jantan	20
2.2.3 Spermatozoa Mencit.....	22
2.3 Sumber ROS pada Spermatozoa	28
2.4 Hidrogen Peroksida	32
2.5 Pengaruh Ekstrak Alfalfa terhadap Kualitas Spermatozoa yang diinduksi H ₂ O ₂	35
2.6 Ekstraksi	39
2.7 Hipotesis Penelitian.....	41
BAB III METODE PENELITIAN	42
3.1 Rancangan Penelitian	42
3.2 Variabel Penelitian	43
3.3 Waktu dan Tempat Penelitian	43
3.4 Alat dan Bahan	43

3.4.1	Alat.....	43
3.4.2	Bahan.....	44
3.5	Prosedur Penelitian.....	44
3.5.1	Persiapan Ekstrak Alfalfa.....	44
3.5.2	Aklimatisasi dan Isolasi Organ Reproduksi.....	44
3.5.3	Inkubasi Spermatozoa dengan H ₂ O ₂ dan Ekstrak	45
3.5.4	Uji motilitas.....	46
3.5.5	Uji Viabilitas	47
3.5.6	Uji integritas membran.....	48
3.6	Analisis Data	48
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN		50
4.1	Pengaruh Ekstrak Etanol 70% Alfalfa dengan Induksi H ₂ O ₂ Terhadap Motilitas Spermatozoa <i>Mus musculus</i> Secara <i>In Vitro</i>	50
4.2	Pengaruh Ekstrak Etanol 70% Alfalfa dengan Induksi H ₂ O ₂ Terhadap Viabilitas Spermatozoa <i>Mus musculus</i> Secara <i>In Vitro</i>	59
4.3	Pengaruh Ekstrak Etanol 70% Alfalfa dengan Induksi H ₂ O ₂ Terhadap Integritas Membran Spermatozoa <i>Mus musculus</i> Secara <i>In Vitro</i>	73
BAB V PENUTUP.....		84
5.3	Kesimpulan.....	84
5.4	Saran.....	84
DAFTAR PUSTAKA.....		86
LAMPIRAN.....		98

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
Tabel 3. 1 Perlakuan pada Penelitian	42
Tabel 3. 2 Perhitungan Pengenceran Semen	46
Tabel 4. 1 Rerata Pengaruh Ekstrak Etanol 70% Alfalfa dengan Induksi H ₂ O ₂ Terhadap Motilitas Spermatozoa <i>Mus musculus</i> Secara <i>In Vitro</i>	50
Tabel 4. 2 Hasil Uji ANOVA faktorial Pengaruh Kombinasi Ekstrak Etanol 70% Alfalfa dengan Induksi H ₂ O ₂ Terhadap Motilitas Spermatozoa <i>Mus musculus</i> Secara <i>In Vitro</i>	58
Tabel 4. 3 Rerata Pengaruh Ekstrak Etanol 70% Alfalfa dengan Induksi H ₂ O ₂ Terhadap Viabilitas Spermatozoa <i>Mus musculus</i> Secara <i>In Vitro</i>	60
Tabel 4. 4 Hasil Uji ANOVA faktorial Pengaruh Ekstrak Etanol 70% Alfalfa dengan Induksi H ₂ O ₂ Terhadap Viabilitas Spermatozoa <i>Mus musculus</i> Secara <i>In Vitro</i>	70
Tabel 4. 5 Hasil Uji Duncan Pengaruh Ekstrak Etanol 70% Alfalfa dengan Induksi H ₂ O ₂ Terhadap Viabilitas Spermatozoa <i>Mus musculus</i> Secara <i>In Vitro</i>	72
Tabel 4. 6 Rerata Pengaruh Ekstrak Etanol 70% Alfalfa dengan Induksi H ₂ O ₂ Terhadap Integritas Membran Spermatozoa <i>Mus musculus</i> Secara <i>In Vitro</i>	74
Tabel 4. 7 Hasil Uji ANOVA faktorial Pengaruh Ekstrak Etanol 70% Alfalfa dengan Induksi H ₂ O ₂ Terhadap Integritas Membran Spermatozoa <i>Mus musculus</i> Secara <i>In Vitro</i>	80
Tabel 4. 8 Hasil Uji Duncan Pengaruh Ekstrak Etanol 70% Alfalfa dan Diinduksi H ₂ O ₂ Terhadap Integritas Membran Spermatozoa <i>Mus musculus</i> Secara <i>In Vitro</i>	82

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
Gambar 2. 1 Bagian tanaman alfalfa (<i>Medicago sativa</i>).....	12
Gambar 2. 2 Struktur Kimia Flavonoid..	17
Gambar 2. 3 Sistem Reproduksi Jantan	20
Gambar 2. 5 Struktur Morfologi Mencit	25
Gambar 2. 7 Dampak stres oksidatif.	30
Gambar 2.8 Keseimbangan antara antioksidan dan ROS pada sperma.	31
Gambar 2. 9 Struktur kimia hidrogen peroksida.	33
Gambar 2. 10 Reaksi fenton.....	34
Gambar 2. 11 Mekanisme antioksidan dan induksi H ₂ O ₂	37
Gambar 4. 1 Hasil Pengamatan Viabilitas Spermatozoa.....	60
Gambar 4. 2 Hasil Pengamatan Integritas Membran	73

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
Lampiran 1. Tabel Perhitungan Rerata Motilitas	98
Lampiran 2. Analisis Motilitas menggunakan SPSS	98
Lampiran 3. Tabel Perhitungan Rerata Viabilitas.....	100
Lampiran 4. Analisis Viabilitas menggunakan SPSS	100
Lampiran 5. Tabel Perhitungan Rerata Integritas Membran.....	102
Lampiran 6. Analisis Integritas Membran menggunakan SPSS	102
Lampiran 7. Dokumentasi Penelitian	104

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Infertilitas merupakan kondisi yang terjadi pada pasangan dalam masa reproduksi. Penyebab infertilitas dapat berasal dari faktor pria dan wanita, infertilitas wanita terjadi pada usia 40 keatas yang ditandai dengan produksi oosit menurun. Sedangkan, infertilitas pria dapat disebabkan oleh gangguan hormonal, kelainan genetik, serta infeksi pada saluran reproduksi dapat mengganggu fungsi sperma sehingga mencakup sekitar 45% kasus infertilitas pria. Selain itu faktor gaya hidup dan paparan lingkungan juga berperan dalam penurunan kualitas sperma (Pujianto *et al.*, 2021). Hal tersebut diperkuat oleh Dewangga dkk., (2021) bahwa nutrisi yang kurang, merokok, dan lingkungan yang buruk dapat mempengaruhi kualitas sperma.

Penurunan kualitas sperma akibat berbagai faktor tersebut tidak hanya terjadi pada manusia, tetapi juga dapat dipelajari melalui hewan model mamalia. Mencit (*Mus musculus*) banyak digunakan dalam penelitian reproduksi karena memiliki kemiripan anatomi, fisiologi, dan genetik dengan manusia, termasuk karakteristik sistem reproduksinya (Mutiarahmi dkk., 2021). Kesamaan tersebut memungkinkan spermatozoa mencit digunakan sebagai model untuk mempelajari mekanisme yang berkaitan dengan kualitas sperma. Oleh karena itu, mencit sering dimanfaatkan dalam penelitian laboratorium di bidang reproduksi (Handajani, 2021)

Kualitas spermatozoa dapat menurun akibat ketidakseimbangan redoks dalam tubuh, yang mengakibatkan peningkatan pro-oksidan dan penurunan

kapasitas sistem antioksidan. Ketidakseimbangan redoks ini mengganggu berbagai proses krusial dalam sistem reproduksi (Twigg *et al.*, 1998). Kondisi tersebut menunjukkan bahwa proses fisiologis dalam tubuh memerlukan keseimbangan agar dapat berjalan optimal. Kata “keseimbangan” tersebut dijelaskan dalam Al-Quran Surah Al-Infitar ayat 6-9 sebagai berikut:

يَا أَيُّهَا الْإِنْسَانُ مَا غَرَّكَ بِرَبِّكَ الْكَرِيمِ ۚ
الَّذِي خَلَقَكَ فَسَوَّبَكَ فَقَدَلَكَ ۖ فِي أَيِّ صُورَةٍ
مَّا شَاءَ رَكَّبَكَ ۚ كَلَّا بَلْ تُكَذِّبُونَ بِالذِّينِ ۚ

Artinya: “Wahai manusia, apakah yang telah memperdayakanmu (berbuat durhaka) terhadap Tuhanmu Yang Maha Mulia, yang telah menciptakanmu lalu menyempurnakan kejadianmu dan menjadikan (susunan tubuh)-mu seimbang? Dalam bentuk apa saja yang dikehendaki, Dia menyusun (tubuh)-mu. Jangan sekali-kali begitu! Bahkan, kamu mendustakan hari Pembalasan” (Q.S. Al-Infitar [82]: 6-9).

Menurut Ash-Shiddieqy (2000) dalam Tafsir An-Nuur menjelaskan bahwa wahai manusia yang diberi akal dan daya berpikir serta kekuatan fisik hingga menjadi makhluk yang paling utama. Apakah yang mendorong kamu berlaku durhaka terhadap tuhan yang maha pemurah, yang telah mencurahkan nikmat-nikmatnya kepadamu? Bukankah sepatutnya kamu mensyukuri tuhan yang menjadikan kamu dalam bentuk sangat baik ini. Asy-Syaukani (1964) dalam Tafsir Fathul Qadir yang diterjemahkan oleh Fachruddin & Saefullah (2008) menjelaskan bahwa “الَّذِي خَلَقَكَ فَسَوَّبَكَ فَقَدَلَكَ” menciptakanmu dari sperma dan belum menjadi apa-apa lalu menyempurnakanmu sebagai seorang laki-laki yang bisa mendengar, melihat, berfikir, dan seimbang. Kata “فَقَدَلَكَ” memiliki makna bahwa allah menjadikan anggota tubuhnya itu sempurna, tidak ada keretakan didalamnya. Pendapat ini diperkuat oleh Az-Zuhaili (2005) dalam Tafsir Al- Munir yang diterjemahkan oleh Al-Kattani (2014) bahwa “فَقَدَلَكَ” menjadikan (susunan tubuh) mu seimbang dalam penciptaan dan anggota baru.

Ayat diatas mengungkapkan bahwa Allah menyempurnakan bentuk tubuh manusia dan memberikan keseimbangan serta struktur manusia sesuai proporsional masing-masing. Nikmat kesempurnaan dan keseimbangan yang diciptakan ini perlu dijaga dengan baik (Wijayanti, 2023). Apabila keseimbangan susunan tubuh terganggu oleh berbagai faktor, seperti ketidakseimbangan redoks dalam tubuh, hal tersebut dapat menyebabkan kerusakan oksidatif pada DNA, protein, dan lipid sperma. Kerusakan oksidatif akan merusak fungsi sperma melalui peroksidasi lipid. Akibatnya, sperma mengalami penurunan motilitas dan kehilangan kemampuan untuk berfusi dengan oosit sehingga terjadi stres oksidatif (Twigg *et al.*, 1998).

Aydemir *et al.*, (2014) menyatakan bahwa semakin kuat kerusakan peroksidatif pada membran sperma, maka sperma juga semakin menurun kualitasnya. Sperma sangat sensitif terhadap stres oksidatif, karena memiliki karakteristik struktural dan fungsionalnya yang unik yaitu kandungan asam lemak tak jenuh ganda (PUFA) pada membran plasmanya. Membran plasma tersusun atas fosfolipid bilayer atau lapisan lipid ganda yang dibentuk oleh lipid polar.

Membran plasma akan berinteraksi dengan berbagai protein dengan gugus kepala hidrofilik dan rantai asil hidrofobik (Tapia *et al.*, 2012). Rantai asil dapat berupa asam lemak tak jenuh ganda, yang terjadi karena terdapat lebih ikatan rangkap didalam rantai karbonnya melalui desaturase dan elongase (Hussein. 2013; Owczarek *et al.*, 2015). Adanya asam lemak tak jenuh ganda pada membran, menyebabkan sperma mudah mengalami kerusakan yang disebabkan ROS (Tapia *et al.*, 2012).

ROS (*reactive oxygen species*) merupakan radikal bebas yang mengandung satu elektron berpasangan dan termasuk molekul yang sangat reaktif (Bouhadana

et al., 2025). ROS akan bereaksi dengan PUFA didalam membran yang akan memicu peroksidasi lipid sehingga menyebabkan fluiditas membran, penurunan integritas membran, dan gangguan fungsi sperma (Argawal *et al.*, 2024). ROS dapat dihasilkan selama metabolisme seluler sebagai produk sampingan, seperti anion superoksida dan radikal bebas. ROS juga dapat diinduksi untuk memicu stres oksidatif (Aydemir *et al.*, 2014). Namun, pada sisi yang lain ROS berperan penting sebagai molekul persinyalan untuk mengatur proses esensial dalam proses maturasi dan kapasitas fertilisasi sperma (Medica *et al.*, 2025).

Dalam penelitian ini, untuk menurunkan kualitas spermatozoa menggunakan induksi H_2O_2 sebagai sumber radikal bebas (ROS). Pendekatan ini mengacu pada penelitian Garg *et al.*, (2009) yang melaporkan bahwa spermatozoa kerbau diinduksi H_2O_2 pada konsentrasi 50 μM , H_2O_2 menyebabkan tingginya kadar MDA akibat jumlah ROS yang terbentuk sehingga dampak pada menurunnya motilitas, viabilitas, dan integritas membran lebih besar. Sebaliknya, pada konsentrasi H_2O_2 rendah kadar MDA belum cukup tinggi untuk menyebabkan kerusakan namun kualitas spermatozoa sudah mampu menurun. Menurut Thakor *et al.*, (2024) menyatakan bahwa sperma sapi yang diinduksi H_2O_2 konsentrasi 50 μM juga menurun motilitasnya sebesar 14%.

Bader *et al.* (2019) juga menyatakan bahwa paparan H_2O_2 pada spermatozoa manusia menyebabkan peningkatan ROS, sehingga terjadi penurunan motilitas progresif 32% dan motilitas total 40% spermatozoa pada konsentrasi 40 μM H_2O_2 . Penurunan tersebut menyebabkan sperma tidak bergerak. Selain itu, viabilitas sperma juga menurun lebih dari 50% sel mati dan juga peningkatan fragmentasi DNA dan vakuolisasi kepala sperma. H_2O_2 merupakan spesies oksigen reaktif yang

berperan untuk mengganggu fisiologis sperma akibat stres oksidatif (Pujianto *et al.*, 2021).

Pemberian konsentrasi H_2O_2 yang tinggi diatas $100\mu\text{M}$ dapat menyebabkan stres oksidatif berat karena merusak seluruh biomolekul esensial (Jomova *et al.*, 2024). Menurut Nosrat *et al.*, (2025) H_2O_2 akan berdifusi secara langsung menembus membran sel dan menyebabkan kerusakan dalam sel. Penginduksian H_2O_2 juga mampu mengaktivasi jalur persinyalan seperti NF- κ B. Namun jika terdapat logam transisi yang bersifat redoks-aktif, maka H_2O_2 akan membentuk radikal hidroksil melalui reaksi fenton (Jomova *et al.*, 2024). Radikal hidroksil tersebut akan memicu rantai bereaksi peroksidasi lipid sehingga menyebabkan gangguan mitokondria dan kerusakan DNA pada sel sperma (Wang *et al.*, 2025). Penelitian yang dilakukan Pujianto *et al.*, (2021) membuktikan bahwa pada konsentrasi $250\mu\text{M}$ H_2O_2 dijadikan sebagai agen stres oksidatif yang ditandai meningkatnya kadar MDA sehingga berdampak pada penurunan viabilitas sperma hingga 42% dan integritas membran menurun signifikan 20,47%.

Penelitian di atas membuktikan induksi H_2O_2 pada spermatozoa meningkatkan kadar ROS yang dapat dilihat dari peningkatan kadar MDA. Peningkatan ROS ini mampu merusak membran sel sehingga menyebabkan penurunan kualitas spermatozoa. Menurut pernyataan Pujianto *et al.*, (2021) menyatakan bahwa sperma rentan terhadap radikal bebas karena sel sperma hanya memiliki sedikit sitoplasma pada diferensiasi terminal, sehingga kandungan enzim antioksidan endogen sangat terbatas seperti glutathione peroksidase, superoksida dismutase, dan katalase.

Kerusakan sperma yang diakibatkan oleh H_2O_2 dapat diatasi dengan pemberian antioksidan. Antioksidan memiliki efektivitas untuk mengurangi kerusakan akibat stres oksidatif melalui dua tahap, yaitu interaksi secara langsung dengan radikal bebas, serta interaksi tidak langsung dengan menurunkan ekspresi enzim penghasil radikal bebas maupun meningkatkan kerja dan produksi enzim antioksidan didalam sel. Antioksidan tidak hanya mencegah dan memperbaiki kualitas sperma dengan menghambat ROS, tetapi juga memodulasi kadarnya di plasma mani untuk menciptakan lingkungan optimal bagi fungsi sperma dan kesuburan (Kaltsas., 2023).

Dalam penelitian ini pemberian antioksidan dalam penelitian ini berasal dari bahan alami, salah satunya yaitu ekstrak etanol 70% alfalfa. Alfalfa mengandung berbagai senyawa aktif seperti vitamin, flavonoid, saponin, kumarin, fitoestrogen, asam amino, alkaloid, dan fitosterol yang berperan sebagai antioksidan (Widyowati dkk., 2014; Soufan et al., 2021). Menurut Solihati., dkk (2013) kandungan antioksidan yang tinggi terbukti mampu mempertahankan kualitas spermatozoa.

Kemampuan antioksidan suatu ekstrak umumnya diukur melalui nilai IC_{50} , di mana semakin kecil nilai IC_{50} menunjukkan semakin kuat aktivitas antioksidannya. Herba alfalfa yang diekstrak dengan etanol 70% menunjukkan aktivitas antioksidan yang kuat dengan nilai IC_{50} sebesar 59,339 $\mu g/mL$, yang mencerminkan kemampuan efektif dalam menangkal radikal bebas sehingga dapat melindungi kerusakan sel sperma akibat stres oksidatif (Widyowati dkk., 2014). Nilai ini sebanding dengan aktivitas antioksidan ekstrak *Centella asiatica* yang memiliki nilai IC_{50} sebesar 53,221 $\mu g/mL$ (Harahap, 2024). Aktivitas yang lebih kuat ditunjukkan oleh ekstrak *Capparis spinosa* dengan nilai IC_{50} 21,591 $\mu g/mL$.

Nilai ini terbukti mampu mempertahankan kualitas sperma manusia hingga motilitas mencapai 51,8%, di mana ekstrak tersebut juga mengandung flavonoid sebagai komponen antioksidan utamanya (Rad *et al.*, 2021). Dengan demikian, semakin kecil nilai IC_{50} suatu ekstrak mencerminkan semakin kuat aktivitas antioksidannya dan semakin besar potensinya dalam mempertahankan kualitas spermatozoa. Hal ini memperkuat alasan penggunaan ekstrak etanol 70% alfalfa dalam penelitian ini, mengingat nilai IC_{50} sebesar 59,339 $\mu\text{g/mL}$ yang tergolong kuat menunjukkan bahwa alfalfa memiliki kemampuan yang memadai dalam menangkal radikal bebas, sehingga diharapkan mampu melindungi spermatozoa dari kerusakan akibat stres oksidatif dan berkontribusi dalam mempertahankan kualitasnya.

Proses penyaringan senyawa antioksidan pada alfalfa, menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 70%. Etanol 70% memiliki tingkat kepolaran yang sesuai dengan sifat senyawa aktif yang ingin diekstrak, sehingga mempermudah penetrasi pelarut masuk ke dalam dinding sel simplisia (Nofita & Rahman., 2025; Maharadingga dkk., 2021). Menurut Hakim & Saputri (2020) keberhasilan ekstraksi sangat dipengaruhi oleh konsentrasi pelarut etanol. Jika konsentrasi etanol lebih besar dari 70% maka komponen hasil ekstraksi sedikit menurun akibat denaturasi protein dan meningkatkan resistensi difusi.

Penelitian yang dilakukan Novita & Rahman., (2025) menyatakan bahwa ekstraksi daun pucuk merah dengan metode maserasi menggunakan pelarut 70% menghasilkan kandungan fenolik total sebesar 858,9 mg GAE/g ekstrak lebih tinggi dibandingkan etanol 96%. Hal tersebut membuktikan bahwa 70% merupakan pelarut yang efektif untuk mengekstrak senyawa fenolik karena bersifat semi-polar

hingga polar. Novita & Rahman (2025) juga mengatakan jika konsentrasi pelarut lebih tinggi dapat menyebabkan pengendapan senyawa sehingga jumlah senyawa aktif yang terlarut menurun.

Senyawa polifenol dan flavonoid yang berhasil diekstrak dijadikan sebagai sumber antioksidan alami untuk menangkap serta menetralkan radikal bebas (Rad *et al.*, 2021). Efek protektif serupa pada ekstrak tanaman lain yang mengandung flavonoid. Loung-on *et al.*, (2022) menyatakan pada sperma sapi yang diinduksi mancozeb diberikan bersamaan dengan ekstrak *Nelumbo nucifera*. Ekstrak *Nelumbo nucifera* mengandung senyawa bioaktif flavonoid berupa quercetin-3-O-arabinoglikosida sehingga secara efektif dapat menangkal radikal bebas. Penambahan ekstrak menunjukkan peningkatan morfologi, viabilitas dan integritas akrosom sperma, serta menurunkan stres oksidatif dan kadar LPO. Oleh karena itu, ekstrak *Nelumbo nucifera* memiliki aktivitas antioksidan dan penangkal radikal bebas untuk mencegah kerusakan sel dan meningkatkan kualitas sperma.

Menurut Kowalczyk *et al.*, (2022) pemberian antioksidan alami atau sintetis sangat diperlukan, karena sperma memiliki cadangan antioksidan endogen terbatas sehingga tidak mampu untuk menjaga kualitasnya dan mudah mengalami kerusakan. Mekanisme pertahanan dari antioksidan akan melalui berbagai jalur reaksi detoksifikasi untuk mempertahankan homeostasis redoks dengan menetralkan ROS (Aydemir *et al.*, 2014). Senyawa antioksidan sintetis seperti quercetin juga dapat meningkatkan kualitas sperma sebagai penetral ROS. Abdallah *et al.* (2011) melaporkan bahwa quercetin mampu melindungi spermatozoa dari kerusakan oksidatif yang diakibatkan oleh pemberian hidrogen peroksida.

Kombinasi antara quercetin konsentrasi 200 μ M yang ditambahkan H₂O₂ konsentrasi 100 μ M menunjukkan peningkatan motilitas dan viabilitas serta mengurangi kadar MDA (*malondialdehid*) pada sperma tikus wistar. Quercetin merupakan salah satu jenis flavonoid dalam kelompok flavonol, yang memiliki sifat antioksidan yang kuat. Senyawa ini memainkan peran penting dalam mendukung fungsional sperma dan pertahanan antioksidan. Dalam penelitian *in vitro*, quercetin berpotensi melindungi sperma dari kerusakan oksidatif yang disebabkan hidrogen peroksida (Abdallah *et al.*, 2011).

Pendekatan penelitian di atas menunjukkan bahwa pemberian antioksidan, baik berasal dari ekstrak tumbuhan maupun sintetis seperti quercetin terbukti efektif mampu mengurangi stres oksidatif akibat ROS dari induksi H₂O₂. Selain itu, H₂O₂ telah banyak digunakan sebagai agen induksi stres oksidatif pada berbagai tingkat konsentrasi, dengan dampak yang bervariasi mulai dari penurunan kualitas spermatozoa pada konsentrasi rendah hingga kerusakan berat pada konsentrasi tinggi. Oleh karena itu, penelitian ini menggunakan H₂O₂ sebagai sumber radikal bebas dengan dua tingkat konsentrasi untuk mengevaluasi pengaruh antioksidan ekstrak alfalfa terhadap kualitas spermatozoa di bawah tekanan oksidatif yang berbeda. Dengan demikian, penelitian ini bertujuan mengetahui apakah efek ekstrak alfalfa bersifat konsisten atau bergantung pada besarnya ROS yang diinduksi H₂O₂, dengan fokus pada kualitas spermatozoa (*Mus musculus*) secara *in vitro*.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dari penelitian ini adalah:

1. Bagaimana pengaruh ekstrak etanol 70% alfalfa terhadap kualitas spermatozoa *Mus musculus* berdasarkan motilitas, viabilitas, dan integritas membran secara *in vitro*?
2. Bagaimana pengaruh induksi H₂O₂ terhadap kualitas spermatozoa *Mus musculus* berdasarkan motilitas, viabilitas, dan integritas membran secara *in vitro*?
3. Apakah ada interaksi ekstrak etanol 70% alfalfa dengan induksi H₂O₂ terhadap kualitas spermatozoa *Mus musculus* berdasarkan motilitas, viabilitas, dan integritas membran secara *in vitro*?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Untuk mengetahui pengaruh ekstrak etanol 70% alfalfa terhadap kualitas spermatozoa *Mus musculus* secara *in vitro*.
2. Untuk mengetahui pengaruh induksi H₂O₂ terhadap kualitas spermatozoa *Mus musculus* secara *in vitro*.
3. Untuk mengetahui pengaruh interaksi ekstrak etanol 70% alfalfa dengan induksi H₂O₂ terhadap kualitas spermatozoa *Mus musculus* secara *in vitro*?

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat dilakukannya penelitian ini adalah:

1. Memberikan informasi tentang pengaruh ekstrak etanol 70% alfalfa terhadap kualitas spermatozoa *Mus musculus* yang diinduksi H₂O₂ secara *in vitro*.

2. Sebagai dasar dalam pengembangan teknik perlindungan kualitas sperma (*Mus musculus*) menggunakan ekstrak alfalfa terhadap penurunan kualitas spermatozoa akibat induksi H_2O_2 .

1.5 Batasan Masalah

Batasan masalah dari penelitian ini adalah:

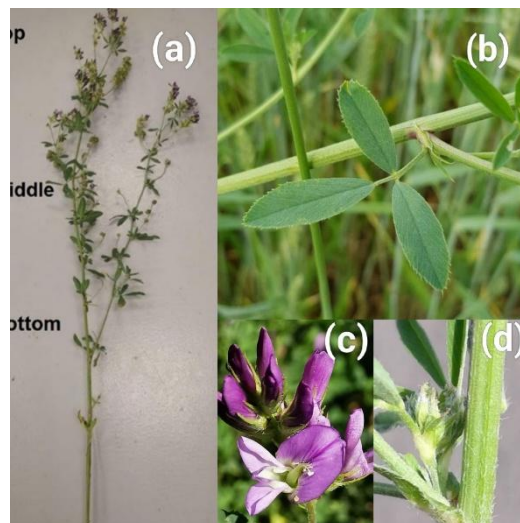
1. Penelitian ini dilakukan secara in vitro menggunakan sperma mencit (*Mus musculus*) yang diperoleh dari proses isolasi organ reproduksi. Penilaian kualitas sperma dilakukan secara mikroskopis yang meliputi motilitas spermatozoa, viabilitas, serta integritas membran plasma spermatozoa melalui uji hipoosmotik. Pengamatan dilakukan setelah perlakuan dan masa inkubasi yang telah ditentukan dalam penelitian.
2. Ekstrak etanol 70% Alfafa yang digunakan yaitu konsentrasi 0%, 2%, dan 6%.
3. Konsentrasi H_2O_2 yang digunakan dengan konsentrasi 0, 10, dan 50 μM yang diperoleh dari pengenceran larutan stok H_2O_2 30% (Merck).
4. Media sperma dalam penelitian ini menggunakan NaCL 0,9%.
5. Parameter yang diamati terbatas pada viabilitas, motilitas, dan integritas membran spermatozoa.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Alfafa (*Medicago sativa* L.)

2.1.1 Deskripsi

Alfafa 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).



Gambar 2. 1 Bagian tanaman alfalfa (*Medicago sativa*). (a) tanaman alfalfa, (b) daun, (c) bunga, dan (d) batang (iNaturalist.org; Hunek *et al.*, 2022).

Alfalfa sebagai tanaman subtropik, tumbuh secara optimal pada suhu 20-30°C dengan pH tanah memiliki 6,5 dan sistem drainase yang baik (Harianja dkk 2021). Penelitian Suwignyo *et al.* (2023) menyatakan bahwa di Indonesia Alfalfa telah dihasilkan varietas yang baru disebut dengan “Alfalfa tropis” yang telah diakui oleh Kementerian Pertanian RI. Varietas tersebut dapat bertahan pada suhu tinggi 48 °C serta menghasilkan kandungan protein kasar yang tinggi sebesar 20%-

32%. Secara taksonomi tanaman Alfalfa menurut Bagavathiannan & Van Acker (2009) dikelompokkan sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Magnoliophyta
Class	: Magnoliopsida
Order	: Fabales
Family	: Fabaceae
Genus	: Medicago
Species	: <i>Medicago sativa</i> (Linnaeus, 1753).

2.1.2 Morfologi

Alfalfa dapat hidup di daerah kering dengan curah hujan 200 mm/tahun atau lahan basah dengan curah hujan 2500 mm/tahun karena tanaman ini memiliki akar yang dapat mencapai kedalam hingga 4,5 meter sehingga pada musim kering mampu menopang kelangsungan hidup. Secara morfologi menurut Sajimin (2011), tanaman ini pertumbuhannya bercabang dan membentuk rhizome, bagian dasar batangnya berupa kayu dan tumbuh mendatar namun bercabang serta batangnya tegak menjulang tinggi sekitar 30-120 cm. Memiliki bentuk daun bertipe trifoliolate dengan satu tangkai atau petiol, dimana satu tangkai terdapat tiga helai daun berukuran 5-15 mm, bagian bawah daun terdapat bulu-bulu tipis begitu juga dibagian tangkainya.

Alfalfa akan berbunga dan menghasilkan biji pada musim kemarau. Tandan bunganya rapat memiliki sekitar 10 sampai 35 kuntum dengan mahkota berwarna ungu atau biru hingga putih. Bunganya akan menghasilkan polong berupa biji yang

akan matang setelah beberapa minggu yaitu 3 hingga 5 minggu (Sajimin,2011) (Gambar 2.1).

2.1.3 Kandungan dan Manfaat

Allah SWT menciptakan segala isi yang ada di bumi dengan rahmat yang tidak sia-sia. Sesuatu yang ada di bumi berhak dimanfaatkan manusia dengan sebaiknya-baiknya. Sebagaimana firman Allah dalam Al-Qur'an surah Thaha ayat 53:

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).

Sebagaimana dijelaskan menurut Asy-Syaukani (1964) dalam Tafsir Fathul Qadir yang diterjemahkan oleh Fachruddin & Saefullah (2008) bahwa “فَأَخْرَجْنَا بِهِ” “أَزْوَاجًا مِّنْ نَّبَاتٍ شَتَّى” Allah tumbuhkan dengan air hujan itu berjenis-jenis tumbuhan yang bermacam-macam. Menurut Al-Qurthubi (1964) dalam Tafsir Al-Qurthubi/Al Jami’ li Ahkaam Al Qur’an yang diterjemahkan oleh Rosyadi & Faturrahman (2009) di bumi Allah menurunkan air hujan sehingga bisa menjadi penyebab munculnya tumbuhan yang berbagai jenis dan bermacam-macam. Pendapat ini diperkuat oleh Az-Zuhaili (2005) dalam Tafsir Al- Munir yang diterjemahkan oleh Al-Kattani (2014) bahwa Allah menurunkan hujan dari awan dan kemudian mengeluarkan berbagai jenis tumbuhan berupa tanaman dengan bentuk yang bermacam-macam, sebagian untuk manusia dan sebagian lainnya untuk binatang.

Ayat diatas menjelaskan bahwa Allah telah mengatur alam semesta sebaik mungkin. Turunnya hujan itu merupakan nikmat yang harus disyukuri. Hujan dapat menyuburkan tanah sehingga dapat menumbuhkan berbagai jenis tumbuhan yang bermanfaat untuk makhluk hidup di bumi (Arsalan dkk., 2022). Tumbuhan yang beraneka ragam diciptakan dengan segala manfaat yang terkandung didalamnya (Suskha dkk., 2020). Sebagaimana firman Allah dalam Al-Qur'an surah Q.S. Al-Luqman Ayat 10 berbunyi:

خَلَقَ السَّمُوتِ بِغَيْرِ عَمَدٍ تَرَوْنَهَا وَالَّتِي فِي الْأَرْضِ رَوَاسِيَ 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. Al-Luqman [31]: 10).

Tim Tafsir Kementerian Agama Republik Indonesia (2008), Allah menurunkan hujan dari langit. Hujan itu berasal dari awan yang dihalau-Nya ke suatu tempat tertentu, kemudian berubah menjadi hujan yang membasahi permukaan bumi. Dengan air hujan itu, tumbuhlah segala macam tumbuh-tumbuhan yang beraneka ragam dengan warna yang indah dan manfaatnya banyak. Menurut Asy-Syaukani (1964) dalam Tafsir Fathul Qadir yang diterjemahkan oleh Fachruddin & Saefullah (2008) lafaz kalimat “*dan Kami turunkan air hujan dari langit, lalu Kami tumbuhkan padanya segala macam tumbuh-tumbuhan yang baik*” maksudnya adalah, kami menurunkan hujan dari langit, sebab penurunan hujan itu Kami tumbuhkan berbagai macam tumbuhan. Dan kata “كَرِيمٍ” merujuk pada keindahan warnanya dan manfaatnya yang banyak. Menurut Az-Zuhaili (2005) dalam Tafsir Al-Munir yang diterjemahkan oleh Al-Kattani (2014), kalimat “مِنْ كُلِّ”

”زَوْجٌ كَرِيمٌ” memiliki makna bahwa setiap jenis tumbuhan yang baik memiliki banyak manfaatnya. Tumbuhan seperti bagian batang, daun, akar, kulit, dan bunga dapat dimanfaatkan menjadi pengobatan tradisional yang mendukung kesehatan dan kesejahteraan kehidupan di bumi (Rizal 2020). Tumbuhan akan menghasilkan suatu komponen aktif yang terkandung sehingga dijadikan alternatif pengobatan tradisional (Pelokang dkk., 2018). Salah satunya yaitu pada tanaman Alfalfa, Alfalfa memiliki khasiat untuk penyembuhan penyakit (Susilowati dkk., 2014).

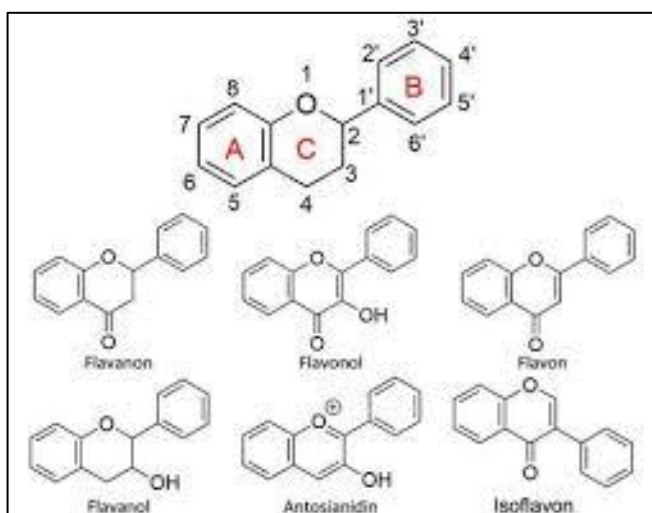
Alfalfa termasuk tanaman leguminosa, yang dapat menyembuhkan berbagai jenis penyakit termasuk kanker. Kandungan serat yang dimiliki alfalfa mampu mengikat lemak dan zat karsinogen yang disebabkan oleh kanker (Widyowati dkk., 2014; Susilowati 2014). Alfalfa juga terkenal sebagai sumber fitoestrogen karena mengandung senyawa kimia berupa coumestrol. Coumestrol dikonsumsi manusia sebagai makanan sehat untuk diet (Hong *et al.*, 2011).

Alfalfa juga akan kaya serat, protein, mineral, vitamin, klorofil, dan karotenoid (Harianja dkk., 2021). Protein yang dimiliki alfalfa juga dapat dijadikan alternatif sebagai sumber nutrisi pengganti protein hewani (Soufan *et al.*, 2021). Selain itu, kandungan klorofil yang dimiliki alfalfa juga berperan sebagai pengaturan kekebalan tubuh dan menangkap radikal bebas (Susilowati dkk., 2014).

Alfalfa memiliki kandungan metabolit sekunder seperti fitoestrogen, alkaloid, fitosterol, asam amino, polisakarida, saponin, dan flavonoid. Selain itu juga memiliki α -tokoferol dalam jumlah 4 mg/100 g berat kering, yang dapat mencegah terjadinya peroksidasi lipid pada sperma. Fitokimia yang dimiliki tanaman ini berupa karoten, kumarin, beta-sitosterol, isofavon, kriptoxantin, daidzein, genistin, limonene, lutein, dan zeaksantin. Senyawa-senyawa tersebut

bersifat sebagai antioksidan, antiinflamasi, imunostimulan, dan antikarsinogenik (Suwignyo *et al.*, 2023; Bafeel & Ibrahim., 2008; Horvat *et al.*, 2022). Senyawa antioksidan non-enzimatik alfalfa seperti fenol, flavonoid, dan fitoestrogen juga dapat meningkatkan aktivitas enzimatik antioksidan termasuk glutathione, katalase, dan SOD (Raeeszadeh *et al.*, 2021).

Alfalfa kaya akan senyawa fenolik yang dapat menangkap radikal bebas oksidatif. Senyawa fenolik yang dimiliki alfalfa yaitu flavonoid yang merupakan kelompok senyawa fenol turunan sekunder (Horvat *et al.*, 2022). Flavonoid memiliki struktur benzene dengan gugus OH yang tergantung. Flavonoid bersifat antioksidan dengan berat molekul rendah dan bersifat polifenol serta memiliki struktur dasar fenil-benzopiran (C₆-C₃-C₆) (Mishra *et al.*, 2024). Struktur kimia yang dimiliki flavonoid dibedakan menjadi beberapa bagian diantaranya flavanon, flavonol, flavon, antiosianidin, dan isoflavon (Gambar 2.2).



Gambar 2. 2 Struktur Kimia Flavonoid. (Ayunda & Malita., 2024).

Flavonoid berperan dalam menetralkan radikal bebas dapat melalui beberapa mekanisme, yaitu donasi elektron dari gugus fenoliknya, pengikatan ion logam yang bersifat pro-oksidatif, penghambatan enzim penghasil ROS, serta

pengaktifan jalur Nrf2 untuk memperkuat mekanisme pertahanan antioksidan pada tingkat seluler (Saerang dkk., 2025).

Menurut El-Khawagah et al. (2020), flavonoid mengandung lima gugus hidroksil ($-OH$) yang memiliki interaksi kuat dengan membran sel. Keberadaan gugus hidroksil tersebut serta cincin B berbentuk katekol menjadikan flavonoid sebagai antioksidan yang sangat efektif. Struktur tersebut memungkinkan flavonoid memiliki kemampuan menangkap radikal bebas ROS yang lebih tinggi dibandingkan vitamin E dan vitamin C. Kemampuan antioksidan tersebut diperoleh melalui mekanisme donasi elektron dari gugus hidroksil kepada radikal bebas, sehingga radikal bebas menjadi lebih stabil dan tidak lagi merusak komponen sel. Dengan demikian, antioksidan mampu menghentikan reaksi berantai oksidatif yang dipicu oleh ROS (Gena dkk., 2021). Menurut Mishra et al. (2024), flavonoid juga mampu menembus membran lipid sebagai molekul amfipatik dan mencegah kerusakan akibat oksidasi. Oleh karena itu, flavonoid berperan dalam melindungi membran dan akrosom spermatozoa serta membantu mempertahankan proses reaksi akrosom yang diperlukan dalam fertilisasi.

Senyawa flavonoid selain terdapat pada alfalfa, juga terdapat pada tanaman lain yang tersebar pada berbagai bagian tanaman, mulai dari akar, batang, kulit, kayu, daun, buah, hingga bunga (Ayunda & Malita., 2024). Penelitian yang dilakukan Tvrdá *et al.* (2020) melaporkan adanya fenol pada ekstrak omija, dengan kandungan flavonoid sebesar 2,66 mg/g. Kandungan antioksidan pada konsentrasi 50 $\mu\text{g/mL}$ ekstrak omija berpengaruh meningkatkan motilitas dan aktivitas mitokondria pada spermatozoa sapi. Selain itu, juga terjadi penurunan produksi ROS 3% dan memberikan perlindungan terhadap molekul protein dan lipid,

sehingga sifat antioksidan dari ekstrak omija memiliki kemampuan dalam melindungi struktur dan komponen sel terhadap dapat kerusakan oksidatif.

Penelitian lain menurut Fuadatin & Hariani (2024) menyatakan bahwa filtrat kelopak rosella mengandung 0,23 mg flavonoid yang mampu menstabilkan radikal peroksidasi lemak. Filtrat tersebut dapat memberikan efektivitas pertahanan terhadap kualitas spermatozoa setelah pembekuan, sehingga dapat menyeimbangkan antara produksi radikal bebas dan antioksidan. Menurut pernyataan Kumbhare *et al.* (2023) antioksidan yang berasal dari tanaman dapat dijadikan alternatif untuk mengurangi masalah infertilitas akibat ROS, sehingga senyawa aktif seperti fenolik dan flavonoid, dapat bekerja menangkal dan menghambat kerusakan sel.

2.2 *Mus musculus*

2.2.1 Hewan Coba Mencit

Hewan coba yang umum dipakai dalam penelitian di laboratorium salah satunya adalah mencit (*Mus musculus*). Mencit dipilih sebagai sumber spermatozoa karena memiliki karakteristik yang cocok untuk model induksi stres oksidatif in vitro dan uji efek protektif antioksidan. Selain itu, mencit juga memiliki proses metabolisme yang mirip dengan manusia serta pertumbuhan reproduksinya relatif cepat sehingga memudahkan penyediaan spermatozoa (Rahman *et al.*, 2019). Secara taksonomi mencit menurut Widyawaty (2018) adalah sebagai berikut:

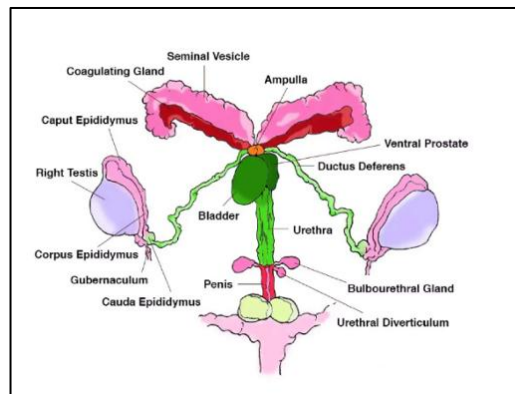
Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Kelas	: Mamalia
Ordo	: Rodentia
Famili	: Muridae

Genus : Mus

Spesies : *Mus musculus* (Linnaeus, 1753)

2.2.2 Sistem Reproduksi Jantan

Organ reproduksi yang dimiliki mencit jantan diantaranya yaitu testis, skrotum, epididimis, vas deferens, kelenjar aksesori, uretra, dan penis (Gambar 2.3). Organ-organ tersebut berperan penting dalam proses spermatogenesis dan transportasi spermatozoa. Mencit jantan akan mencapai kematangan seksual pada umur 10-12 minggu sehingga spermanya dapat digunakan sebagai bahan penelitian (Nugroho, 2018).



Gambar 2. 3 Sistem Reproduksi Jantan (Nugroho, 2018)

Testis merupakan kelenjar utama pada sistem reproduksi jantan yang berperan penting dalam memproduksi spermatozoa. Testis terletak di dalam skrotum melalui mekanisme *descensus testiculorum* yang dikendalikan oleh hormon androgen. Testis akan dibungkus oleh tunika vaginalis, yaitu lapisan membran yang memisahkan testis dari epididimis di dalam rongga skrotum. Tunika vaginalis terbentuk dari peritoneum intra abdomen yang bermigrasi ke dalam skrotum selama perkembangan genitalia interna jantan. Setelah testis bermigrasi, saluran prosesus vaginalis akan menutup (Fitria dkk., 2015; Noor dkk., 2020).

Hal tersebut menyebabkan suhu di dalam testis lebih rendah 2–4 °C dibandingkan suhu tubuh, kondisi ini sangat diperlukan untuk berlangsungnya spermatogenesis secara optimal. Terbentuknya spermatogenesis karena testis mengandung banyak tubulus seminiferus yang terdiri atas sel epitel, serta testis juga mensintesis hormon androgen melalui proses steroidogenesis. Biosintesis hormon androgen berlangsung dalam sel leydig di jaringan intertubular yang berperan menghasilkan hormon testosteron (Fitria dkk., 2015; Noor dkk., 2020).

Spermatozoa yang terbentuk di testis akan dialirkan ke epididimis untuk proses pematangan dan penyimpanan. Epididimis tersusun dari saluran yang berkelok-kelok tidak beraturan, terdiri atas, caput, corpus, dan cauda. Caput epididimis memiliki diameter 5-11 mm dengan panjang 400 cm, tersusun atas 7-8 lobulus yang dilapisi oleh epitel bertingkat silindris tidak bersilia. Epididimis berperan sebagai tempat pematangan spermatozoa sekaligus tempat penyimpanan sementara spermatozoa yang belum matang (Nugroho, 2018).

Proses pematangan spermatozoa ditandai menghilangnya protoplasmik droplet pada bagian kepala spermatozoa. Pada caput epididimis, berperan menyerap cairan yang dihasilkan oleh testis dan juga menghasilkan sekresi cairan dari sel epitel. Hal tersebut mendukung perubahan morfologi akrosom, yang meliputi kondensasi inti, pelepasan sitoplasma, peningkatan muatan negatif, serta penambahan lapisan glikoprotein. Setelah melalui epididimis, spermatozoa selanjutnya dialirkan ke vas deferens (Nugroho, 2018).

Vas deferens berawal dari ujung kauda epididimis di dalam skrotum, kemudian melewati kanalis ingunalis menuju rongga tubuh dan berakhir di uretra penis. Sebelum memasuki uretra, vas deferens bergabung dengan saluran vesika

seminalis membentuk duktus ejakulatoris. Duktus ejakulatoris akan menuju uretra yang menjadi saluran bagi sperma dan urin untuk melewati penis hingga ke luar tubuh (Noor dkk., 2020)

Saat ejakulasi berlangsung, sperma dialirkan melalui vas deferens melalui kontraksi peristaltik yang dikendalikan saraf. Di sepanjang vas deferens terdapat tiga kelenjar, yakni kelenjar vesikula seminalis, kelenjar prostat, dan kelenjar cowper. Ketiga kelenjar tersebut membentuk plasma semen, yang berperan sebagai medium bagi sperma sekaligus melindunginya dari lingkungan asam saluran reproduksi betina. Sperma yang telah bercampur dengan plasma semen, akan didorong sepanjang uretra penis dan dikeluarkan melalui orifisium uretra eksternal di ujung penis (Noor dkk., 2020; Iskandar dkk., 2024).

Penis terdiri dari tiga massa silindris, yakni korpus spongiosum yang dikelilingi tunika albuginea dan dua korpus cavernosum penis. Glans penis dilapisi epitel berlapis gepeng dengan folikel rambut dan merupakan bagian paling sensitif pada penis. Akar penis melekat pada tulang pubis dan berhubungan dengan otot ischiocavernosus yang berperan dalam mempertahankan ereksi serta proses ejakulasi (Putra, 2014).

2.2.3 Spermatozoa Mencit

Spermatozoa yang umum digunakan bahan uji berasal dari mencit karena dijadikan sebagai model penelitian untuk mengevaluasi tingkat fertilitas. Pengujiannya dilakukan dari berbagai faktor, seperti bahan alam, senyawa kimia, paparan lingkungan, serta konsentrasi tertentu untuk mengamati pengaruhnya terhadap kualitas dan kuantitas spermatozoa. Pemilihan spermatozoa mencit sebagai model karena memiliki kemiripan proses spermatogenesis dengan mamalia lain (Nugroho, 2018).

Spermatozoa merupakan sel gamet jantan yang terbentuk melalui proses spermatogenesis di testis dan berfungsi untuk membuahi oosit dalam menghasilkan keturunan. Spermatozoa pada mamalia memiliki bentuk dan ukuran kepala yang bervariasi. Strukturnya terdiri dari tiga bagian utama yaitu kepala, bagian tengah (midpiece), dan ekor (flagellum) (Vieira *et al.*, 2024).

Kepala mengandung haploid genom dari jantan serta akrosom mengandung enzim hidrolitik sebagai organel yang dapat menembus zona pelusida oosit. Akrosom termasuk salah satu faktor dalam menentukan bentuk kepala sperma. Akrosom spermatozoa mencit menutupi sebagian besar sisi dorsal kepala dan memanjang sepanjang apical hook. Bentuk falciform ini terbentuk selama proses spermiogenesis, dimana nukleus mengalami elongasi dan berubah menjadi bentuk sabit (Yogo, 2022).

Proses terbentuknya falciform, bersamaan dengan perpindahan vesikel akrosomal ke daerah dorsal sehingga akrosom menjadi lebih panjang dan tipis. Kepala spermatozoa pada mencit (rodentia) memiliki bentuk sabit atau falciform (*hook-shaped*) dengan lengkungan bagian dorsal (Gambar 2.4). Proses pembentukan struktur kepala spermatozoa juga dipengaruhi oleh kondensasi kromatin inti yang ditandai dengan pergantian histon oleh protamin (Yogo, 2022).

Selain itu, pembentukan kepala spermatozoa juga dipengaruhi oleh manchette yang merupakan struktur sementara yang tersusun dari mikrotubulus dan terbentuk selama tahap spermatid bulat hingga elongasi. Manchette berperan penting dalam pembentukan kepala melalui mekanisme pemahatan (*sculpting*) dan pengaturan distribusi komponen sitoskeleton. Manchette tidak hanya berperan

dalam pembentukan kepala saja namun juga berperan dalam proses pembentukan flagellum (Yogo, 2022).

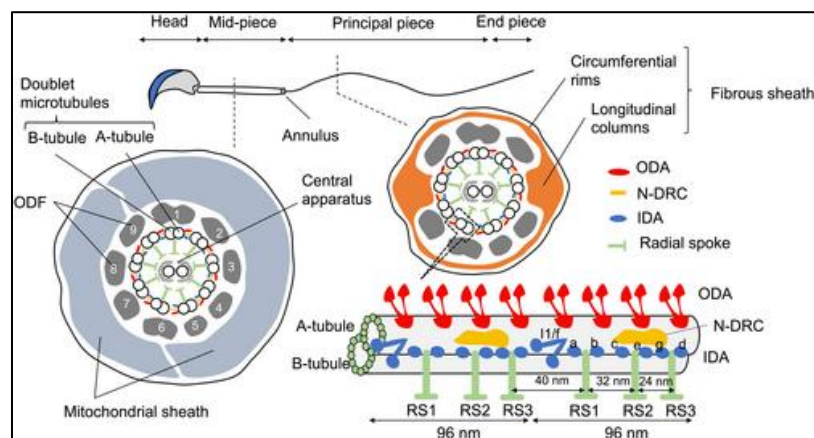
Selanjutnya bagian midpiece memiliki bagian *principal piece* diselubungi oleh *fibrous sheath* yang dibatasi oleh struktur annulus. *Fibrous sheath* ini terdiri atas kolom ventral dan dorsal yang dihubungkan oleh serangkaian rusuk. Di bagian sentralnya, terdapat tonjolan yang berperan menstabilkan cincin aksonema. Kedua struktur tersebut berkontribusi dalam menghasilkan gerakan (Syauqy, 2014). Midpiece kaya akan mitokondria yang tersusun secara spiral berfungsi dalam menyediakan energi dalam bentuk ATP untuk mendukung motilitas flagellum (Vieira *et al.*, 2024).

Amaral (2022) mengatakan untuk memenuhi kebutuhan energi tersebut, spermatozoa memanfaatkan sumber energi baik dari luar (eksogen) maupun dari dalam (endogen). Energi tersebut diperoleh melalui dua jalur metabolisme utama yang terkompartemenisasi. Jalur tersebut adalah glikolisis berlangsung di *principal piece* dan fosforilasi oksidatif (OXPHOS) terjadi melalui rantai transport elektron (ETC) yang terletak di *midpiece* atau lebih tepatnya di membrane mitokondria bagian dalam.

Glikolisis berjalan lebih cepat dan mampu menyediakan ATP secara langsung di tempat yang paling dibutuhkan untuk mendukung motilitas flagellum, meskipun kurang efisien dalam jumlah ATP yang dihasilkan. Sebaliknya fosforilasi oksidatif lebih efisien dalam produksi ATP, namun proses ini bergantung pada ketersediaan oksigen dan memerlukan distribusi ATP dari midpiece menuju seluruh bagian ekor spermatozoa. Oleh karena itu, ketersediaan ATP yang cukup menjadi

dasar motilitas untuk melakukan pergerakan pada ekor spermatozoa (Amaral, 2022).

Flagella spermatozoa mencit dibagi menjadi 3 bagian yaitu bagian tengah (midpiece), bagian utama (principal piece), dan bagian ujung (end piece). Pada bagian midpiece dan principal piece spermatozoa mencit terdapat struktur disebut annulus, yang berfungsi sebagai penghalang sitoplasma dan penanda batas antara keduanya. Sementara komponen struktural inti flagellum adalah aksonema merupakan komponen flagela yang terdiri dari sembilan mikrotubulus ganda dan dua mikrotubulus tunggal sentral. Panjang flagellum spermatozoa mencit memiliki panjang total sekitar 120-130 μm , dengan panjang total sekitar 35-258 μm . Hal tersebut dikatakan bahwa spermatozoa mencit lebih panjang dibandingkan dengan spermatozoa mamalia yang lain (Yoga, 2022).



Gambar 2. 4 Struktur Morfologi Mencit (Yogo, 2022)

Jika terjadi cacat pada struktur morfologi diatas dapat mengakibatkan infertilitas sehingga menyulitkan spermatozoa untuk mencapai gamet betina. Cacat bagian tengah dan ekor dapat memengaruhi motilitas, sedangkan cacat bagian kepala dapat mengganggu interaksi antara sperma dan oosit untuk pembentukan zigot (Vieira *et al.*, 2024). Spermatozoa matang yang baik akan mendukung fungsi

sperma dalam mencapai dan menembus ovum. Oleh karena itu, spermatozoa matang yang diejakulasikan memerlukan kualitas optimal agar mampu bertahan menuju ovum dan melakukan pembuahan (Tanga *et al.*, 2021).

Pernyataan tersebut didukung oleh Putra (2014) bahwa kualitas spermatozoa yang optimal menggambarkan kondisi struktural dan fungsional yang baik, sehingga menjadi indikator utama penentu kesuburan. Sperma memiliki kualitas yang tinggi apabila memiliki karakteristik normal dan mampu membuahi ovum. Penilaian terhadap kualitas sperma umumnya dilakukan berdasarkan beberapa parameter penting yaitu motilitas, viabilitas, dan integritas membran.

Motilitas atau kecepatan gerak maju spermatozoa merupakan parameter utama penentu tingkat pembuahan karena daya gerak flagellum memfasilitasi perjalanan menuju ovum (Nugroho, 2018). Motilitas spermatozoa didorong oleh pergerakan terkoordinasi antara doublet mikrotubulus pada struktur axoneme flagelum. Pergerakan ini bergantung pada aktivitas ATPase dynein sepanjang flagelum yang menghasilkan gaya geser (*sliding*) antara mikrotubulus adjacent, sehingga menghasilkan gerakan maju pada spermatozoa. Regulasi motilitas ini melibatkan mekanisme yang kompleks, mencakup influx ion calcium (Ca^{2+}) ke dalam sitoplasma flagellum serta aktivasi persinyalan protein kinase yang bergantung pada adenosin monofosfat siklik (cAMP) (Amaral, 2022).

Pengukuran motilitas pada sperma mencit, diambil dari kauda epididimis dengan nilai kontrol umumnya tinggi dan konsistensi antar individu >50% (Creasy & Chapin, 2018). Motilitas spermatozoa terbagi menjadi dua yaitu massa dan individu. Motilitas massa didefinisikan sebagai persentase total spermatozoa yang menunjukkan aktivitas gerak progresif dan non-progresif melalui mikroskopis.

Sedangkan motilitas individu adalah pengukuran gerakan sperma tunggal yang diukur berdasarkan pola progresif atau non-progresif secara mikroskopis (Tanga *et al.*, 2021). Untuk memperoleh data motilitas yang baik, interval waktu dari pengambilan sperma sampai pengukuran harus identik antar semua individu yaitu pada waktu optimal 15 menit serta tetap mempertahankan pada suhu 37 °C secara konsisten selama proses analisis (Martinez, 2022).

Viabilitas spermatozoa merupakan bagian penting dalam analisis kualitas sperma dan syarat keberhasilan fertilisasi. Viabilitas spermatozoa mencit memiliki nilai kontrol normal >60% (Garner and Hafez, 2000). Dalam evaluasi viabilitas menggunakan metode pewarnaan eosin-nigrosi. Eosin berfungsi sebagai pewarna sperma mati yang akan menembus membrane plasma spermatozoa sehingga menjadi ungu. Sedangkan nigrosin sebagai pewarna latar belakang untuk memberikan kontras. Spermatozoa yang hidup dengan membran utuh tidak terwanai dan tetap berwarna putih (Tanga *et al.*, 2021).

Integritas membran plasma spermatozoa memegang peranan penting dalam menjaga fungsi sel dan kesuburan. Metode ini digunakan untuk menganalisis membran plasma spermatozoa berdasarkan peningkatan permeabilitas membrane yang mengalami kerusakan. Membran ini berfungsi mempertahankan homeostasis intraseluler, melindungi sel dari agen eksternal, serta memfasilitasi interaksi dengan oosit dan epitel saluran reproduksi betina (Tanga *et al.*, 2021). Keutuhan membran diperlukan untuk mempertahankan homeostasis sel dan menunjang proses fertilisasi, termasuk motilitas, kapasitas, reaksi akrosom serta pengikatan zona pelusida (Hossain *et al.*, 2011).

Oleh karena itu, untuk mengevaluasi integritas membran dapat dilakukan dengan mengukur peningkatan permeabilitas membrane yang rusak, salah satunya melalui uji pembengkakan Hipo-Osmotik (HOS Test) (Tanga *et al.*, 2021). Uji HOS digunakan untuk melihat spermatozoa yang memiliki membran fungsional (Vaez *et al.*, 2014). Spermatozoa yang memiliki membran plasma utuh akan mengalami influx air dalam larutan hipo-osmotik, sehingga ekor melingkar (*coiled tail*). Sebaliknya spermatozoa dengan membran rusak tidak mampu merespon perubahan osmotik sehingga ekor tetap lurus. Reaksi ini mencerminkan integritas fungsional membrane plasma spermatozoa. Nilai normal uji HOS adalah >60%, jika <60% maka kerusakan membran plasma semakin besar dan dapat menurunkan kualitas serta potensi fertilitas spermatozoa (Nugroho, 2018).

2.3 Sumber ROS pada Spermatozoa

ROS merupakan molekul yang sangat reaktif karena memiliki elektron tak berpasangan, sehingga mudah menyerang biomolekul target seperti lipid pada membran sel dan karbohidrat pada asam nukleat (Wagner *et al.*, 2018). Produksi ROS dapat dihasilkan secara alami selama metabolisme sel. ROS dapat dikendalikan oleh sistem antioksidan endogen, seperti superoksida dismutase (SOD), yang mengubah anion superoksida menjadi senyawa yang kurang reaktif. Namun, jika produksi ROS berlebihan, kondisi ini akan memicu stres oksidatif yang dapat merusak berbagai komponen sel (Wang *et al.*, 2025).

Salah satu sumber utama ROS pada spermatozoa berasal dari mitokondria, khususnya selama proses fosforilasi oksidatif di rantai transpor elektron (ETC) (O'Flaherty & Scarlata, 2022). Pada kondisi stres oksidatif, gangguan rantai transpor elektron dapat meningkatkan kebocoran elektron sehingga produksi ROS

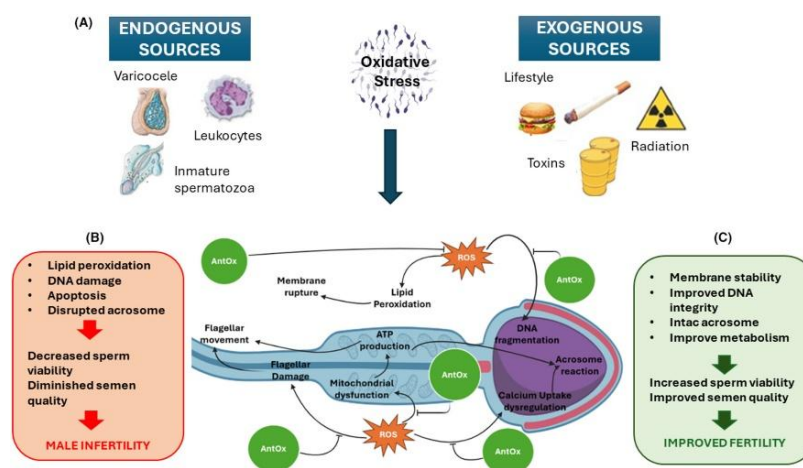
meningkat dan memicu terjadinya stres oksidatif (Sadeghi *et al.*, 2022). Kebocoran elektron dapat bereaksi dengan oksigen membentuk ROS. Apabila produksi ROS mitokondria melebihi kapasitas antioksidan, akan terjadi stres oksidatif yang mengakibatkan penurunan produksi ATP dan merusak mitokondria yang mengganggu motilitas sperma (Wang *et al.*, 2025). Menurut Younus *et al.*, (2024) menyatakan bahwa kerusakan mitokondria dapat menyebabkan masuknya ion kalsium secara berlebihan sehingga mengganggu rantai tranpor elektron.

ROS yang dihasilkan spermatozoa terdiri atas berbagai jenis, antara lain superoksida ($\cdot\text{O}_2^-$), hidrogen peroksida (H_2O_2), radikal proksimal ($\cdot\text{ROO}$), atau hidroksil ($\cdot\text{OH}$). Selain itu juga terdapat nitrogen reaktif (RNS) seperti oksida nitrat ($\cdot\text{NO}$), dinitrogen trioksida (N_2O_3), dan peroksinitrit (ONOO^-), dimana kehadirannya dapat mempengaruhi fungsi sperma dan menurunkan fertilitas (Maynou *et al.*, 2020). Akibatnya, ketika kadar ROS melampaui kapasitas antioksidan, dapat terjadi kerusakan pada sel dan DNA spermatozoa (Wagner *et al.*, 2018).

Keberadaan ROS menyebabkan membran plasma sperma menjadi rentan terhadap radikal bebas yang memicu stres oksidatif. Membran plasma kaya asam lemak tak jenuh (PUFA) berperan untuk mendukung fusi membran dan reaksi akrosom. Namun komponen membran plasma yang rusak dapat memicu peroksidasi lipid, sehingga terjadi kerusakan kimiawi pada membran. Dari proses tersebut menghasilkan radikal bebas yang dapat menyebabkan penipisan ATP, merusak DNA, dan mengganggu integritas membran sehingga menghambat kemampuan sperma (Bouhadana *et al.*, 2025).

Menurut pernyataan Sengupta *et al.*, (2024) ROS dapat berasal dari sumber endogen seperti varikokel, leukosit, dan spermatozoa belum matang dapat mengganggu produksi sperma. Sumber eksogen seperti kebiasaan merokok, sehingga terjadi peningkatan kadar nikotin, logam berat, dan radikal bebas yang mampu merusak DNA serta menurunkan motilitas. Konsumsi alkohol berlebihan juga memicu pembentukan ROS melalui aktivasi enzim sitokrom P450 dan NADPH oksidase dapat menyebabkan kerusakan mitokondria dan fragmentasi DNA.

Selain itu, adanya faktor paparan radiasi seperti elektromagnetik yang dapat menurunkan konsentrasi dan integritas membran sperma. Faktor lingkungan seperti polusi udara dan polusi bahan kimia, juga dapat merusak membran plasma dan mengganggu proses spermatogenesis (Gambar 2.5). Nutrisi yang buruk juga dapat menurunkan kualitas sperma seperti rendahnya asupan vitamin C, B2, B6, selenium, dan Zinc (Dewangga dkk., 2021).

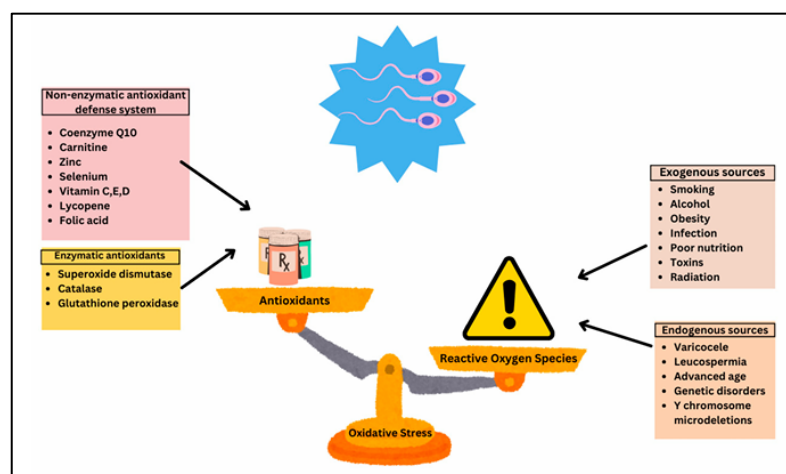


Gambar 2. 5 Dampak stres oksidatif. (a) Sumber ROS, (b) Pengaruh ROS, (c) Pengaruh penambahan antioksidan (Sengupta *et al.*, 2024).

Reactive Oxygen Species (ROS) pada kadar fisiologis juga memainkan peran penting dalam mendukung fungsi optimal spermatozoa. Oleh karena itu,

pelrunya keseimbangan antara ROS dan sistem antioksidan. ROS berfungsi sebagai sinyal sel dengan menginduksi produksi adenosin monofosfat siklik (cAMP). Peningkatan cAMP ini menghambat enzim tirosin fosfatase sehingga mendorong terjadinya fosforilasi tirosin protein. Fosforilasi tirosin tersebut akan memicu kaskade persinyalan untuk proses kapasitas spermatozoa. Proses kapasitas tersebut bergantung keberadaan ROS dan antioksidan. Selain itu, ROS juga mendorong reaksi akrosom, sementara antioksidan dapat menghambat reaksi akrosom (Wagner *et al.*, 2018).

Antioksidan memiliki peran untuk menjaga kesehatan sperma dengan mengurangi kadar ROS (Sengupta *et al.*, 2024). Menurut Bouhadana *et al.* (2025) sistem antioksidan ini terdiri dari dua yaitu mekanisme endogen dan eksogen. Kedua bekerja sama untuk melindungi sperma dari kerusakan oksidatif. Antioksidan dikategorikan menjadi sistem enzimatik maupun non-enzimatik. Sistem enzimatik meliputi glutathione peroksidase (GPx), superoksida dismutase (SOD), dan katalase (CAT) yang merupakan enzim alami yang terdapat dalam sperma atau seminal plasma (Gambar 2.6).

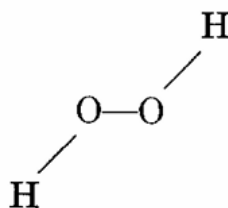


Gambar 2.6 Keseimbangan antara antioksidan dan ROS pada sperma. (Bouhadana *et al.*, 2025).

Kapasitas antioksidan alami sperma terbatas akibat volume sitoplasma yang kecil dan penyebaran komponennya terbatas sehingga perlu pendukung tambahan. Sistem non-enzimatik berperan dalam mendukung pertahanan untuk menetralkan radikal bebas secara langsung dan menjaga keseimbangan redoks dalam sel sperma. Antioksidan eksogen berasal dari suplemen makanan seperti buah-buahan, sayuran, dan ikan sebagai pendukung sistem pertahanan antioksidan endogen dengan menyediakan vitamin, mineral, dan fitokimia yang membantu mencegah pembentukan ROS dan peroksidasi lipid (Bouhadana *et al.*, 2025).

2.4 Hidrogen Peroksida

Hidrogen peroksida merupakan peroksida sangat sederhana dengan senyawa ikatan tunggal oksigen dan dapat berperan sebagai oksidator atau reduktor (Duca & Travin., 2020). Menurut Pędziwiatr *et al.* (2018) hidrogen peroksida memiliki senyawa kimia dengan rumus H_2O_2 , yang terdiri dari 2 atom hidrogen dan 2 atom oksigen (Gambar 2.7). Hidrogen peroksida termasuk kelompok ROS yang ditandai dengan adanya elektron tidak berpasangan dalam strukturnya. Hidrogen peroksida bersifat sebagai oksidator kuat sehingga mampu merusak makromolekul seluler seperti protein, lipid, dan asam nukleat (Abdollahi & Hosseini, 2014). Larutan hidrogen peroksida memiliki viskositas lebih tinggi. Larutan ini memiliki warna biru pucat, tidak berbau, dan kental. Namun jika dibiarkan pada suhu ruang, larutan ini menjadi tidak berwarna dan mengeluarkan bau yang kuat. Hidrogen peroksida juga bersifat asam lemah karena tidak sepenuhnya terionisasi dengan air (Pędziwiatr *et al.*, 2018).



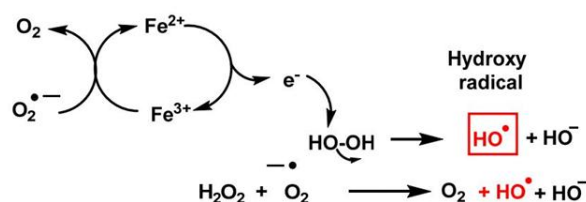
Gambar 2. 7 Struktur kimia hidrogen peroksida (Busing & Levy., 1965).

H_2O_2 tidak hanya berperan sebagai agen oksidatif yang merusak sel, tetapi pada konsentrasi rendah juga berperan sebagai molekul sinyal redoks yang dapat mengaktifkan sistem antioksidan endogen spermatozoa. Evdokimov et al. (2015) melaporkan bahwa inkubasi spermatozoa dengan H_2O_2 konsentrasi rendah yaitu 10 μM dan 100 μM terbukti meningkatkan kadar glutathione tereduksi (GSH) hingga 50% dibandingkan kelompok kontrol, serta meningkatkan aktivitas enzim GAPDS yang berperan dalam metabolisme energi spermatozoa. Hal ini diduga terjadi melalui aktivasi jalur pentosa fosfat yang menghasilkan NADPH, sehingga glutathione teroksidasi dapat direduksi kembali menjadi GSH oleh enzim glutathione reduktase. Dengan demikian, H_2O_2 pada konsentrasi rendah justru dapat memperkuat sistem pertahanan antioksidan endogen spermatozoa, sedangkan pada konsentrasi tinggi bersifat toksik dan merusak kualitas spermatozoa.

Penggunaan H_2O_2 dimanfaatkan sebagai sumber radikal untuk mengetahui mekanisme kerusakan oksidatif karena paparan zat ini secara langsung yang akan meningkatkan kadar ROS dalam tubuh memicu kerusakan sel (Wu *et al.*, 2023). Menurut Ofoedu *et al.* (2021) H_2O_2 dapat menjadi toksik bagi sel jika konsentrasinya diberi diatas 50 μM , jika konsentrasi dibawah itu maka tetap terjadi toksisitas namun dalam tingkat yang rendah 20 μM . Konsentrasi hidrogen peroksida sedang ke tinggi dapat menyebabkan sperma kehilangan mobilitasnya, terutama melalui penipisan ATP intraseluler dan penurunan fosforilasi protein

aksonema. Sebaliknya, peningkatan H_2O_2 yang signifikan mendorong peroksidasi lipid dan kematian sel (Alahmar., 2019).

Penambahan kadar H_2O_2 berlebih memicu pembentukan radikal bebas yang sangat reaktif, termasuk radikal hidroksil dan alkoksi ($\bullet\text{OH}$ dan OH^-) melalui reaksi fenton atau Haber waiss, dimana H_2O_2 adalah produk sampingan metabolisme oksigen yang terbentuk melalui reduksi molekul O_2 ketika menerima elektron. H_2O_2 juga tidak berbahaya karena tingkat reaksinya dengan biomolekul seperti protein, lipid, dan DNA relatif rendah (Rashki *et al.*, 2021; Pham *et al.* 2013; Juan *et al.*, 2021). Namun jika ada logam tertentu seperti Fe^{2+} atau Cu^+ , H_2O_2 dapat memicu pembentukan radikal hidroksil ($\bullet\text{OH}$) yang sangat reaktif sehingga menyebabkan kerusakan oksidatif pada berbagai molekul dalam tubuh, termasuk protein, lipid, dan DNA (Gambar 2.8) (Terzi., 2020).



Gambar 2. 8 Reaksi fenton (Juan *et al.*, 2021).

Penelitian yang dilakukan Ogawa *et al.* (2003) konsentrasi H_2O_2 10mM menghasilkan pembentukan ROS tertinggi ditandai dengan peningkatan sinyal fluoresensi hijau serta pada inti sel (HS-Os-1) terjadi kerusakan DNA akibat oksidasi yang menunjukkan peningkatan fluoresensi. Sementara itu, sel HS-Os-1 yang dikultur dengan H_2O_2 1mM menunjukkan fluoresensi merah terang, menyebabkan disfungsi potensial membran mitokondria dan perubahan apoptosis pada garis sel HS-Os-1. Studi lain yang dilakukan Erdogan *et al.* (2022) pada sel SH-SY5Y diberi paparan H_2O_2 konsentrasi 250 μM menunjukkan penurunan

viabilitas sel 50% serta memicu peningkatan rasio Bax/Bcl-2 yang menunjukkan apoptosis pada sel SH-SY5Y. Dari penelitian di atas terbukti bahwa H_2O_2 salah satu faktor pendorong utama kerusakan sel yang mengakibatkan nekrosis dan apoptosis.

Penelitian terdahulu juga menyatakan bahwa H_2O_2 merupakan agen pengoksidasi yang sangat merusak spermatozoa manusia. H_2O_2 tidak hanya menurunkan kualitas secara fungsional tetapi juga integritas DNA spermatozoa. Sperma yang dipapar H_2O_2 1 mM diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C menyebabkan aktivitas sperma menjadi tidak bergerak sehingga menunjukkan perubahan signifikan dari stres oksidatif terhadap fungsi sperma (Twigg *et al.*, 1998). Alqawasmeh *et al.* (2020) menyatakan bahwa sperma manusia yang diinkubasi dengan H_2O_2 300 μM terbukti menurunkan kualitas sperma, dengan penurunan motilitas total sebesar 30% dan kerusakan DNA sebesar 47,4% setelah dipapar H_2O_2 pasca-pencairan. Dengan demikian, hal ini menunjukkan bahwa konsentrasi H_2O_2 jika semakin meningkat justru menyebabkan kerusakan keseluruhan fungsi spermatozoa.

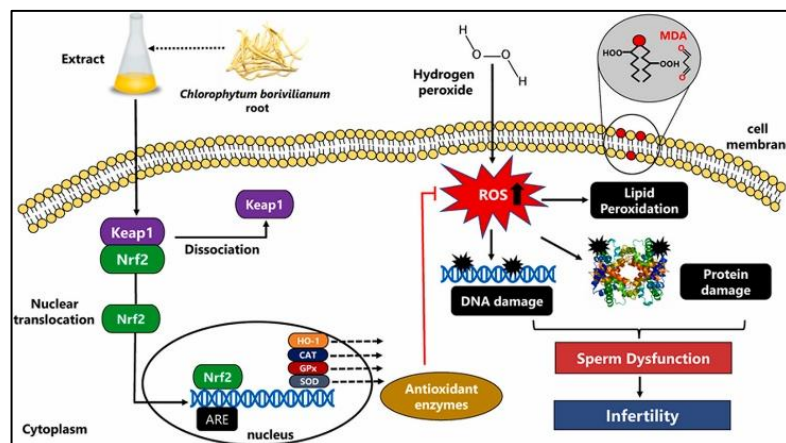
2.5 Pengaruh Ekstrak Alfalfa terhadap Kualitas Spermatozoa yang diinduksi H_2O_2

Pemberian antioksidan dapat mencegah dan mengurangi peroksidasi lipid akibat radikal bebas pada membran plasma spermatozoa. Salah satu tanaman yang memiliki efek antioksidan karena mensintesis berbagai metabolit sekunder yaitu Alfalfa. Alfalfa memiliki senyawa flavonoid yang termasuk kelompok polifenol, dimana memiliki kemampuan menetralkan ROS secara langsung, dengan cara melepaskan ion hidrogen untuk menangkap radikal bebas seperti OH agar menghambat aktivitasnya. Tingginya gugus hidroksil flavonoid berinteraksi

dengan senyawa radikal reaktif, membuat oksigen reaktif menjadi stabil sehingga radikal menjadi tidak aktif (Suwignyo *et al.*, 2023).

Menurut Moretti *et al.* (2023) senyawa antioksidan dari ekstrak tanaman dapat meningkatkan mekanisme pertahanan sel dengan merangsang aktivasi enzim antioksidan dan menekan aktivitas enzim pro-oksidan. Kandungan ekstraknya akan memodulasi produksi ROS, meningkatkan homeostasis redoks, dan mengaktifkan berbagai jalur persinyalan, salah satunya Keap1/Nrf2. Jalur ini merupakan mekanisme pertahanan utama yang berpartisipasi dalam perlindungan spermatozoa terhadap kerusakan oksidatif melalui peningkatan respons antioksidan seluler.

Dalam kondisi normal, Nrf2 terikat oleh protein Keap1 di sitoplasma. Namun, senyawa antioksidan dari tanaman akan memodifikasi protein Keap1, sehingga melepaskan Nrf2 untuk masuk ke dalam nukleus. Nrf2 akan mengikat ARE (*antioxidant response element*), sehingga memicu enzim antioksidan seperti SOD (superoksida dismutase), GSH-px (glutathione peroksidase), CAT (katalase), NQO10 (NADPH kuinon oksidoreduktor), dan heme oxygenase-1, agar lebih tahan terhadap kerusakan oksidatif. Antioksidan berasal dari tanaman juga mengaktifkan SIRT1 dan PGC-1 α untuk mendorong pembentukan mitokondria baru, meningkatkan efisiensi rantai transport elektron, dan mengatur permeabilitas membran mitokondria (Gambar 2.9) (Mararajah *et al.*, 2024; Liu *et al.*, 2025).



Gambar 2. 9 Mekanisme antioksidan dan induksi H_2O_2 (Mararajah *et al.*, 2024).

Proses tersebut berperan dalam mempertahankan fungsi mitokondria, menjaga kestabilan produksi ATP, dan menekan akumulasi ROS berlebih. Mekanisme ini penting dalam mempertahankan kualitas spermatozoa, terutama motilitas karena pergerakan spermatozoa sangat bergantung pada ketersediaan energi dan keseimbangan status oksidatif sel (Gang et al., 2025). Menurut Leyn dkk., (2021) menyatakan bahwa pemberian antioksidan pada konsnetrasi yang tepat akan menghasilkan perlindungan maksimal terhadap reaksi peroksidasi lipid yang disebabkan oleh radikal bebas pada membrane plasma spermatozoa. Meskipun demikian, efektivitas antioksidan tidak selalu berbanding lurus dengan konsentrasi yang diberikan. Pemberian antioksidan dari bahan alami pada konsentrasi tinggi justru berpotensi menimbulkan efek prooksidan apabila kadar ROS dalam sel relatif rendah, sehingga keseimbangan redoks terganggu dan antioksidan berperan sebaliknya dalam meningkatkan akumulasi ROS (Bouayed & Bohn, 2010)

Disisi yang lain, ketika sperma dipapar H_2O_2 dapat mengganggu keseimbangan homeostasis redoks sel pada sel sperma. Ketika sistem pertahanan antioksidan tidak mampu berfungsi secara optimal, dapat terjadi kelebihan radikal bebas dan oksidannya yang dapat menyerang komponen sel. Kondisi ini

menyebabkan disfungsi sel yang pada akhirnya terjadi kematian sel (Kurhaluk *et al.*, 2025; Dutta *et al.*, 2019; Yu *et al.*, 2025). H_2O_2 termasuk zat yang beracun bagi spermatozoa karena dapat menghambat motilitas sperma dan menekan produksi ATP (Abdallah *et al.*, 2011).

Proses penghambatan motilitas sperma dapat disebabkan oleh kerentanan asam lemak tak jenuh ganda (PUFA) yang melimpah pada membran sperma, sehingga memicu reaksi kimia yang dikenal dengan peroksidasi lipid (LPO) (Gambar 2.9). Proses LPO akan menghasilkan aldehida lipid yang menyerang protein mitokondria, sehingga terjadi penurunan motilitas sperma dan kematian sel. Proses tersebut akan memicu reaksi berantai yang dapat mengoksidasi lebih dari 50% membran spermatozoa (Pujianto *et al.*, 2021; Wagner *et al.*, 2018). Oleh karena itu, jika terjadi peningkatan kadar ROS yang disebabkan peroksidasi lipid, maka motilitas sperma menurun. Peroksidasi akan mengurangi fleksibilitas membran dan mengganggu mekanisme flagellum sehingga menghambat motilitas secara keseluruhan (Wagner *et al.*, 2018).

Dengan demikian, ketika ekstrak tumbuhan yang mengandung senyawa antioksidan dikombinasikan dengan H_2O_2 , senyawa tersebut berperan menghentikan rantai reaksi oksidasi dengan cara menetralkan senyawa perantara radikal bebas yang terbentuk akibat paparan H_2O_2 . Mekanisme ini bekerja dengan menghambat aktivitas oksidatif H_2O_2 sehingga radikal lipid yang terbentuk dapat distabilkan dan tidak bereaksi lebih lanjut dengan oksigen maupun molekul lemak lain pada membran plasma spermatozoa (Suwignyo *et al.*, 2023).

Hal ini didukung oleh Mararajah *et al.*, (2024) melaporkan bahwa pemberian ekstrak akar *Chlorophytum brovillianum* yang mengandung flavonoid

dan dikombinasikan dengan induksi H_2O_2 200 μM selama inkubasi 2 jam mampu memberikan pengaruh signifikan terhadap motilitas spermatozoa, di mana pemberian ekstrak mampu melindungi spermatozoa dari kerusakan akibat H_2O_2 . Temuan tersebut menunjukkan bahwa senyawa flavonoid dari ekstrak tanaman berpotensi memberikan efek protektif terhadap spermatozoa yang mengalami stres oksidatif akibat induksi H_2O_2 . Mengacu pada hal tersebut, ekstrak alfalfa yang juga diketahui kaya akan flavonoid diduga memiliki potensi yang serupa dalam melindungi kualitas spermatozoa dari kerusakan oksidatif yang disebabkan oleh induksi H_2O_2 .

2.6 Ekstraksi

Ekstraksi merupakan proses pemisahan senyawa aktif dari bahan alami. Metode ekstraksi dimanfaatkan untuk mendapatkan senyawa antioksidan. Beberapa metode ekstraksi yang dapat digunakan yaitu maserasi, microwave assisted extraction (MAE) dan ultrasonic assisted extraction (UAE) (Fauziyah dkk., 2022). Metode ekstraksi salah satu teknik efektif yang bergantung pada jenis pelarut dan polaritas pelarut karena kelarutan zat dipengaruhi oleh pelarut tersebut. Proses ekstraksi dapat dilakukan dengan atau tanpa pemanasan (Yulinar dkk., 2022).

Metode ekstraksi yang umum digunakan yaitu maserasi. Metode maserasi merupakan senyawa untuk mengisolasi bioaktif. Proses tersebut melibatkan perendaman pelarut sehingga tidak memerlukan proses pemanasan agar tidak merusak zat aktif. Prosesnya melibatkan perendaman sampel dalam pelarut organik pada suhu kamar, sehingga pelarut menembus dinding sel dan rongga sel yang berisi senyawa aktif (Wiranata dkk., 2022).

Metode maserasi memiliki kelemahan seperti waktunya lama, membutuhkan banyak pelarut, dan rentan terhadap reaksi hidrolisis, oksidasi, dan ionisasi yang dapat merusak senyawa fenolik. Maserasi berlangsung lambat pada suhu rendah, namun suhu tinggi oksidasi senyawa antioksidan menjadi cepat (Wiranata dkk., 2022). Pelarut yang dapat digunakan untuk proses ekstraksi yaitu methanol, etanol, etil asetat, dan N-heksana, yang mengisolasi senyawa penting pada tumbuhan. Prinsipnya serbuk tumbuhan akan larut jika pelarutnya memiliki polaritas yang sama (Riasari dkk., 2022).

Etanol digunakan sebagai pelarut untuk melarutkan komponen antioksidan dari golongan metabolit sekunder (Nurhasnawati dkk., 2017) Etanol mengekstrak senyawa dengan berbagai tingkat polaritas, mulai dari polar hingga non-polar. Etanol memiliki ciri-ciri yaitu tahan terhadap pertumbuhan mikroba, harga relative murah, dan bersifat tidak toksik dibandingkan pelarut organik lain (Afifah dkk., 2023). Etanol dengan titik didih 79°C memerlukan pemanas untuk proses pemekatan (Hasanah dan Novian., 2020) Dalam penelitian ini, pelarut yang dipakai etanol 70%, karena sifatnya yang lebih polar sehingga lebih efektif dalam menghasilkan kadar flavonoid total (Wahyudi dan Minarsih., 2023).

Sifat polar yang dimiliki etanol 70%, dapat menarik senyawa polar dari serbuk simplisia (Prasetya dkk., 2025). Hal tersebut didukung oleh pernyataan Andriani dan Murtisiwi (2020) menyatakan bahwa pelarut berkonsentrasi rendah menghasilkan kadar senyawa yang lebih tinggi dibandingkan pelarut berkonsentrasi tinggi (Yunita dan Khodijah., 2020). Wahyudi dan Minarsih (2023) menyatakan bahwa etanol sebagai pelarut sangat mempengaruhi hasil ekstraksi. Etanol 70% dengan kandungan air sebesar 15,2% bersifat lebih polar karena jumlah air yang

lebih tinggi dan adanya gugus OH bersifat polar, sehingga lebih efisien dalam menyaring senyawa metabolit sekunder.

2.7 Hipotesis Penelitian

Hipotesis penelitian ini adalah sebagai berikut:

H1: Pengaruh ekstrak etanol 70% alfafa dengan induksi H₂O₂ berpengaruh terhadap kualitas spermatozoa (*Mus musculus*) secara *in vitro*.

H0: Pengaruh ekstrak etanol 70% alfafa dengan induksi H₂O₂ tidak berpengaruh terhadap kualitas spermatozoa (*Mus musculus*) secara *in vitro*.

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental kuantitatif untuk mengetahui pengaruh ekstrak etanol 70% alfafa terhadap kualitas spermatozoa mencit (*Mus musculus*) yang diinduksi H_2O_2 secara *in vitro*. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial yang terdiri dari 2 faktor yaitu faktor pertama ekstrak etanol Alfafa (E) dengan berbagai konsentrasi yaitu 0% (E0), 2% (E1) dan 6% (E2). Faktor kedua adalah H_2O_2 (H) dengan berbagai konsentrasi yaitu 0 μM (H0), 10 μM (H1), dan 50 μM (H2). Setiap kombinasi perlakuan dikombinasikan membentuk 9 perlakuan, masing-masing diulang sebanyak 3 kali, sehingga terdapat 27 satuan percobaan perlakuan. Adapun desain penelitian dari beberapa perlakuan adalah sebagai berikut:

Tabel 3. 1 Perlakuan pada Penelitian

Ekstrak Alfalfa	H_2O_2		
	H0 (H_2O_2 0 μM)	H1 (H_2O_2 10 μM)	H2 (H_2O_2 50 μM)
E0 (Ekstrak Alfalfa 0%)	E0H0	E0H1	E0H2
E1 (Ekstrak Alfalfa 2%)	E1H0	E1H1	E1H2
E2 (Ekstrak Alfalfa 6%)	E2H0	E2H1	E2H2

Keterangan:

E0H0: Sebagai kontrol

E1H0: Ekstrak daun alfafa dengan konsentrasi 2% dan H_2O_2 konsentrasi 0 μM

E2H0: Ekstrak daun alfafa dengan konsentrasi 6% dan H_2O_2 konsentrasi 0 μM

E0H1: Ekstrak daun alfafa dengan konsentrasi 0% dan H_2O_2 konsentrasi 10 μM

E1H1: Ekstrak daun alfafa dengan konsentrasi 2% dan H_2O_2 konsentrasi 10 μM

E2H1: Ekstrak daun alfafa dengan konsentrasi 6% dan H_2O_2 konsentrasi 10 μM

E0H2: Ekstrak daun alfafa dengan konsentrasi 0% dan H_2O_2 konsentrasi 50 μM

E1H2: Ekstrak daun alfafa dengan konsentrasi 2% dan H_2O_2 konsentrasi 50 μM

E2H2: Ekstrak daun alfafa dengan konsentrasi 6% dan H_2O_2 konsentrasi 50 μM

3.2 Variabel Penelitian

Penelitian ini menggunakan tiga variabel yang terdiri dari:

1. Variabel bebas berupa konsentrasi H_2O_2 dan ekstrak etanol 70% alfalfa. Perlakuan H_2O_2 terdiri atas 0 μM (kontrol), 10 μM (konsentrasi rendah) dan 50 μM (konsentrasi tinggi), sedangkan perlakuan ekstrak alfalfa menggunakan konsentrasi 0%, 2% dan 6%. Konsentrasi tersebut dipilih untuk mengetahui pengaruh H_2O_2 dan ekstrak alfalfa terhadap motilitas, viabilitas, dan integritas membran spermatozoa.
2. Variabel terikat meliputi motilitas, viabilitas, dan integritas membran spermatozoa pada mencit (*Mus musculus*).
3. Variabel kontrol yaitu spermatozoa mencit (*Mus musculus*) berumur 75 hari. Selain itu juga meliputi suhu inkubasi (37°C), waktu inkubasi, serta volume sampel yang dianalisis selama penelitian.

3.3 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan September 2025 hingga April 2026. 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.

3.4 Alat dan Bahan

3.4.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi *buchner filtration funnel*, rotary evaporator, corong, batang pengaduk, beaker glass, erlenmeyer, cawan petri, timbangan analitik, set alat bedah, aluminium foil, tabung Eppendorf,

inkubator, mikropipet, spuit 3 ml, mikroskop, object glass, cover glass, kertas label, dan kertas saring whatman no.1.

3.4.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi cauda epididimis mencit (*Mus musculus*), hidrogen peroksida (30% H₂O₂ Merck), Etanol 70%, Ekstrak daun Alfafa, fruktose, DMSO, Aquades, natrium sitrat, pewarna eosin–nigrosin, serta sodium chloride 0,9% infus.

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Persiapan Ekstrak Alfalfa

Proses ekstraksi alfalfa metode ini sesuai dengan Raeeszadeh *et al* (2021) yang dimodifikasi. Langkah awal dikumpulkan alfafa kemudian di cuci hingga bersih dengan aquades dan dikeringkan selama 24 jam. Setelah proses pencucian Alfalfa dimasukkan kedalam oven untuk proses pengeringan pada suhu 45°C. Setelah proses pengeringan, kadar air yang hilang ditentukan terlebih dahulu, kemudian daun alfalfa yang kering di haluskan. Alfalfa 150 g yang telah dihaluskan ditambahkan etanol 70%, kemudian dilarutkan dan direndam selama 72 jam, dengan perbandingan bubuk dan pelarut 1:10. Setelah proses perendaman, disaring dengan kertas saring whatman no.1 untuk memperoleh filtratnya. Filtrat akan diuapkan dengan rotary evaporator pada suhu 40°C hingga menghasilkan ekstrak kental. Ekstrak yang pekat disimpan dalam wadah tertutup rapat pada suhu 4°C. Ekstrak alfalfa yang pekat dilarutkan kembali dengan DMSO sebanyak 1 ml untuk dilanjutkan pada tahap perlakuan sampel (Tumkiratiwong *et al.*, 2014).

3.5.2 Aklimatisasi dan Isolasi Organ Reproduksi

Tahapan aklimatisasi dilakukan dengan mempersiapkan hewan coba mencit jantan dewasa sebanyak 27 berusia 75 hari lebih dahulu. Semua hewan coba mencit

diaklimatisasi selama 1 minggu sebelum dilakukannya isolasi organ agar dapat beradaptasi dengan lingkungan baru. Selama tahap aklimatisasi, dipastikan hewan coba mencit ditempatkan didalam kandang yang nyaman dan dilengkapi dengan pakan serta air minum (Hafza *et al.*, 2017).

Setelah 7 hari aklimatisasi, memasuki tahapan isolasi organ sesuai metode Hafza *et al.*, (2017) yang dimodifikasi. Hewan coba didislokasi terlebih dahulu, kemudian hewan coba mencit dibedah menggunakan alat bedah dan diambil bagian kauda epididimisnya. Setelah itu, kauda epididimis diletakkan di atas cawan petri yang telah berisi 1 ml larutan NaCl 0,9%. Selanjutnya, kauda epipimis dicincang secara halus hingga terbentuk suspensi sperma yang homogen. Suspensi tersebut selanjutnya dijadikan sebagai sampel uji untuk diberi perlakuan menggunakan larutan H₂O₂ dan ekstrak pada konsentrasi yang telah ditetapkan dalam penelitian.

3.5.3 Inkubasi Spermatozoa dengan H₂O₂ dan Ekstrak

Langkah selanjutnya berdasarkan Garg *et al.*, (2009) yang dimodifikasi. Suspensi spermatozoa dibagi ke dalam beberapa tabung perlakuan yaitu kelompok kontrol 0 μ M H₂O₂, kelompok 10 μ M H₂O₂, dan kelompok 50 μ M H₂O₂. Larutan stok H₂O₂ 1mM dibuat dari H₂O₂ 30% melalui pengenceran menggunakan akuades dan dihomogenkan. Selanjutnya, larutan stok H₂O₂ ditambahkan ke dalam masing-masing tabung suspensi sperma hingga diperoleh konsentrasi akhir H₂O₂ sebesar 10 μ M dan 50 μ M.

Proses setelah ditambahkan H₂O₂ berdasarkan metode Russo *et al* (2006), ekstrak daun Alfalfa pada konsentrasi 0%, 2%, dan 6% secara bersamaan juga ditambahkan ke masing-masing tabung suspensi. Setiap perlakuan diinkubasi pada suhu 37°C, kemudian dilakukan evaluasi motilitas dan viabilitas pada awal inkubasi 0 menit dan setelah 30 menit inkubasi. Kemudian dilanjutkan dengan pengamatan

integritas membran. Pengamatan ini dilakukan secara bertahap untuk melihat perubahan kualitas spermatozoa mencit selama diberi perlakuan.

Tabel 3. 2 Perhitungan Pengenceran Semen

Perlakuan	Volume pada...			Total Volume
	Ekstrak (μl)	H ₂ O ₂ (μl)	Suspensi sperma	
E0H0	0	0	200	200
E0H1	0	2	198	200
E0H2	0	10	190	200
E1H0	4	0	196	200
E1H1	4	2	194	200
E1H2	4	10	186	200
E2H0	12	0	188	200
E2H1	12	2	186	200
E2H2	12	10	178	200

3.5.4 Uji motilitas

Pemeriksaan motilitas spermatozoa menurut Elisia (2022), dengan meneteskan 20 μL suspensi sperma di atas kaca benda dan ditutup dengan kaca penutup, diamati dibawah mikroskop cahaya pada perbesaran 400x. Penilaian penilaian dilakukan dengan menghitung persentase spermatozoa hidup, yaitu spermatozoa yang progresif dari total spermatozoa dengan nilai kisaran antara 0-100%. Perhitungan motilitas spermatozoa dapat menggunakan rumus menurut Nubatonis dkk (2024), sebagai berikut:

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

Perhitungan rerata penurunan motilitas dilakukan menggunakan rumus berikut:

$$\text{Penurunan motilitas (\%)} = \text{Persentase } m0 - \text{Persentase } m30$$

$$x (\%) = \frac{\sum x}{n}$$

Keterangan:

M0 :Persentase motilitas spermatozoa sebelum perlakuan (%)

M30 :Persentase motilitas spermatozoa setelah inkubasi/perlakuan 30 menit (%)

X :Persentase rerata penurunan motilitas (%)

$\sum x$:jumlah seluruh nilai penurunan motilitas dari setiap ulangan (%)

n :jumlah ulangan

3.5.5 Uji Viabilitas

Penilaian viabilitas spermatozoa dilakukan menggunakan metode pewarnaan eosin–nigrosin sesuai dengan Braune *et al.*, (2025) dan Peris *et al.*, (2025) larutan pewarna dibuat dengan dengan melarutkan 0,67 g eosin dan 10 g nigrosine dalam 100 mL aquades. Larutan tersebut dipanaskan kemudian didinginkan, disaring, dan disimpan dalam botol gelap. Preparat dibuat dengan meneteskan suspensi sperma 10 μ L dan larutan pewarna eosin-nigrosin, kemudian dibuat apus tipis, dikeringkan, dan diamati di bawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 400x. Spermatozoa yang hidup atau layak ditandai dengan kepala putih, sementara spermatozoa yang mati memiliki kepala yang berwarna merah atau merah muda. Persentase viabilitas kemudian dihitung dengan rumus (Barek dkk., 2020):

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

Perhitungan rerata penurunan motilitas dilakukan menggunakan rumus berikut:

$$\text{Penurunan viabilitas (\%)} = \text{Persentase } v0 - \text{Persentase } v30$$

$$x (\%) = \frac{\sum x}{n}$$

Keterangan:

V0 :Persentase viabilitas spermatozoa sebelum perlakuan (%)

V30 :Persentase viabilitas spermatozoa setelah inkubasi/perlakuan 30 menit (%)

X :Rerata penurunan viabilitas (%)

$\sum x$:Jumlah seluruh nilai penurunan viabilitas dari setiap ulangan (%)

n :Jumlah ulangan

3.5.6 Uji integritas membran

Penilaian integritas membran dilakukan dengan metode pewarnaan HOST (*Hypo osmotic Swelling Test*) yang sesuai dengan Saputra dkk., (2021). Larutan HOST dibuat terlebih dahulu dengan melarutkan 0,31 g natrium sitrat dan 0,565 g fruktosa yang dilarutkan dalam 50 ml aquades. Setelah pengamatan motilitas dan viabilitas, suspensi spermatozoa hasil perlakuan digunakan untuk pemeriksaan integritas membran. Sebanyak 10 µL suspensi sperma dipindahkan ke tabung Eppendorf, kemudian ditambahkan 5 µL larutan HOST dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Setelah proses inkubasi, suspensi sperma ditetaskan diatas gelas objek. kemudian diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 400x. Utami & Ducha (2023) menyatakan bahwa persentase membran sperma yang normal ditunjukkan dengan ekor sel yang menggulung, sedangkan membran yang rusak ditandai dengan bentuk ekor yang lurus. Hasil yang didapatkan dihitung menggunakan rumus:

$$\text{Integritas membran (\%)} = \frac{\text{Spermatozoa menggulung}}{\text{Spermatozoa menggulung} + \text{spermatozoa lurus}} \times 100\%$$

3.6 Analisis Data

Data hasil penelitian yang diperoleh berupa motilitas, viabilitas, dan integritas membran spermatozoa yang dianalisis menggunakan program SPSS (IBM Corp., 2013). Analisis diawali dengan uji normalitas menggunakan uji Kolmogorov-Smirnov atau Shapiro-Wilk untuk mengetahui apakah data berdistribusi normal. Selanjutnya dilakukan uji homogenitas untuk mengetahui kesamaan varian antar kelompok perlakuan. Data yang memenuhi asumsi normalitas dan homogenitas kemudian dianalisis secara statistik menggunakan uji ANOVA faktorial pada taraf signifikansi $p < 0,05$. Apabila hasil uji ANOVA

menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$), maka dilanjutkan dengan uji lebih lanjut antar perlakuan. Pemilihan uji lanjut didasarkan pada nilai Koefisien Keragaman (KK). Berdasarkan hasil analisis yang diperoleh, nilai KK menunjukkan $>10\%$, maka uji lanjut yang digunakan adalah uji Duncan untuk mengetahui perbedaan nyata antar perlakuan.

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Pengaruh Ekstrak Etanol 70% Alfalfa dengan Induksi H₂O₂ Terhadap Motilitas Spermatozoa *Mus musculus* Secara *In Vitro*

Motilitas merupakan indikator penting kualitas spermatozoa karena mencerminkan kemampuan sel untuk bergerak secara progresif. Dalam penelitian ini pengaruh ekstrak etanol 70% alfalfa dengan induksi H₂O₂ menunjukkan adanya pengaruh terhadap motilitas spermatozoa secara deskriptif. Hal ini terlihat adanya penurunan dari rerata motilitas pada masing-masing perlakuan, dari waktu 0 menit sampai setelah inkubasi 30 menit (Tabel 4.1).

Tabel 4. 1 Rerata Pengaruh Ekstrak Etanol 70% Alfalfa dengan Induksi H₂O₂ Terhadap Motilitas Spermatozoa *Mus musculus* Secara *In Vitro*

Perlakuan	Rerata Penurunan (%) $\pm$ SD
E0H0	13.95 $\pm$ 9.00
E0H1	9.44 $\pm$ 3.51
E0H2	10.26 $\pm$ 8.08
E1H0	9.87 $\pm$ 8.12
E1H1	11.23 $\pm$ 1.85
E1H2	4.08 $\pm$ 7.85
E2H0	7.97 $\pm$ 9.33
E2H1	14.19 $\pm$ 9.16
E2H2	10.75 $\pm$ 7.02

Nilai rerata pada tabel 4.1 diperoleh dari selisih rerata persentase motilitas spermatozoa dari waktu 0 menit ke 30 menit pada setiap perlakuan. Selisih tersebut menunjukkan penurunan viabilitas spermatozoa setelah inkubasi selama 30 menit. Semakin kecil penurunan viabilitas yang diperoleh, maka semakin baik kemampuan perlakuan dalam mempertahankan motilitas spermatozoa, begitu sebaliknya.

Rerata penurunan motilitas spermatozoa yang diperoleh baik diberi perlakuan secara tunggal maupun dikombinasikan dengan H_2O_2 dan yang tidak diberi perlakuan yaitu kelompok kontrol, menunjukkan rerata persentase yang berbeda. Pada kelompok kontrol tanpa perlakuan (E0H0) diperoleh rerata penurunan motilitas sebesar 13,95%, nilai ini lebih tinggi dibanding perlakuan lainnya. Tingginya penurunan motilitas pada kelompok kontrol diduga berkaitan dengan tidak adanya sumber energi yang dapat menunjang aktivitas kemampuan motilitas selama inkubasi.

Menurut Octaviani dkk., (2021) penurunan motilitas dapat terjadi seiring bertambahnya waktu inkubasi karena produksi ROS melebihi kapasitas enzim endogen antioksidan. Selama inkubasi, metabolisme sel mengalami peningkatan sehingga memicu terjadinya peroksidasi lipid. Hal tersebut berpotensi merusak membran plasma dan mengganggu kinerja mitokondria dalam menghasilkan energi untuk pergerakan spermatozoa. Kondisi ini juga memicu akumulasi asam laktat yang menurunkan pH medium menjadi lebih asam, sehingga berpotensi merusak organel sel dan menghambat produksi energi (Adira dkk., 2026). Hal ini sejalan dengan pernyataan Laos dkk., (2021) mengatakan bahwa tingginya nilai penurunan motilitas selama inkubasi dapat menghasilkan radikal bebas yang mengakibatkan peningkatan reaksi oksidasi sehingga sumber energi motilitas menurun. Dengan demikian, spermatozoa menjadi lebih rentan terhadap pembentukan ROS dan mengalami penurunan kemampuan gerak.

Keterbatasan ketersediaan energi pada spermatozoa juga dapat dipengaruhi oleh jenis pengencer yang digunakan. Dalam penelitian ini pengencer yang digunakan yaitu NaCl fisiologis 0,9%. Menurut Nurfitrih dkk., (2023) menyatakan

bahwa larutan NaCL sebagai pengencer menunjukkan hasil yang kurang optimal karena kurang menyediakan energi yang diperlukan oleh spermatozoa, sehingga perlu ditambahkan komponen lain yang mampu mempertahankan motilitas. Akibat kondisi tersebut, kemampuan spermatozoa dalam menyediakan energi untuk pergerakan menjadi terbatas.

Pemberian ekstrak alfalfa secara tunggal tanpa induksi H₂O₂, pada perlakuan E1H0 yaitu pemberian ekstrak alfalfa konsentrasi 2% menunjukkan rerata penurunan motilitas sebesar 9,87% lebih rendah dibandingkan perlakuan kontrol E0H0 sebesar 13,95%. Selanjutnya pada perlakuan E2H0 yaitu pemberian ekstrak alfalfa konsentrasi tinggi 6% rerata penurunan motilitas lebih rendah sebesar 7,97%. Hasil ini menunjukkan bahwa ekstrak alfalfa konsentrasi 6% terdapat kecenderungan dalam mempertahankan motilitas spermatozoa dibandingkan konsentrasi 2%, namun keduanya lebih protektif dibandingkan kelompok kontrol tanpa pemberian alfalfa. Temuan ini sejalan dengan penelitian Biagi *et al.*, (2019) bahwa pemberian ekstrak *Castanea sativa* yang mengandung flavonoid tidak memberikan efek toksik terhadap motilitas spermatozoa sehingga motilitas tetap dapat dipertahankan seiring bertambahnya konsentrasi yang diberikan.

Kemampuan ekstrak dalam mempertahankan motilitas spermatozoa berkaitan dengan kandungan senyawa bioaktif yang bersifat antioksidan. Ekstrak alfalfa dalam penelitian ini diketahui mengandung senyawa bioaktif. Menurut Darni dkk., (2016) alfalfa merupakan tanaman yang kaya akan metabolit sekunder terutama senyawa flavonoid yang diketahui memiliki aktivitas antioksidan. Padmiswari dkk., (2025) mengatakan bahwa senyawa flavonoid diketahui memiliki aktivitas antioksidan yang mampu menangkap radikal bebas. Oleh sebab itu,

kandungan antioksidan dalam ekstrak mampu melindungi spermatozoa dari kerusakan akibat ROS selama proses inkubasi, sehingga motilitas spermatozoa tetap dapat dipertahankan.

Sementara itu, pada perlakuan H_2O_2 secara tunggal sebagai sumber radikal bebas untuk menginduksi ROS, spermatozoa mencit diberi perlakuan dengan tingkat konsentrasi yang berbeda. Pada perlakuan E0H1 yaitu pemberian H_2O_2 konsentrasi $10\mu M$ menunjukkan rerata penurunan motilitas spermatozoa sebesar 9,44% lebih rendah dibandingkan perlakuan kontrol E0H0 sebesar 13,95%. Selanjutnya, pada perlakuan E0H2 yaitu pemberian H_2O_2 konsentrasi tinggi $50\mu M$, rerata penurunan motilitas sebesar 10,26% lebih tinggi dibandingkan E0H1. Hal ini menunjukkan bahwa respon spermatozoa mencit masih mampu mempertahankan motilitasnya baik pada konsentrasi rendah maupun tinggi selama inkubasi. Berbeda dengan penelitian Garg *et al.*, (2009) melaporkan bahwa pemberian H_2O_2 konsentrasi $50\mu M$ terhadap spermatozoa kerbau sudah meningkatkan kadar MDA sehingga motilitas menurun lebih besar, sedangkan pada konsentrasi rendah kadar MDA belum meningkat namun motilitas spermatozoa sudah terlihat menurun.

Menurut Alahmar (2019), H_2O_2 dapat bersifat toksik terhadap sel apabila konsentrasi yang diberikan diatas $50\mu M$, sehingga dapat menyebabkan spermatozoa kehilangan motilitasnya. Hal ini didukung oleh penelitian Mahfouz *et al.*, (2010) bahwa pemberian H_2O_2 pada konsentrasi tinggi ($100mM$) dapat meningkatkan penurunan motilitas spermatozoa sebesar 16% akibat peningkatan kadar ROS intraseluler selama diinkubasi 15 menit.

Pada penelitian ini, induksi H_2O_2 $50\mu M$ tunggal selama inkubasi 30 menit belum menyebabkan peningkatan penurunan motilitas spermatozoa yang lebih

besar. Berbeda dengan penelitian De Castro *et al.*, (2016) melaporkan bahwa pemberian H_2O_2 50 μM sudah dapat meningkatkan penurunan motilitas spermatozoa selama inkubasi 1 jam. Dengan demikian, pada penelitian ini pemberian H_2O_2 secara tunggal terhadap motilitas spermatozoa dipengaruhi oleh konsentrasi yang diberikan belum cukup tinggi dan waktu inkubasi yang relatif singkat, sehingga paparan H_2O_2 pada penelitian ini belum cukup untuk meningkatkan produksi ROS secara optimal. Menurut Karunakaran *et al.*, (2012) jika produksi ROS meningkat akibat H_2O_2 , motilitas spermatozoa dapat terganggu akibat terjadinya stres oksidatif. Hal ini akan berdampak pada tingginya penurunan motilitas spermatozoa melalui kerusakan komponen sel dan gangguan pergerakan spermatozoa.

Berbeda dengan perlakuan tunggal, kombinasi ekstrak alfalfa dengan H_2O_2 konsentrasi rendah pada motilitas justru menunjukkan penurunan meningkat dibandingkan perlakuan alfalfa tunggal. Pada perlakuan E1H1 menunjukkan rerata penurunan motilitas lebih tinggi sebesar 11,23%, dibandingkan E1H0 sebesar 9,87%. Meningkatnya nilai motilitas terlihat jelas pada perlakuan E2H1 dengan rerata penurunan motilitas lebih tinggi sebesar 14,19% dibandingkan E2H0 sebesar 7,97% dan juga lebih tinggi dari kelompok kontrol. Hasil tersebut mengindikasikan bahwa kombinasi ekstrak alfalfa 6% dengan H_2O_2 10 μM (E2H1) justru tidak memberikan efek protektif yang optimal terhadap motilitas spermatozoa mencit melainkan memperburuk kondisi sel. Hasil ini berbeda dengan penelitian Mararajah *et al.*, (2024) melaporkan bahwa pemberian ekstrak akar *Chlorophytum brovillianum* baik konsentrasi rendah maupun tinggi yang dikombinasikan dengan induksi H_2O_2 200 μM selama inkubasi 2 jam mampu memberikan pengaruh

signifikan terhadap motilitas, di mana pemberian ekstrak mampu melindungi spermatozoa dari kerusakan akibat H_2O_2 .

Perbedaan tersebut diduga berkaitan dengan konsentrasi H_2O_2 yang diberikan kurang menjadikan sumber radikal bebas, sehingga kombinasi alfalfa 6% dan H_2O_2 10 μM belum mampu memberikan efek protektif yang optimal terhadap motilitas spermatozoa. Menurut Bouayed dan Bohn (2010), pemberian antioksidan dari bahan alami pada konsentrasi tinggi dapat memberikan efek merugikan apabila jumlah ROS dalam sel relatif rendah, karena keseimbangan redoks terganggu sehingga antioksidan justru berperan sebagai pro-oksidan dan meningkatkan akumulasi ROS.

Pola yang berbeda juga pada kombinasi lainnya, ketika konsentrasi H_2O_2 dinaikkan menjadi 50 μM . Pada perlakuan E1H2 rerata penurunan motilitas justru paling rendah diseluruh perlakuan yaitu sebesar 4,08% dibandingkan pada perlakuan E1H0 sebesar 9,87% maupun E1H1 sebesar 11,23%. Nilai tersebut mengindikasikan bahwa pemberian ekstrak alfalfa konsentrasi 2% yang dikombinasikan dengan H_2O_2 konsentrasi tinggi justru memberikan efek protektif paling optimal dalam mempertahankan motilitas spermatozoa.

Temuan tersebut sejalan dengan penelitian Takalani *et al.*, (2026) melaporkan bahwa pemberian ekstrak air teh putih dari *Camellia sinensis* juga mengandung senyawa polifenol yang mampu mempertahankan motilitas spermatozoa pada konsentrasi rendah setelah diinduksi kumena hidropersida. Hal ini relevan mengingat ekstrak alfalfa mengandung flavonoid yang merupakan bagian dari golongan senyawa polifenol, sehingga aktivitas ini menunjukkan

adanya efek protektif antioksidan dalam menekan ROS sehingga motilitas dapat bertahan setelah induksi stres oksidatif.

Rahman *et al.*, (2019) mengatakan bahwa antioksidan merupakan molekul yang dapat menekan proses oksidasi, sehingga mencegah terjadi stres oksidatif. Antioksidan membantu dalam meningkatkan sintesis antioksidan endogen melalui aktivasi jalur Nrf2 untuk memberikan perlindungan tambahan (Soewondo *et al.*, 2025). Dengan demikian, kandungan antioksidan pada ekstrak alfalfa konsentrasi rendah yang dikombinasikan dengan H_2O_2 50 μM mampu meningkatkan aktivitas sistem antioksidan spermatozoa sehingga pembentukan radikal bebas dapat ditekan dan motilitas spermatozoa tetap terjaga selama proses inkubasi.

Sementara itu, pada perlakuan E2H2 rerata penurunan motilitas sebesar 10,75%. Nilai tersebut meningkat dibandingkan E2H0 sebesar 7,97%, namun menurun jika dibandingkan dengan E2H1 sebesar 14,19%. Hasil ini menunjukkan bahwa pada konsentrasi alfalfa tinggi seiring peningkatan konsentrasi H_2O_2 dari 10 μM ke 50 μM tidak memperburuk kondisi sel secara berkelanjutan, melainkan memberikan perbaikan ringan meskipun efek protektifnya belum mencapai tingkat yang diperoleh pada kombinasi alfalfa konsentrasi rendah.

Hal tersebut diduga karena H_2O_2 pada konsentrasi tertentu juga dapat berperan mengaktifkan sistem antioksidan endogen spermatozoa. Menurut Pena *et al.*, (2019), H_2O_2 diketahui juga berperan dalam persinyalan redoks karena mampu mengoksidasi residu tertentu sehingga dapat mengatur aktivitas seluler secara *reversible* dan respon antioksidan endogen. Hal ini didukung oleh Evdokimov *et al.*, (2015) melaporkan bahwa pemberian H_2O_2 pada konsentrasi 10 μM dan 100 μM selama inkubasi 1 jam dapat meningkatkan kadar glutathione (GSH) sebagai

sistem antioksidan endogen spermatozoa serta meningkatkan aktivitas enzim glikolitik GAPDS.

Perbandingan seluruh kelompok perlakuan menunjukkan bahwa hubungan antara konsentrasi H_2O_2 dan ekstrak alfalfa terhadap motilitas spermatozoa bersifat tidak linier. Pada ekstrak alfalfa konsentrasi rendah (2%) seiring bertambahnya konsentrasi H_2O_2 dari 0 ke 10 μM justru sedikit meningkatkan penurunan motilitas pada perlakuan E1H0 sebesar 9,87% menjadi 11,23% pada perlakuan E1H1. Namun pada konsentrasi H_2O_2 50 μM penurunan motilitas turun menjadi nilai terendah pada perlakuan E1H2 sebesar 4,08%. Pola ini menunjukkan bahwa efek antioksidan pada alfalfa konsentrasi rendah tercapai pada H_2O_2 konsentrasi tinggi.

Sebaliknya, ekstrak alfalfa konsentrasi tinggi (6%) menunjukkan penurunan motilitas tertinggi ketika dikombinasikan dengan H_2O_2 10 μM . Hal ini ditunjukkan pada perlakuan E2H0 sebesar 7,97% menjadi 14,19% pada perlakuan E2H1, kemudian menurun pada perlakuan E2H2 sebesar 10,75% namun tetap lebih tinggi dibandingkan perlakuan alfalfa tunggal. Pola ini mengindikasikan bahwa pada konsentrasi ekstrak alfalfa 6%, keseimbangan redoks sel lebih sensitif terganggu pada rentang konsentrasi H_2O_2 tertentu. Sejalan dengan pernyataan Alharbi (2024) bahwa pemberian antioksidan secara berlebihan dapat memicu ketidakseimbangan redoks yang justru meningkatkan kondisi oksidatif dan berdampak negatif terhadap kualitas spermatozoa. Dalam kondisi fisiologis normal, spermatozoa membutuhkan keseimbangan antara pembentukan ROS dan kapasitas antioksidan untuk mempertahankan fungsi sel, sehingga apabila keseimbangan tersebut terganggu maka dapat menyebabkan kerusakan sel (De Luca et al., 2021; Pujiyanto et al., 2021; Simanjuntak & Zulham, 2020).

Dengan demikian, mekanisme aktivasi antioksidan oleh H_2O_2 ini terjadi pada kedua kombinasi baik E1H2 maupun E2H2, namun hasilnya berbeda. Pada perlakuan E1H2, ekstrak alfalfa konsentrasi rendah mekanisme keduanya bekerja sinergis, sehingga penurunan motilitas paling rendah. Pada perlakuan E2H2, ekstrak alfalfa konsentrasi tinggi justru membebani sel, sehingga aktivasi antioksidan oleh H_2O_2 tidak cukup untuk mengimbangi beban tersebut. Pernyataan tersebut didukung oleh Seddiki & Moreira da Silva (2017) menyatakan bahwa senyawa antioksidan berupa flavonoid menunjukkan aktivitas protektif yang efektif pada konsentrasi rendah, namun berpotensi sitotoksitas pada konsentrasi tinggi.

Data hasil penurunan motilitas spermatozoa yang diperoleh diatas kemudian dianalisis secara statistik menggunakan ANOVA faktorial untuk mengetahui signifikansinya (Tabel 4.2).

Tabel 4. 2 Hasil Uji ANOVA faktorial Pengaruh Kombinasi Ekstrak Etanol 70% Alfalfa dengan Induksi H_2O_2 Terhadap Motilitas Spermatozoa *Mus musculus* Secara *In Vitro*

SK	DB	JK	KT	Fhitung	F 5%
E	2	43.96	21.979	0.374	3.55
H	2	49.99	24.994	0.425	3.55
E*H	4	129.54	32.385	0.550	2.93
Galat	18	1058.92	58.829		

Hasil uji ANOVA faktorial pada tabel 4.2 tersebut menunjukkan bahwa perlakuan yang diberi ekstrak alfalfa tunggal (konsentrasi 2% maupun 6%), H_2O_2 tunggal (konsentrasi $10\mu M$ maupun $50\mu M$), atau interaksi antara keduanya tidak berpengaruh signifikan terhadap penurunan motilitas spermatozoa. Hal ini ditunjukkan oleh nilai F_{hitung} lebih rendah dibandingkan F_{tabel} . Tidak adanya pengaruh signifikan pada ketiga faktor tersebut diduga karena konsentrasi H_2O_2 yang diberikan tidak melebihi $50\mu M$ dengan waktu inkubasi hanya 30 menit, sehingga

tekanan oksidatif yang terbentuk belum cukup optimal untuk menghasilkan perbedaan respons motilitas yang nyata antar kelompok perlakuan.

Menurut De Castro *et al.*, (2016) melaporkan bahwa pemberian H_2O_2 50 μM mampu meningkatkan penurunan motilitas spermatozoa setelah inkubasi 1 jam. Sementara itu, Mahfouz *et al.*, (2010) juga melaporkan bahwa H_2O_2 konsentrasi tinggi (100mM) selama 15 menit dapat meningkatkan produksi ROS. Oleh karena itu, konsentrasi dan waktu inkubasi H_2O_2 pada penelitian ini diduga belum cukup menyebabkan tekanan oksidatif yang berdampak nyata terhadap motilitas spermatozoa, meskipun secara deskriptif tetap terlihat variasi rerata penurunan motilitas antar kelompok perlakuan, seperti pada kombinasi E1H2 penurunan motilitas yang paling rendah dan E2H1 yang paling tinggi.

4.2 Pengaruh Ekstrak Etanol 70% Alfalfa dengan Induksi H_2O_2 Terhadap Viabilitas Spermatozoa *Mus musculus* Secara *In Vitro*

Viabilitas merupakan indikator kemampuan hidup spermatozoa yang mencerminkan integritas membran sel dan kestabilan fisiologisnya. Menurut Setionio dkk., (2022) pengukuran viabilitas ini merupakan indikator kemampuan hidup sel yang mencerminkan integritas membran plasma. Pengukuran viabilitas biasanya dilakukan dengan metode penyerapan warna eosin nigrosin, karena spermatozoa dengan membran yang rusak akan lebih mudah menyerap warna. Pada pengamatan mikroskopik, spermatozoa yang masih hidup terlihat kepala transparan sedangkan spermatozoa yang mati berwarna gelap sehingga dapat membedakan kondisi hidup dan mati sel dengan jelas. Hal ini terlihat pada (Gambar 4.1).



Gambar 4. 1 Hasil Pengamatan Viabilitas Spermatozoa menggunakan mikroskop cahaya pada perbesaran 400x dengan pewarnaan eosin nigrosin. (a) sperma hidup, (b) sperma mati.

Hasil pengamatan yang di peroleh dalam penelitian ini menunjukkan adanya penurunan rerata viabilitas pada masing-masing perlakuan, dari waktu 0 menit sampai setelah inkubasi 30 menit (Tabel 4.3).

Tabel 4. 3 Rerata Pengaruh Ekstrak Etanol 70% Alfalfa dengan Induksi H_2O_2 Terhadap Viabilitas Spermatozoa *Mus musculus* Secara *In Vitro*

Perlakuan	Rerata penurunan (%) $\pm$ SD
E0H0	12.10 $\pm$ 4.65
E0H1	9.82 $\pm$ 10.54
E0H2	11.47 $\pm$ 9.53
E1H0	21.94 $\pm$ 4.48
E1H1	16.47 $\pm$ 12.38
E1H2	5.69 $\pm$ 3.23
E2H0	18.12 $\pm$ 5.88
E2H1	12.90 $\pm$ 2.74
E2H2	26.65 $\pm$ 0.83

Nilai rerata pada tabel 4.3 diperoleh dari selisih rerata persentase viabilitas spermatozoa dari waktu 0 menit ke 30 menit pada setiap perlakuan. Selisih tersebut menunjukkan penurunan viabilitas spermatozoa setelah inkubasi selama 30 menit. Semakin kecil penurunan viabilitas yang diperoleh, maka semakin baik

kemampuan perlakuan dalam mempertahankan motilitas spermatozoa, begitu sebaliknya.

Rerata penurunan viabilitas, baik pada perlakuan tunggal maupun dikombinasikan dengan H₂O₂ dan yang tidak diberi perlakuan yaitu kelompok kontrol, menunjukkan rerata persentase yang berbeda. Pada kelompok kontrol tanpa perlakuan E0H0 menunjukkan rerata penurunan viabilitas lebih tinggi sebesar 12%. Nilai ini menunjukkan bahwa rerata persentase viabilitas spermatozoa masih dapat dipertahankan oleh sperma selama inkubasi 30 menit, sehingga sebagai acuan dalam menilai perubahan viabilitas akibat pemberian ekstrak alfalfa dan H₂O₂.

Spermatozoa ketika diberi ekstrak alfalfa secara tunggal tanpa induksi H₂O₂, menunjukkan rerata penurunan viabilitas spermatozoa mencit meningkat dibandingkan kontrol. Perlakuan E1H0 menunjukkan penurunan viabilitas spermatozoa sebesar 21,94%, kemudian menurun pada perlakuan E2H0 sebesar 18,12%. Kedua nilai tersebut lebih tinggi dibandingkan kontrol E0H0 (12,10%). Hasil tersebut mengindikasikan bahwa pemberian ekstrak alfalfa tunggal belum memberikan efek protektif yang optimal terhadap viabilitas spermatozoa, meskipun pada konsentrasi yang lebih tinggi 6% penurunan yang terjadi sedikit lebih rendah dibandingkan konsentrasi 2%. Temuan ini sejalan dengan Phankhio *et al.*, (2025) melaporkan bahwa pemberian ekstrak daun *Paederia foetida* yang diketahui mengandung senyawa flavonoid dan fenolik, baik pada konsentrasi rendah maupun tinggi, pemberian ekstrak belum mampu memberikan efek protektif yang optimal terhadap viabilitas spermatozoa selama inkubasi.

Menurut Subani (2014) pemberian ekstrak pada konsentrasi tinggi dapat menimbulkan efek pro-oksidan sehingga terjadi ketidakseimbangan antara senyawa

antioksidan dan oksidan di dalam sel spermatozoa, yang menyebabkan menurunnya daya hidup spermatozoa. Peningkatan penurunan viabilitas spermatozoa diduga berkaitan dengan kandungan senyawa aktif yang terdapat di dalam ekstrak alfalfa. Aitken *et al.*, (2016) mengatakan bahwa senyawa polifenol dapat menstimulasi aktivitas pro-oksidan pada kondisi tertentu.

Sementara itu, ketika spermatozoa mencit diberi H_2O_2 secara tunggal menunjukkan rerata penurunan viabilitas menurun dibandingkan kelompok kontrol E0H0, baik pada konsentrasi rendah 10 μM maupun tinggi 50 μM dengan rerata persentase penurunan pada E0H1 sebesar 9,82% kemudian meningkat pada perlakuan E0H2 sebesar 11,47%. Nilai tersebut mengindikasikan bahwa peningkatan konsentrasi H_2O_2 dari 10 μM ke 50 μM cenderung meningkatkan penurunan viabilitas spermatozoa, meskipun keduanya masih berada dibawah nilai kontrol E0H0 (12,10%). Hal ini menunjukkan bahwa ROS yang terbentuk belum menyebabkan kerusakan membran spermatozoa secara berlebihan, sehingga respon spermatozoa mencit terhadap viabilitas masih dapat ditoleransi. Berbeda dengan penelitian Garg *et al.*, (2009) melaporkan bahwa pemberian H_2O_2 konsentrasi 50 μM sudah mampu menunjukkan menurunnya viabilitas spermatozoa kerbau dari tingginya kadar MDA dibandingkan pada konsentrasi rendah.

Hal tersebut didukung oleh Pujiyanto *et al.*, (2021) melaporkan bahwa paparan H_2O_2 250 μM dapat menyebabkan penurunan viabilitas spermatozoa manusia setelah diinkubasi 2 jam, sedangkan konsentrasi H_2O_2 10-100 μM masih dapat mengaktifkan sistem pertahanan sel. Sejalan dengan itu Chaki (2002) melaporkan bahwa paparan H_2O_2 konsentrasi rendah belum menyebabkan kerusakan spermatozoa dan efek yang ditimbulkan bersifat *reversible*. Namun,

peningkatan konsentrasi H_2O_2 yang lebih tinggi dapat menginduksi kerusakan sel. Perbedaan respons tersebut menunjukkan bahwa sensitivitas spermatozoa terhadap H_2O_2 dapat dipengaruhi oleh kondisi sel dan kemampuan spermatozoa dalam mentoleransi stres oksidatif

Konsentrasi H_2O_2 yang diberikan pada penelitian ini tidak melebihi 50 μM dengan waktu inkubasi hanya 30 menit, sehingga diduga masih berada dalam batas toleransi oleh sel. Hal ini berbeda dengan penelitian Mahfouz *et al.*, (2010) melaporkan bahwa induksi H_2O_2 100 μM selama 15 menit inkubasi sudah dapat menurunkan viabilitas spermatozoa melalui peningkatan jumlah sel mati, sehingga dampaknya langsung menurunkan viabilitas sperma. Dengan demikian, rendahnya penurunan viabilitas spermatozoa pada penelitian ini dipengaruhi oleh perbedaan konsentrasi serta respon spermatozoa terhadap produksi ROS.

Pola yang berbeda terlihat ketika ekstrak alfalfa dikombinasikan dengan H_2O_2 pada konsentrasi rendah. Perlakuan E1H1 menunjukkan penurunan viabilitas menurun sebesar 16,47% dibandingkan E1H0 sebesar 21,94%. Pola serupa juga terlihat pada E2H1 dengan penurunan viabilitas menurun sebesar 12,90% dibandingkan E2H0 sebesar 18,12%. Hasil ini menunjukkan bahwa kehadiran H_2O_2 konsentrasi rendah menunjukkan kecenderungan memberikan efek protektif terhadap viabilitas spermatozoa mencit dibandingkan pemberian alfalfa secara tunggal.

Kondisi ini diduga berkaitan dengan kemampuan H_2O_2 konsentrasi rendah dalam mengaktifkan antioksidan endogen spermatozoa melalui mekanisme persinyalan redoks (Pena *et al.*, 2019). Evdokimov *et al.*, (2015) melaporkan bahwa pemberian H_2O_2 pada konsentrasi 10 μM dan 100 μM selama inkubasi dapat

meningkatkan kadar glutathione (GSH) sebagai sistem antioksidan endogen spermatozoa serta meningkatkan aktivitas enzim glikolitik GAPDS. Dengan demikian, pada konsentrasi H₂O₂ rendah, antioksidan eksogen dari alfalfa dan aktivasi pertahanan endogen sel bekerja saling melengkapi pada kedua konsentrasi alfalfa.

Pola yang berlawanan justru muncul ketika konsentrasi H₂O₂ dinaikkan menjadi 50 μ M. Pada ekstrak alfalfa 2% + H₂O₂ 50 μ M (E1H2), penurunan viabilitas justru semakin menurun menjadi 5,69%, nilai ini paling rendah di seluruh perlakuan. Hasil tersebut mengindikasikan bahwa keberadaan H₂O₂ konsentrasi tinggi justru mendukung efektivitas ekstrak alfalfa 2%, sehingga kombinasi ini bekerja sinergis dan menghasilkan penurunan viabilitas paling rendah dalam mempertahankan kualitas spermatozoa selama inkubasi 30 menit. Temuan ini sejalan dengan penelitian Sreelatha & Padma (2011) melaporkan bahwa senyawa antioksidan flavonoid dari ekstrak tumbuhan *Moringa oleifera* pada konsentrasi rendah yang diinduksi bersamaan dengan H₂O₂ 200 μ M mampu menekan pembentukan ROS dengan menghambat peroksidasi, sehingga mampu memberikan perlindungan kembali terhadap viabilitas spermatozoa.

Hal tersebut relevan dengan ekstrak alfalfa yang juga mengandung senyawa antioksidan berupa flavonoid, saponin, tanin, dan fitoestrogen yang pemberiannya mampu bekerja secara simultan pada berbagai jalur perlindungan sel sehingga memberikan manfaat untuk daya hidup spermatozoa (Widyaningrum dkk., 2024). Sebagaimana dalam Q.S. Asy-Syu'ara ayat 7:

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

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 (2014) orang-orang kafir berpaling dari memikirkan tanda-tanda kekuasaan Allah dan bukti-bukti yang dapat disaksikan, lantas Allah berfirman “اولم يروا الى الارض كم انتبتا فيها من كل زوج كريم” apakah mereka tidak melihat ke bumi yang telah Allah ciptakan dan tumbuhkan di bumi itu berbagai macam tumbuh-tumbuhan dan buah-buahan yang banyak manfaatnya. Mereka dengan hal itu dapat bukti keagungan kuasa Allah dan dahsyatnya kekuasaan-Nya, bahwa Allah ada dan Esa lagi Mahakuasa terhadap segala sesuatu untuk memberikan petunjuk kepada kaum dan lainnya.

Menurut Quraaisy Sihab (2002) dalam tafsir Al-Misbah kata “كريم” memiliki makna menggambarkan segala sesuatu yang baik bagi setiap objek yang disifatinya. Tumbuhan yang baik maka yang subur dan bermanfaat. Pendapat ini diperkuat oleh Asy-Syaukani (1964) dalam Tafsir Fathul Qadir yang diterjemahkan oleh Fachruddin & Saefullah (2008) makna kata “الزوج” disini adalah bermacam-macam atau ragam, sedangkan kata “كريم” adalah baik. Makna dari kata tersebut adalah berbagai macam tumbuhan yang bermanfaat tidak ada yang mampu menumbuhkannya kecuali Tuhan Semesta alam.

Ayat diatas memiliki makna bahwa tumbuhan yang diciptakan Allah tidak hanya indah secara bentuk dan warna, tetapi juga memiliki manfaat bagi kehidupan. Sejalan dengan hal tersebut, pemberian antioksidan alami yang berasal dari ekstrak alfalfa juga dapat memberikan manfaat berupa efek positif terhadap viabilitas spermatozoa. Hal ini menunjukkan bahwa setiap tumbuhan yang tumbuh di bumi

memiliki tujuan dan manfaat yang jelas yang telah ditentukan. Tumbuhan yang diciptakan ini sudah secara terukur, baik bentuk maupun unsur-unsurnya sehingga manfaat yang diberikan berbeda-beda begitupun juga karakteristik yang dimiliki berbeda. Hal ini diperkuat oleh firman Allah SWT dalam Q.S Al-Hijr ayat 19 berbunyi:

وَالْأَرْضَ مَدَدْنَاهَا وَأَلْقَيْنَا 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 “وَأَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ شَيْءٍ مَّوْزُونٍ” 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 “مَّوْزُونٍ” 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 oleh Allah SWT telah berada dalam kondisi yang terukur, yaitu dalam keadaan yang tepat dan sesuai dengan ketentuan-Nya. Dalam suatu tumbuhan, Allah menetapkan manfaat didalamnya sehingga menghasilkan fungsi biologis yang dapat menunjang kehidupan. Adanya manfaat ini mendorong manusia untuk melakukan kajian ilmiah lebih lanjut guna mengidentifikasi serta memahami peran fisiologis dari masing-masing tumbuhan. Peran fisiologis pada ekstrak alfalfa dalam penelitian ini, diketahui memberikan manfaat sebagai sumber antioksidan alami yang kaya akan flavonoid dan polifenol.

Senyawa tersebut bekerja dengan menangkal radikal bebas sehingga mampu mempertahankan daya hidup spermatozoa (Darni dkk., 2016). Hal ini diperkuat oleh Sari *et al.*, (2023) bahwa penambahan antioksidan mampu menekan peroksidasi lipid melalui penghambatan proses oksidasi pada fase inisiasi maupun propagasi, di mana radikal turunan antioksidan memiliki stabilitas yang lebih tinggi dari pada radikal lipid, sehingga reaksi berantai terhenti dan pembentukan radikal lipid baru dapat dicegah. Sreelatha & Padma (2011) juga menambahkan bahwa pemberian ekstrak tumbuhan mampu meningkatkan aktivitas enzim antioksidan sehingga membantu memperkuat sistem pertahanan sel dalam menghadapi stres oksidatif. Dengan demikian, senyawa yang terkandung dalam ekstrak alfalfa diduga mampu memberikan perlindungan terhadap viabilitas spermatozoa melalui dua cara yaitu, menekan pembentukan ROS dan meningkatkan aktivitas enzim antioksidan ketika dikombinasikan H_2O_2 50 μM selama inkubasi.

Sebaliknya, pada ekstrak alfalfa 6% + H_2O_2 50 μM (E2H2), penurunan viabilitas mengalami kenaikan sebesar 26,65%. Hal ini diduga oleh tingginya tekanan ROS yang dihasilkan oleh H_2O_2 50 μM , sehingga melebihi kemampuan

senyawa antioksidan dalam ekstrak alfalfa 6% untuk menetralsirnya. Karunakaran *et al.*, (2012) menyatakan bahwa H_2O_2 mampu menginduksi peroksidasi lipid pada membran spermatozoa bergantung konsentrasi yang diberikan. Peningkatan peroksidasi lipid ini berkontribusi terhadap kerusakan membran sel sehingga berdampak pada penurunan viabilitas.

Konsentrasi ekstrak alfalfa 6% yang diberikan dalam perlakuan E2H2 diduga telah melampaui ambang batas protektif antioksidan. Akibatnya, keseimbangan redoks terganggu dan senyawa antioksidan pada kondisi normal bersifat protektif justru berpotensi menjadi prooksidan sehingga akumulasi ROS semakin meningkat. Hal ini didukung oleh penelitian Biagi *et al.*, (2019) melaporkan bahwa pemberian ekstrak daun *Castanea sativa* pada konsentrasi tinggi tidak efektif memberikan perlindungan terhadap viabilitas spermatozoa yang diinduksi H_2O_2 100 μM karena kadar MDA tidak mampu ditekan oleh senyawa antioksidan yang terkandung. Biagi *et al.*, (2019) juga menjelaskan bahwa hal ini berkaitan senyawa flavonoid dan polifenol yang pada konsentrasi tinggi justru dapat bersifat toksik terhadap sel spermatozoa. Hal tersebut sejalan dengan pernyataan Kanner (2020) bahwa pemberian polifenol pada konsentrasi tinggi dapat menunjukkan jalur pro-oksidatif yang bersifat sitotoksik sehingga berpotensi meningkatkan pembentukan ROS.

Perbandingan rerata penurunan viabilitas spermatozoa secara keseluruhan terhadap seluruh kelompok perlakuan menunjukkan bahwa hubungan antara konsentrasi H_2O_2 dan ekstrak alfalfa tidak linear serta berbeda arah pada dua konsentrasi alfalfa yang diuji. Pada alfalfa konsentrasi rendah (2%), peningkatan konsentrasi H_2O_2 dari 0 hingga 50 μM secara konsisten meningkatkan efek

protektif, terlihat dari penurunan viabilitas yang terus mengecil (21,94% pada E1H0; 16,47% pada E1H1; 5,69% pada E1H2). Pola ini mengindikasikan bahwa kapasitas antioksidan alfalfa konsentrasi rendah rendah belum terlampaui meskipun H_2O_2 dinaikkan hingga 50 μM , sehingga aktivasi pertahanan endogen oleh H_2O_2 dan kerja antioksidan eksogen dari alfalfa tetap bersinergi pada seluruh rentang konsentrasi yang diuji.

Sebaliknya, pada alfalfa konsentrasi tinggi (6%), efek protektif hanya konsisten terlihat hingga H_2O_2 konsentrasi rendah 10 μM (18,12% pada E2H0 menjadi 12,90% pada E2H1), namun berbanding terbalik menjadi penurunan viabilitas tertinggi pada H_2O_2 konsentrasi tinggi 50 μM (26,65% pada E2H2). Pola respons yang tidak linier ini menunjukkan bahwa pada kombinasi ekstrak alfalfa konsentrasi tinggi dengan H_2O_2 konsentrasi tinggi, efek perlindungan terhadap spermatozoa mencapai batas maksimal terhadap kapasitas protektif sel. Sejalan dengan pernyataan Dutta *et al.*, (2022) bahwa aktivitas antioksidan tidak selalu memberikan efek protektif yang menguntungkan, karena efektivitasnya juga dipengaruhi oleh konsentrasi yang digunakan.

Dalam kondisi ROS yang tinggi akibat H_2O_2 , kemampuan antioksidan untuk menetralkan ROS dapat terlampaui sehingga justru memperparah kerusakan sel. Paparan H_2O_2 dapat mengganggu keseimbangan homeostasis redoks sel spermatozoa, sehingga ketika sistem pertahanan antioksidan tidak berfungsi secara optimal, terjadi akumulasi radikal bebas yang menyerang komponen sel. Kondisi ini menyebabkan disfungsi sel yang pada akhirnya berujung pada kematian sel (Kurhaluk *et al.*, 2025; Dutta *et al.*, 2019; Yu *et al.*, 2025). Dengan demikian, perbedaan respons antara konsentrasi alfalfa 2% dan 6% terhadap peningkatan

konsentrasi H_2O_2 menegaskan bahwa efektivitas ekstrak alfalfa berbeda tergantung konsentrasi yang digunakan, baik terhadap konsentrasinya ekstrak itu sendiri maupun terhadap besarnya tekanan oksidatif yang diberikan

Data rerata penurunan viabilitas spermatozoa tersebut kemudian dianalisis secara statistik menggunakan ANOVA faktorial untuk mengetahui signifikansinya pada (Tabel 4.4).

Tabel 4. 4 Hasil Uji ANOVA faktorial Pengaruh Ekstrak Etanol 70% Alfalfa dengan Induksi H_2O_2 Terhadap Viabilitas Spermatozoa *Mus musculus* Secara *In Vitro*

SK	DB	JK	KT	Fhitung	F 5%
E	2	259.16	129.578	2.591	3.55
H	2	68.87	34.434	0.688	3.55
E*H	4	631.27	157.818	3.155	2.93
Galat	18	900.35	50.019		

Hasil Uji ANOVA faktorial pada tabel 4.4 tersebut menunjukkan bahwa faktor ekstrak alfalfa tunggal baik konsentrasi 2% maupun 6% menunjukkan nilai F_{hitung} lebih kecil daripada F_{tabel} . Begitu juga induksi H_2O_2 secara tunggal baik konsentrasi 10 μM dan 50 μM menunjukkan nilai F_{hitung} lebih kecil daripada F_{tabel} . Hasil menunjukkan bahwa kedua faktor perlakuan secara tunggal tidak berpengaruh signifikan terhadap viabilitas spermatozoa. Tidak berpengaruh pada perlakuan tunggal H_2O_2 diduga karena konsentrasi H_2O_2 yang diberikan pada penelitian ini tidak melebihi 50 μM , sehingga belum bisa menyebabkan sumber radikal bebas atau ROS yang terbentuk belum cukup menyebabkan kematian sel. Hal ini didukung oleh Chaki (2002) yang melaporkan bahwa paparan H_2O_2 pada konsentrasi dibawah 50 μM belum menyebabkan kerusakan spermatozoa dan efek yang ditimbulkan masih bersifat *reversible*. Sementara itu, tidak berpengaruhnya pemberian ekstrak alfalfa tunggal diduga kondisi sel belum mengalami tekanan

oksidatif, sehingga kandungan antioksidan ekstrak alfalfa belum mampu memberikan respons perlindungan yang konsisten dan terukur terhadap viabilitas spermatozoa. Hal ini sejalan dengan Phankhieo *et al.*, (2025) yang melaporkan bahwa pemberian ekstrak yang mengandung flavonoid dan fenolik baik pada konsentrasi rendah maupun tinggi belum mampu memberikan efek protektif yang optimal terhadap viabilitas spermatozoa.

Berbeda dengan perlakuan tunggal, interaksi antara ekstrak alfalfa dengan H_2O_2 menunjukkan nilai F_{hitung} lebih besar daripada F_{tabel} , sehingga terdapat pengaruh interaksi yang signifikan terhadap viabilitas spermatozoa. Pengaruh signifikan ini terlihat dari respons antar kombinasi konsentrasi. Pada kombinasi ekstrak alfalfa 2% dengan H_2O_2 50 μM (E1H2), penurunan viabilitas spermatozoa justru paling rendah di antara seluruh perlakuan sebesar 5,69%. Hal ini menunjukkan bahwa pada konsentrasi ekstrak alfalfa rendah, kehadiran H_2O_2 konsentrasi tinggi turut mendukung respons redoks protektif sel. Menurut Pena *et al.*, (2019) pemberian H_2O_2 pada konsentrasi rendah justru berperan mengaktifkan sistem antioksidan endogen spermatozoa melalui mekanisme persinyalan redoks.

Sebaliknya, kombinasi ekstrak alfalfa 6% dengan H_2O_2 50 μM (E2H2) menghasilkan penurunan viabilitas spermatozoa tertinggi sebesar 26,65%. Hal ini menunjukkan bahwa antioksidan ekstrak alfalfa yang diberikan pada tekanan oksidatif akibat H_2O_2 konsentrasi tinggi diduga melampaui ambang batas protektif antioksidan sehingga keseimbangan redoks terganggu dan senyawa antioksidan justru berpotensi menjadi prooksidan. Hal ini sesuai dengan pernyataan Kanner (2020) bahwa pemberian senyawa antioksidan pada konsentrasi tinggi dapat

menunjukkan jalur pro-oksidatif yang bersifat sitotoksik sehingga berpotensi meningkatkan pembentukan ROS.

Selanjutnya, hasil berpengaruh signifikan tersebut dilakukan uji lanjut untuk mengetahui adanya perbedaan antar perlakuan. Uji ini digunakan karena nilai koefisien kergama (KK) diketahui lebih dari 10%, sehingga uji Duncan dinilai sesuai untuk membandingkan perbedaan antar perlakuan pada (Tabel 4.5).

Tabel 4. 5 Hasil Uji Duncan Pengaruh Ekstrak Etanol 70% Alfalfa dengan Induksi H_2O_2 Terhadap Viabilitas Spermatozoa *Mus musculus* Secara *In Vitro*

Perlakuan	Rerata (%) $\pm$ SD
E1H2	5.69 ± 3.23^a
E0H2	11.47 ± 9.53^{ab}
E0H1	11.48 ± 10.54^{ab}
E0H0	12.10 ± 4.65^{ab}
E2H1	12.90 ± 2.74^{ab}
E1H1	16.47 ± 12.38^{bc}
E2H0	18.12 ± 5.88^{bc}
E1H0	21.94 ± 4.48^c
E2H2	26.65 ± 0.83^c

Keterangan: notasi dengan huruf yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan nyata pada taraf 5%.

Hasil Uji Duncan pada tabel 4. 5 terdapat perbedaan pola penurunan viabilitas spermatozoa antar perlakuan setelah inkubasi selama 30 menit. Perlakuan E1H2, menunjukkan tidak berbeda nyata pengaruhnya dengan perlakuan E0H2, E0H1, E0H0, dan E2H. Namun perlakuan E1H2 berbeda nyata pengaruhnya dengan perlakuan E1H1, E2H0, E1H0, dan E2H2. Perlakuan E0H2, E0H1, E0H0, dan E2H1 menunjukkan tidak berbeda nyata satu sama lain dan juga tidak berbeda nyata pengaruhnya dengan perlakuan E1H1 dan E2H0. Namun, berbeda nyata dengan perlakuan E1H0 dan E2H2. Pemberian kombinasi ekstrak alfalfa dengan H_2O_2 yang memberikan pengaruh terendah dalam menurunkan viabilitas spermatozoa mencit yaitu pada perlakuan E1H2, dengan rerata penurunan viabilitas

spermatozoa sebesar 5,69%, sehingga perlakuan ini paling efektif dalam mempertahankan viabilitas spermatozoa selama inkubasi 30 menit.

4.3 Pengaruh Ekstrak Etanol 70% Alfalfa dengan Induksi H_2O_2 Terhadap Integritas Membran Spermatozoa *Mus musculus* Secara *In Vitro*

Integritas membran merupakan salah satu indikator penting kualitas spermatozoa karena mencerminkan kemampuan membran plasma dalam mempertahankan fungsi fisiologis sel. Membran plasma yang utuh berperan dalam metabolisme spermatozoa, reaksi akrosom, serta penetrasi spermatozoa pada kumulus oophorus oosit. Kerusakan membran plasma dapat mengurangi fungsi spermatozoa karena berkurangnya komponen seluler dan inaktivasi protein penting, yang pada akhirnya menurunkan fertilitas sel (Parera *et al.*, 2023). Uji integritas membran spermatozoa mencit dilakukan dengan metode HOST yang dapat dilihat pada (Gambar 4.2).



Gambar 4. 2 Hasil Pengamatan Integritas Membran menggunakan mikroskop cahaya pada perbesaran 400x dengan uji HOST. (a) Membran plasma rusak, (b) Membran plasma utuh.

Hasil pengamatan pada gambar 4.2 menunjukkan bahwa spermatozoa mencit yang ditandai huruf (a) menunjukkan membran plasma rusak yang ditandai dengan ekor tetap lurus tanpa perubahan bentuk. Sebaliknya, pada huruf (b) ekor spermatozoa mengalami pembengkokan yang menandakan membran plasma utuh.

Menurut penelitian Parera *et al.*, (2023) menyatakan bahwa spermatozoa akan bereaksi dengan larutan hiposmotik karena larutan tersebut bergerak masuk kedalam sel melalui membran plasma akibat perbedaan tekanan osmotik. Masuknya larutan ini menyebabkan sel membengkak pada bagian ekor. Sebaliknya, spermatozoa yang membrane plasmanya rusak tidak menunjukkan pembengkakan atau perubahan bentuk ekor karena struktur dan fungsi membran telah terganggu.

Membran plasma terganggu karena pengaruh kombinasi ekstrak etanol 70% alfalfa dengan induksi H₂O₂ mengalami perubahan terhadap integritas membran spermatozoa. Perubahan tersebut disebabkan oleh H₂O₂ yang memicu produksi ROS, sehingga merusak struktur membran sel spermatozoa yang dapat dilihat dari nilai rerata integritas membran pada (tabel 4.6).

Tabel 4. 6 Rerata Pengaruh Ekstrak Etanol 70% Alfalfa dengan Induksi H₂O₂ Terhadap Integritas Membran Spermatozoa *Mus musculus* Secara *In Vitro*

Perlakuan	Rerata (%) $\pm$ SD
E0H0	24.03 $\pm$ 4.89
E0H1	18.25 $\pm$ 2.41
E0H2	14.30 $\pm$ 2.26
E1H0	17.35 $\pm$ 3.93
E1H1	12.79 $\pm$ 1.53
E1H2	9.49 $\pm$ 2.04
E2H0	13.02 $\pm$ 1.90
E2H1	11.65 $\pm$ 3.38
E2H2	11.57 $\pm$ 3.00

Rerata persentase integritas membran pada tabel 4.6 menunjukkan adanya perbedaan antara kelompok kontrol, perlakuan ekstrak alfalfa tunggal, H₂O₂ tunggal, maupun perlakuan kombinasi keduanya. Pada kelompok kontrol tanpa perlakuan (E0H0) memiliki nilai integritas membran tertinggi sebesar 24,03%

dibandingkan perlakuan lainnya. Hasil tersebut menunjukkan bahwa pada kelompok kontrol spermatozoa masih mampu mempertahankan keutuhan membrannya dengan baik. Namun demikian, nilai integritas yang diperoleh masih tergolong rendah dan belum mencapai kondisi optimal. Menurut Nugroho (2018) rerata integritas membran yang berada di bawah 60% mengindikasikan bahwa sebagian besar spermatozoa telah mengalami kerusakan membran sehingga fungsi sel menjadi terganggu.

Kerusakan membran dapat disebabkan oleh proses inkubasi yang dapat meningkatkan produksi radikal bebas yang berbahaya. Membran plasma spermatozoa kayak akan asam lemak tak jenuh ganda sehingga sangat rentan bereaksi dengan radikal bebas. Peningkatan radikal bebas selama inkubasi dapat memicu terjadinya peroksidasi lipid sehingga menyebabkan kerusakan pada membran plasma spermatozoa (Yusrina dkk., 2018). Temuan ini sejalan dengan penelitian Luzardin dkk., (2020) melaporkan bahwa integritas membran mengalami penurunan ketika bertambahnya waktu inkubasi. Penurunan integritas membran ini disebabkan akibat terganggunya metabolisme sel spermatozoa sehingga membran plasma tidak mampu mempertahankan fungsinya secara optimal.

Pemberian ekstrak alfalfa tunggal tanpa induksi H_2O_2 menunjukkan rerata integritas membran spermatozoa menurun dibandingkan kelompok kontrol. Hal ini terlihat pada perlakuan E1H0 rerata integritas membran sebesar 17,35%, kemudian menurun pada perlakuan E2H0 sebesar 13,02%. Meskipun perlakuan E1H0 memiliki rerata lebih tinggi dibanding E2H0, kedua perlakuan tersebut tetap menunjukkan integritas membran yang lebih rendah daripada kontrol E0H0 (24,03%). Hasil ini mengindikasikan bahwa peningkatan konsentrasi ekstrak alfalfa

tidak memberikan perlindungan yang lebih baik terhadap integritas membran seiring bertambahnya konsentrasi, melainkan diduga belum optimalnya kemampuan senyawa antioksidan dalam ekstrak alfalfa untuk menahan kerusakan akibat radikal bebas selama inkubasi.

Temuan tersebut sejalan dengan penelitian Zhang *et al.*, (2024) melaporkan bahwa pemberian ekstrak pucilagin yang juga mengandung senyawa antioksidan seperti polifenol sebagai sumber antioksidan menunjukkan integritas membran spermatozoa menurun seiring bertambahnya konsentrasi. Hal ini mengindikasikan bahwa konsentrasi antioksidan yang diberikan tidak selalu memberikan efek protektif terhadap spermatozoa, tetapi juga berpotensi menimbulkan prooksidan, sehingga menyebabkan terganggunya fungsi akrosom serta menurunkan kestabilan membran spermatozoa.

Pernyataan Akbar (2010) juga mengatakan bahwa menurunnya integritas membran spermatozoa dapat dipengaruhi oleh kandungan saponin dan alkaloid yang terdapat dalam tanaman alfalfa. Senyawa tersebut dapat berinteraksi dengan komponen penyusun membran spermatozoa yang terdiri atas lipid dan protein. Kadar saponin yang berlebihan berpotensi mengganggu susunan lipid bilayer membran sehingga menyebabkan fungsi membran menjadi kurang optimal dalam mempertahankan kestabilan sel. Loetjettanarom *et al.*, (2025) menyatakan bahwa pemberian ekstrak dari bahan alam jika belum menunjukkan efek protektif yang optimal terhadap integritas membran spermatozoa, maka terjadi ketidakseimbangan antara antioksidan dan radikal bebas.

Peningkatan ROS secara berlebihan dapat memicu kerusakan membran sel, sehingga pemberian antioksidan dari bahan alami belum mampu memberikan

perlindungan terhadap membran spermatozoa (Loetjettanarom *et al.*, 2025). Kondisi ini sejalan dengan pernyataan Moustakli *et al.*, (2025) bahwa gangguan homeostasis redoks akibat pemberian antioksidan yang tidak sesuai dapat memicu kondisi *reductive stress* yang mengganggu fungsi mitokondria dan jalur persinyalan sel yang sensitif terhadap perubahan redoks. Dengan demikian, pemberian ekstrak alfalfa secara tunggal belum mampu memberikan perlindungan yang optimal terhadap integritas membran spermatozoa karena efektivitas antioksidan tidak hanya ditentukan oleh konsentrasi yang diberikan tetapi juga kemampuannya dalam menjaga keseimbangan homeostasis redoks sel spermatozoa.

Sementara itu, ketika spermatozoa mencit diinduksi H_2O_2 sebagai sumber radikal bebas menunjukkan bahwa paparan ROS dari H_2O_2 dapat menurunkan integritas membran spermatozoa. Pada perlakuan H_2O_2 secara tunggal menunjukkan rerata integritas membrane yang lebih rendah dibandingkan kontrol. Hal ini terlihat pada perlakuan E0H1 menunjukkan rerata integritas membrae sebesar 18,25%, kemudian menurun ketika konsentrasinya ditingkatkan pada perlakuan E0H2 sebesar 14,30%. Hasil ini mengindikasikan bahwa semakin tinggi konsentrasi H_2O_2 yang diberikan secara tunggal, semakin menurun integritas membran spermatozoa yang terjadi. Hal ini didukung oleh penelitian Nosrat *et al.*, (2025) melaporkan bahwa pemberian H_2O_2 pada konsentrasi yang tepat secara signifikan menyebabkan integritas membran spermatozoa menurun akibat tingginya kadar ROS yang memicu kerusakan membran plasma spermatozoa, sehingga metabolisme energi spermatozoa terganggu.

Selain itu, Naseer *et al.*, (2025) juga melaporkan bahwa pemberian H_2O_2 seiring bertambahnya konsentrasi memberikan efek merugikan terhadap fungsi

sperma akibat peningkatan stres oksidatif. Hal ini karena membran spermatozoa menjadi target utama ROS karena memiliki kandungan asam lemak tak jenuh ganda yang tinggi sehingga rentan mengalami peroksidasi lipid. Peroksidasi lipid akibat induksi H_2O_2 dapat menyebabkan kerusakan pada membran plasma sehingga integritas membrannya menurun (Subani, 2014). Hal ini didukung oleh Chaki (2002) yang menyatakan bahwa paparan H_2O_2 dapat menginduksi stres oksidatif spermatozoa melalui peningkatan ROS secara berlebih, yang selanjutnya memperparah kerusakan komponen membran plasma sehingga permeabilitas dan stabilitas membran spermatozoa terganggu. Dengan demikian, induksi H_2O_2 secara tunggal terbukti menyebabkan rendahnya integritas membran plasma spermatozoa melalui mekanisme peroksidasi lipid yang bergantung pada konsentrasi yang diberikan.

Berbeda dengan perlakuan tunggal, ketika ekstrak alfalfa dikombinasikan dengan H_2O_2 pada konsentrasi rendah, integritas membran justru menurun dibandingkan perlakuan alfalfa tunggal pada kedua tingkat konsentrasi. Perlakuan E1H1 rerata integritas membran menurun sebesar 12,97% dibandingkan perlakuan E1H0 sebesar 17,35%. Pola serupa terlihat pada E2H1 dengan rerata lebih rendah sebesar 11,65% dibandingkan perlakuan E2H0 sebesar 13,02%. Hasil ini mengindikasikan bahwa penambahan H_2O_2 pada konsentrasi rendah, integritas membran menurun pada kedua konsentrasi ekstrak alfalfa yang diberikan karena kandungan ekstrak alfalfa belum mampu memberikan perlindungan yang optimal terhadap tekanan oksidatif tambahan yang ditimbulkan H_2O_2 .

Hal tersebut didukung oleh penelitian Eskandari & Momeni (2016) yang melaporkan bahwa pemberian antioksidan silymarin yang dikombinasikan dengan

sodium arsenite selama inkubasi tetap menunjukkan penurunan integritas membran dibandingkan perlakuan antioksidan tunggal. Hasil tersebut mengindikasikan bahwa keberadaan agen penginduksi radikal bebas tetap menyebabkan penurunan integritas membran meskipun telah diberikan antioksidan.

Disisi yang lain, ketika ekstrak alfalfa dikombinasikan dengan H_2O_2 konsentrasi tinggi menunjukkan rerata integritas membran menurun di antara seluruh perlakuan. Hal ini terlihat pada perlakuan E1H2 nilai rerata integritas membran sebesar 9,49%. Nilai ini mengindikasikan bahwa penambahan ekstrak alfalfa konsentrasi rendah pada kondisi tekanan oksidatif tinggi tidak memberikan efek protektif, melainkan justru memperparah rendahnya jumlah integritas membran spermatozoa. Hasil tersebut berbanding terbalik dengan hasil yang diperoleh pada parameter viabilitas dan motilitas bahwa kombinasi perlakuan E1H2 justru menunjukkan hasil terbaik.

Hal ini didukung oleh penelitian Moreira et al. (2022) yang melaporkan bahwa antioksidan hiperosida dalam ekstrak *Castanea sativa* pada konsentrasi rendah yang dikombinasikan dengan H_2O_2 300 μM juga tidak mampu mencegah kerusakan membran spermatozoa, sehingga tekanan oksidatif H_2O_2 tetap memberikan dampak negatif terhadap integritas membran meskipun antioksidan telah ditambahkan. Dengan demikian, pada konsentrasi antioksidan yang rendah, kapasitas penetralan ROS diduga belum mencukupi untuk mengimbangi tekanan oksidatif yang tinggi akibat H_2O_2 , sehingga ROS yang terakumulasi memicu peroksidasi lipid pada membran plasma spermatozoa dan menyebabkan penurunan integritas membran yang lebih besar dibandingkan perlakuan lainnya.

Sementara itu, pada perlakuan E2H2 rerata integritas membran sebesar 11,57% sedikit menurun dibandingkan E2H1 sebesar 11,65% namun lebih tinggi dibandingkan E1H2 sebesar 9,49%. Hasil ini menunjukkan bahwa pada konsentrasi alfalfa tinggi, peningkatan konsentrasi H₂O₂ dari 10 µM ke 50 µM hampir tidak mengubah tingkat kerusakan membran, sehingga diduga kapasitas antioksidan ekstrak alfalfa konsentrasi tinggi sudah mencapai batas kejenuhannya terhadap kerusakan membran. Berbeda dengan alfalfa konsentrasi 2% yang justru mengalami rerata paling rendah terhadap integritas membran pada konsentrasi H₂O₂ yang sama. Sejalan dengan temuan Phankhieo *et al.*, (2025) melaporkan bahwa ekstrak tumbuhan pada konsentrasi tinggi tidak hanya gagal meningkatkan kualitas spermatozoa, tetapi juga dapat berubah menjadi prooksidan yang menurunkan kualitas spermatozoa. Kondisi ini menyebabkan kerusakan membran karena pemberian antioksidan eksogen sudah berada di titik jenuh, sehingga peningkatan konsentrasi H₂O₂ tidak banyak memperburuk kondisi sel yang telah terganggu.

Hasil rerata integritas membran spermatozoa yang diperoleh, kemudian dianalisis secara statistik menggunakan uji ANOVA faktorial untuk mengetahui signifikansinya (Tabel 4.7).

Tabel 4. 7 Hasil Uji ANOVA faktorial Pengaruh Ekstrak Etanol 70% Alfalfa dengan Induksi H₂O₂ Terhadap Integritas Membran Spermatozoa *Mus musculus* Secara *In Vitro*

SK	DB	JK	KT	Fhitung	F 5%
E	2	237.59	118.794	13.234	3.55
H	2	184.55	92.277	10.28	3.55
E*H	4	56.72	14.179	1.58	2.93
Galat	18	161.58	8.976		

Berdasarkan hasil uji ANOVA faktorial pada tabel 4.7 menunjukkan bahwa faktor ekstrak alfalfa tunggal, baik konsentrasi 2% dan 6% berpengaruh signifikan terhadap integritas membran spermatozoa, ditunjukkan oleh nilai F_{hitung} lebih besar daripada F_{tabel} . Pengaruh signifikan ini diduga karena perbedaan konsentrasi ekstrak memengaruhi kemampuan antioksidan dalam menjaga keseimbangan redoks sel, sehingga efektivitasnya terhadap integritas membran bergantung pada konsentrasi yang diberikan. Hal ini sejalan dengan Zhang et al. (2024) yang melaporkan bahwa pemberian ekstrak yang mengandung polifenol menunjukkan perubahan integritas membran seiring bertambahnya konsentrasi.

Demikian pula, faktor H_2O_2 tunggal baik pada konsentrasi 10 μM dan 50 μM juga berpengaruh signifikan terhadap integritas membran spermatozoa, ditunjukkan nilai F_{hitung} lebih besar dari F_{tabel} . Pengaruh signifikan ini diduga karena peningkatan konsentrasi H_2O_2 secara langsung meningkatkan produksi ROS sehingga memicu kerusakan membran sel yang berdampak pada integritas membran. Hal ini didukung oleh Nosrat et al. (2025) yang melaporkan bahwa pemberian H_2O_2 secara signifikan menyebabkan integritas membran menurun melalui peningkatan ROS yang merusak membran plasma. Oleh karena itu, semakin tinggi konsentrasi H_2O_2 yang diberikan, semakin besar pula kerusakan yang ditimbulkan terhadap integritas membran.

Berbeda dengan kedua faktor tunggal tersebut, interaksi antara konsentrasi ekstrak alfalfa dengan H_2O_2 tidak menunjukkan pengaruh yang signifikan terhadap integritas membran spermatozoa, ditunjukkan dengan nilai F_{hitung} lebih kecil dari F_{tabel} . Hasil ini mengindikasikan bahwa kedua faktor bekerja secara independen dalam memengaruhi integritas membran, tanpa saling memperkuat maupun

melemahkan efek satu sama lain. Tidak adanya interaksi yang signifikan ini diduga karena ekstrak alfalfa, pada kondisi tekanan oksidatif yang ditimbulkan H_2O_2 , belum mampu memberikan respons perlindungan tambahan yang cukup terhadap membran plasma spermatozoa sehingga tekanan oksidatif H_2O_2 tetap mendominasi kerusakan yang terjadi terlepas dari konsentrasi alfalfa yang diberikan. Hal ini didukung oleh Moreira et al. (2022) yang melaporkan bahwa antioksidan konsentrasi rendah yang dikombinasikan dengan H_2O_2 tidak mampu mencegah kerusakan membran spermatozoa. Selain itu, Eskandari dan Momeni (2016) juga melaporkan bahwa kombinasi antioksidan dengan agen penginduksi radikal bebas tetap menyebabkan integritas membran menurun karena keberadaan agen oksidatif tetap berdampak negatif meskipun antioksidan telah diberikan.

Selanjutnya, uji lanjut Duncan dilakukan pada faktor yang berpengaruh signifikan yaitu ekstrak alfalfa dan induksi H_2O_2 secara tunggal. Uji Duncan dipilih karena nilai koefisien keragaman (KK) yang diperoleh lebih dari 10%, sehingga dinilai sesuai untuk membandingkan perbedaan antar perlakuan pada (Tabel 4.8).

Tabel 4. 8 Hasil Uji Duncan Pengaruh Ekstrak Etanol 70% Alfalfa dan Diinduksi H_2O_2 Terhadap Integritas Membran Spermatozoa *Mus musculus* Secara *In Vitro*

Perlakuan	Rerata (%) $\pm$ SD
E0	18.86 ± 5.16^a
E1	13.21 ± 4.15^b
E2	12.08 ± 3.00^b
H0	18.13 ± 5.82^a
H1	14.23 ± 3.77^b
H2	11.79 ± 2.99^b

Keterangan: notasi dengan huruf yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan nyata pada taraf 5%.

Hasil Uji Duncan pada tabel 4.5 menunjukkan bahwa perlakuan kontrol tanpa pemberian ekstrak alfalfa (E0) merupakan rerata gabungan dari perlakuan

E0H0, E0H1, dan E0H2 memiliki rerata integritas membran tertinggi sebesar 18,86% yang ditandai dengan notasi a, sehingga berbeda nyata dengan perlakuan ekstrak alfalfa konsentrasi 2% (E1) dan 6% (E2). Perlakuan (E1) terdiri atas gabungan perlakuan E1H0, E1H1, dan E1H2, sedangkan pada perlakuan (E2) terdiri atas gabungan perlakuan E2H0, E2H1, dan E2H2. Kedua perlakuan E1 dan E2 tidak menunjukkan perbedaan satu sama lain. Perbedaan tersebut menunjukkan bahwa pemberian ekstrak alfalfa seiring bertambahnya konsentrasi yang diberikan cenderung menurunkan integritas membran spermatozoa dibandingkan tanpa pemberian ekstrak.

Sementara itu, perlakuan kontrol tanpa H_2O_2 (H0) merupakan rerata gabungan dari perlakuan E0H0, E1H0, dan E2H0 menunjukkan rerata integritas membran spermatozoa tertinggi sebesar 18,13% yang ditandai dengan notasi a, sehingga terdapat perbedaan dengan perlakuan induksi H_2O_2 10 μ M (H1) dan 50 μ M (H2). Perlakuan (H1) terdiri atas gabungan perlakuan E0H1, E1H1, dan E2H1, sedangkan pada perlakuan (H2) merupakan gabungan perlakuan E0H2, E1H2, dan E2H2, namun kedua perlakuan H1 dan H2 tidak menunjukkan perbedaan satu sama lain. Hasil tersebut menunjukkan bahwa induksi H_2O_2 seiring bertambahnya konsentrasi yang diberikan menyebabkan penurunan integritas membran spermatozoa akibat peningkatan ROS yang memicu kerusakan membran plasma spermatozoa.

BAB V PENUTUP

5.3 Kesimpulan

Kesimpulan yang diperoleh dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Ekstrak etanol 70% alfalfa secara tunggal tidak berpengaruh terhadap motilitas dan viabilitas spermatozoa *Mus musculus* secara *in vitro*, namun berpengaruh terhadap integritas membran.
2. Induksi H₂O₂ secara tunggal tidak berpengaruh terhadap motilitas dan viabilitas spermatozoa *Mus musculus* secara *in vitro*, namun berpengaruh terhadap integritas membran.
3. Terdapat interaksi antara ekstrak etanol 70% alfalfa dengan induksi H₂O₂ terhadap viabilitas spermatozoa, namun ekstrak etanol 70% alfalfa dengan induksi H₂O₂ tidak berinteraksi terhadap motilitas dan integritas membran spermatozoa *Mus musculus* secara *in vitro*.

5.4 Saran

Saran dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Perlu dilakukan penelitian lanjutan menggunakan satu konsentrasi H₂O₂ yang lebih tinggi sebagai sumber radikal bebas, karena pada penelitian ini dua tingkat konsentrasi H₂O₂ (10 µM dan 50 µM) belum optimal menurunkan kualitas spermatozoa secara *in vitro*.
2. Perlu dilakukan penelitian lanjutan dengan pengujian parameter stres oksidatif, seperti kadar MDA untuk mengetahui tingkat peroksidasi lipid membran spermatozoa akibat paparan ROS yang diinduksi H₂O₂.

3. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut menggunakan jenis pengencer yang berbeda untuk mengetahui media yang paling optimal dalam mempertahankan kualitas spermatozoa selama perlakuan secara *in vitro*.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdallah, F.B., Zribi, N., & Ammar-Keskes, L. 2011. Antioxidative potential of Quercetin against hydrogen peroxide induced oxidative stress in spermatozoa in vitro. *Andrologia*, 43(4): 261-265.
- Abdollahi, M., & Hosseini, A. 2014. Hydrogen peroxide. *Encyclopedia of toxicology*, 2: 967-970.
- 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.
- Afifah, N., Riyanta, A. B., & Amananti, W. 2023. Pengaruh waktu maserasi terhadap hasil skrining fitokimia pada ekstrak daun mangga harum manis (*Mangifera indica* l.). *Jurnal Crystal: Publikasi Penelitian Kimia dan Terapannya*, 5(1): 54-61.
- Aitken, R. J., Muscio, L., Whiting, S., Connaughton, H. S., Fraser, B. A., Nixon, B., ... & De Iuliis, G. N. 2016. Analysis of the effects of polyphenols on human spermatozoa reveals unexpected impacts on mitochondrial membrane potential, oxidative stress and DNA integrity; implications for assisted reproductive technology. *Biochemical pharmacology*, 121, 78-96.
- Akbar, A. (2010). Tumbuhan Dengan Kandungan Senyawa Aktif Yang Berpotensi Sebagai Bahan Antifertilitas. Jakarta: Adabia Press
- Alahmar, A. T. 2019. Role of oxidative stress in male infertility: an updated review. *Journal of human reproductive sciences*, 12(1): 4-18.
- Alharbi, M. 2024. Impact of antioxidants on conventional and advanced sperm function parameters: an updated review. *Cureus*, 16(2), e54253.
- Alqawasmeh, O. A., Zhao, M., Chan, C. P., Leung, M. B., Chow, K. C., Agarwal, N., ... & Chan, D. Y. (2021). Green tea extract as a cryoprotectant additive to preserve the motility and DNA integrity of human spermatozoa. *Asian journal of andrology*, 23(2): 150-156.
- Al-Qurthubi, S.I. 2009. *Tafsir Al-Qurthubi atau Al Jami' li Ahkaam Al Qur'an: Jilid 11*. Jakarta: Pustaka Azzam
- Amaral, A. 2022. Energy metabolism in mammalian sperm motility. *WIREs mechanisms of disease*, 14(5): e1569.
- Andriani, D., & Murtisiwi, L. 2020. Uji aktivitas antioksidan ekstrak etanol 70% bunga telang (*Clitoria ternatea* L) dari daerah sleman dengan metode DPPH. *Pharmacon: Jurnal Farmasi Indonesia*, 17(1): 70-76.
- Aprioku, J. S. 2013. Pharmacology of free radicals and the impact of reactive oxygen species on the testis. *Journal of reproduction & infertility*, 14(4): 158-172.
- 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.
- Ash-Shiddieqy, T.M.H. 2000. *Tafsir Al-Qur'anul Majid An-Nuur: Jilid 3*. Semarang: Pustaka Rizki Putra.
- Ash-Shiddieqy, T.M.H. 2000. *Tafsir Al-Qur'anul Majid An-Nuur: Jilid 4*. Semarang: Pustaka Rizki Putra.

- Asy-Syaukani. 2008. *Fathul Qadir (Al Jami' baina Ar-Riwayah wa Ad-Dirayah min ilm Al-Tafsir): Jilid 8*. Jakarta: Pustaka Azzam.
- Asy-Syaukani. 2008. *Fathul Qadir (Al Jami' baina Ar-Riwayah wa Ad-Dirayah min ilm Al-Tafsir): Jilid 7*. Jakarta: Pustaka Azzam.
- Aydemir, B., Onaran, İ., Alici, B., Kızıler, A. R., Cinemre, F. B., & Gürol, G. 2014. Relationships Between Levels of Reactive Oxygen Species in Spermatozoa and GSTM1 Polymorphism in Infertile Men. *Journal of Applied Biological Sciences*, 8(2), 39-43.
- Ayunda, R. D., & Malita, S. 2024. Pemanfaatan Senyawa Flavonoid sebagai Antioksidan pada Penderita Hiperkolesterolemia: Studi Literatur. *Jurnal Kedokteran (Unram Medical Journal)*, 13(3): 177-187.
- Az-Zhuhaili, W. 2014. *Tafsir Al-Munir: Jilid 10*. Jakarta: Gema Insani.
- Az-Zhuhaili, W. 2014. *Tafsir Al-Munir: Jilid 11*. Jakarta: Gema Insani.
- Az-Zhuhaili, W. 2014. *Tafsir Al-Munir: Jilid 13*. Jakarta: Gema Insani.
- Az-Zhuhaili, W. 2014. *Tafsir Al-Munir: Jilid 8*. Jakarta: Gema Insani.
- Bader, R., Ibrahim, J. N., Moussa, M., Mourad, A., Azoury, J., Azoury, J., & Alaaeddine, N. 2019. In vitro effect of autologous platelet-rich plasma on H2O2-induced oxidative stress in human spermatozoa. *Andrology*, 8(1): 191-200.
- 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.
- 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. *Jurnal Nukleus Peternakan*, 7(2): 109-117.
- Biagi, M., Noto, D., Corsini, M., Baini, G., Cerretani, D., Cappellucci, G., & Moretti, E. 2019. Antioxidant effect of the Castanea sativa Mill. leaf extract on oxidative stress induced upon human spermatozoa. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019(1), 8926075.
- Bouayed, J., & Bohn, T. 2010. Exogenous antioxidants—Double-edged swords in cellular redox state: Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 3(4), 228-237.
- 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.
- Busing, W. R., & Levy, H. A. 1965. Crystal and Molecular Structure of Hydrogen peroxide: A Neutron-Diffraction Study. *The Journal of chemical physics*, 42(9): 3054-3059.
- Chaki, S. P., & Misro, M. M. 2002. Assessment of human sperm function after hydrogen peroxide exposure: development of a vaginal contraceptive. *Contraception*, 66(3), 187-192.
- Creasy, D. M., & Chapin, R. E. 2018. *Fundamentals of toxicologic pathology* (3rd ed., pp. 459–516).

- Darni, J., Tjahjono, K., & Sofro, M. A. U. 2016. Pengaruh pemberian ekstrak daun Alfalfa (*Medicago sativa*) terhadap profil lipid dan kadar malondialdehida tikus hiperkolesterolemia. *Jurnal Gizi Klinik Indonesia*, 13(2), 51-58.
- De Castro, L. S., De Assis, P. M., Siqueira, A. F., Hamilton, T. R., Mendes, C. M., Losano, J. D., ... & Assumpção, M. E. 2016. Sperm oxidative stress is detrimental to embryo development: a dose-dependent study model and a new and more sensitive oxidative status evaluation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016(1), 8213071.
- De Luca, M. N., Colone, M., Gambioli, R., Stringaro, A., & Unfer, V. 2021. Oxidative stress and male fertility: role of antioxidants and inositols. *Antioxidants*, 10(8), 1283.
- Dewangga, M. W., Nasihun, T., & Isradji, I. 2020. Dampak olahraga berlebihan terhadap kualitas sperma. *Jurnal Penelitian Kesehatan "Suara Forikes"*, 12(1): 58-61.
- Duca, G., & Travin, S. 2020. Reactions' mechanisms and applications of hydrogen peroxide. *American Journal of Physical Chemistry*, 9(2): 36-44.
- 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.
- Dutta, S., Sengupta, P., Roychoudhury, S., Chakravarthi, S., Wang, C. W., & Slama, P. 2022. Antioxidant paradox in male infertility: 'A blind eye' on inflammation. *Antioxidants*, 11(1), 167.
- El-Khawagah, A. R., Kandiel, M. M., & Samir, H. 2020. Effect of quercetin supplementation in extender on sperm kinematics, extracellular enzymes release, and oxidative stress of egyptian buffalo bulls frozen-thawed semen. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, 604460.
- Erdogan, M. A., Bayar, C., Ozkaya, E., Metin, A., Birim, D., Armagan, G., ... & Cebe, G. E. 2022. Neuroprotective effects of different *Lavandula stoechas* L. extracts against hydrogen peroxide toxicity in vitro. *International Journal of Pharmacology*, 18(5): 883-896.
- Eskandari, F., & Momeni, H. R. (2016). Silymarin protects plasma membrane and acrosome integrity in sperm treated with sodium arsenite. *International Journal of Reproductive BioMedicine*, 14(1), 47.
- Evdokimov, V. V., Barinova, K. V., Turovetskii, V. B., Muronetz, V. I., & Schmalhausen, E. V. 2015. Low concentrations of hydrogen peroxide activate the antioxidant defense system in human sperm cells. *Biochemistry (Moscow)*, 80(9), 1178-1185.
- Fauziyah, R., Widyasanti, A., & Rosalinda, S. 2022. Perbedaan Metode Ekstraksi terhadap Kadar Sisa Pelarut dan Rendemen Total Ekstrak Bunga Telang (*Clitoria ternatea* L.). *Kimia Padjadjaran*, 1(1): 18-25.
- Fitria, L., Mulyati, T. C., & Budi, A. S. 2015. Profil reproduksi jantan tikus (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769) galur wistar stadia muda, pradewasa, dan dewasa. *J Biol Papua*, 7(1), 29-36.
- Fuadatin, D. R., & Hariani, D. (2024). Penambahan Filtrat Kelopak Rosella (*Hibiscus sabdariffa*) dalam Pengencer Tris Kuning Telur pada Semen Beku Kambing Kaligesing. *LenteraBio: Berkala Ilmiah Biologi*, 13(2): 308-317.
- Gang, G., Gao, R., Li, R., Jin, X., Xing, Y., Yan, S., ... & Shi, B. 2025. Study on the Regulatory Effect of Water Extract of *Artemisia annua* L. on

- Antioxidant Function of Mutton Sheep via the Keap1/Nrf2 Signaling Pathway. *Antioxidants*, 14(7): 1-20.
- Gao, Z., Huang, K., & Xu, H. 2001. Protective effects of flavonoids in the roots of *Scutellaria baicalensis* Georgi against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in HS-SY5Y cells. *Pharmacological research*, 43(2), 173-178.
- Garg, A., Kumaresan, A., & Ansari, M. R. 2009. Effects of hydrogen peroxide (H₂O₂) on fresh and cryopreserved buffalo sperm functions during incubation at 37 C in vitro. *Reproduction in domestic animals*, 44(6): 907-912.
- Garner, D. L., & Hafez, E. S. E. 2000. Spermatozoa and seminal plasma. *Reproduction in farm animals*, 96-109.
- Gena, M. G. G., Foeh, N. D., & Gaina, C. D. (2021). Ekstrak etanol daun kelor (*Moringa oleifera* Lam.) sebagai antioksidan dalam pengencer semen babi Landrace berbasis air buah lontar. *Jurnal Veteriner Nusantara*, 4(1), 8-8.
- Griswold, M. D. 2016. Spermatogenesis: the commitment to meiosis. *Physiological reviews*, 96(1): 1-17.
- Hakim, A. R., & Saputri, R. 2020. Narrative review: Optimasi etanol sebagai pelarut senyawa flavonoid dan fenolik. *Jurnal Surya Medika (JSM)*, 6(1), 177-180.
- Handajani, F. (2021). Metode pemilihan dan pembuatan hewan model beberapa penyakit pada penelitian eksperimental. Sidoarjo: Zifatama Jawara, 51-62.
- 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.
- 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.
- Hayati, A., Mangkoewidjojo, S., Hinting, A., & Moeljopawiro, S. 2006. Hubungan kadar mda sperma dengan integritas membran spermatozoa tikus (*Rattus norvegicus*) setelah pemaparan 2-methoxyethanol. *Berkala Penelitian Hayati*, 11(2), 151-154.
- Hong, Y. H., Wang, S. C., Hsu, C., Lin, B. F., Kuo, Y. H., & Huang, C. J. 2011. Phytoestrogenic compounds in alfalfa sprout (*Medicago sativa*) beyond coumestrol. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(1): 131-137.
- 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): 1-12.
- Hossain, M. S., Johannisson, A., Wallgren, M., Nagy, S., Siqueira, A. P., & Rodriguez-Martinez, H. 2011. Flow cytometry for the assessment of animal sperm integrity and functionality: state of the art. *Asian journal of andrology*, 13(3), 406.
- Hunek, A.D., Szymanek, M., Matwijczuk, A., Leszczyński, N., Niemczynowicz, A., & Myśliwa-Kurdziel, B. 2022. Impact of electromagnetic stimulation on the mechanical and photophysical properties of alfalfa leaves. *Scientific Reports*, 12(1): 16687.

- Hussein, J. S. 2013. Cell membrane fatty acids and health. *Int J Pharm Pharm Sci*, 5(3), 38-46.
- Iqbal, S., Naz, S., Bhutta, M. F., Sufyan, A., & Awan, M. A. (2022). Antioxidant effect of Moringa olifera leaves extract in extender improves post-thaw quality, kinematics, lipid peroxidation, total antioxidant capacity and fertility of water buffalo bull semen. *Andrologia*, 54(1), e14300.
- Iskandar, A.I., Anwar, A., Mansyur, M., Achmad, D., Alfian., & Lawrence, G. 2024. Perbandingan Mikroskopik Gambaran Bercak Makroskopik Sperma Dan Berdasarkan Karakteristik Objek Kain Sesuai Dengan Waktu Pengambilan. *Al-Iqra Medical Journal: Jurnal Berkala Ilmiah Kedokteran*, 7(2): 34-45.
- Jomova, K., Alomar, S. Y., Alwasel, S. H., Nepovimova, E., Kuca, K., & Valko, M. 2024. Several lines of antioxidant defense against oxidative stress: antioxidant enzymes, nanomaterials with multiple enzyme-mimicking activities, and low-molecular-weight antioxidants. *Archives of toxicology*, 98(5), 1323-1367.
- Juan, C. A., Pérez de la Lastra, J. M., Plou, F. J., & Pérez-Lebeña, E. 2021. The chemistry of reactive oxygen species (ROS) revisited: outlining their role in biological macromolecules (DNA, lipids and proteins) and induced pathologies. *International journal of molecular sciences*, 22(9): 1-21.
- Kaltsas, A. (2023). Oxidative stress and male infertility: the protective role of antioxidants. *Medicina*, 59(10): 1-28.
- Kanner, J. 2020. Polyphenols by generating H₂O₂, affect cell redox signaling, inhibit PTPs and activate Nrf2 axis for adaptation and cell surviving: in vitro, in vivo and human health. *Antioxidants*, 9(9), 797.
- Karunakaran, M., Devanathan, T. G., Kulasekar, K., Sridevi, P., Pon Jawahar, T., Loganatahsamy, K., ... & Selvaraju, S. 2012. Effect of heparin binding protein and hydrogen peroxide on lipid peroxidation status of bovine sperm cells. *Indian Journal of Animal Sciences*, 82(9), 976.
- Kowalczyk, A. 2022. The role of the natural antioxidant mechanism in sperm cells. *Reproductive Sciences*, 29(5): 1387-1394.
- Kumbhare, S. D., Ukey, S. S., & Gogle, D. P. 2023. Antioxidant activity of *Flemingia praecox* and *Mucuna pruriens* and their implications for male fertility improvement. *Scientific Reports*, 13(1), 19360.
- Kurhaluk, N., Kamiński, P., & Tkaczenko, H. 2025. Oxidative stress, antioxidants, gut microbiota and male fertility. *Cell Physiol Biochem*, 59(S2), 82-123.
- Laos, R., Marawali, A., Kune, P., Belli, H. L., & Uly, K. 2021. Pengaruh Penambahan Filtrat Rosella (*Hibiscus sabdariffa* Linn) Ke Dalam Pengencer Tris-Kuning Telur Terhadap Kualitas Spermatozoa Kambing Kacang. *Jurnal Nukleus Peternakan*, 8(2), 124-135.
- Lestari, S. A., Darmawan, D., & Rosadi, B. 2022. Toksisitas Gliserol Dan Kualitas Spermatozoa Sapi Bali Post Thawing. *Majalah Ilmiah Peternakan*, 25(2), 79-84.
- 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. *Jurnal Nukleus Peternakan*, 8(1), 23-32.

- 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: 1-22.
- Loetjettanarom, T., Authaida, S., Boonkum, W., & Chankitisakul, V. 2025. Effect of *Kaempferia parviflora* supplementation in semen extenders on post-thaw sperm quality in Thai native bulls. *Animals*, 15(7), 962.
- Luzardin, L., Saili, T., & Aku, A. S. 2020. Hubungan Lama Waktu Sexing Dengan Kualitas Spermatozoa Sapi Bali (*Bos sondaicus*) Pada Medium Sexing Tris-Kuning Telur. *Jurnal Ilmiah Peternakan Halu Oleo*, 2(1), 15-18.
- Maharadingga, M., Pahriyani, A., & Arista, D. (2021). Uji aktivitas ekstrak etanol 70% daun ketapang (*Terminalia catappa* L.) pada hamster Syrian jantan hiperglikemia dan hiperkolesterolemia dengan parameter pengukuran kolesterol total dan LDL. *Lumbung Farmasi: Jurnal Ilmu Kefarmasian*, 2(2), 80-88.
- Mahfouz, R. Z., du Plessis, S. S., Aziz, N., Sharma, R., Sabanegh, E., & Agarwal, A. 2010. Sperm viability, apoptosis, and intracellular reactive oxygen species levels in human spermatozoa before and after induction of oxidative stress. *Fertility and sterility*, 93(3), 814-821.
- Martinez, G. 2022. First-line evaluation of sperm parameters in mice (*Mus musculus*). *Bio-protocol*, 12(20), e4529-e4529.
- Maynou, R. J., & Yeste, M. 2020. Oxidative stress in male infertility: causes, effects in assisted reproductive techniques, and protective support of antioxidants. *Biology*, 9(4): 1-16.
- Medica, A. J., Swegen, A., Seifi-Jamadi, A., McIntosh, K., & Gibb, Z. 2025. Catalase in Unexpected Places: Revisiting H₂O₂ Detoxification Pathways in Stallion Spermatozoa. *Antioxidants*, 14(6), 718.
- Mishra, R., Nikam, A., Hiwarkar, J., Nandgude, T., Bayas, J., & Polshettiwar, S. 2024. Flavonoids as potential therapeutics in male reproductive disorders. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, 10(1): 100.
- Mumford, S. L., Kim, S., Chen, Z., Barr, D. B., & Louis, G. M. B. (2015). Urinary phytoestrogens are associated with subtle indicators of semen quality among male partners of couples desiring pregnancy. *The Journal of nutrition*, 145(11), 2535-2541.
- Mutiarahmi, C. N., Hartady, T., & Lesmana, R. (2021). Kajian Pustaka: Penggunaan Mencit sebagai hewan coba di laboratorium yang mengacu pada prinsip kesejahteraan hewan. *Jurnal Indonesia Medicus Veterinus*, 10(1), 134-145.
- Mondal, P., Maity, R., & Mallick, C. 2022. In vitro spermicidal effect of *Thevetia Peruviana* leaves on human spermatozoa. *Andrologia*, 54(2), e14323.
- Moreira, M. V., Pereira, S. C., Guerra-Carvalho, B., Carrageta, D. F., Pinto, S., Barros, A., ... & Alves, M. G. (2021). Hyperoside supplementation in preservation media surpasses vitamin C protection against oxidative stress-induced damages in human spermatozoa. *Cellular Physiology and Biochemistry*, vol. 56 (S1), p. 1-23.
- 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): 1-25.

- Moustakli, E., Christopoulos, P., Potiris, A., Zikopoulos, A., Matsas, A., Arkoulis, I., ... & Stavros, S. 2025. Reductive stress and the role of antioxidants in male infertility: a narrative review. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 312(5), 1503-1514.
- Naseer, Z., Ahmad, E., Aksoy, M., Küçük, N., Serin, I., Ceylan, A., ... & Kum, C. 2015. Protective effect of cholesterol-loaded cyclodextrin pretreatment against hydrogen peroxide induced oxidative damage in ram sperm. *Cryobiology*, 71(1), 18-23.
- Noor, M. S., Husaini, H., Putri, A. O., Rosadi, D., Anhar, V. Y., Laily, N., ... & Fatimah, H. 2020. *Buku Panduan Kesehatan Reproduksi Pada Remaja*. Yogyakarta: CV Mine.
- Nosrat, Z. F., Yari, S., Mahmoodi, B., & Hasanein, P. 2025. Effects of N-acetylcysteine on rat sperm treated with hydrogen peroxide in in vitro conditions. *Biotechnic & Histochemistry*, 100(5): 303-311.
- Novita, D., & Rahman, D. F. 2025. Penetapan kadar senyawa fenolik ekstrak etanol 70% daun pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* walp.) dengan metode folin-ciocalteu. *Journal Pharma Saintika*, 8(2), 19-26.
- 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.
- Nugroho, R.A. 2018. *Mengenal Mencit Sebagai Hewan Laboratorium*. Samarinda. Mulawarman University Press.
- Nurfitrih, N. J., & Tis'in, M. 2023. Pengaruh konsentrasi larutan madu dalam NaCl fisiologis terhadap motilitas dan viabilitas spermatozoa ikan koi (*Cyprinus carpio* L.). *Jurnal Trofish*, 2(1), 5-12.
- Nurhasnawati, H., Sukarmi, S., & Handayani, F. 2017. Perbandingan metode ekstraksi maserasi dan sokletasi terhadap aktivitas antioksidan ekstrak etanol daun jambu bol (*Syzygium malaccense* L.). *Jurnal Ilmiah Manuntung*, 3(1): 91-95.
- O'Flaherty, C., & Scarlata, E. 2022. Oxidative stress and reproductive function: The protection of mammalian spermatozoa against oxidative stress. *Reproduction*, 164(6), F67-F78.
- Octaviani, N. A. A., Utomo, B., Sunarso, A., Hamid, I. S., Madyawati, S. P., & Suprayogi, T. W. 2021. Pengaruh pemberian ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera* Lam.) terhadap motilitas dan viabilitas spermatozoa tikus (*Rattus norvegicus*) dengan paparan panas. *Ovozoa: Journal of Animal Reproduction*, 10(3), 2021-65.
- O'Flaherty, C. 2014. Peroxiredoxins: hidden players in the antioxidant defence of human spermatozoa. *Basic and Clinical Andrology*, 24(1), 4.
- Ofoedu, C. E., You, L., Osuji, C. M., Iwouno, J. O., Kabuo, N. O., Ojukwu, M., ... & Korzeniowska, M. 2021. Hydrogen peroxide effects on natural-sourced polysacchrides: free radical formation/production, degradation process, and reaction mechanism—a critical synopsis. *Foods*, 10(4): 1-33.
- Ogawa, Y., Takahashi, T., Kobayashi, T., Kariya, S., Nishioka, A., Mizobuchi, H., ... & Sonobe, H. 2003. Mechanism of hydrogen peroxide-induced apoptosis of the human osteosarcoma cell line HS-Os-1. *International journal of molecular medicine*, 12(4): 459-463.

- Owczarek-Wiktorowska, A., Berezinska, M., & Nowak, J. Z. 2015. PUFA: structures, metabolism and functions. *Adv Clin Exp Med*, 24(6), 931-941.
- Padmiswari, A. A. I. M., Wulansari, N. T., & Harditya, K. B. 2025. Pengaruh Pemberian Ekstrak Kombinasi Daun Pegagan (*Centella asiatica*) Dan Daun Mint (*Mentha arvensis*) Terhadap Jumlah Sel Testis Pada Mencit Jantan (*Mus musculus*). *Berita Biologi*, 24(2), 241-250.
- Pędziwiatr, P. 2018. Decomposition of hydrogen peroxide-kinetics and review of chosen catalysts. *Acta Innovations*, 26: 45-52.
- Pelokang, C. Y., Koneri, R., & Katili, D. 2018. Pemanfaatan Tumbuhan Obat Tradisional oleh Etnis Sangihe di Kepulauan Sangihe Bagian Selatan, Sulawesi Utara (The Usage of Traditional Medicinal Plants by Sangihe Ethnic in the Southern Sangihe Islands, North Sulawesi). *Jurnal Bios Logos*, 8(2): 45-51.
- Peña, F. J., O'Flaherty, C., Ortiz Rodríguez, J. M., Martín Cano, F. E., Gaitskell-Phillips, G. L., Gil, M. C., & Ortega Ferrusola, C. 2019. Redox regulation and oxidative stress: The particular case of the stallion spermatozoa. *Antioxidants*, 8(11), 567.
- Peris, S. I., Bilodeau, J. F., Dufour, M., & Bailey, J. L. 2007. Impact of cryopreservation and reactive oxygen species on DNA integrity, lipid peroxidation, and functional parameters in ram sperm. *Molecular reproduction and development*, 74(7): 878-892.
- Pham, A. N., Xing, G., Miller, C. J., & Waite, T. D. 2013. Fenton-like copper redox chemistry revisited: Hydrogen peroxide and superoxide mediation of copper-catalyzed oxidant production. *Journal of catalysis*, 301: 54-64.
- Phankhieo, S., Laoung-On, J., Quiggins, R., Nuchniyom, P., & Sudwan, P. 2025. Antioxidant activity of *Paederia foetida* Linn. leaf extract and its effect on bovine sperm quality. *Veterinary Sciences*, 12(8), 775.
- Prasetya, A. A. N. P. R., Ratnasari, P. M. D., & Ardianti, N. P. L. 2025. Aktivitas Analgesik Ekstrak Etanol 70% Kayu Secang (*Caesalpinia sappan* L.) pada Mencit Secara In Vivo. *Jurnal Mandala Pharmacon Indonesia*, 11(1): 66-76.
- Pujianto, D. A., Oktarina, M., & Sharaswati, I. A. S. 2021. Hydrogen peroxide has adverse effects on human sperm quality parameters, induces apoptosis, and reduces survival. *Journal of human reproductive sciences*, 14(2):121-128.
- Putra, Y. 2014. Pengaruh rokok terhadap jumlah sel spermatozoa mencit jantan (*Mus Musculus*, Strain Jepang). *Sainstek: Jurnal Sains dan Teknologi*, 6(1), 30-42.
- Raeeshzadeh, 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*, (1): 1-10.
- Rahman, M. S., Kang, K. H., Arifuzzaman, S., Pang, W. K., Ryu, D. Y., Song, W. H., ... & Pang, M. G. 2019. Effect of antioxidants on BPA-induced stress on sperm function in a mouse model. *Scientific reports*, 9(1): 10584.
- Rashki Ghaleno, L., Alizadeh, A., Drevet, J. R., Shahverdi, A., & Valojerdi, M. R. 2021. Oxidation of sperm DNA and male infertility. *Antioxidants*, 10(1), 1-15.

- Riasari, H., Fitriansyah, S. N., & Hoeriah, I. S. 2022. Perbandingan metode fermentasi, ekstraksi, dan kepolaran pelarut terhadap kadar total flavonoid dan steroid pada daun sukun (*Artocarpus altilis* (Parkinson) Fosberg). *Jurnal Sains dan Teknologi Farmasi Indonesia*, 11(1): 1-17.
- Rizal, S. 2020. Manfaat Alam Dan Tumbuhan Sumber Belajar Anak Dalam Perspektif Islam. *Childhood Education: Jurnal Pendidikan Anak Usia Dini*, 1(2): 96-107.
- Russo, A., Troncoso, N., Sanchez, F., Garbarino, J. A., & Vanella, A. 2006. Propolis protects human spermatozoa from DNA damage caused by benzo [a] pyrene and exogenous reactive oxygen species. *Life sciences*, 78(13): 1401-1406.
- Sadeghi, N., Boissonneault, G., Tavalae, M., & Nasr-Esfahani, M. H. 2023. Oxidative versus reductive stress: a delicate balance for sperm integrity. *Systems biology in reproductive medicine*, 69(1), 20-31.
- Saerang, S. H., Limanan, D., Yulianti, E., & Ferdinal, F. 2025. Analisis Fitokimia, Uji Fenolik Dan Total Antioksidan Ekstrak Biji Chia Metode Frap. *Jurnal Muara Medika dan Psikologi Klinis*, 5(1): 63-74.
- Sajimin. 2011. *Medicago sativa* L. (alfalfa) sebagai tanaman pakan ternak harapan di Indonesia. *J. Wartazoa*, 2(21): 91-98.
- Saputra, A. D. W., & Fahrudin, M. M. 2024. Ilmu Biologi Sel dan Studinya Sebagai Penyusun Makhluq Hidup: Bukti Kekuasaan Allah SWT dalam Ciptaan-Nya. *Es-Syajar: Journal of Islam, Science and Technology Integration*, 2(2), 198-208.
- Sari, N. M., Yuliani, G. A., Yimer, N., Hernawati, T., Herupradoto, E. B. A., & Hidayatik, N. 2023. Reddragon (*Hylocereus polyrhizus*) fruit peel extract increased the motility and viability of spermatozoa of hypercholesterolemic rats (*Rattus norvegicus*). *Ovozoa J. Anim. Reprod*, 12(1), 33-41.
- Sayyid, Q. (2001). *Tafsir Fi Zhilalil Qur'an: Jilid 15*. Jakarta: Gema Insanik.
- Seddiki, Y., da Silva, F. M., & da Silva, F. M. (2017). Antioxidant properties of polyphenols and their potential use in improvement of male fertility: a review. *Biomed J Sci Tech Res*, 1(3), 612-617.
- Sengupta, P., Dutta, S., & Irez, T. 2024. Oxidants and antioxidants in male reproduction: roles of oxidative and reductive stress. *J Integr Sci Technol*, 12(3): 753-753.
- 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.
- Shihab, M.Q. 2002. Tafsir al-Misbah: Pesan, Kesan dan Keserasian Al-Qu'ran. Jakarta: Lentera Hati.
- Signorini, C., Corsaro, R., Collodel, G., Maettner, R., Sterzik, K., Strehler, E., ... & Moretti, E. 2025. Addition of Chlorogenic Acid to Human Semen: Effects on Sperm Motility, DNA Integrity, Oxidative Stress, and Nrf2 Expression. *Antioxidants*, 14(4), 382.
- Signorini, C., Saso, L., Ghareghomi, S., Telkoparan-Akillilar, P., Collodel, G., & Moretti, E. 2024. Redox homeostasis and Nrf2-regulated mechanisms are relevant to male infertility. *Antioxidants*, 13(2), 193.

- Simanjuntak, E. J., & Zulham, Z. 2020. Superoksida Dismutase (SOD) dan radikal bebas. *Jurnal Keperawatan Dan Fisioterapi (Jkf)*, 2(2), 124-129.
- Soewondo, A., Rahayu, S., Marhendra, A. P. W., Paramita, N. S., & Winarso, A. R. J. 2025. Effect of Aqueous Basil Extract (*Ocimum sanctum*) on Monosodium Glutamate-Induced Mice Sperm. *Biotropika: Journal of Tropical Biology*, 13(2), 47-53.
- Solihati, N., Purwantara, B., Supriatna, I., & Winarto, A. (2013). Perkembangan sel-sel spermatogenik dan kualitas sperma pasca pemberian ekstrak pegagan (*Centella asiatica*). *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner*, 18(3), 192-201.
- Soufan, W., Okla, M. K., Salamatullah, A., Hayat, K., Abdel-Maksoud, M. A., & Al-Amri, S. S. 2021. Seasonal variation in yield, nutritive value, and antioxidant capacity of leaves of alfalfa plants grown in arid climate of Saudi Arabia. *Chilean journal of agricultural research*, 81(2): 182-190.
- Sreelatha, S., & Padma, P. R. 2011. Modulatory effects of Moringa oleifera extracts against hydrogen peroxide-induced cytotoxicity and oxidative damage. *Human & experimental toxicology*, 30(9), 1359-1368.
- Subani, N. D. 2014. Effect of skin extract mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) against sperm quality and malondialdehyde levels of mice (*Mus musculus*) exposed with 2-methoxyethanol. *Jurnal Info Kesehatan*, 12(1), 259670.
- Suhardi, R., Megawati, N., Ardhani, F., Summpunn, P., & Wuthisuthimethavee, S. 2020. Motility, Viability, and Abnormality of the Spermatozoa of Bali Bull with Andromed® and Egg Yolk-Tris Diluents Stored at 4° C. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 10(2): 249-256.
- Susilowati, S., Nuria, M. C., & Budiarti, A. 2014. Identifikasi Kandungan Senyawa Kimia Ekstrak Etanol Herba Alfalfa (*Medicago sativa*, L). *Media Farmasi Indonesia*, 9(2): 732-742.
- Suskha, A., Rusydi, A. M., & Wusqa, U. 2020. Manfaat air bagi tumbuhan: Perspektif Al-Qur'an dan sains. *Al Quds*, 4(2): 447-466.
- Suwignyo, B., Rini, E. A., & Helmiyati, S. 2023. The profile of tropical alfalfa in Indonesia: A review. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 30(1): 1-8.
- Takalani, N. B., Monsees, T. K., Henkel, R., & Opuwari, C. S. 2026. White tea aqueous extract counteracts cumene hydroperoxide-induced oxidative damage in human sperm: a comparative study with L-ascorbic acid. *Journal of Men's Health*, 22(1), 90-105.
- Talluri, T. R., Kumaresan, A., Paul, N., Elango, K., Raval, K., Nag, P., ... & Pal, Y. 2024. Heterologous seminal plasma reduces the intracellular calcium and sperm viability of cryopreserved stallion spermatozoa. *Biopreservation and Biobanking*, 22(1), 82-87.
- Tanga, B. M., Qamar, A. Y., Raza, S., Bang, S., Fang, X., Yoon, K., & Cho, J. 2021. Semen evaluation: Methodological advancements in sperm quality-specific fertility assessment—A review. *Animal bioscience*, 34(8), 1253.
- Tapia, J. A., Macias-Garcia, B., Miro-Moran, A., Ortega-Ferrusola, C., Salido, G. M., Pena, F. J., & Aparicio, I. M. 2012. The membrane of the mammalian spermatozoa: much more than an inert envelope. *Reproduction in domestic animals*, 47, 65-75.
- Terzi F. 2020. In veterinary medicine: oxidative stress and antioxidants. *Current Researches In Health Sciences*. (Goncagül G, Günaydın E, Eds.), Turki: Duvar Publishing.

- Thakor, H. P., Verma, A., Elango, K., Vedamurthy, G. V., Manimaran, A., Jeyakumar, S., & Kumaresan, A. 2024. Effect of different concentrations of hydrogen peroxide on indigenous bull sperm motility. *International Journal of Veterinary Sciences and Animal Husbandry*, 9(2): 881-884
- Tumkiratiwong, P., Ploypattarapinyo, R., Pongchairerk, U., & Thong-Asa, W. 2014. Reproductive toxicity of *Momordica charantia* ethanol seed extracts in male rats. *Iranian journal of reproductive medicine*, 12(10): 695-704.
- Tvrda, E., Michalko, J., Árvay, J., Vukovic, N. L., Ivanišová, E., Ďuračka, M., ... & Kačániová, M. 2020. Characterization of the Omija (*Schisandra chinensis*) extract and its effects on the bovine sperm vitality and oxidative profile during in vitro storage. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2020(1): 1-15.
- Twigg, J. P., Irvine, D. S., & Aitken, R. J. 1998. Oxidative damage to DNA in human spermatozoa does not preclude pronucleus formation at intracytoplasmic sperm injection. *Human reproduction (Oxford, England)*, 13(7): 1864-1871.
- Vaez, A., Mardani, M., & Razavi, S. 2014. Impact of saffron on rat sperm membrane integrity and spermatogenesis status. *Advanced biomedical research*, 3(1), 146.
- Vieira, C. P., Procópio, M. S., & Avelar, G. F. 2024. Optimization of spermatozoa analysis in mice: A comprehensive protocol. *Tissue and Cell*, 89: 102463.
- Wagner, H., Cheng, J. W., & Ko, E. Y. 2018. Role of reactive oxygen species in male infertility: An updated review of literature. *Arab journal of urology*, 16(1), 35-43.
- Wagner, H., Cheng, J. W., & Ko, E. Y. 2018. Role of reactive oxygen species in male infertility: An updated review of literature. *Arab journal of urology*, 16(1), 35-43.
- Wahyudi, A. T., & Minarsih, T. 2023. Pengaruh Ekstraksi dan Konsentrasi Etanol terhadap Kadar Flavonoid Total dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Jahe Emprit (*Zingiber officinale* var. Amaram). *Indonesian Journal of Pharmacy and Natural Product*, 6(01): 30-38.
- Wang, Y., Fu, X., & Li, H. 2025. Mechanisms of oxidative stress-induced sperm dysfunction. *Frontiers in Endocrinology*, 16: 1520835.
- Widyawaty, E. D. 2018. Pengaruh Meniran Dosis Bertingkat Terhadap Ekspresi IGF-1 Dan Ketebalan Endometrium Pada Mencit Betina Model Endometriosis. *Jurnal Biosains Pascasarjana*, 20(1), 9-21
- Widyowati, H., Ulfah, M., & Sumantri. 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.
- Wijayanti, I. 2023. Islamisasi Sains Melalui Integrasi Ayat-Ayat Kauniah Dalam Pembelajaran Ipa Sekolah Dasar. *Jurnal Madrasah Ibtidaiyah*, 1(2): 58-78.
- Wiranata, G.I., Malida, M. V. S., & Sasadara, V. 2022. Pengaruh Pelarut Dan Metode Ekstraksi Terhadap Kandungan Metabolit Sekunder Dan Nilai Ic₅₀ Ekstrak Umbi Bit (*Beta vulgaris* L.). *Jurnal Integrasi Obat Tradisional*, 2(1): 7-13.
- Wu, H., Ye, N., Huang, Z., Lei, K., Shi, F., & Wei, Q. 2023. Dietary curcumin supplementation relieves hydrogen peroxide-induced testicular injury by

- antioxidant and anti-apoptotic effects in roosters. *Theriogenology*, 197: 46-56.
- Yogo, K. 2022. Molecular basis of the morphogenesis of sperm head and tail in mice. *Reproductive medicine and biology*, 21(1): e12466.
- Younus, A. M., Yamanaka, T., & Shimada, M. 2024. The protective effects of antioxidants against endogenous and exogenous oxidative stress on bull sperm. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Animal*, 60(9), 969.
- Yu, X., Jin, M., Zhang, Y., Lu, Y., Zhu, R., Liu, Y. F., ... & Sun, J. 2025. Oxidative stress and its implications for male reproductive dysfunction: mechanistic Insights, clinical Impacts, and advances in therapeutic interventions. *Andrology*.
- Yulinar, F., & Suharti, P. H. 2022. Seleksi Proses Ekstraksi Daun Sirih Pada Pra Rancangan Pabrik Hand Sanitizer Daun Sirih Dengan Kapasitas Produksi 480 Ton/Tahun. *Distilat: Jurnal Teknologi Separasi*, 8(1): 146-153.
- Yunita, E., & Khodijah, Z. 2020. Pengaruh konsentrasi pelarut etanol saat maserasi terhadap kadar kuersetin ekstrak daun asam jawa (*Tamarindus indica* L.) secara spektrofotometri UV-Vis. *PHARMACY: Jurnal Farmasi Indonesia (Pharmaceutical Journal of Indonesia)*, 17(2): 273-280.
- Yusrina, A., Solihati, N., & Hilmia, N. 2018. Pengaruh waktu inkubasi pada proses sexing sperma berbasis glutathione terhadap motilitas dan membran plasma utuh chilled semen domba lokal. *Jurnal Ilmu Ternak Universitas Padjadjaran*, 18(1), 41-46.
- Zagórska-Dziok, M., Ziemlewska, A., Nizioł-Łukaszewska, Z., & Bujak, T. 2020. Antioxidant activity and cytotoxicity of *Medicago sativa* L. seeds and herb extract on skin cells. *BioResearch Open Access*, 9(1): 229-242.
- Zhang, L., Wang, X., Sohail, T., Jiang, C., Sun, Y., Wang, J., ... & Li, Y. 2024. Punicalagin protects ram sperm from oxidative stress by enhancing antioxidant capacity and mitochondrial potential during liquid storage at 4 C. *Animals*, 14(2), 318.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Tabel Perhitungan Rerata Motilitas

Perlakuan	Waktu Inkubasi	Motilitas (%) pada Ulangan ke-			Total	Rerata	Selisih
		1	2	3			
E0H0	0 Menit	37.86	58.99	57.60	154.45	51	14
	30 Menit	32.39	35.59	44.63	112.61	38	
E0H1	0 Menit	32.00	42.01	37.01	111.02	37	9
	30 Menit	24.7	28.53	29.49	82.71	28	
E0H2	0 Menit	36.33	38.16	26.52	101.00	34	10
	30 Menit	25.59	20.08	24.56	70.23	23	
E1H0	0 Menit	39.19	59.23	51.13	149.55	50	10
	30 Menit	30.58	40.68	48.68	119.95	40	
E1H1	0 Menit	48.48	38.41	51.91	138.81	46	11
	30 Menit	30.12	36.28	38.71	105.11	35	
E1H2	0 Menit	29.41	40.36	35.79	105.56	35	4
	30 Menit	27.35	34.65	31.33	93.32	31	
E2H0	0 Menit	58.33	59.54	62.04	179.91	60	8
	30 Menit	51.26	43.31	62.64	157.21	52	
E2H1	0 Menit	56.80	45.45	55.74	157.99	53	14
	30 Menit	42.17	40.81	32.44	115.42	38	
E2H2	0 enit	48.62	39.22	40.98	128.82	43	11
	30 Menit	28.99	37.89	29.71	96.58	32	

Lampiran 2. Analisis Motilitas menggunakan SPSS
Uji Normalitas (Shapiro-Wilk)

Tests of Normality							
	Kombinasi	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Motilitas	E0H0	.210	3	.	.991	3	.820
	E0H1	.374	3	.	.777	3	.060
	E0H2	.191	3	.	.997	3	.901
	E1H0	.228	3	.	.982	3	.743
	E1H1	.261	3	.	.958	3	.604
	E1H2	.249	3	.	.968	3	.656
	E2H0	.212	3	.	.990	3	.811
	E2H1	.185	3	.	.998	3	.922
	E2H2	.190	3	.	.997	3	.904

a. Lilliefors Significance Correction

Uji Homogenitas (Levene Test)

Levene's Test of Equality of Error Variances ^{a,b}					
		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Motilitas	Based on Mean	.630	8	18	.743
	Based on Median	.449	8	18	.876
	Based on Median and with adjusted df	.449	8	15.358	.873
	Based on trimmed mean	.619	8	18	.751

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Dependent variable: Motilitas

b. Design: Intercept + E + H + E * H

Uji ANOVA

Tests of Between-Subjects Effects					
Dependent Variable: Motilitas					
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	223.483 ^a	8	27.935	.475	.858
Intercept	2804.186	1	2804.186	47.667	<.001
E	43.957	2	21.979	.374	.693
H	49.988	2	24.994	.425	.660
E * H	129.538	4	32.385	.550	.701
Error	1058.918	18	58.829		
Total	4086.587	27			
Corrected Total	1282.401	26			

a. R Squared = .174 (Adjusted R Squared = -.193)

Uji Homogenitas

Levene's Test of Equality of Error Variances ^{a,b}					
		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Viabilitas	Based on Mean	2.093	8	18	.092
	Based on Median	.891	8	18	.543
	Based on Median and with adjusted df	.891	8	7.870	.563
	Based on trimmed mean	2.000	8	18	.106
Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.					
a. Dependent variable: Viabilitas					
b. Design: Intercept + E + H + E * H					

Uji ANOVA

Tests of Between-Subjects Effects					
Dependent Variable: Viabilitas					
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	959.296 ^a	8	119.912	2.397	.059
Intercept	6240.512	1	6240.512	124.762	<.001
E	259.157	2	129.578	2.591	.103
H	68.868	2	34.434	.688	.515
E * H	631.271	4	157.818	3.155	.039
Error	900.351	18	50.019		
Total	8100.159	27			
Corrected Total	1859.646	26			
a. R Squared = .516 (Adjusted R Squared = .301)					

Uji DMRT (Uji Duncan's Multiple Range Test)

Viabilitas				
Duncan ^a				
Kombinasi	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
E1H2	3	5.6867		
E0H2	3	11.4733	11.4733	
E0H1	3	11.4767	11.4767	
E0H0	3	12.1033	12.1033	
E2H1	3	12.9033	12.9033	
E1H1	3	16.4733	16.4733	16.4733
E2H0	3	18.1200	18.1200	18.1200
E1H0	3		21.9433	21.9433
E2H2	3			26.6467
Sig.		.073	.127	.122
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.				
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.				

Lampiran 5. Tabel Perhitungan Rerata Integritas Membran

Perlakuan	Integritas membran (%) pada Ulangan ke-			Rerata
	1	2	3	
E0H0	28.165	25.294	18.636	24
E0H1	20.77	15.97	18.02	18
E0H2	16.33	14.71	11.86	14
E1H0	13.05	20.77	18.24	17
E1H1	13.16	14.10	11.11	13
E1H2	7.20	11.10	10.17	9
E2H0	12.45	15.13	11.47	13
E2H1	8.03	14.71	12.23	12
E2H2	8.89	14.81	11.00	12

Lampiran 6. Analisis Integritas Membran menggunakan SPSS
Uji Normalitas

Tests of Normality							
	Kombinasi	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Integritas Membran	E0H0	.269	3	.	.950	3	.569
	E0H1	.206	3	.	.993	3	.837
	E0H2	.238	3	.	.976	3	.701
	E1H0	.255	3	.	.962	3	.627
	E1H1	.262	3	.	.956	3	.597
	E1H2	.297	3	.	.917	3	.441
	E2H0	.284	3	.	.934	3	.502
	E2H1	.234	3	.	.978	3	.717
	E2H2	.242	3	.	.973	3	.686
a. Lilliefors Significance Correction							

Uji Homogenitas

Levene's Test of Equality of Error Variances ^{a,b}					
		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Integritas Membran	Based on Mean	1.026	8	18	.453
	Based on Median	.388	8	18	.913
	Based on Median and with adjusted df	.388	8	11.257	.906
	Based on trimmed mean	.970	8	18	.488
Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.					
a. Dependent variable: Integritas Membran					
b. Design: Intercept + E + H + E * H					

Uji ANOVA

Tests of Between-Subjects Effects					
Dependent Variable: Integritas Membran					
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	478.858 ^a	8	59.857	6.668	<.001
Intercept	5848.344	1	5848.344	651.520	<.001
E	237.588	2	118.794	13.234	<.001
H	184.554	2	92.277	10.280	.001
E * H	56.716	4	14.179	1.580	.223
Error	161.576	18	8.976		
Total	6488.779	27			
Corrected Total	640.434	26			

a. R Squared = .748 (Adjusted R Squared = .636)

Uji DMRT (Uji Duncan's Multiple Range Test)

Integritas Membran			
Duncan ^{a,b}			
Ekstrak	N	Subset	
		1	2
E2	9	12.0797	
E1	9	13.2114	
E0	9		18.8614
Sig.		.433	1.000
Means for groups in homogeneous subsets are displayed. Based on observed means. The error term is Mean Square(Error) = 8.976.			
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 9.000.			
b. Alpha = .05.			

Integritas Membran			
Duncan ^{a,b}			
H2O2	N	Subset	
		1	2
H2	9	11.7852	
H1	9	14.2332	
H0	9		18.1341
Sig.		.100	1.000
Means for groups in homogeneous subsets are displayed. Based on observed means. The error term is Mean Square(Error) = 8.976.			
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 9.000.			
b. Alpha = .05.			

Lampiran 7. Dokumentasi Penelitian Hasil Pengamatan

Motilitas	Viabilitas	Integritas Membran
	 a. Spermatozoa hidup b. Spermatozoa mati	 a. Membran plasma rusak b. Membran plasma utuh

Proses Ekstraksi

 Simplisia Alfalfa	 Penimbangan simplisia alfalfa	 Pembuatan ekstrak dengan maserasi
 Penyaringan Ekstrak	 Pemekatan ekstrak dengan Rotary evaporator	 Ekstrak Alfalfa

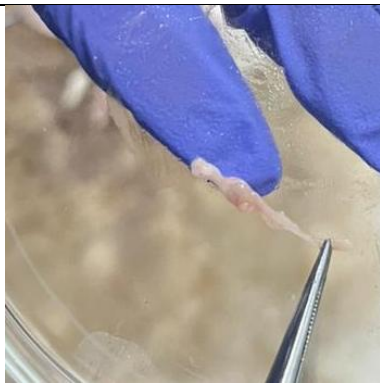
Proses Isolasi Spermatozoa Mencit



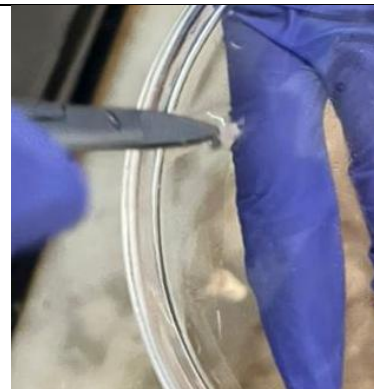
Dislokasi pada hewan mencit



Pembedahan pengambilan kauda epididimis



Preparasi kauda epididimis mencit



Kauda epididimis dicincang dalam pengencer NaCl 0,9%



Suspensi Spermatozoa



JURNAL BIMBINGAN SKRIPSI/TESIS/DISERTASI

IDENTITAS MAHASISWA

NIM : 220602110095
Nama : JIHAN IHZA NABILLA
Fakultas : SAINS DAN TEKNOLOGI
Jurusan : BIOLOGI
Dosen Pembimbing 1 : Kholifah Holil, M.Si
Dosen Pembimbing 2 : DIDIK WAHYUDI, S.Si., M.Si
Judul Skripsi/Tesis/Disertasi : PENGARUH KOMBINASI EKSTRAK ETANOL 70% ALFALFA TERHADAP KUALITAS SPERMATOZOA KAMBING ETAWA (CAPRA AEGAGRUS HIRCUS) YANG DIPAPAR HIDROGEN PEROKSIDA (H₂O₂) SECARA IN VITRO

IDENTITAS BIMBINGAN

No	Tanggal Bimbingan	Nama Pembimbing	Deskripsi Proses Bimbingan	Tahun Akademik	Status
1	16 Juni 2025	Kholifah Holil, M.Si	Konsultasi judul penelitian	Ganjil 2025/2026	Sudah Dikoreksi
2	02 September 2025	Kholifah Holil, M.Si	Konsultasi judul (2)	Ganjil 2025/2026	Sudah Dikoreksi
3	11 September 2025	Kholifah Holil, M.Si	Konsultasi Bab III	Ganjil 2025/2026	Sudah Dikoreksi
4	25 September 2025	Kholifah Holil, M.Si	ACC Bab III	Ganjil 2025/2026	Sudah Dikoreksi
5	30 September 2025	DIDIK WAHYUDI, S.Si., M.Si	Bimbingan integrasi BAB I	Ganjil 2025/2026	Sudah Dikoreksi
6	02 Oktober 2025	DIDIK WAHYUDI, S.Si., M.Si	Bimbingan integrasi BAB I	Ganjil 2025/2026	Sudah Dikoreksi
7	03 Oktober 2025	Kholifah Holil, M.Si	ACC BAB I	Ganjil 2025/2026	Sudah Dikoreksi
8	08 Oktober 2025	DIDIK WAHYUDI, S.Si., M.Si	ACC BAB I DAN BAB II	Ganjil 2025/2026	Sudah Dikoreksi
9	10 Oktober 2025	Kholifah Holil, M.Si	ACC BAB II	Ganjil 2025/2026	Sudah Dikoreksi
10	10 April 2026	Kholifah Holil, M.Si	Konsultasi BAB IV	Genap 2026/2027	Sudah Dikoreksi
11	17 April 2026	Kholifah Holil, M.Si	Revisi BAB IV	Genap 2026/2027	Sudah Dikoreksi
12	06 Mei 2026	DIDIK WAHYUDI, S.Si., M.Si	Bimbingan Integrasi BAB IV	Genap 2026/2027	Sudah Dikoreksi
13	07 Mei 2026	DIDIK WAHYUDI, S.Si., M.Si	Revisi Integrasi BAB IV	Genap 2026/2027	Sudah Dikoreksi
14	07 Mei 2026	DIDIK WAHYUDI, S.Si., M.Si	Revisi Integrasi BAB IV	Genap 2026/2027	Sudah Dikoreksi
15	08 Mei 2026	DIDIK WAHYUDI, S.Si., M.Si	ACC Integrasi BAB IV	Genap 2026/2027	Sudah Dikoreksi
16	27 Mei 2026	Kholifah Holil, M.Si	Konsultasi abstrak dan BAB V	Genap 2026/2027	Sudah Dikoreksi
				Genap	

17	02 Juni 2026	Kholifah Holil, M.Si	ACC Abstrak, BAB IV, dan BAB V	2026/2027	Sudah Dikoreksi
----	--------------	----------------------	--------------------------------	-----------	-----------------

Telah disetujui
Untuk mengajukan ujian Skripsi/Tesis/Desertasi

Dosen Pembimbing 2


DIDIK WAHYUDI, S.Si., M.Si

Malang, _____
Dosen Pembimbing 1


Kholifah Holil, M.Si





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 : Jihan Ihza Nabilla
NIM : 220602110095
Judul : Pengaruh Kombinasi Ekstrak Etanol 70% Alfalfa Terhadap Kualitas Spermatozoa (*Mus musculus*) yang Diinduksi H₂O₂ 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	19%	

Mengetahui,
Kepala Program Studi Biologi



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