

PENGARUH EKSTRAK ETANOL 96% AKAR SALUANG BELUM (*Luvunga sarmentosa*) TERHADAP VIABILITAS SPERMATOZOA MANUSIA *IN VITRO*

Silvani Permatasari^{1✉}, Annisa Zaskia Alexandra Tangdibali², Indria Augustina³
Septi Handayani¹, Astrid Teresa⁴

Abstrak

Kasus infertilitas terbanyak ditemukan karena adanya masalah pada laki-laki. Salah satu pengobatan alternatif pada infertilitas yaitu menggunakan bahan herbal akar Saluang Belum (*Luvunga sarmentosa*). Tanaman ini ditemukan di Kalimantan Tengah yang diketahui dapat mencegah infertilitas dan dipercaya oleh masyarakat suku Dayak dapat meningkatkan vitalitas pada laki-laki. Senyawa yang terdapat pada akar Saluang Belum dapat mencegah kematian sel sehingga meningkatkan kualitas spermatozoa. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui pengaruh ekstrak etanol 96% akar Saluang Belum terhadap viabilitas pada spermatozoa manusia *in vitro*. Akar Saluang Belum diekstrak dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96%. Setelah didapatkan ekstrak kental kemudian dianalisis kandungan senyawa metabolit sekunder dengan uji fitokimia. Sampel yang digunakan adalah spermatozoa manusia *in vitro* dari donor normozoospermia yang diambil sebanyak 15 secara *consecutive sampling*. Data diuji statistik menggunakan *one way variance* (ANOVA) dilanjutkan dengan *post-hoc LSD*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa senyawa yang terdapat di dalam ekstrak etanol 96% akar Saluang Belum adalah terpenoid, flavonoid, steroid, fenolik dan alkaloid. Jumlah viabilitas sperma meningkat secara signifikan dibandingkan kelompok kontrol ($p < 0,05$), dengan konsentrasi efektif adalah 100 ng/mL. Berdasarkan hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol 96% akar Saluang Belum dapat meningkatkan viabilitas spermatozoa manusia *in vitro*.

Kata kunci: akar *Luvunga sarmentosa*, ekstrak etanol 96%, spermatozoa, viabilitas

THE EFFECT OF 96% ETHANOL EXTRACT OF SALUANG BELUM ROOTS (*Luvunga sarmentosa*) ON HUMAN SPERM VIABILITY *IN VITRO*

Abstract

Most cases of infertility are found due to problems in men. One alternative treatment for infertility is the use of the herbal ingredient Saluang Belum root (*Luvunga sarmentosa*). This plant, found in Central Kalimantan, is recognized for its potential to prevent infertility and is believed by the Dayak tribe to enhance male vitality. The compounds present in Saluang Belum roots can prevent cell death, thereby improving the quality of spermatozoa. This research aimed to evaluate the effect of a 96% ethanol extract of Saluang Belum root on the viability of human spermatozoa *in vitro*. The Saluang Belum roots were extracted using the maceration method with 96% ethanol as the solvent. After obtaining a concentrated extract, the secondary metabolite compounds were analyzed through a phytochemical test. The samples consisted of human spermatozoa from 15 normozoospermia donors, which were collected using consecutive sampling. Data analysis was conducted using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by post-hoc LSD tests. The research findings indicated that the 96% ethanol extract of Saluang Belum roots contained terpenoids, flavonoids, steroids, phenolics, and alkaloids. The viability of spermatozoa significantly increased compared to the control group ($p < 0.05$), with an effective concentration of 100 ng/mL. Based on these results, it can be concluded that the 96% ethanol extract of Saluang Belum roots can enhance the viability of human spermatozoa *in vitro*.

Keywords: ethanol extract 96%, *Luvunga sarmentosa* roots, spermatozoa, viability

¹Departemen Biokimia dan Biologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Palangka Raya

²Sarjana Kedokteran, Fakultas Kedokteran, Universitas Palangka Raya

³Departemen Parasitologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Palangka Raya

⁴Departemen Dermatologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Palangka Raya

✉ E-mail: silvani.permatasari@med.upr.ac.id

Pendahuluan

Upaya memperbaiki kualitas sperma terus dikembangkan. Kemajuan inseminasi *in vitro* yang dilakukan di luar tubuh untuk mencapai pembuahan merupakan salah satu pengobatan gangguan infertilitas pria.¹ Hingga saat ini, peningkatan kualitas sperma dengan terapi hormonal masih belum optimal dan menimbulkan efek samping, termasuk kerusakan pada organ reproduksi epitel germinal dan perubahan suasana hati.^{2,3} Oleh karena itu, obat-obatan atau senyawa herbal yang aman sangat diperlukan untuk meningkatkan kualitas sperma. Berbagai tanaman herbal juga dikenal dapat membantu meningkatkan kualitas sperma, seperti akar Saluang Belum (*Luvunga sarmientosa*).⁴

Di Indonesia, khususnya Kalimantan Tengah, berbagai tanaman telah dimanfaatkan sebagai obat herbal. Salah satu tanaman tersebut adalah Saluang Belum yang dikenal dapat meningkatkan stamina pria. Batang dan akar tanaman ini sering dimanfaatkan dengan berbagai cara, dan masyarakat mungkin menyaringnya sebelum dikonsumsi, tergantung pada adat istiadat setempat.⁵ Pemeriksaan fitokimia yang dilakukan sebelumnya menunjukkan bahwa akar Saluang Belum mengandung senyawa metabolit sekunder flavonoid dan steroid. Metabolit sekunder yang memiliki sifat antioksidan ini antara lain alkaloid, flavonoid, senyawa fenolik, steroid, dan terpenoid.⁶

Ekstrak akar Saluang Belum menghambat apoptosis melalui jalur fosforilasi tirosin dan Akt/PI3K dengan mengaktifasi protein antiapoptosis berupa BCL-2.⁴ Akt merupakan sebuah protein kinase serin/treonin yang berfungsi dalam regulasi ketahanan hidup sel. Selain itu, kapasitas dan motilitas (kinetika) spermatozoa sangat rumit terkait dengan kemampuan mereka untuk bertahan, sebuah fenomena yang ditandai dengan penekanan jalur apoptosis

melalui aktivasi Akt.⁴ Akt memfosforilasi berbagai protein, termasuk beberapa yang terkait dengan jalur kematian sel. Aktivasi Akt dapat memfosforilasi beberapa protein target, termasuk protein Bad. Setelah terfosforilasi, protein Bad melepaskan protein penghambat yang dapat menghambat apoptosis, sehingga meningkatkan kelangsungan hidup sel.⁷

Akar Saluang Belum, dalam penelitian sebelumnya, terbukti meningkatkan kualitas sperma pada tikus.⁸ Namun, masih sedikit penelitian yang membahas pengaruhnya terhadap kelangsungan hidup sperma manusia. Berdasarkan latar belakang tersebut, peneliti tertarik untuk melakukan percobaan pengaruh ekstrak etanol 96% akar Saluang Belum terhadap viabilitas spermatozoa secara *in vitro*.

Bahan dan Metode

Metode Ekstraksi

Akar Saluang Belum sebanyak 3000 g yang diambil dari Desa Buhut, Muara Teweh, Kalimantan Tengah, dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan tanah atau kotoran yang menempel pada akar. Kemudian dipotong kecil-kecil, diblender, dan disaring hingga menjadi simplisia. Setelah itu, simplisia dimasukkan ke dalam bejana untuk diekstraksi dengan cara maserasi selama 3x24 jam dengan pelarut etanol 96%. Ekstrak disaring dan dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* kemudian diuapkan menggunakan cawan porselen dalam *water bath* hingga diperoleh ekstrak akar Saluang Belum yang kental.

Uji Fitokimia

Setelah ekstraksi, untuk mengidentifikasi zat penyusun akar Saluang Belum, analisis fitokimia kuantitatif dilakukan untuk uji kandungan terpenoid, flavonoid, steroid, fenolik, dan alkaloid.

Etik Penelitian

Penelitian ini telah disetujui oleh Komite Etik Penelitian Kedokteran, Fakultas Kedokteran, Universitas Palangka Raya dengan nomor: 69/UN24.9/LL/2023 dan *informed consent* tertulis telah didapatkan dari seluruh subjek penelitian. Penelitian ini menggunakan sampel sperma manusia dengan kriteria normozoospermia yang diperoleh dari donor laki-laki.

Uji Bioaktivitas Saluang Belum terhadap Viabilitas Sperma

Sperma manusia diperoleh melalui masturbasi setelah abstinensia selama minimal tiga hari. Kriteria inklusi sampel dalam penelitian ini adalah infertil, konsentrasi sperma ≥ 50 juta sel setelah dihitung menggunakan mikroskop cahaya berdasarkan pedoman WHO, pria sehat berusia 20-30 tahun. Kriteria eksklusi sampel pada penelitian ini adalah sampel ejakulasi yang telah disimpan selama ≥ 6 jam pada suhu ruangan dan mempunyai konsentrasi sperma ≤ 50 juta sel setelah dihitung menggunakan mikroskop cahaya. Jumlah sampel (subjek penelitian) dihitung berdasarkan rumus estimasi satu proporsi dengan *simple random sampling*.⁹

$$n = \frac{Z^2_{1-\alpha/2} P (1-P)}{d^2}$$

Berdasarkan rumus tersebut, $Z_{1-\alpha/2}$ adalah 1,960 (tingkat kepercayaan 95%); P adalah populasi yang tidak diketahui (maksimum 0,5), dengan D (derajat akurasi 25%), sehingga jumlah sampel dibulatkan menjadi 15 orang.⁹

Semen dikumpulkan dalam wadah steril dan dibiarkan pada suhu kamar selama 30 menit untuk dicairkan. Spermatozoa dicuci dengan 1,5 mL Percoll 50%. Selanjutnya tabung disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 30 menit. Supernatan dibuang, dan pelet dicuci dengan 3 ml media BWW (*Biggers, Whitten, and Whittingham*). Lalu,

tabung disentrifugasi kembali dengan kecepatan 3000 rpm selama 20 menit. Supernatan dibuang, dan pelet sedimen spermatozoa murni disuspensikan kembali dengan 1 ml BBW lalu dihomogenkan. Setelah itu, konsentrasi spermatozoa diukur dengan cara memasukkan 95 μ L *sperm diluting fluid* dan 5 μ L spermatozoa yang telah dicuci ke dalam tabung 1,5 ml kemudian dihomogenisasi. Sebanyak 10 μ L sampel, lalu dimasukkan ke dalam *Neubauer chamber*. Selanjutnya, dilakukan perhitungan konsentrasi menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400x menggunakan metode analisis sperma standar menurut WHO. Sperma dibagi menjadi lima kelompok yaitu kontrol (dengan BWW), diberikan ekstrak etanol *Luvunga sarmentosa* 96% dengan konsentrasi 100 ng/mL, 200 ng/mL, 400 ng/mL, dan 800 ng/mL. Kelima kelompok diinkubasi pada suhu 37 °C selama 60 menit.

Selanjutnya, 20 μ L sperma yang selesai diinkubasi diteteskan ke kaca objek, kemudian ditambahkan 20 μ L Eosin Y dan ditutup dengan penutup kaca objek. Sampel dibiarkan kering selama 1-2 menit, dan spermatozoa dipetakan di bawah mikroskop dengan perbesaran 400x. Viabilitas dan kelainan spermatozoa digambarkan pada perbesaran 400x dalam 200 spermatozoa. Spermatozoa hidup tidak berwarna, sedangkan spermatozoa mati mempunyai kepala berwarna merah.

Data primer akan diperoleh dalam penelitian ini, yang dikumpulkan melalui pengamatan viabilitas sperma. Data primer yang diperoleh berupa data kuantitatif antara lain persentase viabilitas spermatozoa yang digunakan untuk menyimpulkan pengaruh ekstrak etanol 96% akar Saluang Belum terhadap viabilitas spermatozoa. Jika data biasanya terdistribusi dan homogen, maka akan dilakukan uji *one way ANOVA* dengan $\alpha = 0,05$ untuk melihat adanya perbedaan mendasar pada setiap kelompok yang dianalisis, dilanjutkan dengan analisis *post-hoc*.

Hasil

Uji Fitokimia

Hasil uji fitokimia kuantitatif ekstrak etanol 96% akar Saluang Belum menunjukkan kandungan flavonoid dengan kadar 47,750 mg/mL, terpenoid dengan kadar 61,467 mg/mL, steroid dengan kadar 41,862 mg/mL, fenolik dengan kadar 38,867 mg/mL, dan alkaloid dengan kadar 25,639%.

Uji Bioaktivitas Saluang Belum terhadap Viabilitas Sperma

Hasil penelitian menunjukkan bahwa viabilitas spermatozoa meningkat pada kelompok yang diberi ekstrak etanol akar Saluang Belum 96%, dari kelompok konsentrasi 100 ng/mL ke kelompok konsentrasi tertinggi 800 ng/mL. Secara keseluruhan hasil yang ditampilkan pada Tabel 1 menunjukkan persentase (%) viabilitas spermatozoa yang dilakukan dengan mengamati 100 sperma. Uji statistik menunjukkan ekstrak etanol 96% akar Saluang Belum pada kelompok 100 ng/mL hingga 800 ng/mL berpengaruh terhadap viabilitas spermatozoa dibandingkan kelompok kontrol dengan BWW. Hasil uji LSD menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan tiap kelompok dengan nilai $p = 0,000$ ($p < 0,05$).

Tabel 1. Pengaruh ekstrak etanol 96% akar Saluang Belum terhadap viabilitas spermatozoa

Konsentrasi Ekstrak (ng/mL)	Viabilitas Sperma (%)
	Rerata \pm SD
Kontrol Negatif	59,27 \pm 6,330 ^{a, b, c, d, e}
100	71,07 \pm 4,431 ^{b, c, d, e}
200	77,53 \pm 4,969 ^{c, d, e}
400	83,80 \pm 3,858 ^{d, e}
800	91,73 \pm 3,535 ^e

Keterangan: ^{a,b,c,d,e} menunjukkan perbedaan nyata ($P < 0,05$)

Pembahasan

Berdasarkan hasil uji fitokimia, ekstrak etanol 96% akar Saluang Belum mengandung terpenoid, flavonoid, steroid, fenolik, dan alkaloid. Penelitian sebelumnya telah menunjukkan khasiat rebusan akar Saluang Belum yang mengandung flavonoid, steroid, triterpenoid, alkaloid, tanin, dan saponin dalam meningkatkan jumlah spermatid pada gambaran histologis tubulus seminiferus mencit.¹⁰ Senyawa-senyawa ini yang memberikan efek terhadap sperma sehingga mampu meningkatkan kualitasnya. Adapun kualitas sperma yang baik menurut WHO 2021 adalah dilihat dari konsentrasi ≥ 39 juta, motilitas $\geq 42\%$, sperma imotil $\leq 20\%$ viabilitas $\geq 54\%$, dan morfologi normal imatur $\leq 4\%$.¹¹

Senyawa terpenoid bekerja sebagai antioksidan utama untuk mengurangi pembentukan radikal bebas baru dengan memutus reaksi berantai dan mengubahnya menjadi produk yang lebih stabil.¹² Penelitian ini membuktikan bahwa kandungan terpenoid pada ekstrak etanol 96% akar Saluang Belum dapat meningkatkan viabilitas spermatozoa, Hal ini juga didukung oleh penelitian yang dilakukan oleh Li *et al.* (2022) membuktikan bahwa triterpenoid dari *Ganoderma lucidum* meningkatkan histomorfologi dan fungsi testis tikus jantan paruh baya dengan mengurangi stres oksidatif dan apoptosis seluler.¹³

Adanya steroid pada ekstrak etanol 96% akar Saluang Belum meningkatkan kelangsungan hidup spermatozoa. *Acalypha indica* yang mengandung steroid menunjukkan efeknya pada peningkatan viabilitas spermatozoa.⁸ Musfirah dkk, (2016) menunjukkan adanya steroid meningkatkan kualitas sperma dengan viabilitas yang baik.⁸ Pujiyanto dkk. (2019) menunjukkan bahwa steroid menghambat apoptosis dengan menurunkan caspase 3. Pelepasan sitokrom C dari mitokondria dihasilkan dari aktivasi Bcl-2. Protein Bcl-2 berperan penting dalam keseimbangan intraseluler. Sitokrom C akan

menginduksi apoptosis sel melalui interaksi dengan *apoptosis protease-activating factor-1* (Apaf-1). Apaf-1 akan berikatan dengan protein *pro caspase 9* dan menyebabkan pembelahan dan aktivasi protein *pro caspase 9* menjadi *caspase 9*. Sebagai inisiator, *caspase 9* akan mengaktifkan *caspase 3* yang merupakan protein eksekutor yang menyebabkan degradasi protein dan kematian sel.⁴

Senyawa lain yang terkandung dalam ekstrak etanol 96% akar Saluang Belum adalah flavonoid, sebagai antioksidan pada ekstrak akar Saluang Belum dapat mencegah kerusakan membran spermatozoa, sehingga dapat meningkatkan motilitas spermatozoa.⁴ Flavonoid teroksidasi oleh radikal sehingga menghasilkan radikal bebas yang lebih stabil dan non-reaktif. Flavonoid dapat menangkap radikal bebas secara langsung melalui sumbangan atom hidrogen. Radikal dibuat tidak aktif, yaitu $R\cdot$ adalah radikal bebas, dan $FI-O\cdot$ adalah radikal fenoksil. Aktivitas antioksidan flavonoid secara *in vitro* bergantung pada susunan gugus fungsi dalam struktur intinya.¹⁴

Senyawa fenolik merupakan antioksidan yang bereaksi dengan berbagai radikal bebas.¹⁵ Fenolik pada teh kelopak *Nelumbo nucifera* telah meningkatkan viabilitas sperma tikus secara signifikan jika dibandingkan dengan kelompok kontrol dan juga dapat meningkatkan libido pada tikus jantan.¹⁶

Alkaloid berfungsi sebagai antioksidan karena mengandung nitrogen atom dalam strukturnya, yang memiliki pasangan elektron bebas sehingga mengurangi aktivitas radikal bebas dalam tubuh.¹⁷ Derbak *et al.* (2023) menunjukkan bahwa alkaloid pada ekstrak *Peganum harmala* meningkatkan motilitas, integritas membran, dan jumlah sperma mencit jantan. Jika integritas membran meningkat, maka kelangsungan hidup spermatozoa akan meningkat.¹⁸

Penelitian ini menunjukkan bahwa konsentrasi ekstrak etanol 96% akar Saluang

Belum yang efektif untuk meningkatkan viabilitas sperma adalah 100 ng/mL dibandingkan kontrol negatif. Konsentrasi efektif menurut farmakologi merupakan konsentrasi paling rendah, namun dapat memberikan efek yang menguntungkan.¹⁹ Peningkatan kelangsungan hidup spermatozoa disebabkan oleh adanya senyawa seperti terpenoid, flavonoid, steroid, fenolik, dan alkaloid. Senyawa-senyawa yang terdapat pada ekstrak etanol 96% akar Saluang Belum bekerja secara sinergis dan tidak bekerja sendiri untuk meningkatkan viabilitas atau kelangsungan hidup spermatozoa secara *in vitro*. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa induksi ekstrak akar Saluang Belum dapat menurunkan apoptosis spermatozoa dan meningkatkan fosforilasi Akt yang berkaitan dengan pengaturan motilitas, viabilitas, dan membran mitokondria spermatozoa yang berperan dalam kelangsungan hidup spermatozoa (viabilitas sperma).⁴

Kesimpulan

Senyawa yang terkandung dalam ekstrak etanol 96% akar Saluang Belum (*Luvunga sarmantosa*) adalah alkaloid, terpenoid, flavonoid, fenolik, dan steroid. Ekstrak etanol 96% akar Saluang Belum bekerja secara efektif pada konsentrasi 100 ng/mL untuk meningkatkan viabilitas sperma.

Saran

Perlu dilakukan penelitian serupa dengan konsentrasi yang lebih tinggi pada ekstrak akar Saluang Belum (*Luvunga sarmantosa*) dan dengan waktu inkubasi yang berbeda. Perlu diteliti lebih lanjut efek ekstrak akar Saluang Belum secara *in vitro* menggunakan sampel semen pasien asthenozoospermia untuk mengetahui efektivitasnya dalam meningkatkan kualitas spermatozoa.

Daftar Pustaka

1. Stephens S, Arnett D, and Meacham R. The Use of In Vitro Fertilization in the Management of Male Infertility: What the Urologist Needs to Know. *Reviews in Urology*. 2013;15(4):154–160
2. Martínez-Fresneda L, O'Brien E, López Sebastián A, Velázquez R, Toledano-Díaz A, and Tesfaye D. In Vitro Supplementation of Testosterone or Prolactin Affects Spermatozoa Freezability in Small Ruminants. *Domestic Animal Endocrinology*. 2020; 72:2-9. doi: 10.1016/j.domaniend.2019.06.004
3. Khourdaji I, Lee H, Smith RP. Frontiers in hormone therapy for male infertility. *Transl Androl Urol*. 2018 Jul; 7(Suppl 3):S353-S366. doi: 10.21037/tau.2018.04.03
4. Humairoh N. Efek Ekstrak Etanol Akar Saluang Balum (*Lavanga sarmentosa*) Terhadap Kualitas Dan Ketahanan Hidup Spermatozoa Secara In Vitro. [Thesis]. Tidak Diterbitkan. Depok: Universitas Indonesia. 2021
5. Syarpin, Permatasari S, and Pujianto DA. Analysis of Phytochemical Constituents and Antioxidant Activity From the Fractions of *Luvunga sarmentosa* Root Extract Using LCMS/MS. *Biodiversitas*. 2023; 24(2):733–40. doi: <https://doi.org/10.13057/biodiv/d240208>
6. Trinovita E, Rahman MI, Carmelita AB. Evaluasi Potensi Aktivitas Ekstrak Etanol Akar Seluang Belum (*Luvunga sarmentosa* (Blume)Kurz.) Terhadap Radikal Bebas 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH). Buku Prosiding Seminar Nasional Online Biologi Penyakit. Surabaya, 19-21 Juni 2020: 94–114
7. Pujianto D, Sisca S, and Yunaini L. Progesterone Increases Capacitation and Exerts A Prosurvival Effect In Sperm Via Akt Activation. *Journal of Natural Science, Biology and Medicine*. 2019; 10(3):24–28. doi: 10.4103/jnsbm.JNSBM_24_19
8. Musfirah Y, Bachri MS, and Nurani LH. Potensi Ekstrak Etanol 70% Akar Saluang Balum (*Lavanga sarmentosa* Blume Kurz) Terhadap Kualitas dan Viabilitas Sperma Mencit. *Pharmaciana*. 2016; 6(2):131–8. doi: 10.12928/pharmaciana.v6i2.4037
9. Permatasari S, Syarpin, and Pujianto DA. Photochemical and Bioactivity Examination of Fractionated Saluang Belum Root Extract (*Lavanga sarmentosa*) on In-Vitro Human Sperm Motility. *Jurnal Kedokteran dan Kesehatan Indonesia*. 2023; 14(2):128–34. <https://doi.org/10.20885/JKKI.Vol14.Iss2.art3>
10. Permatasari S, Rahmatina H, Adnyana IGHE, and Widayati R. Pengaruh Rebusan Akar Saluang Belum (*Lavanga sarmentosa*) Terhadap Jumlah Spermatid pada Gambaran Histologis Tubulus Seminiferus Mencit. *Jurnal Surya Medika*. 2023; 9(2):69–73
11. World Health Organization. WHO Laboratory Manual for The Examination and Processing of Human Semen. 6th edition. Geneva: World Health Organization. 2021
12. Kartika L, Ardana M, and Rusli R. Aktivitas Antioksidan Tanaman Artocarpus. 12 th Proceeding of Mulawarman Pharmaceuticals Conferences. 11-12 Desember 2020. P. 237–44
13. Li Y, Liang W, Han Y, Zhao W, Wang S, and Qin C. Triterpenoids and Polysaccharides from *Ganoderma lucidum* Improve the Histomorphology and Function of Testes in Middle-Aged Male Mice by Alleviating Oxidative Stress and Cellular Apoptosis. *Nutrients*. 2022; 14(22):2-16. doi: 10.3390/nu14224733
14. Asih D, Kadek WN, Gede I, and Wiansana S. Aktivitas Antioksidan Ekstrak Amla (*Phyllanthus emblica/Emblica officinalis*). *Jurnal Ilmiah Multi Disiplin Indonesia*. 2022; 1(6):674–687. <https://doi.org/10.32670/ht.v1i6.1533>

15. Zeb A. Concept, Mechanism, and Applications of Phenolic Antioxidants in Foods. *Journal of Food Biochemistry*. 2020; 44(9):1–22. doi: 10.1111/jfbc.13394
16. Laoung-On J, Jaikang C, Saenphet K, and Sudwan P. Phytochemical Screening, Antioxidant and Sperm Viability of *Nelumbo nucifera* Petal Extracts. *Plants*. 2021; 10(7):2–20. doi: 10.3390/plants10071375
17. Hasan H, Ain Thomas N, Hiola F, Nuzul Ramadhani F, and Ibrahim AS. Skrining Fitokimia dan Uji Aktivitas Antioksidan Kulit Batang Matoa (*Pometia pinnata*) dengan Metode 1,1-Diphenyl-2-picrylhidrazil (DPPH). *Indonesian Journal of Pharmaceutical Education*. 2022; 2(1):67–73. doi:10.37311/ijpe.v2i1.10995
18. Derbak H, Imre K, Benabdelhak AC, Moussaoui M, Kribeche A, and Kebbi R. Effect of *Peganum harmala* Total Alkaloid Extract on Sexual Behavior and Sperm Parameters in Male Mice. *Veterinary Sciences*. 2023; 10(8):2-13. doi: 10.3390/vetsci10080498
19. Thomas N, Ting N. Minimum Effective Dose. In: Wiley Stats Ref: *Statistics Reference Online*. John Wiley & Sons, Ltd. 2014. P. 1-6.