



**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK DAUN  
*CYCLEA BARBATA L. MIERS*  
TERHADAP MOTILITAS SPERMATOZOA  
MENCIT BALB/C JANTAN YANG DIPAPAR ASAP ROKOK**

*THE EFFECT OF EXTRACT CYCLEA BARBATA L. MIERS ON SPERMATOZOA  
MOTILITY OF MALE BALB/C MICE EXPOSED BY CIGARETTE SMOKE*

**ARTIKEL  
KARYA TULIS ILMIAH**

**Disusun untuk memenuhi sebagian persyaratan  
guna mencapai derajat sarjana strata-1 kedokteran umum**

**RAJA AL FATH WIDYA ISWARA  
G2A 006 149**

**PROGRAM PENDIDIKAN SARJANA KEDOKTERAN  
FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS DIPONEGORO  
TAHUN 2010**

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK DAUN *CYCLEA BARBATA L. MIERS*  
TERHADAP MOTILITAS SPERMATOZOA MENCIT BALB/C JANTAN  
YANG DIPAPAR ASAP ROKOK**

Raja AL Fath Widya Iswara<sup>1</sup>, Ahmad Zulfa Juniarto<sup>2</sup>  
**ABSTRAK**

**Latar belakang:** Asap rokok merupakan senyawa radikal bebas yang memberikan gangguan pada kelainan membran dan motilitas spermatozoa. Senyawa fenol yang terkandung dalam daun *Cyclea barbata L. Miers* berfungsi sebagai antioksidan mampu menghentikan rantai radikal bebas pada oksidasi lipid. Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan pengaruh ekstrak daun *Cyclea barbata L. Miers* terhadap motilitas spermatozoa mencit Balb/c jantan yang dipapar asap rokok.

**Metode:** Penelitian ini menggunakan *post test only control group design*. Jumlah sampel sebanyak 35 ekor mencit Balb/c jantan yang dibagi menjadi lima kelompok. Kelompok K(-) adalah kelompok tanpa perlakuan. Kelompok K(+) hanya diberi paparan asap rokok. Kelompok P1 dipapar asap rokok dan diberi ekstrak daun *Cyclea barbata L. Miers* dosis 3,75 g/l/hari. Kelompok P2 dipapar asap rokok dan diberi ekstrak daun *Cyclea barbata L. Miers* dosis 7,5 g/l/hari. Kelompok P3 dipapar asap rokok dan diberi ekstrak daun *Cyclea barbata L. Miers* dosis 15 g/l/hari. Perlakuan selama 21 hari, pada hari ke-22 semua mencit diterminasi dan diperiksa motilitas spermatozoanya.

**Hasil:** Rerata motilitas spermatozoa adalah: Kelompok K(-)=74,94; Kelompok K(+)=10,64; Kelompok P1=45,80; Kelompok P2=53,40; Kelompok P3=39,54. Uji *Kruskal Wallis* didapatkan perbedaan bermakna motilitas spermatozoa pada semua kelompok ( $p < 0,05$ ). Uji *Man whitney* terdapat perbedaan yang bermakna antara K(-) dengan K(+), K(+) dengan P1 dan K(+) dengan P2.

**Simpulan:** Pemberian ekstrak daun *Cyclea barbata L. Miers* menimbulkan pengaruh perbaikan motilitas spermatozoa pada Mencit Balb/c jantan yang dipapar asap rokok secara signifikan. Penggunaan dosis 7,5 g/l per hari memberi hasil terbaik dalam meningkatkan motilitas spermatozoa

**Kata kunci:** asap rokok, *Cyclea barbata L. Miers*, motilitas spermatozoa

<sup>1</sup>Mahasiswa program pendidikan S-1 kedokteran umum FK Undip

<sup>2</sup>Staf pengajar Bagian Biologi FK Undip, Jl Dr. Sutomo No.18 Semarang

**THE EFFECT OF EXTRACT CYCLEA BARBATA L. MIERS  
ON SPERMATOZOA MOTILITY OF MALE BALB/C MICE  
EXPOSED BY CIGARETTE SMOKE**

**ABSTRACT**

**Background:** Cigarette smoke is a free radical that can disturb human spermatozoa such as the abnormality of membrane and sperm motility. Fenol substance in *Cyclea barbata L. Miers* have function as antioxidant which can stop free radical chain in lipid peroxidase. This research was directed to prove the effect of extract *Cyclea barbata L. Miers* to the sperm motility mice Balb/c with cigarette smoke.

**Methodhs:** This experimental research used the post test only control group design. The sample were 35 Balb/c mice which divided into five groups. Control negative goup was only given meal standard. Control positive exposed by cigarette smoke only. Group P1 exposed by cigarette smoke and extract *Cyclea barbata L. Miers* 3,75 g/l/day. Group P2 exposed by cigarette smoke and extract *Cyclea barbata L. Miers* 7,5 g/l/day. Group P3 exposed by cigarette smoke and extract *Cyclea barbata L. Miers* 15 g/l/day. This experimental lasted for 21 days. On the 22<sup>th</sup> all mice were terminated and the sperm motility was examined.

**Result:** Mean of spem motility: group K(-)=74,94; group K(+)=10,64; Group P1=45,80; Group P2=53,40; Group P3=39,54. Kruskal Wallis test shown significant difference spem motility in all group ( $p < 0,05$ ). Man whitney test also shown significant difference between K(-) with K(+), K(+) with P1 and K(+) with P2.

**Conclusion:** Extract *Cyclea barbata L. Miers* giving effect to the sperm motility Balb/c mice with cigarette smoke significant. Dose 7,5 g/l/day give the best effect in repair and increasing sperm motility.

**Keywords:** cigarette smoke, sperm motility, *Cyclea barbata L. Miers*

## PENDAHULUAN

*Cyclea barbata L. Miers* merupakan salah satu tanaman obat potensial yang lebih dikenal masyarakat sebagai cincau hijau. Daun cincau hijau yang banyak dikonsumsi sebagai bahan minuman penyegar berbentuk gel yang harganya terjangkau, mudah didapat dan enak rasanya. Masyarakat kita mengenal cincau hijau sebagai obat untuk meredakan panas dalam, demam, sakit perut, tifus, bengkak bekas dipukul, obat sakit mata, keracunan makanan udang, penambah nafsu makan, disentri, sariawan, bisul, radang lambung dan usus, dan penurun tekanan darah tinggi.<sup>1</sup>

Daun *Cyclea barbata L. Miers* diketahui mengandung klorofil, serta senyawa bioaktif polifenol, saponin, flavonoid dan lemak. Keempat komponen ini secara umum dikenal sebagai antioksidan, antikanker, dan antiinflamasi. Namun sampai saat ini senyawa-senyawa bioaktif tersebut belum diisolasi dari daun cincau hijau. Senyawa polifenol yang terkandung dalam daun cincau hijau dapat memberikan efek antioksidan primer karena mampu menghentikan rantai radikal bebas pada oksidasi lipid.<sup>2,3</sup>

Berbagai manfaat dari cincau hijau tersebut menjadikan cincau hijau sebagai makanan yang memenuhi kriteria ”*healthy desert*” dan semakin digemari, seiring dengan kecenderungan masyarakat saat ini untuk memanfaatkan produk alami sebagai makanan sehat dan pengobatan alternatif.<sup>1,2</sup>

Senyawa radikal bebas dapat menyebabkan kerusakan oksidatif pada tubuh sehingga menimbulkan berbagai keadaan patologis dalam tubuh. Asap rokok merupakan suatu oksidan (radikal bebas) yang dapat mempengaruhi proses oksidasi dalam tubuh manusia. Asap rokok dapat menimbulkan stress oksidatif dengan meningkatkan radikal bebas dan mengurangi konsentrasi antioksidan. Dilaporkan bahwa satu hisapan rokok terkandung radikal bebas/oksidan sebanyak  $10^{16}$  mol.<sup>4</sup>

Beberapa penelitian telah membuktikan bahwa asap rokok yang merupakan senyawa radikal bebas dapat menyebabkan infertilitas. Dimana asap rokok tersebut akan mengganggu proses spermatogenesis, motilitas spermatozoa, maupun kualitas dari spermatozoa.<sup>5</sup>

Hingga saat ini belum ada laporan terkait mengenai pengaruh ekstrak daun *Cyclea Barbata L. Miers* dengan dosis bertingkat terhadap motilitas spermatozoa pada orang yang terpapar asap rokok.

Berdasarkan hal-hal tersebut di atas, didapat perumusan masalah yaitu apakah pemberian ekstrak daun *Cyclea barbata L. Miers* dengan dosis bertingkat dapat mempengaruhi motilitas spermatozoa pada mencit Balb/c jantan yang dipapar asap rokok ?

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak daun *Cyclea barbata L. Miers* terhadap motilitas spermatozoa mencit Balb/c jantan yang dipapar asap rokok.

Penelitian ini diharapkan dapat memberi informasi dan mengetahui apakah pemakaian *Cyclea barbata L. Miers* mempengaruhi motilitas spermatozoa pada orang yang terpapar asap rokok, serta memberikan masukan informasi untuk penelitian lebih lanjut.

## **METODE**

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental dengan *post test only control group design*. Besar sampel ditentukan berdasarkan ketentuan WHO, terdiri dari 35 ekor mencit Balb/c jantan yang diperoleh dari Laboratorium Biologi Fakultas MIPA Universitas Negeri Semarang, umur 6-8 minggu, sehat dan aktif, berat badan 25-30 gram, tidak ada kelainan anatomi, diadaptasi selama satu minggu, dan diberi pakan standar serta minum secara *ad libitum*.

Setelah mencit diadaptasikan selama satu minggu, kemudian 35 ekor mencit tersebut dibagi secara acak menjadi lima kelompok percobaan, masing-masing kelompok terdiri atas tujuh ekor mencit. Lima kelompok tersebut adalah kelompok kontrol negatif (K(-)) yang tanpa perlakuan, kelompok kontrol positif (K(+)) yang hanya dipapar asap rokok, kelompok P1 yang dipapar asap rokok dan diberi ekstrak daun *Cyclea barbata L. Miers* dengan dosis 3,75 g/l/hari, kelompok P2 dengan dosis *Cyclea barbata L. Miers* 7,5 g/l/hari, dan kelompok P3 dengan dosis *Cyclea barbata L. Miers* 15 g/l/hari.

Setiap kelompok mencit ditempatkan pada kotak terbuka berukuran 40x30x15 cm dan dipapar asap rokok kretek sebanyak satu batang perhari dengan menggunakan spuit tanpa jarum. Setelah dipapar, kelompok P1, P2, dan P3 diberi ekstrak daun *Cyclea barbata L. Miers* sesuai dosis. Penentuan dosis berdasarkan konversi perhitungan dosis. Dosis yang digunakan berdasarkan penelitian sebelumnya yaitu 3,75 g/l, 7,5 g/l, dan 15

g/l atau setara dengan 0,2 ml, 0,4 ml, dan 0,8 ml. Ekstrak daun *Cyclea barbata L. Miers* diberikan secara oral dengan sonde lambung. Perlakuan berlangsung selama 21 hari, pada hari ke 22 mencit diterminasi kemudian diambil sampel spermatozoanya. Pembuatan preparat dan pemeriksaan motilitas spermatozoa dilakukan di Laboratorium Biologi Universitas Negeri Semarang.

Pemeriksaan motilitas spermatozoa dilakukan pada masing-masing kelompok dengan cara mengambil spermatozoa 1 cm di bawah caput epididimis, diklem, kemudian dipotong. Bagian yang dipotong tadi dikeluarkan spermanya dengan cara dipencet kemudian ditetesi NaCl sebanyak 2 tetes, diaduk agar menjadi homogen. Sperma diletakkan di atas objekglass, ditutup dengan deckglass, diperiksa di bawah mikroskop dengan perbesaran lensa objektif 10X. Pemeriksaan dilakukan pada lima lapangan pandang untuk setiap preparat.<sup>6</sup> Motilitas dari spermatozoa didalamnya dikelompokkan ke dalam kriteria A, B, C atau D berdasarkan penampakan spermatozoa:<sup>7</sup>

- (A) Motilitas cepat dan lurus
- (B) Motilitas lambat
- (C) Bergerak di tempat
- (D) Tidak bergerak.

Data yang dikumpulkan merupakan data primer hasil penelitian eksperimental laboratorik yaitu berupa presentase motilitas spermatozoa mencit Balb/c jantan kriteria A dan B. Data tersebut kemudian diproses dengan menggunakan program SPSS 15.0 *for windows*. Tiap variabel dianalisa secara deskriptif dan disajikan dalam bentuk tabel dan grafik menurut kelompok perlakuannya.

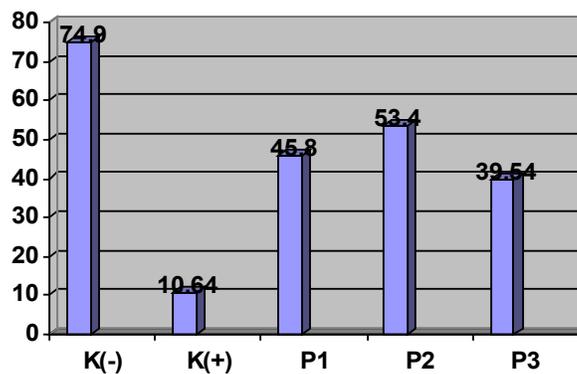
## HASIL

Populasi Mencit strain Balb/c jantan yang diperoleh dari Laboratorium Biologi Fakultas MIPA Universitas Negeri Semarang sebanyak 35 ekor yang memenuhi kriteria inklusi penelitian dibagi dalam lima kelompok perlakuan. Masing-masing kelompok terdiri atas tujuh ekor mencit yang diambil secara acak sesuai dengan *Research Guidelines for Evaluating Safety and Efficacy Of Herbal Medicine* dari WHO yaitu minimal lima ekor tiap satu kelompok.<sup>8</sup>

Pada penelitian ini semua mencit dapat diambil datanya karena tidak terjadi *drop out* selama perlakuan. Namun dari masing-masing kelompok hanya diambil lima ekor mencit yang terlihat aktif. Sebagai analisa data hanya memakai presentase motilitas spermatozoa kriteria A dan B yang dapat dilihat pada tabel dan gambar di bawah ini.

Tabel 1. Presentase motilitas spermatozoa mencit Balb/c jantan kriteria A+B dalam lima lapangan pandang

Kelompok	N	Rerata	SD	Minimal	Maksimal
K (-)	5	74,94	11,03	57,3	86,2
K (+)	5	10,64	6,55	5,1	18,0
P1	5	45,80	29,82	20,7	79,4
P2	5	53,40	31,79	18,4	88,4
P3	5	39,54	29,89	10,0	78,8



Gambar 1. Diagram motilitas spermatozoa mencit kriteria A dan B tiap kelompok

Dari histogram di atas menunjukkan bahwa pemberian ekstrak daun *Cyclea barbata L. Miers* dapat mempertahankan motilitas spermatozoa kelompok P1, P2, dan P3 dibandingkan kelompok K(+). Paparan asap rokok sangat berpengaruh terhadap motilitas spermatozoa dimana terlihat dari kelompok K(-) yang sangat menurun pada kelompok K(+).

Data motilitas spermatozoa diuji normalitasnya dengan uji *Shapiro-Wilk*. Hasilnya menunjukkan distribusi data yang tidak normal sehingga uji selanjutnya adalah uji *Kruskal Wallis*. Dari uji tersebut didapatkan perbedaan bermakna dalam hal motilitas spermatozoa pada semua kelompok ( $p < 0,05$ ). Untuk mengetahui beda antar dua kelompok dilanjutkan dengan uji *Man Whitney*, dengan hasil seperti tabel 2 berikut.

Tabel 2. Perbedaan antar kelompok dengan uji *Man Whitney*

P	K (-)	K (+)	P1	P2	P3
K (-)	-	0,009*	0,175	0,465	0,760
K (+)	0,009*	-	0,009*	0,009*	0,760
P1	0,175	0,009*	-	0,602	0,602
P2	0,465	0,009*	0,602	-	0,347
P3	0,760	0,760	0,602	0,347	-

\* Bermakna  $p < 0,05$

Dari tabel dapat diketahui bahwa terdapat perbedaan yang bermakna antara K(-) dengan K(+), K(+) dengan P1 dan K(+) dengan P2.

## PEMBAHASAN

Asap rokok merupakan suatu oksidan (radikal bebas) yang dapat mempengaruhi proses oksidasi dalam tubuh manusia. Asap rokok dapat menyebabkan stress oksidasi dan menginduksi lipid peroksidase dan lipoprotein peroksidasi. Peroksidasi lipid menimbulkan efek yang sangat merugikan terhadap membran sel.<sup>9,10</sup>

Paparan asap rokok pada penelitian ini mengandung radikal bebas yang dapat menurunkan motilitas spermatozoa. Penurunan ini disebabkan oleh adanya gangguan pada proses spermatogenesis. Hal ini terlihat pada penurunan motilitas spermatozoa pada kelompok kontrol positif (K(+)) dan kelompok perlakuan (P1, P2, P3) yang dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif (K(-)) yang tanpa perlakuan apapun. Hasil ini memperkuat penelitian-penelitian sebelumnya yang menunjukkan betapa buruknya efek asap rokok terhadap kualitas spermatozoa terutama motilitas spermatozoa.

Menurut penelitian asap rokok dapat merusak viabilitas spermatozoa, spermatogenesis, dan menimbulkan gangguan hormonal serta mengakibatkan timbulnya bahan-bahan yang bersifat toksik terhadap sperma.<sup>5,9</sup> Radikal bebas yang terdapat pada asap rokok dalam bentuk leukosit *pnn* memberikan gangguan spermatozoa berupa hilangnya motilitas sperma, gagalnya proses kapasitasi yang menyebabkan proses akrosom tidak terjadi, dan rusakny membran sel sperma.<sup>5</sup>

Hasil penelitian lain juga menunjukkan bahwa radikal bebas dapat menurunkan frekuensi gerak flagel yang mengakibatkan motilitas spermatozoa akan menurun. Hal ini diduga terjadi akibat produksi ATP mitokondria yang rendah. Selain itu dengan terbentuknya peroksida lipid pada membran spermatozoa dapat menyebabkan kerusakan membran spermatozoa. Peroksida lipid itu berasal dari reaksi berantai antara radikal bebas dengan asam lemak jenuh ganda yang terdapat pada membran spermatozoa.<sup>4,5</sup>

Terjadinya kerusakan peroksidasi pada membran spermatozoa diakibatkan enzim pertahanan seperti superoksida dismutase dan glutathion peroksidase dalam sitoplasma spermatozoa tidak banyak. Dengan kata lain spermatozoa hanya mengandung sedikit sitoplasma sehingga enzim yang dibutuhkan untuk menghambat terbentuknya oksigen reaktif tidak cukup efektif. Jika konsentrasi radikal bebas di sekitar spermatozoa cukup banyak, maka lambat laun spermatozoa akan mati. Sebaliknya, jika konsentrasi radikal bebas sedikit, walaupun jumlah tersebut cukup untuk menghambat motilitas, spermatozoa masih dapat bangkit kembali dari pengaruh radikal bebas setelah 6-24 jam.<sup>5</sup>

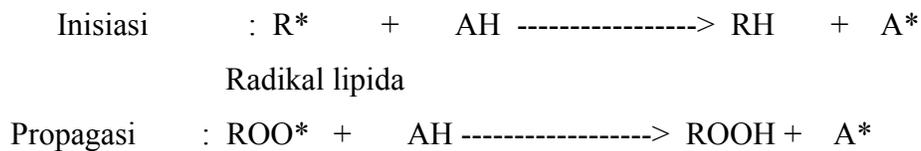
Perbaikan dan peningkatan motilitas spermatozoa dengan pemberian ekstrak daun *Cyclea barbata L. Miers* cukup beralasan. Dimana hasil tersebut menunjukkan bahwa kandungan polifenol sebagai antioksidan yang terkandung dalam daun *Cyclea barbata L. Miers* mampu meredam radikal bebas yang timbul akibat paparan asap rokok dengan cara menghentikan rantai radikal bebas pada oksidasi lipid.<sup>2,3,11,12</sup>

Hingga saat ini belum ada publikasi ilmiah ataupun literatur yang menunjukkan tentang pengaruh ekstrak daun *Cyclea barbata L. Miers* terhadap motilitas spermatozoa. Penelitian sebelumnya yang pernah dilakukan yaitu tentang pengaruh berbagai antioksidan lain seperti Vitamin C, Vitamin E, Jus Buah Tomat terhadap motilitas spermatozoa mencit yang dipapar asap rokok. Dari hasil penelitian ini menunjukkan kecocokan dan memperkuat penelitian-penelitian sebelumnya dimana antioksidan mampu mempertahankan motilitas spermatozoa dari paparan asap rokok karena kandungan fenol berfungsi sebagai antioksidan.

Berdasarkan mekanisme kerjanya, antioksidan memiliki dua fungsi yaitu primer dan sekunder. Fungsi primer yaitu dengan memberikan atom hidrogen secara cepat ke radikal lipid (R\*, ROO\*) atau mengubahnya ke bentuk lebih stabil, sementara turunan radikal antioksidan (A\*) tersebut memiliki keadaan lebih stabil dibanding radikal lipida.

Fungsi sekunder antioksidan yaitu memperlambat laju autooksidasi dengan berbagai mekanisme pemutusan rantai autooksidasi dengan perubahan radikal lipida ke bentuk lebih stabil.<sup>13</sup>

Jika antioksidan (AH) primer ditambahkan dengan konsentrasi rendah maka akan menghambat atau mencegah reaksi autooksidasi lemak dan minyak. Penambahan tersebut dapat menghalangi reaksi oksidasi pada tahap inisiasi maupun propagasi. Radikal-radikal antioksidan (A\*) yang terbentuk pada reaksi tersebut relatif lebih stabil dan tidak mempunyai cukup energi untuk dapat bereaksi dengan molekul lipida lain membentuk radikal lipida baru.<sup>13</sup>

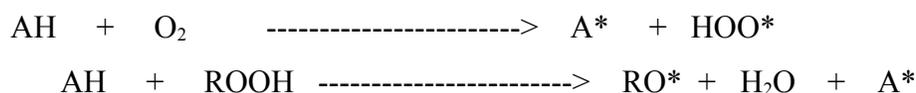


Gambar 2. Reaksi penghambatan antioksidan primer terhadap radikal lipida.

Kelompok perlakuan P2 dengan dosis 7,5 gr/l menunjukkan hasil presentase motilitas spermatozoa yang lebih baik dibanding kelompok P1 dosis 3,75 gr/l dan P3 dosis 15 gr/l. Hal ini menunjukkan kesesuaian dengan dosis *Cyclea barbata L. Miers* yang direkomendasikan saat ini yaitu sekitar 7,25 gr/l.<sup>14</sup>

Pada kelompok P3 menunjukkan penurunan motilitas dibanding kelompok P1 dan P2 yang seharusnya kelompok P3 dengan dosis *Cyclea barbata L. Miers* yang lebih tinggi dibanding kelompok lainnya menunjukkan motilitas yang lebih tinggi juga. Hal ini dapat terjadi karena dosis 15 gr/l bukan dosis optimum dalam memperbaiki motilitas spermatozoa.

Dosis antioksidan yang diberikan bisa berpengaruh pada laju oksidasi. Pada konsentrasi tinggi aktivitas antioksidan sering lenyap bahkan antioksidan tersebut menjadi prooksidan. Jika telah menjadi prooksidan maka fungsi antioksidan tersebut menjadi tidak berguna lagi. Hal ini sesuai dengan teori yang menyebutkan bahwa laju oksidasi dipengaruhi oleh besarnya konsentrasi antioksidan yang ditambahkan. Pada konsentrasi tinggi, aktivitas antioksidan sering lenyap bahkan antioksidan tersebut menjadi prooksidan (Gambar 3).<sup>15</sup>



Gambar 3. Antioksidan bertindak sebagai prooksidan pada konsentrasi tinggi.

Dari penelitian ini dapat diambil kesimpulan yaitu pemberian ekstrak daun *Cyclea barbata L. Miers* menimbulkan pengaruh perbaikan motilitas spermatozoa pada Mencit Balb/c jantan yang dipapar asap rokok secara signifikan. Penggunaan dosis 7,5 g/l per hari memberi hasil terbaik dalam meningkatkan motilitas spermatozoa.

## **SARAN**

Penelitian seperti ini perlu dilakukan dengan dosis lain yang lebih bervariasi dan lama perlakuan yang lebih lama sehingga bisa dilihat lebih lanjut seberapa besar efek *Cyclea barbata L. Miers* terhadap motilitas spermatozoa.

## **UCAPAN TERIMA KASIH**

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Prof. Dr. Dr. Hertanto WS, Sp. GK selaku ketua penguji, dr. Eriawan Agung Nugroho Sp. U selaku penguji, Bagian Kimia FK Undip, serta staf Laboratorium Biologi FMIPA UNNES atas waktu, bimbingan dan bantuannya hingga penelitian ini dapat selesai.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Adyaksa G. Pengaruh pemberian ekstrak daun *Cyclea barbata* L. miers terhadap gambaran histologis ginjal mencit balb/c. Karya Tulis Ilmiah. Semarang: Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro; 2005.
2. Hyene K. Tumbuhan berguna indonesia. Jilid IV. Jakarta: Yayasan Sarana Jaya; 2001.
3. Huson B.J.F. Food antioxidant elsevier applied science. London: Univ Press, 1998; p.19-64.
4. Kalbe Farma. Antioksidan cegah kesuburan pria. c2004 [updated 11 Oktober 2004; cited 14 April 2009]. Available from: <http://www.kalbe.co.id/?mn=news&tipe=detail&detail=17515/>.
5. Radikal bebas penyebab infertilitas pria. c2003 [update 23 November 2003; cited 14 April 2009]. Available from: <http://www.cyberman.cbn.net.id/detil.asp?kategori=health&newsno=392/>.
6. Juniarto AZ. Petunjuk praktikum analisa sperma. Semarang: Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro; 2006.
7. Soehadi K. Analisa sperma. Surabaya: Airlangga Univ Press; 1982.
8. WHO. Research guidelines for evaluating the safety and efficiency of herbal medicines. Manila : WHO Regional Office for Western Pacific; 1993.
9. Anonim. Radikal bebas. c2005 [updated 11 Januari 2005; cited 20 April 2009]. Available from: [http://www.wikipedia.com/radikal\\_bebas/](http://www.wikipedia.com/radikal_bebas/).
10. Halliwill B. Reactive oxygen species in living system source, biochemistry and rate in human disease. AMJ Med 3-14. London: Univ Press; 1991.
11. Sunanto H. Budidaya cincau. Yogyakarta: Kanisius; 1995.
12. Anonim. *Cyclea barbata miers* (pdf). c2005 [updated 31 januari 2005, cited 14 April 2009]. Available from: [http://www.iptek.apjii.or.id/data/tanaman/kat\\_mid.htm#c/](http://www.iptek.apjii.or.id/data/tanaman/kat_mid.htm#c/).
13. Opara EC. Antioxidant the latest weapon in the war on smoking part 2. c2000 [updated 200 August 14, cited 20 April 2009]. Available from: <http://www.nutritionalnews.net//VRP's> Nutritional News//.
14. Kelana A, Mala AK, Hidayat R. Tak sekedar minuman segar. c2003 [updated 15 Januari 2003, cited 14 April 2009]. Available from: [http://www.gatra.com/tak\\_sekedar\\_minuman\\_segar/](http://www.gatra.com/tak_sekedar_minuman_segar/).
15. Arouma OI. Free radicals, antioxidant and international nutrition. Brazil: Faculty of Pharmaceutical Science University of Sao Paulo at Roberio Preto-Sao Paulo; 1999.