



Pengaruh Tinta Cumi-Cumi (*Loligo* sp.) Terhadap Kualitas dan Kuantitas Spermatozoa Mencit (*Mus musculus* L.) yang Diinduksi D-Galaktosa

Dewi Restika Ayu Safitri^{1,*}, Sutyarso², Hendri Busman³, Nuning Nurcahyani⁴

¹Jurusan Biologi Universitas Lampung, Jalan Prof. Dr. Soemantri Brodjonegoro, Bandar Lampung, Indonesia

²Jurusan Biologi Universitas Lampung, Jalan Prof. Dr. Soemantri Brodjonegoro, Bandar Lampung, Indonesia

³Jurusan Biologi Universitas Lampung, Jalan Prof. Dr. Soemantri Brodjonegoro, Bandar Lampung, Indonesia

⁴Jurusan Biologi Universitas Lampung, Jalan Prof. Dr. Soemantri Brodjonegoro, Bandar Lampung, Indonesia

*restikasafitrisman@gmail.com

Abstract

Increased levels of free radicals in the body are thought to trigger oxidative stress and cause aging. Biologists state that aging is one of the causes of infertility in men. Squid ink is known to have high antioxidant activity so that it can be used as an alternative treatment. Therefore, this study was conducted with the aim of knowing the effect of inking squid on the quality and quantity of male individual spermatozoa, which included sperm count, motility, and viability of the spermatozoa of mice experiencing oxidative stress due to D-Galactose induction. This research was conducted experimentally in December 2022 – March 2023 where 24 male mice were divided into 4 groups, namely K, K- (D-Gal 150 mg/kgBB), P1 (D-Gal 150 mg/kgBB + squid ink 40 mL/kgBB), and P2 (D-Gal 150 mg/kgBB + squid ink 100 mL/kgBB). The results showed that squid ink was able to increase the quality and quantity (sperm count, motility, and viability) of mice spermatozoa which had previously decreased due to D-Galactose induction, where the best results for each parameter were shown by P2.

Keywords: Squid ink, D-galactose, infertility, mice, aging

Abstrak

Peningkatan kadar radikal bebas di dalam tubuh diduga dapat memicu terjadinya stress oksidatif dan menyebabkan penuaan. Para ahli Biologi menyatakan bahwa penuaan merupakan salah satu penyebab terjadinya infertilitas pada pria. Tinta cumi-cumi diketahui memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi sehingga dapat dimanfaatkan sebagai alternatif pengobatan. Oleh sebab itu, penelitian ini dilakukan dengan tujuan mengetahui pengaruh pemberian tinta cumi-cumi terhadap kualitas dan kuantitas spermatozoa individu jantan, yang meliputi jumlah, motilitas, dan viabilitas spermatozoa mencit yang mengalami stress oksidatif akibat penginduksian D-Galaktosa. Penelitian ini dilakukan secara eksperimental pada Desember 2022 – Maret 2023 dimana 24 ekor mencit jantan dibagi menjadi 4 kelompok, yaitu K, K- (D-Gal 150 mg/kgBB), P1 (D-Gal 150 mg/kgBB + tinta cumi-cumi 40 mL/kgBB), dan P2 (D-Gal 150 mg/kgBB + tinta cumi-cumi 100 mL/kgBB). Hasil penelitian menunjukkan bahwa tinta cumi-cumi mampu meningkatkan kualitas dan kuantitas (jumlah, motilitas, dan viabilitas) spermatozoa mencit yang sebelumnya mengalami penurunan akibat penginduksian D-Galaktosa, dimana hasil terbaik pada masing-masing parameter ditunjukkan oleh P2.

Kata kunci : Tinta cumi-cumi, D-galaktosa, infertilitas, mencit, penuaan

PENDAHULUAN

Penuaan (*aging*) merupakan suatu peristiwa alamiah yang pasti dialami oleh setiap makhluk hidup. Menurut para ahli Biologi, penuaan pada makhluk hidup terjadi akibat peningkatan kadar radikal bebas yang memicu terjadinya stress oksidatif dan menyebabkan kerusakan sel-sel tubuh serta menghambat proses perbaikan terhadap kerusakan-kerusakan tersebut [1]. Stress oksidatif merupakan kondisi dimana radikal bebas di dalam tubuh mengalami peningkatan, sedangkan antioksidan mengalami penurunan jumlah dibandingkan radikal bebas, sehingga sel-sel normal akan mengalami oksidasi dan mengakibatkan kerusakan sel maupun jaringan [2]. Banyak faktor yang dapat menyebabkan stress oksidatif dan mengakibatkan terjadinya penuaan, diantaranya penurunan daya tahan tubuh akibat serangan penyakit tertentu, perubahan hormon, dan stress, radiasi sinar matahari, polusi, dan induksi senyawa-senyawa yang mengandung radikal bebas [3]. Menurut López-Otín *et al.* (2013), peristiwa penuaan pada makhluk hidup ditandai oleh beberapa hal, diantaranya kemunduran kualitas fenotip, hilangnya kemampuan tubuh dalam meregulasi proses penginderaan nutrisi, epigenetik tubuh mengalami perubahan, kemampuan sistem komunikasi interseluler mengalami gangguan, dan lain sebagainya [4].

Peristiwa penuaan yang dialami oleh makhluk hidup dapat mengakibatkan berbagai macam penyakit degeneratif, termasuk infertilitas. Infertilitas atau kemandulan merupakan ketidakmampuan pasangan yang telah menikah untuk memperoleh keturunan meskipun telah melakukan hubungan seksual secara teratur tanpa melibatkan alat kontrasepsi [5]. Tidak hanya terjadi pada wanita, infertilitas juga dapat terjadi pada pria. Pada pria, kasus-kasus infertilitas didominasi oleh menurunnya kualitas dan kuantitas spermatozoa yang mampu dihasilkan, termasuk konsentrasi, jumlah, motilitas, viabilitas, dan morfologi spermatozoa [6]. D-Galaktosa merupakan senyawa yang telah banyak digunakan dalam bidang kesehatan dan farmasi untuk mendemostrasikan proses stress oksidatif yang memicu berbagai penyakit degeneratif, termasuk penuaan pada makhluk hidup. Senyawa ini diketahui sebagai bahan dasar penyusun susu dalam bentuk oligosakarida dan termasuk golongan gula aldoheksosa yang kaya akan radikal bebas. Senyawa ini bekerja dengan cara merusak rangkaian proses metabolisme karbohidrat sehingga mengakibatkan terjadinya stress oksidatif [7]. Namun, tingkat stress oksidatif makhluk hidup akibat penginduksian D-Galaktosa dapat dinetralisir dengan memanfaatkan antioksidan. Menurut Parwata (2016), antioksidan merupakan senyawa-senyawa yang memiliki kemampuan untuk menetralkan sifat toksik radikal bebas dengan cara mendonorkan elektron yang dimiliki tanpa kehilangan kestabilannya, sehingga senyawa tersebut tidak lagi bersifat toksik di dalam tubuh [8].

Affandi *et al.* (2019) mengemukakan bahwa tinta cumi-cumi merupakan salah satu bahan alam yang memiliki aktivitas antioksidan dengan jumlah tinggi dan berpotensi dikembangkan dalam bidang kesehatan dan farmakologi. Tinta cumi-cumi diketahui mengandung melanin, asam sinamat, *betaine*, *choline*, DHI, DHICA, protein, senyawa fenolik, dan karbohidrat. Senyawa-senyawa tersebut bekerja dengan cara berikatan dengan molekul-molekul radikal bebas mengubahnya menjadi molekul-molekul non-toksik dan sifatnya stabil. Selain itu, senyawa-senyawa tersebut juga mampu meningkatkan antioksidan bersifat enzimatis, misalnya SOD, CAT, dan GPx yang berperan dalam memproduksi antioksidan secara alami di dalam tubuh [9]. Oleh sebab itu, penelitian ini dilakukan guna membuktikan potensi tinta cumi-cumi dalam meningkatkan antioksidan di dalam tubuh dan mencegah terjadinya stress oksidatif yang memicu infertilitas melalui pengujian terhadap kualitas dan kuantitas spermatozoa yang mampu dihasilkan.

METODE

Penelitian ini dilaksanakan pada Desember 2022 – Maret 2023 di Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung. Penelitian ini bersifat eksperimental menggunakan tipe Rancangan Acak Lengkap (RAL). Sebanyak 24 ekor mencit jantan dibagi menjadi 4 kelompok secara acak, yaitu **Kontrol** (Mencit diberi makan dan minum tanpa diberikan D-Galaktosa maupun tinta cumi-cumi), **Kontrol Negatif** (D-galaktosa 150 mg/kgBB), **Perlakuan 1** (D-Galaktosa 150 mg/kgBB + tinta cumi-cumi 40 mL/kgBB), dan **Perlakuan 2** (D-Galaktosa 150 mg/kgBB + tinta cumi-cumi 100 mL/kgBB). Keempat kelompok tersebut kemudian dipelihara 35 hari atau mengikuti satu kali siklus spermatozoa. Penginduksian D-Galaktosa dilakukan secara intraperitoneal menggunakan *sprit syringe* 1 mL, sedangkan pemberian tinta cumi-cumi dilakukan secara oral menggunakan sonde lambung.

Terdapat tiga parameter yang diamati dalam penelitian ini, yaitu jumlah (juta/mL), viabilitas (%), dan motilitas (%). Pengamatan pada masing-masing parameter penelitian dilakukan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400x. Jumlah spermatozoa dihitung dengan cara diencerkan sebanyak 20x, kemudian dihitung menggunakan hemositometer dan hasilnya dikalikan dengan 200.000/mL. Motilitas spermatozoa dihitung dengan cara rumus berikut (Fatmawati dkk., 2016) [10].

$$\text{Motilitas Spermatozoa (\%)} = \frac{a}{a+b} \times 100\%$$

a merupakan spermatozoa motil, sedangkan b adalah spermatozoa imotil.

Sementara itu, persentase viabilitas spermatozoa dihitung menggunakan rumus berikut.

$$\text{Viabilitas Spermatozoa (\%)} = \frac{a}{a+b} \times 100\%$$

a merupakan spermatozoa yang kepalannya tidak terwarnai, sedangkan b adalah spermatozoa yang kepalanya terwarnai.

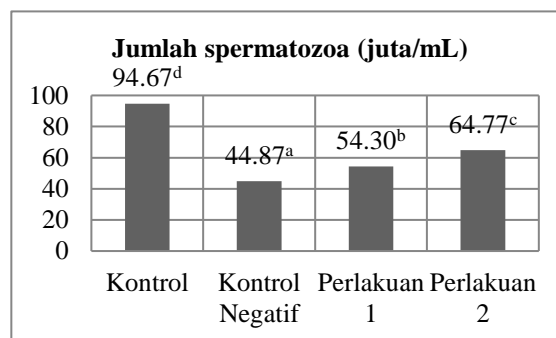
Analisis data dilakukan menggunakan *Analysis of Variance* (ANOVA) pada taraf 5% untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan pada masing-masing kelompok, lalu analisis data dilanjutkan menggunakan uji BNT untuk melihat perbedaan pada masing-masing kelompok.

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. HASIL

1. Jumlah Spermatozoa Mencit

Penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa secara statistik, jumlah spermatozoa mencit pada kelompok Kontrol berbeda nyata dengan kelompok Kontrol Negatif, Perlakuan 1, dan Perlakuan 2. Hasil penelitian menunjukkan bahwa terjadi penurunan jumlah spermatozoa yang semula 94,67 juta/mL (K) menjadi 44,86 juta/mL (K-) setelah diinduksi D-Galaktosa sebanyak 150 mg/kgBB. Jumlah tersebut kemudian kembali mengalami peningkatan menjadi 54,300 juta/mL setelah diberi tinta cumi-cumi sebanyak 40 mL (P1) dan 64,767 juta/mL setelah diberi tinta cumi-cumi sebanyak 100 mL/kgBB (P2). Hasil uji ANOVA pada taraf 5% yang dilanjutkan menggunakan uji BNT terhadap rata-rata jumlah spermatozoa disajikan pada **Gambar 1**.



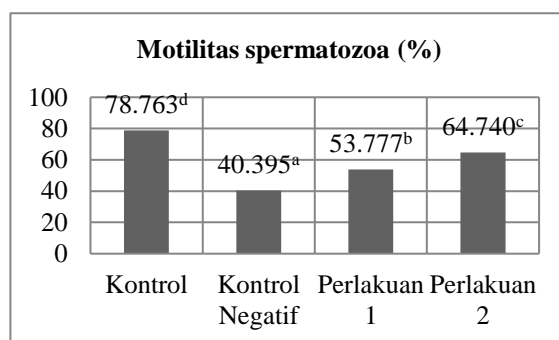
Gambar 1. Jumlah Spermatozoa Mencit

Keterangan: Huruf yang berbeda menunjukkan bahwa hasil analisis menggunakan ANOVA 5% berbeda nyata.

2. Motilitas Spermatozoa Mencit

Hasil penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa motilitas spermatozoa mencit yang diinduksi D-Galaktosa (K-) mengalami penurunan menjadi 40,395% jika

dibandingkan dengan yang tidak mendapat perlakuan apapun (K), yaitu 78,763%. Jika dibandingkan dengan kelompok Perlakuan (P1 dan P2), terlihat bahwa terjadi peningkatan persentase motilitas spermatozoa setelah pemberian tinta cumi-cumi. Meskipun kelompok perlakuan sama-sama mampu menaikkan persentase spermatozoa motil, namun hasil terbaik dimiliki oleh P2, yakni dengan persentase spermatozoa motil mencapai 64,767%, sedangkan P1 hanya mampu meningkatkan motilitas spermatozoa hingga 53,572% saja. Hasil analisis ANOVA 5% dan uji BNT pada motilitas spermatozoa mencit yang diinduksi D-Galaktosa dan diberi tinta cumi-cumi ditunjukkan pada **Gambar 2**.

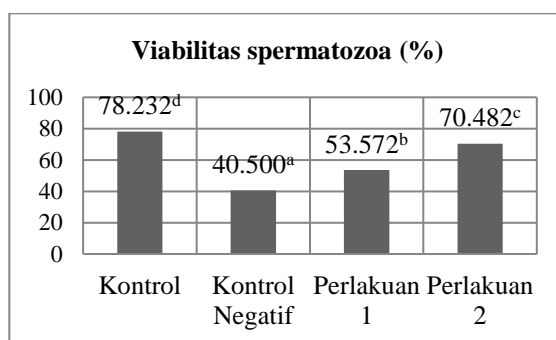


Gambar 2. Motilitas Spermatozoa Mencit

Keterangan: Huruf yang berbeda menunjukkan bahwa hasil analisis menggunakan ANOVA 5% berbeda nyata.

3. Viabilitas Spermatozoa Mencit

Viabilitas spermatozoa mencit setelah dianalisis menggunakan ANOVA pada taraf 5% dan dilanjutkan dengan uji BNT ditunjukkan pada **Gambar 3**.



Gambar 3. Viabilitas Spermatozoa Mencit

Keterangan: Huruf yang berbeda menunjukkan bahwa hasil analisis menggunakan ANOVA 5% berbeda nyata.

Hasil pada **Gambar 3**. menunjukkan bahwa masing-masing kelompok berbeda nyata secara statistik, dimana kelompok yang diinduksi D-Galaktosa memiliki viabilitas spermatozoa paling buruk, yakni hanya 40,500%. Viabilitas spermatozoa kelompok yang

diinduksi D-Galaktosa sebanyak 150 mg/kgBB kemudian mengalami peningkatan setelah diberi tinta cumi-cumi sebanyak 40 mL/kgBB dan 100 mL/kgBB. Dari kedua jenis dosis tersebut, Perlakuan 2 menunjukkan hasil paling baik, yakni dengan viabilitas sebesar 70,482%, sedangkan Perlakuan 1 hanya mampu meningkatkan viabilitas spermatozoa hingga 53,572% saja. Meskipun terjadi peningkatan, namun jumlahnya belum melebihi viabilitas spermatozoa mencit yang tidak mendapat perlakuan apapun (Kontrol). Diduga, dosis tinta cumi-cumi yang digunakan belum sepenuhnya mampu memperbaiki kerusakan yang diakibatkan oleh invasi molekul dan senyawa radikal bebas.

PEMBAHASAN

1. Jumlah Spermatozoa

Keberhasilan proses spermatogenesis sangat berpengaruh dalam menentukan jumlah spermatozoa yang dihasilkan dalam satu kali ejakulasi, sehingga gangguan yang terjadi pada proses tersebut dapat menyebabkan penurunan jumlah yang mampu dihasilkan. Menurut Zhang *et al.* (2021), kadar FSH dan LH sangat berperan dalam menentukan keberhasilan proses spermatogenesis. Apabila aktivitas kedua hormon tersebut mengalami gangguan, maka pembentukan hormon testosteron dan ABP yang mengatur keberlangsungan proses spermatogenesis juga akan ikut terganggu [11]. Pada penelitian ini, D-Galaktosa yang diketahui bersifat toksik diinduksikan kepada hewan uji guna mengetahui pengaruhnya dalam menurunkan jumlah spermatozoa. Hasil yang didapatkan menunjukkan bahwa terjadi degradasi jumlah spermatozoa yang dihasilkan oleh hewan uji. Hasil ini sesuai dengan Salman *et al.* (2016) yang menunjukkan bahwa jumlah spermatozoa hewan uji mengalami penurunan setelah diinduksi dengan D-Galaktosa dalam dosis tertentu. Penurunan ini terjadi akibat meningkatnya kadar radikal bebas yang memicu tingginya aktivitas *Malonaldehyde* (MDA) dan *Lactate Dehydrogenase* (LDH), sementara aktivitas enzim kaya akan antioksidan, yaitu *Superoxide Dismutase* (SOD) dan katalase (CAT) mengalami penurunan [12]. Selain itu, Liao *et al.* (2020) menyatakan bahwa D-Galaktosa yang diinduksikan ke dalam tubuh hewan uji akan menyebabkan disfungsi gen-gen pengatur proses spermatogenesis, misalnya *Cycl2*, *Hkt1*, *Pltp*, *Utp3*, *Zpbp*, dan *Cabyr*. Kondisi ini terjadi akibat peroksidasi asam lemak yang meningkat, sedangkan senyawa yang menetralkan toksisitasnya (dalam hal ini antioksidan enzimatis, misalnya ROS) mengalami penurunan [13].

Antioksidan yang terkandung dalam tinta cumi-cumi telah banyak dimanfaatkan dalam bidang pengobatan berbagai macam penyakit. Pemberian tinta cumi-cumi terhadap mencit yang mengalami stress oksidatif diharapkan mampu memperbaiki kerusakan yang diakibatkan oleh proses penginduksian D-Galaktosa. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian tinta cumi-cumi mampu meningkatkan jumlah spermatozoa mencit yang sebelumnya mengalami penurunan. Hasil ini sesuai dengan Gu *et al.* (2020) yang menjelaskan bahwa tinta cumi-cumi mampu melindungi fungsi reproduksi testis dan meningkatkan aktivitas antioksidan di dalamnya, sehingga aktivitas gen-gen yang mengatur proses spermatogenesis tidak terganggu dan kerusakan struktur akibat stress oksidatif dapat dicegah ataupun diperbaiki [14]. Kadar SOD dan CAT yang ikut meningkat mengindikasikan terjadinya perbaikan kerusakan struktur kimiawi penyusun tubuh dan produksi hormon-hormon reproduksi juga berjalan normal, sehingga kerusakan stress oksidatif yang dialami mencit akibat penginduksian D-Galaktosa dapat diperbaiki. Pernyataan ini sesuai dengan penelitian Liu *et al.* (2011) yang menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan pada tinta cumi-cumi mampu memperbaiki kerusakan sel dan jaringan yang memicu peningkatan aktivitas *Superoxide Dismutase* (SOD) dan menekan jumlah *Malonaldehyde* (MDA) [15].

2. Motilitas Spermatozoa

Kemampuan spermatozoa untuk bergerak secara efisien dalam mendukung keberhasilan proses fertilisasi di dalam tuba falopi disebut dengan motilitas. Pergerakan spermatozoa sangat dipengaruhi oleh energi yang dimiliki. Apabila energi yang dimiliki oleh spermatozoa telah digunakan seluruhnya dan tidak ada aktivitas pembentukan kembali, maka spermatozoa akan kehilangan kemampuan untuk bergerak (imotil) [16]. Mitokondria merupakan bagian sel yang sangat penting dalam proses pembentukan energi pada spermatozoa. Pada saat D-Galaktosa diinduksikan ke dalam tubuh, maka akan terjadi kerusakan pada mitokondria akibat sifat toksik molekul-molekul radikal bebas yang terkandung dalam D-Galaktosa. Molekul-molekul tersebut tidak hanya merusak struktur sel dan fungsi mitokondria, tetapi juga gugus fungsi dan struktur senyawa-senyawa yang mitokondria untuk menghasilkan energi. Akibatnya, proses pembentukan energi tidak dapat terjadi dan spermatozoa kehilangan kemampuannya untuk bergerak [17]. Oleh sebab itu, antioksidan tinggi digunakan untuk memperbaiki kerusakan-kerusakan tersebut.

Tinta cumi-cumi diketahui mengandung senyawa-senyawa antioksidan dalam jumlah yang tinggi dan dapat dimanfaatkan dalam pengobatan pada penurunan parameter spermatozoa, khususnya motilitas. Hasil penelitian ini membuktikan teori-teori tersebut, dimana kelompok mencit yang diinduksi D-Galaktosa dan diberi tinta cumi-cumi mengalami peningkatan motilitas jika dibandingkan dengan kelompok yang diinduksi D-Galaktosa saja. Hasil penelitian ini sesuai dengan David *et al.* (2022) yang menunjukkan bahwa terjadi penginduksian D-Galaktosa menyebabkan terjadinya stress oksidatif akibat menurunnya kadar antioksidan alami tubuh, sehingga progresivitas spermatozoa mencit juga ikut terganggu [18]. Nasution (2017) menyatakan bahwa kandungan antioksidan tinta cumi-cumi dapat menghambat regenerasi *Reactive Oxygen Species* (ROS) di dalam tubuh dan menyusun ulang tatanan struktur senyawa-senyawa superoksida agar bersifat stabil dan kehilangan toksisitasnya. Dengan demikian, kerusakan struktur mitokondria maupun bahan-bahan produksi energi dapat diminimalisir dan diperbaiki, sehingga proses pembentukan energi bagi spermatozoa dapat berjalan seperti keadaan normal [19].

3. Viabilitas Spermatozoa

Viabilitas diartikan sebagai kemampuan spermatozoa untuk bertahan hidup dalam kondisi tertentu di luar tubuh. Sama seperti motilitas, viabilitas juga sangat bergantung pada energi yang dimiliki. Spermatozoa yang tidak memiliki energi akan kehilangan kemampuan hidupnya [20]. Tinta cumi-cumi merupakan bahan alam yang mengandung berbagai macam antioksidan seperti flavonoid, fenolik, dan mineral. Pernyataan ini sesuai dengan Riyad *et al.* (2020) menyatakan bahwa senyawa-senyawa fenolik dan flavonoid merupakan antioksidan yang mampu memperbaiki kerusakan membran akibat peroksidasi lemak. D-Galaktosa diketahui mampu meningkatkan kadar MDA melalui peroksidasi lemak, sehingga akumulasi *Reactive Oxygen Species* (ROS) di dalam tubuh tidak hanya bertambah, tetapi membran plasma juga tidak dapat melakukan fungsinya dengan maksimal [21]. Kandungan mineral yang dimiliki oleh tinta cumi-cumi dapat berikatan dengan antioksidan enzimatis dan mendukung aktivitasnya dalam memodifikasi susunan struktur molekul dan senyawa yang bersifat racun [22]. Hal ini sesuai dengan Zaharah and Rabeta (2018) yang menyatakan bahwa tinta cumi-cumi memiliki aktivitas antioksidan hingga 94,87% dan dapat meningkatkan viabilitas spermatozoa yang mengalami penurunan akibat aktivitas radikal bebas dari D-Galaktosa [23].

PENUTUP

Penelitian yang telah dilaksanakan menunjukkan bahwa tinta cumi-cumi mampu memperbaiki kerusakan pada proses spermatogenesis akibat aktivitas D-Galaktosa, sehingga jumlah, motilitas, dan viabilitas spermatozoa mencit mengalami peningkatan. Sehingga dapat disimpulkan bahwa tinta cumi-cumi dapat dikembangkan dalam bidang farmakologi dan medis sebagai metode pengobatan alternatif terhadap infertilitas.

DAFTAR PUSTAKA

1. Jin, K. 2010. Modern Biological Theories of Aging. *Aging and Disease*. 1(2): 72-74.
2. Walczak-Jedrzejowska, R., Wolski J. K., and Slowikowska-Hilczner J. 2013. The Role of Oxidative Stress and Antioxidant in Male Fertility. *Central European Journal of Urology*. 66(1): 60-67.
3. Swastika, A., Mufrod, dan Purwanto. 2013. Aktivitas Antioksidan Krim Ekstrak Sari Tomat (*Solanum lycopersicum* L.). *Traditional Medicine Journal*. 18(3): 132-140.
4. López-Otín, C., Blasco M. A., Partridge L., Serrano M., and Kroemer G. 2013. The Hallmarks of Aging. *Cell*. 153(6):1194-1217.
5. Dillasamola, D. 2021. *Infertilitas: Kumpulan Jurnal Penelitian Mengenai Infertilitas*. Padang: LPPM Universitas Andalas.
6. Stone, B. A., Alex A., Werlin L. B., and Marrs R. P. 2013. Age Thresholds for Changes in Semen Parameters in Men. *Fertility and Sterility*. 100(4): 952-958.
7. Mohammadi, E., Mehri S., Bostan H. B., and Hosseinzadeh H. 2018. Protective Effect of Crocin Against D-Galactose Induced Aging in Mice. *Avicenna Journal of Phytomedicine*. 8(1): 14-23.
8. Parwata, M. O. A. 2016. *Antioksidan*. Bali: Program Pascasarjana Universitas Udayana.
9. Affandi, R. I., Fadjar M., and Ekawati A. W. 2019. Active Compounds on Squid (*Loligo* sp.) Ink Extract Powder as Immunostimulants Candidate to Against Shrimp Disease. *Research Journal of Life Sciences*. 6(3); 150-161.
10. Fatmawati, D., Israhanto I., Iwang Y., dan Suparmi. 2016. Kualitas Spermatozoa Mencit Balb/C Jantan Setelah Pemberian Ekstrak Buah Kepel (*Stelechocarpus burahol*). *MKB*. 48(3); 155-159.
11. Zhang, Q., Yang C., Zhang M., Lu X., Cao W., Xie C., Li X., Wu J., Zhong C., and Geng S. 2021. Protective Effects of Ginseng Stem-Leaf Saponins on D-Galactose Induced Reproductive Injury in Male Mice. *Aging*. 13(6): 8916-8928.
12. Salman, M. T., Olayaki A. L., Alagbonsi A. I., and Oyewopo O. A. 2016. Spermatotoxic Effects of Galactose and Possible Mechanisms of Action. *Middle East Fertility Society Journal*. 21: 82-90.
13. Liao, H. C., Chen H. B., Chiang S. H., Chen W. C., Chen F. M., Ke C. C., Wang Y. Y., Lin N. W., Wang C. C., and Lin H. Y. 2016. Optimizing a Male Reproductive Aging Mouse Model by D-Galactose Injection. *International Journal of Molecular Sciences*. 17(1): 98-108.
14. Gu, Y. P., Yang X. M., Duan Z. H., Shang J. H., Luo P., Xiao W., Zhang D. Y. and Liu H. Z. 2017. Squid Ink Polysaccharide Prevents Autophagy and Oxidative Stress Affected by Cyclophosphamide in Leydig Cells of Mice: a Pilot Study. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. 20(11); 1194-1199.

15. Liu, H., Luo P., Chen S., and Shang J. 2011. Effects of Squid Ink on Growth Performance, Antioxidant Functions, and Immunity in Growing Broiler Chickens. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences*. 24(12): 1752-1756.
16. Unitly, A. J. A., Eddy L., Nindatu M., dan Reaso. 2022. Peningkatan Motilitas dan Viabilitas Spermatozoa *Rattus novergicus* Terpapar Asap Rokok Pasca Diterapi Sirup Cengkeh. *Jurnal Biologi Edukasi*. 14(1): 14-20.
17. Piomboni, P., Focarelli R., Stendardi A., Ferramosca, and Zara aV. 2012. The Role of Mtochondria in Energy Production for Human Sperm Motility. *International Journal of Andrology*. 35: 109-124.
18. David, B. K., Isaac T. A., Ajayi F. A., Adebola O. A., Isaac A. J., Peter B. A., Grace A., Kayode T. O., and Oyekunle S. O. 2022. Effect of Vernonia amygdalina Leaves Extract on Testicular Functions of D-Galactose Induced Ageing Male Albino Rats. *Journal of Pharmacology and Toxicology*. 17(1): 1-13.
19. Nasution, F. M., Mardia R. s., Azri A., Hutabarat R. R., Al-izza F. dan Asfur R. 2017. Pengaruh Pemberian Ekstrak Tinta Cumi (Squid Ink) terhadap Aterosklerosis. *Jurnal e-Biomedik*. 5(2).
20. Putra, L. M. dan Nur D. 2019. Viabilitas Spermatozoa Kambing Boer Pasca Pembekuan dalam Pengencer Tris Dasar Soya dengan Kombinasi Gula yang Berbeda. *LenteraBio*. 8(1): 31-35.
21. Riyad, M. Y., Rizki E. A., and Mohammed E. S. N. 2020. Active Components of Squid Ink and Food Applications. *Egyptian Journal of Food Science*. 48(1): 123-133.
22. Zulaikhah, S. T. 2017. The Role of Antioxidant to Prevent Free Radicals in the Body. *Jurnal Sains Medika*. 8(1): 39.45.
23. Zaharah, F. and Rabeta. 2018. Antioxidant and Antimicrobial Activities of Squid Ink Powder. *Journal of Food Research*. 2(1): 82-88.