

Efek Protektif Pemberian Ekstrak Etanol 96% Bekatul Beras Merah Terhadap Jumlah Rerata Spermatosit Primer dan Ketebalan Tubulus Seminiferus Tikus Putih Jantan Galur *Sprague dawley* yang Terpapar Asap Rokok Kretek

Nandya Dwizella¹, Soraya Rahmanisa², Ratna Dewi Puspitasari³

¹Mahasiswa, Fakultas Kedokteran, Universitas Lampung

²Bagian Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Lampung

³Bagian Obstetri dan Ginekologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Lampung

Abstrak

Paparan asap rokok dapat menyebabkan stres oksidatif yang dapat menghambat spermatogenesis sehingga meningkatkan infertilitas. Bekatul merupakan limbah dari penggilingan padi yang berfungsi sebagai antioksidan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek protektif pemberian ekstrak etanol 96% bekatul beras merah terhadap jumlah rerata spermatosit primer dan ketebalan tubulus seminiferus tikus yang terpapar asap rokok kretek. Penelitian eksperimental dengan menggunakan 25 ekor tikus yang dibagi menjadi 5 kelompok yaitu K(-) tidak diberi perlakuan, K(+) diberi paparan asap rokok, P1 diberi paparan asap rokok dan ekstrak etanol 96% bekatul beras merah dosis 100 mg/KgBB, P2 diberi paparan asap rokok dan ekstrak etanol 96% bekatul beras merah dosis 200 mg/KgBB dan P3 diberi paparan asap rokok dan ekstrak etanol 96% bekatul beras merah dosis 400 mg/KgBB. Perlakuan dilakukan selama 30 hari. Jumlah rerata spermatosit primer K(-), K(+), P1, P2 dan P3 adalah 113,6±47; 50,7±5,0; 112,7±9,4; 107,3±5,6; 109,4±5,3. Ketebalan tubulus seminiferus pada K(-), K(+), P1, P2 dan P3 adalah 249,9±12,5; 209,7±6,3; 244,8±19,3; 246,8±11,2; 239,5±5,9. Data dianalisis dengan uji *One Way Anova* didapatkan hasil $p=0,00$ ($p<0,05$). Uji *Posthoc* menunjukkan perbedaan nyata antara K(+) dengan K(-), P1, P2, P3. Pemberian ekstrak etanol 96% bekatul beras merah dapat mencegah berkurangnya jumlah rerata spermatosit primer dan ketebalan tubulus seminiferus tikus putih yang terpapar asap rokok kretek.

Kata kunci : asap rokok, bekatul, ketebalan tubulus seminiferus, spermatosit primer

The Protective Effect 96% Ethanol Extract of Red Rice Bran (*Oryza nivara*) to Mean Primary Spermatocyte count and Seminiferous Tubule Thickness Male White Rats *Sprague dawley* Exposure with Kretek Cigarette Smoke

Abstract

Exposure to cigarette smoke can cause oxidative stress that can inhibit spermatogenesis thus increasing infertility. Bran is a waste of rice mill that serves as an antioxidant. The purpose of this research to know the protective effect of 96% ethanol extract of red rice bran to the mean primary spermatocytes count and tubule seminiferous thickness white rats exposure to cigarette smoke. Experimental research using 25 rats divided into 5 groups, K (-) was not treated, K (+) was exposed to cigarette smoke, P1 was exposed to cigarette smoke and 96% ethanol extract red rice bran dose 100 mg / KgBB, P2 given exposure to cigarette smoke and 96% ethanol extract red rice bran dose 200 mg / KgBB and P3 given exposure to cigarette smoke and 96% ethanol extract red rice bran dose 400 mg / KgBB. Treatment was carried out for 30 days. The mean number of primary spermatocytes K (-), K (+), P1, P2 and P3 were 113.6 ± 47; 50.7 ± 5.0; 112.7 ± 9.4; 107.3 ± 5.6; 109.4 ± 5.3. The thickness of the seminiferous tubules in K (-), K (+), P1, P2 and P3 is 249.9 ± 12.5; 209.7 ± 6.3; 244.8 ± 19.3; 246.8 ± 11.2; 239.5 ± 5.9. The result were analyzed by One Way Anova test showed that $p = 0,00$ ($p < 0,05$). Posthoc test shows the real difference between K (+) with K (-), P1, P2, P3. Administration of 96% ethanol extract of red rice bran can prevent the reduction mean of primary spermatocytes count and the thickness of seminiferous tubules of white mice exposed to kretek cigarette smoke

Keyword : cigarette smoke, rice bran, tubule seminiferous thickness, primary spermatocyte

Korespondensi : Nandya Dwizella, alamat Perum Servitia kotabaru D6 Bandar Lampung, HP 085788519906, email Nandya.dwizella@yahoo.com

Pendahuluan

Merokok menjadi kebiasaan hidup bagi orang dewasa maupun remaja.

Merokok sudah menjadi gaya hidup di masa kini meskipun mereka mengetahui dampak negatif dari mengonsumsi rokok.¹ Penelitian

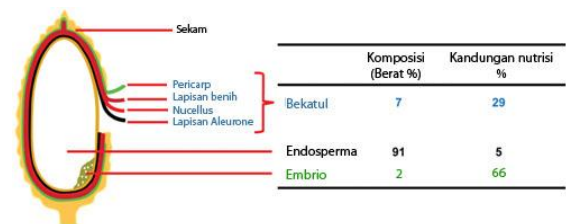
terhadap jumlah konsumsi rokok pada tahun 1980-2012 di 187 negara, didapatkan bahwa terjadi peningkatan terhadap jumlah perokok dari 4,96 milyar pada tahun 1980 menjadi 6,25 milyar pada tahun 2012.² Indonesia merupakan negara ketiga dengan jumlah perokok terbanyak setelah China dan India, khususnya kepulauan Riau dengan proporsi tertinggi perokok setiap harinya (27,2%)³. WHO memperkirakan pada tahun 2025 di Indonesia terdapat 5.675.700 orang yang berusia mulai dari 15 tahun untuk merokok setiap harinya.⁴

Rokok mengandung 4000 bahan kimia yang merugikan bagi kesehatan, sekitar 100 senyawa dalam rokok bersifat sangat toksik dan 70 bahan kimia yang terkandung dalam rokok dapat menyebabkan kanker seperti tar, nikotin, nitrosamin, karbonmonoksida, PAH (*Polynuclear Aromatic Hydrogen*), fenol, karbonil, klorindioksin dan furan.⁵ Kandungan rokok merupakan radikal bebas yang mengganggu keseimbangan antara antioksidan dan prooksidan dalam tubuh. Hal ini mengakibatkan terjadinya stres oksidatif yang berakhir pada kerusakan oksidatif dalam tubuh.⁶

Dampak senyawa toksik yang terkandung dalam rokok terhadap sistem reproduksi pria dapat meningkatkan infertilitas dengan menurunkan jumlah sel-sel spermatogenik, sel leydig, sel sertoli dan menginduksi proses apoptosis dalam testis.⁷ Penelitian sebelumnya menyatakan bahwa dalam kondisi normal, sistem reproduksi menghasilkan sedikit spesies oksigen reaktif (ROS) atau radikal bebas yang berfungsi untuk regulasi sperma, kapasitas sperma dan reaksi akrosom, tetapi ROS dalam jumlah banyak dapat menghambat spermatogenesis.⁸ Radikal bebas (ROS) yang diproduksi oleh testis dalam jumlah sedikit dapat diatasi dengan pertahanan dari dalam tubuh sebagai zat antiradikal atau biasa dikenal dengan antioksidan endogen, namun radikal bebas dalam jumlah banyak tidak dapat dinetralisir oleh antioksidan endogen sehingga membutuhkan antioksidan yang berasal dari luar atau antioksidan eksogen.⁹

Bekatul merupakan limbah dari penggilingan padi yang sering digunakan untuk pakan hewan ternak. Bekatul terdapat diantara endosperma dan sekam. Bekatul

sendiri merupakan bagian dari beras yang terdiri atas pericarp, lapisan aleurone, lapisan benih dan nucellus.¹⁰ Penelitian yang dilakukan oleh Prapsiwi pada tahun 2013,, bekatul memiliki kandungan bioaktif yang dapat mencegah kerusakan tubuh akibat radikal bebas. Kandungan bioaktif yang terdapat dalam bekatul antaralain tokoferol, β - karoten, antosianin dan γ -oryzanol. Bahan bioaktif ini berfungsi untuk mencegah terjadinya stress oksidatif.¹¹



Gambar 1. Bagian Bekatul.¹⁰

Tokoferol yang terdapat dalam kandungan bekatul berfungsi mencegah terjadinya peroksidasi lipid dan memutus reaksi berantai. Pemutusan reaksi berantai ini akan membentuk molekul yang stabil dan mengakhiri peroksidasi lipid.¹² Kandungan γ -oryzanol dalam bekatul jumlahnya 10-20 kali lebih banyak dibandingkan tokoferol, dan γ -oryzanol memiliki aktivitas antioksidan 8-10 kali lebih besar dibandingkan dengan vitamin E.¹³ Kandungan β -karoten yang terdapat dalam bekatul menghambat reaksi peroksidasi radikal dengan cara deaktivator radikal bebas melalui transfer elektron.¹¹

Metode

Penelitian ini merupakan penelitian analitik eksperimental dengan *Post Test Only Control Group Design* dengan membandingkan hasil pada kelompok yang diberi perlakuan dengan kelompok yang tidak diberi perlakuan. Penelitian ini dilakukan di *Pet house* Fakultas Kedokteran Universitas Lampung, Laboratorium Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Universitas Lampung, dan Laboratorium Patologi Anatomi dan Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Hewan coba dipelihara di *Pet house* Fakultas Kedokteran Universitas Lampung dari masa adaptasi, diberi perlakuan hingga terminasi. Penelitian ini akan dilakukan kurang lebih 35 hari pada bulan Oktober-November 2017. Populasi penelitian adalah tikus putih jantan

galur *Sprague dawley* berumur 2-3 bulan dengan berat 200-350 gram. Sampel berjumlah 25 yang diambil menggunakan metode *simple random sampling* dan dikelompokkan dalam 5 kelompok yaitu : 1) Kelompok kontrol negatif (K-): tikus tidak diberikan perlakuan. 2) Kelompok kontrol positif (K+): tikus diberikan paparan asap rokok selama 30 hari. 3) Kelompok perlakuan 1 (P1): tikus diberi paparan asap rokok dan ekstrak etanol 96% bekatul beras merah 100 mg/KgBB selama 30 hari. 4) Kelompok perlakuan 2 (P2): tikus diberi paparan asap rokok dan ekstrak etanol 96% bekatul beras merah selama 30 hari. 5) kelompok perlakuan 3 (P3): tikus diberi paparan asap rokok dan ekstrak etanol 96% bekatul beras merah selama 30 hari.

Pembuatan ekstrak bekatul dilakukan di Fakultas Pertanian Program studi Teknik Hasil Pertanian dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol 96%. Bekatul dipanaskan pada suhu 110°C selama 5 menit untuk menginaktivasi enzim lipase yang menyebabkan bekatul mudah berbau tengik.¹⁴ Bekatul beras merah direndam dalam pelarut etanol 96%, pelarut dipersiapkan sesuai dengan perbandingan 1gr: 6 ml selama 7 hari dan diaduk sesering mungkin. Hasilnya di peras dan disaring untuk diambil filtratnya. Filtrat hasil penyaringan dipekatkan dengan rotary evaporator pada suhu 50°C untuk mendapatkan ekstrak kental bekatul. Setiap 1 kg bekatul utuh menghasilkan ekstrak 31,197 gram.¹⁵

Pemaparan radikal bebas ke tikus putih jantan galur *Sprague dawley* menggunakan 2 batang rokok kretek dengan satu batang rokok mengandung tar 39 mg dan

nikotin 2,3 mg. Pemaparan dilakukan di kandang khusus pemaparan yang diberi celah untuk air pump dengan spuit 20cc dan dihubungkan oleh selang karet sepanjang 3 cm, dan celah yang digunakan untuk ventilasi udara.¹⁶ Pada penelitian yang dilakukan Syamsulina tahun 2005 menyatakan bahwa pemaparan asap rokok kretek dengan dosis 2 batang per hari selama 30 hari dapat menyebabkan terjadinya stress oksidatif.¹⁷

Proses terminasi hewan coba dilakukan di laboratorium biologi molekuler dengan cara *cervical dislocation*. Pembuatan sediaan testis dilakukan di laboratorium histologi. Pengamatan ketebalan tubulus seminiferus dilakukan dengan memilih tubulus seminiferus yang paling bulat dengan mikroskop cahaya perbesaran 200x. Ketebalan tubulus seminiferus di ukur dengan mikroskop cahaya dengan satuan mikronmeter (μm). Pengukuran dilakukan dengan mengukur jarak terpanjang dan terpendek dari tubulus seminiferus. Setiap sampel diambil 10 diameter tubulus yang telah dipilih dan dihitung rata-ratanya.¹⁸ Perhitungan spermatosit primer tiap sampel dilakukan dengan mikroskop cahaya perbesaran 200x lalu dibagi 4 lapang pandang, tiap lapang pandang dipilih tubulus yang sesuai dan dengan menggunakan mikroskop perbesaran 400x dihitung jumlah sel spermatosit primer lalu dijumlah dan dirata-ratakan.¹⁶

Hasil

Jumlah rerata spermatosit primer dihitung dengan menggunakan mikroskop cahaya perbesaran 200x dan 400x. Didapatkan jumlah rerata spermatosit primer tiap pengulangan pada tabel berikut

Tabel 1. Rerata Jumlah Spermatosit Primer dan Standar Deviasi Tiap Pengulangan.

	Pengulangan Tikus					Rerata ± SD
	1	2	3	4	5	
K(-)	112,7±10,7	119,7±3,8	109,5±17,7	109±7,1	117,5± 5,0	113,6±4,7
K(+)	58,5±9,0	49,7±4,9	46,2±4,9	52,7±21,1	46,7±10,8	50,7±5,0
P1	125,5±9,1	100,2±11,0	110,5±18,5	109,7±15,1	117,7±21,7	112,7±9,4
P2	100,2±6,9	113,5±18,7	100,7±9,7	102±8,4	110,2±3,0	107,3±5,6
P3	106,2±10,0	105,7±18,4	106±8,7	111,2±8,5	118,2±10,6	109,4±5,3

Jumlah rerata spermatosit primer terlebih dahulu dilakukan uji normalitas data

Saphiro-wilk dan didapatkan data berdistribusi normal ($p>0,05$). Selanjutnya data diuji variasi

atau homogenitas nya dengan uji homogenitas levene dan didapatkan data

rerata jumlah spermatosit primer memiliki variasi data sama atau homogen ($p>0,05$).

Nilai yang didapati dari uji normalitas dan uji homogenitas memenuhi persyaratan untuk menggunakan uji parametrik *One-way Anova*. Uji One way Anova mendapatkan hasil $p=0,000$ ($p<0,05$), artinya terdapat perbedaan bermakna paling tidak pada dua kelompok perlakuan. Analisis data dilanjutkan untuk mengetahui perbedaan masing-masing kelompok dengan dengan uji *posthoc bonferroni*. Jumlah rerata spermatosit primer terendah didapatkan pada kelompok K(+)

yaitu $50,7 \pm 5,0$ dan berbeda nyata dengan kelompok K(-), P1, P2 dan P3. Diantara K(-), P1, P2 dan P3 tidak didapatkan perbedaan nyata antara kelompok tersebut.

Pengukuran ketebalan tubulus seminiferus dilakukan dengan mengukur jarak terpanjang dan jarak terpendek dari tubulus seminiferus. Setiap sampel diambil 10 tubulus seminiferus yang dianggap paling bulat lalu dirata-ratakan.¹⁹ Hasil perhitungan dari ketebalan tubulus seminiferus masing-masing sampel dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Ketebalan Tubulus Seminiferus dan Standar Deviasi Setiap Kelompok Perlakuan.

	Pengulangan Tikus					Rerata $\pm$ SD
	1	2	3	4	5	
K(-)	262,5 $\pm$ 13,9	249,8 $\pm$ 18,9	258,9 $\pm$ 21,7	248 $\pm$ 26,1	230 $\pm$ 19,1	249,9 $\pm$ 12,5
K(+)	202,9 $\pm$ 15,6	205,3 $\pm$ 20	209,4 $\pm$ 16,9	219,3 $\pm$ 22,6	211,9 $\pm$ 14,8	209,7 $\pm$ 6,3
P1	238,4 $\pm$ 33,7	226,9 $\pm$ 14,4	277,5 $\pm$ 21,8	245,4 $\pm$ 19,5	236,2 $\pm$ 27,5	244,8 $\pm$ 19,3
P2	237,6 $\pm$ 21,2	238,1 $\pm$ 20,9	246 $\pm$ 26,3	265,6 $\pm$ 19,6	246,9 $\pm$ 20,1	246,8 $\pm$ 11,2
P3	233,1 $\pm$ 14,6	240,4 $\pm$ 23,7	246,6 $\pm$ 27,1	233,9 $\pm$ 27,7	243,8 $\pm$ 17,9	239,5 $\pm$ 5,9

Setelah mendapatkan ketebalan tubulus seminiferus tiap kelompok perlakuan, dilanjutkan dengan uji normalitas data dengan saphiro-wilk data ketebalan tubulus seminiferus berdistribusi normal ($p>0,05$). Selanjutnya data diuji variasi atau homogenitas nya dengan uji homogenitas levene dan didapatkan data rerata jumlah spermatosit primer memiliki variasi data sama atau homogen ($p>0,05$). Nilai yang didapati dari uji normalitas dan uji homogenitas memenuhi persyaratan untuk menggunakan uji parametrik *One-way Anova*. Uji One way Anova mendapatkan hasil $p=0,000$ ($p<0,05$), yang artinya terdapat perbedaan bermakna paling tidak pada dua kelompok perlakuan. Berdasarkan dari hasil uji statistik, analisis data dilanjutkan untuk mengetahui perbedaan pada tiap kelompok perlakuan dengan uji post hoc bonfferoni dan didapatkan ketebalan tubulus seminiferus terendah pada kelompok K(+), dan berbeda nyata terhadap kelompok K(-), P1, P2 dan P3.

Pembahasan

Berdasarkan data yang telah diperoleh, K(-) memiliki jumlah rerata spermatosit primer tertinggi dibandingkan kelompok lain. Hal ini dikarenakan K(-)

merupakan kelompok tikus yang diberi pakan standar dan tidak diberi perlakuan apapun, sehingga jumlah rerata spermatosit primer dalam batas normal. Pada kelompok K(+), jumlah rerata spermatosit primer menurun baik secara statistik maupun klinis dibandingkan dengan kelompok perlakuanlain. Susunan sel spermatosit primer dalam tubulus seminiferus tampak tidak penuh. Hal ini disebabkan oleh karena paparan asap rokok sebagai sumber radikal bebas eksogen meningkatkan radikal bebas dalam tubuh.²⁰

Asap rokok yang masuk ke dalam tubuh akan berakumulasi pada sistem sirkulasi dan cairan seminal. Testis merupakan organ yang memiliki kerentanan yang tinggi terhadap stres oksidatif, dalam beberapa situasi, kerusakan yang diakibatkan radikal bebas pada sperma mampu ditanggulangi oleh antioksidan endogen, namun kadar ROS yang melebihi ambang batas tidak dapat dinetralisir oleh antioksidan endogen. Hal ini terjadi karena testis tidak bisa merespon stres oksidatif dengan sintesis lebih banyak enzim antioksidan tersebut.²¹ Paparan asap rokok memicu terjadinya stres oksidatif yang menyebabkan terjadinya kerusakan DNA, abnormalitas kromosom dan peroksidasi lipid.²² Hal ini sejalan dengan penelitian Syamsulina bahwa paparan 2 batang asap rokok selama 30 hari meningkatkan kadar

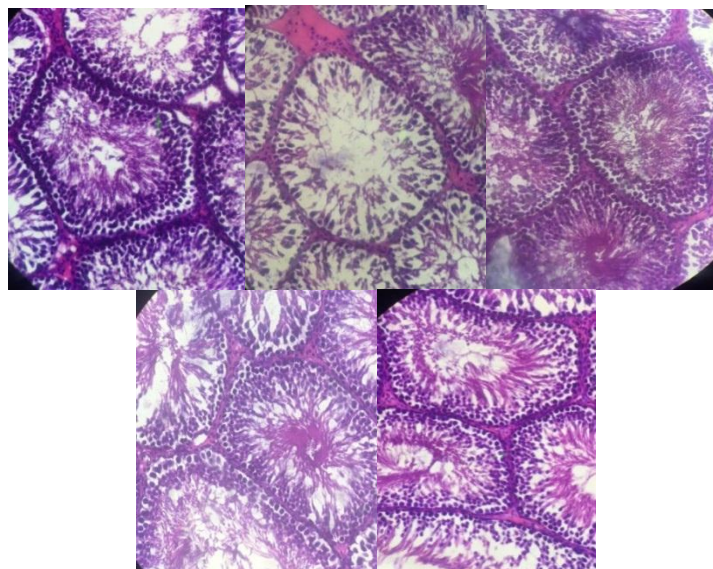
MDA dalam tubuh yang mengindikasikan adanya peningkatan peroksidasi lipid.¹⁷

Peroksidasi lipid merupakan kerusakan oksidatif terhadap asam lemak tak jenuh ganda. Peroksidasi lipid dimulai dimana LH sebagai target yang bereaksi dengan Radikal ($R\bullet$) membentuk radikal asam lemak ($L\bullet$), radikal asam lemak ($L\bullet$) ini berikatan dengan oksigen (O_2) dan membentuk radikal peroksil asam lemak ($LOO\bullet$). Radikal peroksil asam lemak ($LOO\bullet$) mengoksidasi molekul LH dan membentuk reaksi berantai baru yang menimbulkan radikal bebas lebih banyak. Reaksi peroksida lipid ini selalu menghasilkan aldehid, dimana aldehid merupakan bahan aktif yang akan menimbulkan kerusakan pada sel lain.¹²

Senyawa yang terkandung dalam asap rokok khususnya *polycyclic aromatic hydrocarbon* (PAH) dan dioxin, memiliki efek menghambat meiosis pada spermatosit.²³ Penelitian yang telah dilakukan menggunakan flow cytometry untuk mendeteksi protein antiapoptosis BCL2 dan BCL2L1 dan protein proapoptosis BAX dan BAD yang terdapat dalam spermatosit, mengemukakan bahwa pemaparan asap rokok meningkatkan protein proapoptosis BAX dan BAD yang dipengaruhi oleh AHR. Pemaparan asap rokok juga secara

langsung dapat memperngaruhi regulasi gen yang bertanggung jawab dalam kerusakan DNA.²² Kandungan nikotin pada asap rokok mempengaruhi hipotalamus secara langsung untuk menghambat sel leydig memproduksi testosteron.²⁹

Jumlah rerata spermatosit primer pada P1, P2 dan P3 tidak memiliki perbedaan yang nyata terhadap K(-). Pemberian ekstrak etanol 96% bekatul beras merah sebagai antioksidan pada kelompok P1, P2 dan P3 dapat mencegah penurunan jumlah spermatosit. Kandungan zat aktif dalam ekstrak etanol 96%bekatul beras merah berfungsi untuk memutus reaksi berantai radikal bebas yang terdapat dalam membran sel spermatosit primer dan menjadikannya lebih stabil.¹² γ -oryzanol merupakan zat aktif terbanyak dalam ekstrak bekatul yang berfungsi untuk mencegah terjadinya peroksidasi lipid dan mencegah ketidakseimbangan antara oksidan dan antioksidan.²⁴ Penelitian yang dilakukan oleh Arab dkk pada tahun 2011 tentang aktivitas antioksidan dalam ekstrak bekatul beras merah disebutkan bahwa ekstrak etanol bekatul beras merah dapat mencegah atau menghambat proses peroksidasi lipid.²⁵



Gambar 2. Gambaran Tubulus Seminiferus Tiap Perlakuan dengan Perbesaran 400x. Kiri atas, kelompok K(-). Tengah, kelompok K(+). Kanan atas, kelompok P1. Kiri bawah, kelompok P2. Kanan bawah, kelompok P3.

Ketebalan tubulus seminiferus terendah yaitu pada kelompok K(+), yang diberikan perlakuan asap rokok tanpa ekstrak etanol 96% bekatul beras merah. Hal ini

disebabkan karena pengaruh radikal bebas yang terdapat dalam asap rokok merusak sel dan jaringan didalam testis.²⁶ Penelitian tentang gambaran histopatologi testis pada

6. Fitria, Triandhini RINKR, Mangimbulude JC, Karwur FF. Merokok dan Oksidasi DNA. *Sains Med.* 2013;5(2):113-20.
7. Dai JB, Wang ZX, Qiao ZD. The hazardous effects of tobacco smoking on male fertility. *Asian J Androl.* 2015;(17):954-60.
8. Moein MR, Dehghani VO, Tabibnejad N, Vahidi S. Reactive oxygen species (ROS) level in seminal plasma of infertile men and healthy donors. *Irian J Reprod Med.* 2007;5(2):51-5.
9. Saryono, Retnani, Santoso. Seduhan biji kurma (Phoenix Dactylifera) memperkuat membran sel sperma untuk menurunkan kadar malondialdehid. *J Ners.* 2013;10(2): 355
10. Park H-Y, Lee K-W, Choi H-D. Rice bran constituents: Immunomodulatory and therapeutic activities. *Food Funct* [internet]. 2017 [disitasi tanggal 20 Januari 2017]: 1-9. Tersedia dari: doi:10.1039/C6FO01763K.
11. Mumpuni PD. Analisis kadar tokoferol, γ -oryzanol dan β -karoten serta aktivitas antioksidan minyak bekatul kasar [skripsi]. Semarang: Universitas Diponegoro; 2013.
12. Nimse SB, Pal D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Adv.* 2015; 5(35): 27986-8006.
13. Minatel IO, Francisqueti FV, Corrêa CR, Pace G, Lima P. Antioxidant activity of γ -oryzanol: A complex network of interactions. *Int J Mol Sci.* 2016;17:3-6..
14. Purwanto A, Fajriyati AN, Wahyuningtyas D. Pengaruh jenis pelarut terhadap rendemen dan aktivitas antioksidan dalam ekstrak minyak bekatul padi (rice bran oil). 2014;13(1):29-34.
15. Mustofa S, Anindito AA, Pratiwi A, Putri AA, Maulana M. The influence of Piper retrofractum Vahl (Java's chili) extract towards lipid profile and histology of rats coronary artery with high-fat diet. *Juke.* 2014; 4(7): 52-9.
16. Irawati L, Julizar, Irahmah M. Hubungan jumlah dan lamanya merokok dengan viskositas darah. 2011:137-46.
17. Revianti S. Efek proteksi ekstrak buah merah (Pandanus conoideus) terhadap stres oksidatif di eritrosit Rattus norvegicus galur wistar yang terpapar asap rokok kretek [thesis]. Surabaya: Univesitas Airlangga; 2005.
18. Ganes D. Pengaruh pemberian ekstrak kulit buah delima merah (Punica granatum L.) terhadap jumlah sel spermatid dan diameter tubulus seminiferus tikus putih (Rattus norvegicus) yang dipapar gelombang elektromagnetik ponsel [skripsi]. Surakarta: Universitas Sebelas Maret; 2010.
19. Bustam KA. Pengaruh pemberian vitamin c terhadap berat testis, jumlah sel leydig, dan diameter tubulus seminiferus mencit (Mus musculus L) jantan dewasa yang diinduksi monosodium glutamat [skripsi]. Lampung : Universitas Lampung; 2012.
20. Varghese A, Deepinder F, Chandra A, Jeat AW, Pathan F, Agarwal A. Male reproductive system-anatomy and physiology. United States: AMERICAN Center for Reproductive Medicine; 2014.
21. Flaherty C. The enzymatic antioxidant system of human spermatozoa. *Adv Androl.* 2014: 1-15.
22. Esakky P, Hansen DA, Drury AM, Cusumano A, Moley KH. Cigarette smoke-induced cell death of a spermatocyte cell line can be prevented by inactivating the Aryl hydrocarbon receptor . *Cell Death Discov* [internet]. 2015 [disitasi tanggal 20 Januari 2018]; 1:1-11. Tersedia dari: doi:10.1038/cddiscovery.2015.50.
23. Omurtag K, Esakky P, Debosch BJ, Schoeller EL, Chi MM, Moley KH. Modeling the effect of cigarette smoke on hexose utilization in spermatocytes. *Reprod Sci.* 2015;22(1):94-101.
24. Kaeoket K, Donto S, Nualnoy P, Noiphinit J, Chanapiwat P. Effect of gamma-oryzanol-enriched rice bran oil on quality of cryopreserved boar semen. 2012;74(9):1149-53.
25. Arab F, Alemzadeh I, Maghsoudi V. Determination of antioxidant component and activity of rice bran extract. *Sci Iran.* 2011;18(6):1402-6.
26. Ahmadnia H, Ghanbari M, Moradi MR,

- Dalouee MK. Effect of cigarette smoke on spermatogenesis in rats. *Urol J*. 2007;4(3):159-63.
27. Loegito M, Sargowo D, Hinting A, Widodo A. Effect of cigarette smokes density on histopathology testis of rats. *IJDR*. 2017;7(8):14490-3.
28. Khammanit R, Lomarat P, Anantachoke N, Sato V, Ungsurungsie M, Mangmool S. Inhibition of oxidative stress through the induction of antioxidant enzymes of pigmented rice bran in HEK-293 cells. *Nat Prod Commun*. 2017;12(7):1107-10.
29. Rahmanisa, S. Steroid sex hormone and its implementation to reproductive function. *Juke*. 2014: 4(7);97-105.