

**Efek Antioksidan Ekstrak Etanol *Bulbus* Bawang Dayak
(*Eleutherine americana*) terhadap Kualitas Spermatozoa Tikus Putih
(*Rattus norvegicus* L) yang Dipapar Asap Rokok Kretek**

**Antioxidant Effect of Ethanol Extract of Bulbus Dayak Onion (*Eleutherine americana*)
to the Quality of Spermatozoa Exposed by Cigarette Smoke in Rats
(*Rattus norvegicus*)**

Demes Chornelia Martantiningtyas¹, Anni Nurliani¹, Rusmiati¹

¹Program Studi Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu pengetahuan Alam,
Universitas Lambung Mangkurat, Kalimantan Selatan
Email : dchornelia@yahoo.com

Abstract

The toxic substance within the cigarette smoke causing oxidative stress that may damage the quality of spermatozoa. Oxidative stress occurs because the amount of reactive oxygen species and antioxidant produced by the body are not in balanced. One of the alternative approaches of natural antioxidant produced by plant is dayak onion. The bulbous of dayak onion contains steroid, tanin, saponin, naphthoquinone and flavonoid compound. The aims of this study are to find out the ability of antioxidant from ethanol extract of dayak onion bulbous to increase the quality of spermatozoa affected by smoke and to find out the dose of ethanol extract of dayak onion bulbous that can increase the percentage of viability, morphology, and amount of spermatozoa affected by smoke. In this study, three doses of treatments: 30 mg/kg BW, 60 mg/kg BW, and 90 mg/kg BW were used. The results of dose 30 mg/kg BW, 60 mg/kg BW, and 90 mg/kg BW extended the increased in the normal morphology and amount spermatozoa percentage rather than that of only treated by only the smoke, whereas the viability for dose of 30 mg/kg BW cannot increase in the percentage of spermatozoa viability after affected by smoke.

Key words: Antioxidant, spermatozoa, dayak onion, smoke, rats

Abstrak

Zat toksik yang terkandung dalam asap rokok dapat menyebabkan stress oksidatif yang dapat mengurangi ataupun merusak kualitas spermatozoa. Stress oksidatif dapat terjadi karena jumlah spesies oksigen reaktif dengan jumlah antioksidan yang dihasilkan oleh tubuh tidak seimbang. Salah satu alternatif antioksidan alami yang berasal dari tanaman adalah bawang dayak. *Bulbus* bawang dayak mengandung senyawa steroid, tanin, saponin, naftoquinon, dan flavonoid. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui kemampuan antioksidan ekstrak etanol *bulbus* bawang dayak dalam meningkatkan kualitas spermatozoa akibat paparan asap rokok dan mengetahui dosis pemberian ekstrak etanol *bulbus* bawang dayak yang dapat meningkatkan persentase viabilitas, morfologi, dan jumlah spermatozoa akibat paparan asap rokok. Pada penelitian ini digunakan tiga dosis perlakuan, masing-masing adalah dosis 30 mg/kg BB, 60 mg/kg BB, dan 90 mg/kg BB. Hasil penelitian ini menunjukkan, bahwa dosis 30 mg/kg BB, 60 mg/kg BB, dan 90 mg/kg BB, memberikan peningkatan dalam persentase morfologi normal dan jumlah spermatozoa jika dibandingkan dengan perlakuan yang hanya diberi asap rokok, sedangkan untuk viabilitas, dosis 30 mg/kg BB tidak dapat meningkatkan persentase viabilitas spermatozoa setelah dipapar asap rokok.

Kata kunci : Antioksidan, spermatozoa, bawang dayak, asap rokok, tikus putih

Pendahuluan

Paparan asap rokok dapat menyebabkan terjadi penurunan konsentrasi sperma (13%), viabilitas sperma (3%), dan penurunan jumlah morfologi normal sperma (3%) (Vine, 1996). Menurunnya kualitas sperma diakibatkan karena zat toksik yang terkandung dalam asap rokok meningkatkan spesies oksigen reaktif pada seminal sehingga dapat menimbulkan stress oksidatif yang dapat menurunkan kualitas spermatozoa (Hussein *et al.*, 2010) dan menyebabkan terjadinya kerusakan DNA, akibatnya membawa dampak buruk, seperti cacat pada anak yang dilahirkan (Sorahan, 1997). Stress oksidatif dapat terjadi karena jumlah spesies oksigen reaktif dengan jumlah antioksidan yang dihasilkan oleh tubuh tidak seimbang (Baker and Aiten, 2005).

Sistem antioksidan dalam tubuh manusia memiliki keterbatasan, sementara pembentukan radikal bebas berlangsung terus-menerus, karena itu perlu asupan antioksidan yang berasal dari luar tubuh (Soares, 2009). Salah satu alternatif antioksidan alami adalah bawang dayak. *Bulbus* bawang dayak mengandung senyawa steroid (Tyassari, 2009), tanin, saponin, naftoquinon, flavonoid (Kuntorini and Laurentius, 2009) dan memiliki kemampuan antioksidan dengan nilai IC_{50} sebesar 25,3339 $\mu\text{g/ml}$ dengan menggunakan DPPH sebagai sumber radikal bebas (Kuntorini and Astuti, 2010). Antioksidan, terutama fenol berperan sebagai penangkap radikal bebas penyebab peroksidasi lipid. Penelitian yang dilakukan *in vitro* pada buah mengkudu, daun teh, gandum, dan daun dewandaru diketahui memiliki aktivitas antioksidan seiring dengan tingginya kandungan golongan senyawa fenolat (Emmons *et al.*, 1999; Utami *et al.*, 2005).

Pada penelitian ini digunakan tiga parameter dalam menganalisis kualitas spermatozoa, yaitu viabilitas, morfologi, dan jumlah spermatozoa. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan antioksidan ekstrak etanol *bulbus* bawang dayak dalam meningkatkan kualitas spermatozoa akibat paparan asap rokok dan dosis pemberian ekstrak etanol *bulbus* bawang dayak yang dapat meningkatkan persentase viabilitas, morfologi, dan jumlah spermatozoa akibat paparan asap rokok.

Materi dan Metode

Pada penelitian ini digunakan ekstrak bulbus bawang dayak sebagai sumber antioksidan dan rokok kretek sebagai sumber radikal bebas. Metode ekstraksi yang digunakan untuk mendapatkan ekstrak bulbus bawang dayak adalah maserasi dengan etanol. Untuk pemaparan asap rokok digunakan *smoking chamber*. Perlakuan dilakukan selama 53 hari, selanjutnya masing-masing hewan percobaan dikorbankan dengan cara dislokasi leher dan selanjutnya dinekropsi untuk diambil kauda epididimis. Kemudian kauda epididimis diambil dan diletakkan ke dalam cawan petri yang berisi NaCl fisiologis 0,9%. Suspensi spermatozoa yang telah diperoleh digunakan untuk pengamatan kualitas spermatozoa yang meliputi: viabilitas spermatozoa, jumlah spermatozoa, dan morfologi spermatozoa.

Analisis viabilitas spermatozoa dilakukan dengan pewarnaan supravital dengan eosin-nigrosin. Pengamatan dilakukan pada 100 spermatozoa di bawah mikroskop, spermatozoa hidup tidak berwarna, sedangkan spermatozoa mati akan berwarna merah dan hasilnya dinyatakan dalam persen (Suhadi dan Arsyad, 1983). Pemeriksaan morfologi dapat diamati pada sedimen apusan dengan

pewarnaan Giemsa. Pemeriksaan morfologi spermatozoa dilakukan dengan membedakan bentuk spermatozoa normal dan abnormal dari 100 spermatozoa yang diamati.

Perhitungan jumlah spermatozoa dilakukan dengan cara mengambil satu mL semen, kemudian dilihat pada preparat pengamatan morfologi, apabila jumlah spermatozoa per lapang pandang lebih dari 50 buah, maka campuran semen dan larutan NaCl 0,9% dihisap dengan pipet leukosit sampai tanda 0,5. Jika jumlah spermatozoa per lapang pandang berjumlah lebih kecil dari 50 buah, maka sperma dihisap sampai tanda 1,0 pada pipet leukosit. Pipet yang telah berisi sperma kemudian diencerkan dengan larutan pengencer sampai tanda 11 setelah itu pipet dikocok rata. Campuran semen dengan pengencer diletakkan pada kamar hitung Neubauer.

Jumlah spermatozoa dihitung pada 16 kotak (mempunyai ukuran masing-masing 0,25 x 0,25 mm²). Hasil perhitungan menunjukkan jumlah spermatozoa per mL semen (Suhadi dan Arsyad, 1983).

Hasil dan Pembahasan

Penelitian ini menunjukkan, bahwa rerata viabilitas spermatozoa tikus putih pada kelompok yang diberi asap rokok dan ekstrak etanol bulbus bawang dayak dengan dosis bertingkat adalah lebih tinggi jika dibandingkan dengan rerata viabilitas spermatozoa pada perlakuan yang hanya dipapar asap rokok (Tabel 1). Persentase viabilitas spermatozoa dapat terlihat pada preparat apusan, spermatozoa hidup dan spermatozoa yang mati (Gambar 1)

Tabel 1 . Hasil analisis rerata kualitas spermatozoa tikus setelah dipapar asap rokok dan pemberian ekstrak etanol *bulbus* bawang dayak

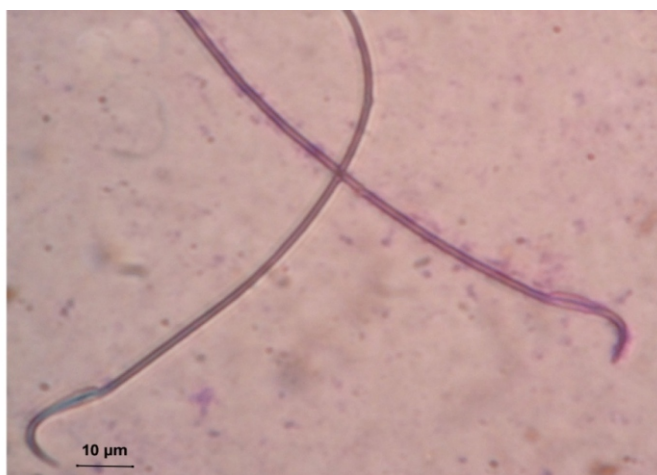
Perlakuan	Viabilitas spermatozoa (%)	Morfologi normal spermatozoa (%)	Jumlah spermatozoa (Juta/mL)
P0	84,75 ± 3,30 ^a	87,50 ± 6,35 ^a	219,00 ± 17,77 ^a
P1	29,75 ± 1,70 ^b	30,25 ± 7,41 ^b	93,00 ± 15,09 ^b
P2	32,25 ± 2,50 ^b	52,50 ± 1,91 ^c	133,00 ± 18,58 ^c
P3	48,00 ± 6,27 ^c	70,25 ± 1,70 ^d	169,50 ± 35,90 ^d
P4	64,00 ± 5,28 ^d	87,00 ± 4,08 ^a	208,50 ± 8,16 ^c

Keterangan :

Angka yang diikuti huruf yang sama tidak berbeda nyata, sebaliknya jika angka diikuti oleh huruf yang berbeda nyata pada sig < 0,05

Morfologi spermatozoa tikus putih terpapar asap rokok banyak mengalami kelainan jika dibandingkan dengan kontrol tanpa perlakuan (P0). Beberapa kelainan yang tampak secara morfologi adalah kepala yang terlipat, ekor menggulung, dan bagian tengah yang terlipat (Gambar 2). Perlakuan yang diberi antioksidan ekstrak etanol bulbus bawang dayak dengan dosis bertingkat (30 mg/kg

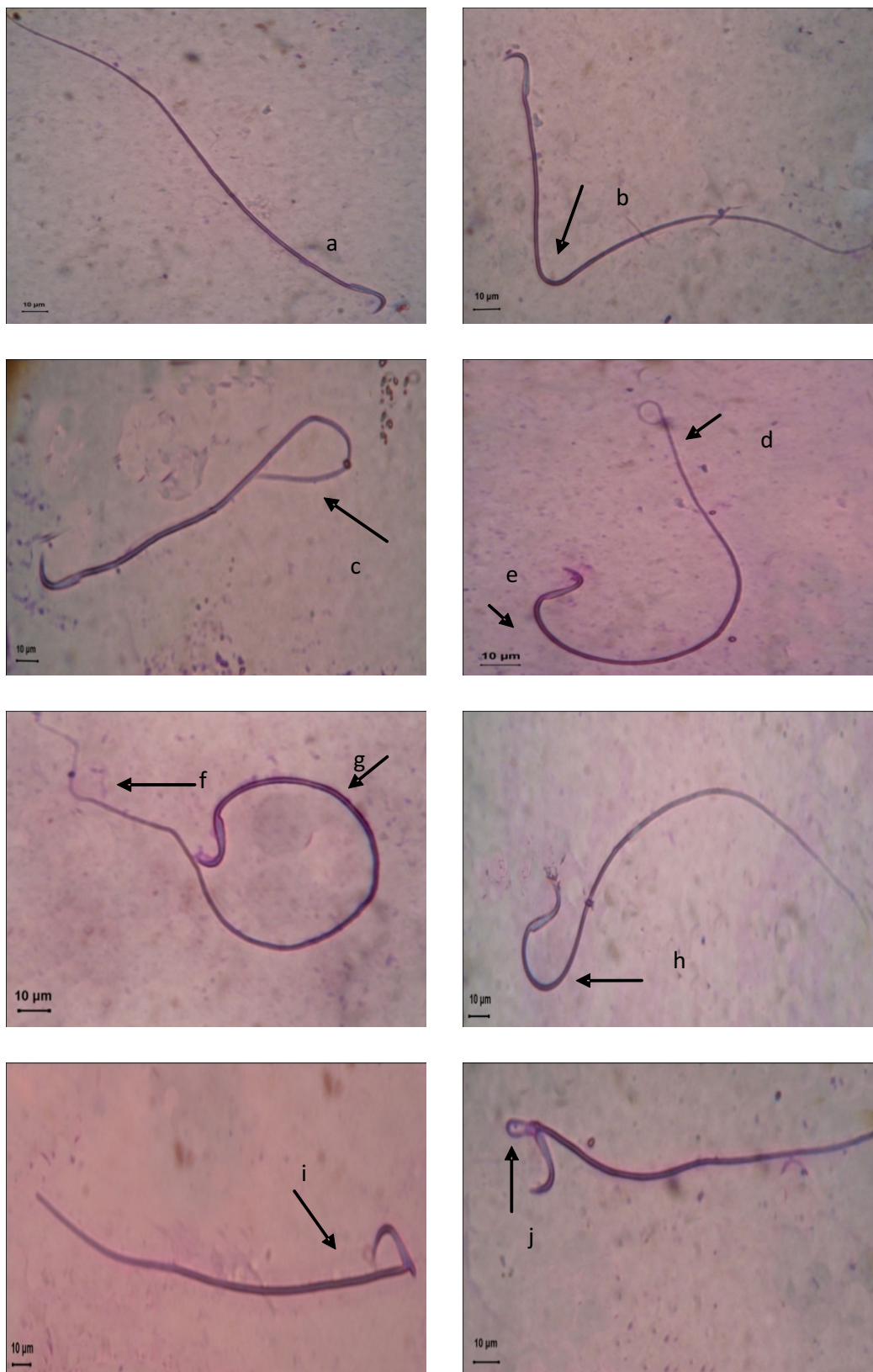
BB= 52,50%, 60 mg/kg BB= 70,25%, 90 mg/kg BB= 87%), morfologi normal spermatozoa mengalami peningkatan. Meningkatnya persentase spermatozoa normal pada tikus putih yang dipapar asap rokok, karena kandungan senyawa fenol dan flavonoid mampu menangkal radikal bebas, sehingga memperlancar tahapan spermatogenesis.



Gambar 1. Preparat viabilitas spermatozoa dengan pewarnaan eosin nigrosin. Spermatozoa mati (a), Spermatozoa hidup (b) (Perbesaran 1000x)

Penghitungan pada jumlah spermatozoa menunjukkan pemberian ekstrak etanol bawang dayak dengan dosis bertingkat (Tabel 1) memiliki jumlah yang lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan hanya asap rokok saja (P1 = 46,50 juta/mL). Hussein *et al.* (2010) menyatakan, bahwa tidak ada perbedaan yang berarti antara kualitas spermatozoa perokok aktif maupun perokok pasif, sehingga perokok aktif maupun pasif memiliki resiko yang sama. Hal tersebut karena kandungan asap rokok, seperti nikotin, tar, leptin, karbon monoksida, dan senyawa lainnya dapat mengganggu sistem reproduksi. Nikotin termasuk dalam golongan alkaloid yang dapat memberikan efek negatif bagi tubuh. Nikotin yang terdapat dalam asap rokok memberikan efek negatif pada fungsi gonad,

dan menyebabkan perubahan proses biokimia dalam testis (Riesenfield and Olivia, 1998) sehingga mengakibatkan terjadinya reduksi jumlah spermatozoa dalam epididimis (Wong *et al.*, 2000). Nikotin yang merupakan alkaloid dapat mengganggu aktifitas ATP-ase yang ada di dalam membran sel spermatozoa. Enzim (ATP-ase) berada pada bagian tengah ekor spermatozoa yang berfungsi mempertahankan keseimbangan sel, toksisitas dari nitrogen dapat menghilangkan keseimbangan sel. Kandungan nikotin pada rokok menyebabkan potensial membran spermatozoa terganggu sehingga menimbulkan abnormalitas pada seluruh bagian spermatozoa. Kerusakan tersebut terjadi terutama pada bagian ekor spermatozoa (Soaeres, 2009).



Gambar 2. Morfologi spermatozoa tikus dengan pewarnaan giemsa 10%. Spermatozoa normal (a), ekor menggulung (d dan f), bagian tengah melekuk (b, c, e, dan h), kepala terlipat (i dan j) (Perbesaran 1000x)

Menurunnya jumlah spermatozoa setelah dipapar asap rokok kemungkinan besar terjadi karena terganggunya proses spermatogenesis. Asap rokok menyebabkan terganggunya spermatogenesis di dalam tubulus seminiferus. Testosteron, FSH, dan LH adalah hormon yang berperan penting dalam proses spermatogenesis. Nikotin mempengaruhi kerja sistem saraf pusat dan kemudian menghambat kerja GnRH sehingga pembentukan FSH dan LH terhambat (Trummer *et al.*, 2002). Terhambatnya pembentukan FSH dan LH, maka spermatogenesis berjalan tidak normal. Penelitian yang dilakukan Sukmaningsih (2009) menyatakan, bahwa terjadinya penurunan jumlah spermatisit akibat pemaparan asap rokok, diduga karena terjadinya penurunan testosteron. Perokok aktif maupun pasif mengalami penurunan testosteron (Trummer *et al.*, 2002), karena LH yang mengaktifkan sel Leydig sebagai penghasil hormon testosteron tidak dapat berfungsi (Yardimci *et al.*, 1997)

Testosteron diperlukan untuk memulai proses meiosis spermatisit, dan berperan pada pembelahan profase meiosis pertama tahap diakinesis, yaitu pada saat dimulainya pembelahan metafase. Pada tahap tersebut, inti dan sitoplasma tumbuh menjadi sel terbesar di antara lapisan sel spermatogenik (Guyton, 1996). Spermatisit yang mengalami kerusakan, seperti atrofi tubular, nekrosis tubular, hilangnya sel intermedia, maka akan mengalami degenerasi dan difagositosis oleh sel sertoli sehingga jumlah spermatisit menjadi berkurang. Penurunan jumlah spermatisit menyebabkan jumlah spermatid juga menurun karena jumlah spermatisit yang mengalami meiosis kedua menjadi spermatid menurun, ini berdampak pada menurunnya jumlah spermatozoa yang dihasilkan. Penurunan hormon menyebabkan terlepasnya spermatid dari sel sertoli

ke lumen tubulus sehingga menyebabkan gagalnya tahap spermiogenesis.

Selain itu, testosteron juga penting dalam pemeliharaan saluran epididimis sehingga turunnya kadar testosteron akibat asap rokok (Trummer *et al.*, 2002) menyebabkan fungsi epididimis terganggu. Stanier dan Forsling (1990) melaporkan, bahwa testosteron berperan dalam menjaga kelangsungan hidup spermatozoa di dalam epididimis. Ganggunya permeabilitas membran sperma oleh senyawa alkaloid yang terkandung pada asap rokok dapat menyebabkan penurunan spermatozoa hidup yang berakibat mengganggu transpor nutrisi yang diperlukan spermatozoa untuk daya tahan hidupnya. Proses pematangan spermatozoa di epididimis terjadi perkembangan motilitas, perubahan struktur ekor, perubahan morfologi akrosom dan hilangnya *cytoplasmic droplet*, serta perubahan plasma membran. Spermatozoa abnormal yang banyak ditemukan dalam penelitian ini adalah ekor yang tidak lurus (keriting) (Gambar 2. f) dan ekor menggulung (Gambar 2. d). Kadar testosteron dalam darah yang rendah dan berada dibawah ambang diperlukan untuk proses pematangan menyebabkan persentase spermatozoa yang abnormal meningkat.

Kualitas spermatozoa yang rendah juga dapat disebabkan oleh adanya spesies oksigen reaktif (SOR) yang terdapat dalam asap rokok. Fase partikulat (tar) pada rokok mampu larut dalam cairan dan menghasilkan anion superoksida ($O_2^{\bullet-}$) dan kemudian H_2O_2 dan radikal hidroksil reaktif (HO^{\bullet}), yang menyebabkan kerusakan oksidatif pada membran lipid, enzim dan DNA (Pryor *et al.*, 1998). Para peneliti dalam bidang kedokteran reproduktif mempertimbangkan SOR yang merupakan radikal bebas sebagai salah satu mediator dari ketidaksuburan yang menyebabkan kelainan fungsi

sperma. Spesies oksigen reaktif yang dihasilkan oleh fase gas rokok dapat menyebabkan kerusakan oksidatif pada membran lipida, protein, enzim, dan DNA. Pryor *et al.* (1992) menyatakan, bahwa tar yang terdapat dalam asap rokok mampu membentuk radikal bebas seperti semiquinon (QH•) dan pusat radikal karbon (–C•). Radikal bebas yang stabil diidentifikasi sebagai o- dan p-benzoquinone dan berperan dalam kerusakan DNA.

Kerentanan spermatozoa terhadap stress oksidatif disebabkan karena komponen asam lemak tak jenuh ganda (PUFA) pada membran plasma sperma (Alvarez and Storey, 1995). Spesies oksigen reaktif (SOR) sangat reaktif mengoksidasi lipid, karbohidrat dan asam amino, sehingga akan sangat mudah SOR menyerang sperma yang membran plasmanya memiliki komposisi lemak tak jenuh ganda (Griveau and Lannou, 1997). Lipid adalah zat utama yang bertanggung jawab atas fluiditas membran *lipid bilayers* dan proses pematangan sel sperma dalam epididimis untuk kapasitas dalam saluran reproduksi wanita (Pryor *et al.*, 1998). Selain itu, membran lipid sperma juga berperan penting dalam interaksi gamet, salah satunya adalah *sulfogalactosylglycerolipid*, yang merangsang kemampuan spermatozoa dalam menginduksi perubahan komposisi zona pellusida. Singkatnya semua komponen lipid yang terletak di membran sperma terlibat dalam berbagai aktivitas yang penting, apabila lipid sperma terganggu maka dapat mengganggu semua fungsi sperma.

Peroksidasi asam lemak tak jenuh ganda (PUFA) dalam membran sel sperma merupakan reaksi autokatalitik yang menimbulkan disfungsi sel berhubungan dengan hilangnya fungsi membran dan integritas (Uotila *et al.*, 1994). Rusaknya lipid pada membran sel spermatozoa mengakibatkan

integritas membran menjadi berkurang atau rusak, dan menyebabkan pengangkutan air dan nutrisi yang diperlukan spermatozoa menjadi terganggu dan mengakibatkan terjadinya pertambahan volume sel dan membuat membran sel merenggang. Kerenggangan pada membran sel mengakibatkan membran sel spermatozoa akan mengangkat bagian ekor yang bersifat lentur sehingga membengkok ke arah kepala yang menyebabkan keabnormalitasan pada bagian ekor. Spermatozoa yang mempunyai integritas membran normal, pengangkutan nutrisi dan air tidak terhambat sehingga menyebabkan membran sel tidak merenggang.

Radikal bebas tersebut dapat dikurangi efeknya dengan cara penambahan antioksidan yang berasal dari luar tubuh, seperti antioksidan yang berasal dari bawang dayak. Pada penelitian ini diberikan beberapa perlakuan terhadap beberapa kelompok dengan dosis pemberian ekstrak etanol *bulbus* bawang dayak bertingkat. Antioksidan adalah substansi yang diperlukan tubuh untuk menetralsasi radikal bebas dan mencegah kerusakan yang ditimbulkan oleh radikal bebas terhadap sel normal, protein, dan lemak dengan cara menyumbangkan elektron hidrogen pada radikal bebas untuk menjadi radikal bebas stabil yang sifatnya tidak merusak. Sesuai mekanisme kerjanya, antioksidan memiliki dua fungsi. Fungsi utama antioksidan, yaitu sebagai pemberi atom hidrogen disebut sebagai antioksidan primer. Senyawa ini dapat memberikan atom hidrogen secara cepat ke radikal lipida (R•, ROO•) atau mengubahnya ke bentuk lebih stabil, sementara turunan radikal antioksidan (A•) tersebut memiliki keadaan lebih stabil dibanding radikal lipida. Fungsi kedua merupakan fungsi sekunder antioksidan, yaitu memperlambat laju auto-oksidasi dengan berbagai mekanisme di luar mekanisme pemutusan rantai

auto-oksidasi dengan pengubahan radikal lipida ke bentuk lebih stabil. Penambahan antioksidan (AH) primer dengan konsentrasi rendah pada lipida dapat menghambat atau mencegah reaksi auto-oksidasi lemak dan minyak. Radikal antioksidan ($A\bullet$) yang terbentuk pada reaksi tersebut relatif stabil dan tidak mempunyai cukup energi untuk dapat bereaksi dengan molekul lipida lain membentuk radikal lipida baru (Aitken and Roman, 2008). Radikal antioksidan dapat saling bereaksi membentuk produk non radikal. Antioksidan dapat digolongkan berdasarkan kelarutan menjadi dua, yaitu larut dalam air (*water soluble antioxidant*) dan larut dalam lemak (*lipid soluble antioxidant*). Antioksidan yang larut dalam air meliputi vitamin C dan asam urat, sedangkan antioksidan yang larut dalam lemak meliputi ubiquinon, tokoferol, karotenoid, tokoferol dan flavonoid.

Senyawa polifenol, seperti flavonoid dan fenol mampu menghambat antioksidan melalui mekanisme penangkapan radikal dengan cara menyumbangkan satu elektron pada elektron yang tidak berpasangan dalam radikal bebas sehingga banyaknya radikal bebas menjadi berkurang. Senyawa fenol meliputi aneka ragam senyawa yang berasal dari tumbuhan, yang mempunyai ciri sama, yaitu cincin aromatik yang mengandung satu atau dua gugus hidroksil. Flavonoid merupakan senyawa pereduksi yang baik, menghambat banyak reaksi oksidasi baik secara enzim maupun non enzim. Flavonoid bertindak sebagai penampung yang baik bagi radikal hidroksi dan superoksida dengan demikian melindungi lipid membran terhadap reaksi yang merusak (Robinson, 1991).

Gugus hidroksil yang terdapat pada senyawa fenol memberikan elektronnya sehingga dapat menangkal radikal bebas dari rantai peroksidasi

(ROO) dengan $ArOH$ sebagai antioksidan seperti reaksi di bawah ini : $ROO\bullet + ArOH \longrightarrow ROOH + ArO\bullet$. Antioksidan akan cenderung bereaksi dengan radikal bebas terlebih dahulu sebelum bereaksi dengan molekul lainnya karena antioksidan bersifat sangat mudah teroksidasi. Fenol yang kehilangan atom hidrogennya akan menjadi radikal ArO yang dapat menjadi stabil kembali melalui penataan ulang (Valavanidis *et al.*, 2009). Kelompok yang diberi antioksidan ekstrak etanol bulbus bawang dayak menunjukkan adanya peningkatan dalam viabilitas, morfologi, dan jumlah spermatozoa.

Daftar Pustaka

- Aitken, J. R., and Roman, S. D. (2008) Antioxidant system and oxidative stress in testes. *Ox. Med. Cell. Long.* 1:15-24.
- Alvarez, J. G. and Storey, B.T. (1995) Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.* 42: 334-336.
- Baker, A. M. and Aitken, R. J. (2005) Reactive oxygen species in spermatozoa : methods for monitoring and significance for the origin of genetic disease and infertility. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 3:67.
- Emmons, C. L. and Peterson, D. M. (1999) Antioxidant activity and phenolic contents of oat groats and hulls. *Cereal. Chem.* 76: 902-906.
- Grivcau, J.F. and Lannou, D. (1997) Reactive Oksigen Species and Human Spermatozoa: Physiology and Pathology. *Int J Androl*, 20 : 61.
- Huseein, A., Ayman, A. G., Mohamed and Medhat, E. (2010) Effect of tobacco smoking on semen quality in men with subfertility. *Uro Today Internat. J.* 10: 3834.
- Kuntorini, E. M. dan Astuti, M. D. (2010) Penentuan aktivitas antioksidan ekstrak etanol bulbus

- bawang dayak (*Eleutherin americana*). *Sains dan Terapan Kimia* 4: 1.
- Kuntorini, E. M. and Laurentius, H. N. (2009) Structural development and bioactive content of red bulb plant (*Eleutherine americana*); a traditional medicines for local Kalimantan people. *Biodiversitas* 11: 102-106.
- Pryor, W.A. (1992) Biological effects of cigarette smoke, wood smoke, and the smoke from plastics: the use of Electron spin resonance. *Free Radic. Biol. Med.* 13: 659–676.
- Pryor, W. A., Stone, K., Zang, L.Y. and Bermudez, E. (1998) Fractionation of aqueous cigarette tar extracts: fractions that contain the tar radical cause DNA damage. *Chem. Res. Toxicol.* 11: 441–448.
- Riesenfeld, A. and Olivia, H. (1988) Effect nicotin on the fertility cytology and life span of male rats. *Acta Anat.* 131: 171-176.
- Robinson, T. (1991) Kandungan Kimia Organik Tumbuhan Tinggi. Terjemahan Kosasih Padmawinata. Penerbit ITB, Bandung.
- Smith, F. M. (2006) Reproductive Physiology (Animal Science 4314). http://animalsciences.missouri.edu/courses/4314/microscope_slides/sperm.htm Diakses tanggal 3 juni 2011
- Soares, S. (2009) Cigarette smoking and fertility. *Reprod. Biol. Insight* 2: 39-46.
- Sorahan, T. P., Lanchashire, R. J., Hulthen, M. A., Peck, I. M. and Stewart, A. M. (1997) Child-hood cancer and parental use of tobacco, Deaths from 1953 to 1995. *Br. J. Cancer* 75: 134-138.
- Suhadi, K. dan Arsyad, K. M. (1983) Analisis sperma. Airlangga Universty Press, Surabaya.
- Sukaminingsih, A. (2009) Penurunan jumlah spermatid pakiten dan spermatid tubulus seminiferus testis pada mencit (*Mus musculus*) yang dipapar asap rokok. *J. Biol.* 8: 31-35.
- Trummer, H., Aberman, H., Josef, H. and Karl, P. (2002) The impact of cigarette smoking on human semen parameters and hormones. *Human Reprod.* 17: 1554-1559.
- Tyassari, H. (2009) Uji aktivitas antidiabetes ekstrak metanol bulbus bawang dayak (*Eleutherin palmifolia*) terhadap tikus putih jantan yang diinduksi aloksan. Skripsi. Program S-1, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lambung Mangkurat. Tidak dipublikasikan.
- Uotila, J.T., Kirkkola, A. L., Rorarius, M., Tuimala, R.J. and Metsa-Ketela, R.J. (1994) The total peroxy radical-trapping ability of plasma and cere brospinal fluid in normal and preeclamptic parturients. *Free Rad. Biol. Med.* 16: 581-90.
- Utami, W., Dai, M. dan Sofiana, Y.R. (2005) Aktivitas penangkap radikal dengan metode DPPH serta penetapan kandungan fenol dan flavonoid dalam ekstrak kloroform, ekstrak etil asetat, ekstrak etanol daun dewandaru (*Eugenia uniflora* L). *Pharm. J. Indonesia* 6: 5-9.
- Valavanidis, A., Thomais, V. and Konstantinos, F. (2009) Tobacco smoke: Involvement of reactive oxygen species and stable free radicals in mechanisms of oxidative damage, carcinogenesis and synergistic effects with other respirable particles. *J. Environ. Res. Public Health* 2: 445–462.
- Vine, M.F. (1996) Smoking and male reproduction: a review. *Int. J. Androl.* 19: 323-337.
- Yardimci, S., Atan, A., Delibasi, T., Sungoruglo, K. and Guven, M. C. (1997) Long-term effect of cigarette-smoke exposure on plasma hormon testosterone luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone levels in male rats. *Br. J. Urol* 79: 66-69.