

Pengaruh Ekstrak Etanolik Kecambah Kacang Hijau (*Phaseolus radiatus*) Terhadap Jumlah dan Morfologi Spermatozoa Mencit Yang Terpapar 2-Methoxyethanol

Citra Maruliyanda, Alfiah Hayati, I.B. Rai Pidada
Prodi S1 Biologi, Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga, Surabaya

ABSTRACT

Male infertility causes by many factor, one of them is toxic chemical 2-methoxyethanol (2-ME). The *Phaseolus radiatus* contain the antioxidant vitamin E. Vitamin E as antioxidant can avoid free radicals and break the chain of lipid peroxidation process in cell membrane. The ethanol extract of *Phaseolus radiatus* used to overcome the effect of 2-ME. This main aim of this study to know the influence of this extracts to sperm count and sperm morphology of mice after exposure of 2-ME. Thirty BALB/C male mice (*Mus musculus*) 8-9 week old, weighed 25-28 grams, was divided into 5 groups, 2 control groups and 3 treatment groups. Negative control group (Kn) were given aquades 0,1 ml by *gavage* within 40 days, positive control group (Kp) were given 2-ME 200 mg/kg body weight daily by *intraperitoneal* injection within 5 days, and continued by giving aquades 0,1 ml within 35 days, treatment groups (P1, P2, dan P3) were given 2-ME 200 mg/kg body weight daily within 5 days, continued by giving extract in three doses 0,5 ; 1 ; and 2 g/kg BB within 35 days. Mice were sacrificed, epididimis were collected and examined. Count and normal morphology of spermatozoa were observed. The data analyzed by One-way ANOVA to investigate the influenced of treatment groups. Then LSD test to show the differences *mean* between treatment groups. The result showed that 2-ME can decrease sperm count and sperm normal morphology. The extract can increase sperm count and normal morphology after exposure of 2-ME. The conclusion of this study, the extract at dose of 1 g/kg can increased sperm sperm count, whereas the dose of 2 g/kg can increase normal morphology of sperm. The green bean sprout ethanol extract at dose of 2 g/kg can recover sperm count and normal morphology of sperm.

Keyword : 2-ME, *Phaseolus radiatus*, spermatozoa

PENGANTAR

Infertilitas merupakan masalah yang memiliki angka kejadian yang cukup besar di Indonesia. Penyebab infertilitas pria dipengaruhi oleh banyak faktor, diantaranya adalah hormon, infeksi, radiasi, obat dan bahan kimia baik alami maupun sintetik, yang dapat berinteraksi dengan sistem endokrin (Pasqualloto *et al.*, 2004). Salah satu bahan kimia yang bersifat toksik tersebut adalah 2-methoxyethanol (2-ME). Di dalam tubuh, 2-ME dioksidasi oleh *alkohol*

dehydrogenase menjadi 2-Methoxyacetaldehyde (MALD) yang kemudian dimetabolisme lebih lanjut menjadi 2-Methoxyacetic acid (MAA) yang bersifat toksik oleh *aldehyde dehydrogenase* (Moslen *et al.*, 1995; Kim dan Smialowicz, 1997). Senyawa 2-ME akan tersebar luas dan masuk ke dalam sirkulasi darah kemudian menuju organ yang sensitif terhadap zat tersebut yaitu testis, limpa dan timus (Miller *et al.*, 1983). Senyawa 2-ME juga dapat menyebabkan penurunan motilitas dan morfologi spermatozoa (Hayati *et al.*, 2005). Senyawa 2-ME yang diberikan pada mencit jantan dengan dosis 200 mg/kg berat badan dapat menyebabkan kerusakan tubulus seminiferus, yaitu adanya penurunan jumlah spermatogonium, spermatosit primer, spermatosit oval dan ukuran diameter serta tebal epitel tubulus seminiferus (Hayati *et al.*, 2004).

MAA merupakan oksidan kuat yang dapat menyebabkan stress oksidasi pada spermatozoa. Oleh karena itu, untuk mengatasi efek dari reaksi oksidasi dari 2-ME diperlukan zat yang bersifat antioksidan yang dapat menangkal radikal bebas. Antioksidan merupakan *scavenger* dan menekan efek dari ROS dan peroksidasi lipid (Vernet *et al.*, 2004). Sumber antioksidan antara lain berasal dari tumbuh-tumbuhan. Di Indonesia, kecambah kacang hijau (*Phaseolus radiatus*) dipercaya dapat meningkatkan kesuburan pria. Kandungan zat gizi pada biji kacang hijau (*Phaseolus radiatus*) sebelum dikecambahkan, berada dalam bentuk tidak aktif (terikat). Setelah perkecambahan, bentuk tersebut diaktifkan sehingga meningkatkan daya cerna bagi manusia. Peningkatan zat-zat gizi pada kecambah mulai tampak sekitar 24-48 jam saat perkecambahan (Astawan, 2005). Sedangkan peningkatan vitamin E (a-tokoferol) terjadi setelah proses perkecambahan selama 48 jam (Anggrahini, 2009). Sebagai antioksidan, vitamin E berfungsi sebagai donor ion hidrogen yang mampu mengubah radikal peroksil menjadi radikal tokoferol yang kurang reaktif, sehingga tidak mampu merusak rantai asam lemak (Wardlaw dan Jeffrey, 2007).

Bahan dan cara kerja

Hewan percobaan dalam penelitian ini adalah mencit (*Mus musculus*) jantan 30 ekor, strain BALB/C, umur 8-9 minggu, berat badan 25-28 g. Hewan

coba dikelompokkan menjadi 5 kelompok, yang terdiri dari 2 kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan. Kelompok kontrol negatif (Kn) diberi aquades 0,1 ml secara *gavage* selama 40 hari, kontrol positif (Kp) diberi 2-ME dosis 200 mg/kg berat badan satu kali sehari secara *intraperitoneal* selama 5 hari, lalu diberi aquades 0,1 ml selama 35 hari, perlakuan (P1, P2, dan P3) diberi 2-ME dosis 200 mg/kg BB satu kali sehari selama 5 hari, kemudian diberi ekstrak kecambah kacang hijau dosis berturut-turut 0,5 ; 1 ; dan 2 g/kg BB selama 35 hari.

Pembuatan ekstrak etanolik kecambah kacang hijau

Kecambah kacang hijau (*Phaseolus radiatus*) yang berumur 48 jam ditimbang sebanyak 1 kg dan dikering anginkan sampai kering. Kecambah yang kering dihaluskan dengan blender, lalu direndam dengan etanol 90 % sebanyak 1 L selama satu malam. Fraksi etanol dipisahkan dari serbuk kecambah yang telah direndam dengan cara disaring. Dilakukan evaporasi etanol dengan menggunakan *rotary evaporator* selama 2 hari dan hasilnya berupa ekstrak etanolik kecambah.

Pengambilan spermatozoa

Mencit dikorbankan dengan cara dislokasi leher dan dibedah di bagian bawah abdomen untuk diambil epididimis bagian cauda. Kemudian cauda epididimis sepanjang 0,5 cm dicacah dalam 1 ml larutan NaCl 0,9% dengan menggunakan gunting dan scalpel sampai terbentuk suspensi sperma.

Penghitungan jumlah spermatozoa

Jumlah spermatozoa dihitung dengan menggunakan bilik hitung *Improved Neubauer* (hemositometer). Suspensi spermatozoa sebanyak 1 ml yang telah diencerkan dalam larutan NaCl 0,9% di ambil 10 µl, kemudian diletakkan ke dalam bilik hitung (hemositometer) lalu ditutup dengan kaca penutup. Jumlah spermatozoa dihitung di bawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x.

Pengamatan morfologi spermatozoa

Pengamatan persentase morfologi spermatozoa dilakukan dengan membuat smear suspensi spermatozoa. Satu tetes spermatozoa ditetaskan di satu ujung gelas obyek, kemudian diberi 1 tetes Eosin 1% dan 1 tetes Nigrosin 10%, kemudian dihomogenkan dan dibuat hapusan dan dikering anginkan selama 2-4 menit. Sebanyak 100 sel spermatozoa diamati morfologinya (%) dibawah mikroskop cahaya 400x.

Analisis data

Data dianalisis dengan uji ANOVA untuk mengetahui adanya pengaruh nilai rata-rata antar kelompok perlakuan. Selanjutnya dilakukan uji BNT (Beda Nyata Terkecil) untuk mengetahui perbedaan *mean* antar kelompok perlakuan.

HASIL

Jumlah spermatozoa mencit setelah pemberian 2-ME pada kelompok kontrol positif (Kp) dan kelompok perlakuan yang telah diberi ekstrak etanolik kecambah (P1 dan P2) lebih rendah daripada kontrol negatif (Kn), yaitu dari *mean* $5,49 \pm 0,23$ juta sel/ml menjadi sebesar $3,31 \pm 0,25$; $3,66 \pm 0,18$ dan $4,34 \pm 0,27$ juta sel/ml. Sedangkan pada P3 jumlah spermatozoa lebih tinggi daripada kontrol negatif (Kn), yaitu sebesar $5,56 \pm 0,19$ juta sel/ml (Tabel 1).

Jumlah spermatozoa yang diberi ekstrak etanolik kecambah kacang hijau setelah terpapar 2-ME (P1, P2, dan P3) lebih tinggi daripada kontrol positif (Kp) yang terpapar 2-ME, yaitu dari *mean* $3,31 \pm 0,25$ juta sel/ml menjadi $3,66 \pm 0,18$; $4,34 \pm 0,27$ dan $5,56 \pm 0,19$ juta sel/ml. Peningkatan jumlah spermatozoa seiring dengan penambahan dosis ekstrak etanolik kecambah kacang hijau yang diberikan (Tabel 1).

Tabel 1. Rerata jumlah dan morfologi normal spermatozoa mencit kelompok kontrol dan kelompok perlakuan yang diberi 2- ME dan ekstrak etanolik kecambah kacang hijau berbagai dosis

Perlakuan	Jumlah spermatozoa (juta sel/ml) pada kelompok perlakuan	Rerata morfologi normal spermatozoa (%) pada kelompok perlakuan
Kontrol negatif (Kn)	5,49±0,23 ^a	82,10±1,19 ^a
Kontrol positif (Kp)	3,31±0,25 ^b	73,53±1,13 ^b
Perlakuan 1 (P1)	3,66±0,18 ^c	74,02±0,68 ^b
Perlakuan 2 (P2)	4,34±0,27 ^d	75,40±0,40 ^c
Perlakuan 3 (P3)	5,56±0,19 ^a	83,18±1,26 ^a

Keterangan :

Notasi huruf yang sama pada rerata menunjukkan tidak berbeda nyata pada taraf 0,05 (berdasarkan uji BNT).

Hasil analisis data jumlah spermatozoa dengan menggunakan ANOVA satu arah menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanolik kecambah kacang hijau (*Phaseolus radiatus*) berpengaruh terhadap jumlah spermatozoa mencit setelah terpapar 2-ME ($P < 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa ada perbedaan antara kelompok kontrol negatif (Kn), kontrol positif (Kp) dan perlakuan (P1, P2, dan P3). Hasil uji BNT terhadap jumlah spermatozoa menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan pada beberapa kelompok perlakuan, kecuali kelompok Kn (diberi aquades 0,1 ml) dengan P3 (diberi 2-ME dosis 200 mg/kg berat badan dan kecambah kacang hijau 2 g/kg berat badan) tidak menunjukkan perbedaan secara signifikan ($P > 0,05$) terhadap jumlah spermatozoa.

Morfologi normal spermatozoa mencit setelah pemberian 2-ME pada kelompok kontrol positif (Kp) dan kelompok perlakuan (P1 dan P2) lebih rendah daripada kontrol kontrol negatif (Kn), yaitu dari *mean* 82,10±1,19 menjadi 73,53±1,13; 74,02±0,68 dan 75,40±0,40. Sedangkan pada P3 morfologi normal spermatozoa lebih tinggi daripada kontrol negatif (Kn), yaitu sebesar 83,18±1,26 (Tabel 1).

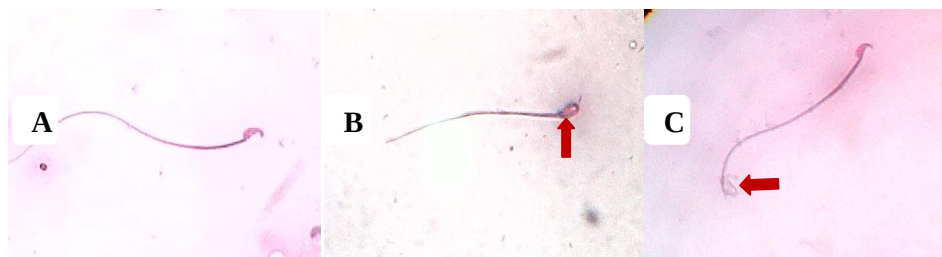
Morfologi normal spermatozoa yang diberi ekstrak etanolik kecambah kacang hijau setelah terpapar 2-ME (P1, P2, dan P3) lebih tinggi daripada positif (Kp) yang terpapar 2-ME, yaitu dari *mean* 73,53±1,13 menjadi 74,02±0,68; 75,40±0,40 dan 83,18±1,26. Morfologi normal spermatozoa meningkat seiring

dengan pertambahan dosis ekstrak etanolik kecambah kacang hijau yang diberikan (Tabel 1).

Hasil analisis data morfologi spermatozoa dengan menggunakan ANOVA satu arah menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanolik kecambah kacang hijau (*Phaseolus radiatus*) berpengaruh terhadap morfologi spermatozoa mencit setelah terpapar 2-ME ($P < 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa ada perbedaan antara kelompok kontrol negatif (Kn), kontrol positif (Kp) dan kelompok perlakuan (P1, P2, dan P3).

Hasil uji BNT terhadap morfologi spermatozoa menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan pada beberapa kelompok perlakuan, kecuali kelompok Kp (diberi 2-ME dosis 200 mg/kg berat badan) dengan P1(diberi 2-ME dosis 200 mg/kg berat badan dan kecambah kacang hijau 0,5 g/kg berat badan), dan kelompok Kn (diberi aquades 0,1 ml) dengan P3 (diberi 2-ME dosis 200 mg/kg berat badan dan ekstrak kecambah kacang hijau 2 g/kg berat badan) tidak menunjukkan perbedaan secara signifikan ($P > 0,05$) terhadap morfologi normal spermatozoa.

Morfologi spermatozoa mencit diamati dibawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x.



Gambar 1. Morfologi spermatozoa mencit. A. Spermatozoa normal; B-C spermatozoa dengan kelainan morfologi pada bagian kepala dan ekor.

Kelainan morfologi spermatozoa dapat terjadi di bagian kepala, leher, ekor, atau kombinasi antara bagian-bagian tersebut. Pada morfologi spermatozoa yang diamati, terdapat kelainan yang terjadi pada bagian kepala dan ekor, yaitu bentuk kepala yang tidak beraturan, ukuran kepala mengecil,

kepala membesar (Gambar 1.B), tidak memiliki kepala, ekor patah, melingkar (Gambar 1.C), atau bercabang dan terdapat *cytoplasmic droplet*.

PEMBAHASAN

Jumlah spermatozoa mencit yang diberi 2-ME (Kp) mengalami penurunan dari kelompok kontrol negatif (Kn) yang hanya diberi aquades, yaitu dari *mean* $5,49 \pm 0,23$ juta sel/ml menjadi sebesar $3,31 \pm 0,25$ juta sel/ml. Penurunan jumlah spermatozoa ini disebabkan oleh senyawa MAA yang merupakan hasil metabolit 2-ME. Senyawa MAA menyebabkan degenerasi pada sel spermatogenik, terutama spermatosit pakhiten dan spermatid (Rumanta *et al.*, 2001). Sel spermatogenik yang telah rusak diabsorpsi oleh sel Sertoli sehingga mengakibatkan berkurangnya jumlah spermatozoa.

Setelah diberi ekstrak etanolik kecambah kacang hijau jumlah spermatozoa kelompok perlakuan (P1, P2, dan P3) mengalami peningkatan dari kelompok kontrol positif (kelompok yang terpapar 2-ME) seiring dengan pertambahan dosis. Peningkatan pada P1, P2 dan P3 berbeda signifikan dengan kelompok kontrol positif (berdasarkan uji BNT). Hal ini menunjukkan bahwa pada dosis pemberian ekstrak etanolik kecambah kacang hijau sebesar 0,5 g/kg berat badan (P1) mampu meningkatkan jumlah spermatozoa mencit. Dibandingkan dengan jumlah spermatozoa kelompok kontrol negatif ($5,49 \pm 0,23$ juta sel/ml), kelompok P1 dan P2 mengalami penurunan, jumlahnya lebih rendah yaitu sebesar $3,66 \pm 0,18$ dan $4,34 \pm 0,27$ juta sel/ml. Berdasarkan uji BNT, kelompok P1 dan P2 mengalami penurunan yang signifikan dari kelompok kontrol negatif (Kn). Sedangkan pada P3 jumlah spermatozoa lebih tinggi daripada kontrol negatif (Kn) walaupun perbedaannya tidak signifikan, yaitu sebesar $5,56 \pm 0,19$ juta sel/ml. Hal ini menunjukkan bahwa dosis pemberian ekstrak kecambah kacang hijau sebesar 2 g/kg berat badan (P3) adalah dosis yang dapat memulihkan sel-sel spermatozoa yang telah terpapar 2-ME yang ditunjukkan dengan peningkatan jumlah spermatozoa pada kelompok P3 dari kelompok Kn walaupun perbedaannya tidak signifikan.

Morfologi normal spermatozoa mencit yang diberi 2-ME (Kp) mengalami penurunan dari kelompok kontrol negatif (Kn), yaitu dari *mean* $82,10 \pm 1,19$ menjadi $73,53 \pm 1,13$. Mekanisme yang menyebabkan terjadinya penurunan morfologi spermatozoa adalah meningkatnya jumlah *Reactive Oxygen Spesies* (ROS) yang disebabkan oleh adanya gangguan epididimis. Menurut Quratul 'aini (2006), menyatakan bahwa terjadinya kelainan pada morfologi spermatozoa adalah dikarenakan adanya gangguan pada sel-sel Sertoli yang menyebabkan adanya kelainan pada proses maturasi dari sel spermatozoa yang terjadi pada epididimis. Sel Sertoli tidak dapat memfagositosis *cytoplasmic droplet* sehingga menyebabkan morfologi tidak normal pada spermatozoa.

Setelah diberi ekstrak etanolik kecambah kacang hijau, kelompok perlakuan (P1, P2 dan P3) mengalami peningkatan dari kelompok kontrol positif seiring dengan pertambahan dosis. Pada P1 perbedaannya tidak signifikan dengan kelompok kontrol positif, sedangkan pada P2 dan P3 perbedaannya signifikan dengan kelompok kontrol positif. Hal ini menunjukkan bahwa pada dosis pemberian ekstrak etanolik kecambah kacang hijau sebesar 1 g/kg berat badan (P2) mampu meningkatkan morfologi normal spermatozoa mencit. Dibandingkan dengan morfologi normal spermatozoa kelompok kontrol negatif ($82,10 \pm 1,19$), kelompok P1 dan P2 mengalami penurunan yang signifikan (berdasarkan uji BNT), jumlahnya lebih rendah yaitu sebesar $74,02 \pm 0,68$ dan $75,40 \pm 0,40$. Sedangkan pada P3 morfologi normal spermatozoa lebih tinggi daripada kontrol negatif walaupun perbedaannya tidak signifikan, yaitu sebesar $83,18 \pm 1,26$. Hal ini menunjukkan pada dosis pemberian ekstrak kecambah kacang hijau sebesar 2 g/kg berat badan (P3) terjadi pemulihan sel-sel spermatozoa yang telah terpapar 2-ME yang ditunjukkan dengan peningkatan morfologi normal spermatozoa pada kelompok P3 dari kelompok Kn walaupun perbedaannya tidak signifikan.

Peningkatan jumlah spermatozoa dan morfologi normal spermatozoa setelah pemberian ekstrak etanolik kecambah kacang hijau ini disebabkan oleh kandungan antioksidan yang ada dalam ekstrak kecambah kacang hijau dapat menangkal radikal bebas yang ditimbulkan oleh 2-ME. Vitamin E merupakan

antioksidan yang kandungannya paling besar dalam kecambah kacang hijau (Winarsi, 2007). Vitamin tersebut larut dalam lemak dan dapat mencegah peroksidasi lipid dan stress oksidatif. Terhentinya stress oksidatif menyebabkan pertumbuhan spermatosit tidak terganggu sehingga proses spermatogenesis dapat berlangsung normal. Prasetyastuti dan Sunarsi (2008) menyatakan bahwa, vitamin E adalah sebuah pelindung *polyunsaturated fatty acid* (PUFA) pada membran sel. Radikal bebas umumnya mengkatalisis peroksidasi PUFA di membran sel. Vitamin E bereaksi dengan radikal bebas untuk mencegah kerusakan membran sel. Vitamin E yang ada dalam kecambah kacang hijau dapat mengendalikan peroksida lemak dengan menyumbangkan hidrogen kedalam reaksi, menyekat aktivitas tambahan yang dilakukan oleh peroksida, sehingga memutus reaksi berantai dan bersifat membatasi kerusakan (Hariyatmi, 2004).

KESIMPULAN

Pemberian ekstrak etanolik kecambah kacang hijau pada dosis 0,5 g/kg berat badan dapat meningkatkan jumlah spermatozoa mencit yang terpapar 2-ME. Sedangkan pemberian ekstrak etanolik kecambah kacang hijau pada dosis 1 g/kg berat badan dapat meningkatkan morfologi normal spermatozoa mencit yang terpapar 2-ME. Sementara pemberian ekstrak etanolik kecambah kacang hijau pada dosis 2 g/kg berat badan dapat memulihkan jumlah, dan morfologi normalspermatozoa mencit yang terpapar 2-ME.

DAFTAR PUSTAKA

- Anggrahini, S., 2009, *Pengaruh Lama Pengecambahan terhadap Kandungan α -Tokoferol dan Senyawa Proksimat Kecambah Kacang Hijau (*Phaseolus radiatus* L.)*. <http://patpijogja.wordpress.com/2009/08/27/pengaruh-lama-pengecambahan-terhadap-kandungan-a-tokoferol-dan-senyawaproksimat-kecambah-kacang-hijau-phaseolus-radiatus-l-oleh-srianggrahini-staf-pengajar-fakultas-teknologi-pertanian-ugm/>. Diakses tanggal 4 Januari 2012.
- Astawan M, 2005, *Kacang Hijau: Antioksidan yang Membantu Kesuburan Pria*, http://web.ipb.ac.id/~tpg/de/pubde_ntrtnhlth_kacanghijau.php. Diakses tanggal 12 September 2011.

- Hayati A., Yunaida B., I.B. Rai Pidada, Darmanto W., dan Winarni D., 2004, Efek 2-methoxyethanol terhadap Struktur Histologi Testis Mencit (*Mus musculus*), *Penelitian Berkala Hayati*, **10** (1):7-12.
- Hayati, A., D.R. Any, dan I.B. Rai Pidada, 2005, Spermatozoa Motility and Recovery Process in Mice after The Induction of 2-Methoxyethanol, *Folia Medica Indonesiana*, **41** (2): 90-95.
- Hariyatmi. 2004. Kemampuan vitamin E sebagai antioksidan terhadap radikal bebas pada lanjut usia. *Jurnal MIPA*, **14** (1), 52-60
- Kim BS. dan Smialowicz RJ., 1997, The Role of Metabolism in 2-ME-induced Suppression of in vitro Polyclonal Antibody Responses by Rat and Mouse Lymphocytes. *Journal Toxicology*, **123** (3) : 227-239.
- Miller, R.R, Herman, E. A, Langvardt P.W, Mckenna M.J, dan Schewtz B.A, 1983, Comparative metabolism and disposition of ethylene glycol monoethyl ether and propylene glycol monoethyl ether in male rats, *J. Toxicology and Applied Pharmacology*, **67** (2) : 229-237.
- Moslen MT, Kaphalia L, Balasubramanian H, Yin YM, dan Au WW, 1995, Species differences in testicular and hepatic biotransformation of 2-methoxyethanol, *Toxicology*, **96** (3) : 217-24.
- Pasqualloto, F.F., Lucon A.M., Sobreiro B.P., Pasqualloto E.B., dan Arap S., 2004, Effects of medical Therapy, Alcohol, Smooking, and Endocrine Disruptors on Male Infertility, *Review Hospital Clinic Medical*, St. Paulo, **59** (6): 375-382.
- Quratul'ainy, S. 2006. Pengaruh pemberian vitamin E terhadap jumlah spermatozoa mencit jantan strain Balb/C yang dipaparkan asap rokok. *Skripsi*. Fakultas Kedokteran. Universitas Diponogoro. Semarang. hal. 8-10
- Rumanta, M., T.W. Surjowo dan S. Sudarwati, 2001, *Pengaruh Asam Methoxyacetat terhadap Organ Reproduksi Mencit (Mus Musculus)* Swiss Webster Jantan, Proceeding Institute Technology Bandung, Bandung.
- Vernet P, Aitken RJ, dan Drever JR., 2004, Antioxidant strategies in the epididymis, *Mol Cell Endocrinol*, **216** (1-2) : 31-39.
- Wardlaw G. M., dan Jeffrey S. H., 2007, *Perspectives in Nutrition: the Vitamins and Minerals*. 7th ed. New York: Mc Graw Hill, pp: 318-320.
- Winarsi H, 2007, *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*, Kanisius, Yogyakarta.