

**Analisis Kualitas Sperma Tikus Putih (*Rattus Norvegicus*)
dengan Makanan Tinggi Kalori pada Pemberian
Ekstrak Manggis (*Garciana mangostana*)**

Dahril¹, Dasrul², Dhita Dwiyani³, Reza Maulana⁴

*¹Bagian Ilmu Bedah Divisi Urologi Fakultas Kedokteran
Unsyiah/RSUZA, ²Fakultas Kedokteran Hewan Unsyiah, ³Mahasiswa
Program Studi Profesi Dokter Fakultas Kedokteran Unsyiah, ⁴Bagian
Anatomi Histologi Fakultas Kedokteran Unsyiah*

Abstrak

Hiperkolesterolemia dapat menyebabkan keadaan infertilitas melalui efek radikal bebas yang dihasilkan sehingga dibutuhkan perhatian lebih pada penanganan infertilitas ini. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menilai dan membandingkan pengaruh pemberian ekstrak kulit manggis terhadap kualitas sperma tikus putih yang diberi makanan tinggi kolesterol. Penelitian ini berupa penelitian eksperimental dengan rancangan *post test only control group design*. Subjek penelitian ini adalah tikus putih *rattus norvegicus* strain Wistar Hasil penelitian menunjukkan penurunan kualitas sperma pada kelompok pemberian makanan tinggi kolesterol. Kesimpulan penelitian ini adalah bahwa pemberian ekstrak kulit manggis (*Garciana mangostana*) dapat meningkatkan kualitas sperma tikus putih *rattus norvegicus*

Kata kunci: Ekstrak kulit manggis, kualitas sperma

Pendahuluan

Infertilitas adalah tidak tercapainya kehamilan dari pasangan yang telah berhubungan seksual secara teratur tanpa menggunakan alat dan metode kontrasepsi apapun setelah menikah selama 12 bulan atau lebih. Banyak faktor yang mempengaruhi infertilitas, sehingga banyak pasangan tidak memiliki anak disebabkan infertilitas.(1,2)

Terdapat hampir 50 juta pasangan di seluruh dunia pada tahun 2010 yang mengalami masalah infertilitas dan 50% diantaranya disebabkan faktor dari pria. (3,4) Penelitian pada tahun 2000 di Indonesia 3-4,5 juta dari 30 juta pasangan usia subur mengalami infertilitas. (5) Faktor-faktor yang dapat menimbulkan infertilitas pada pria, dapat disebabkan oleh gangguan spermatogenesis, kelainan pada testis atau di luar testis, gangguan pada transportasi sperma akibat kelainan anatomi dari saluran-saluran yang dilewati sperma. Faktor lainnya yaitu perubahan gaya hidup, radiasi, faktor psikologis, faktor genetik, dan lain-lain. (6)

Gaya hidup masyarakat telah berubah mengikuti perkembangan zaman, perubahan yang terjadi termasuk dalam pola makan. Menurut penelitian Riset Kesehatan Dasar (RISKESDAS) tahun 2010, perubahan pola makan seperti konsumsi makanan dan minuman dengan kadar gula yang tinggi, garam tinggi, dan lemak yang tinggi pada masyarakat pedesaan dan perkotaan cukup tinggi. Konsumsi lemak yang tinggi tersebut beresiko menyebabkan hiperkolesterolemia. (7) Prevalensi global dari peningkatan kadar kolesterol menurut *World Health Organization* (WHO) pada tahun 2008 pada dewasa sekitar 39%. (8) Menurut data dari RISKESDAS tahun 2013 menyatakan sekitar 35,9%

penduduk Indonesia diatas 15 tahun memiliki kadar kolesterol total diatas nilai normal. (9)

Penelitian membuktikan bahwa hiperkolesterolemia memberikan pengaruh terhadap terjadinya infertilitas. Dampak utama hiperkolesterolemia terhadap infertilitas sebagai akibat adanya peningkatan senyawa oksigen reaktif atau *reactive oxygen spesies* (ROS) yang selanjutnya menyebabkan stres oksidatif pada organ reproduksi dan spermatozoa (10,11) Pada penelitian yang dilakukan di United States oleh Argawal *et al* pada tahun 2014, didapatkan hasil bahwa terjadi peningkatan kadar ROS dalam plasma seminal pria yang mengalami infertilitas sebanyak 30% sampai 40%. (1) Penelitian lain yang dilakukan oleh Bashandy pada tahun 2007 menghasilkan kesimpulan terjadi penurunan motilitas sperma pada tikus yang diberi pakan tinggi kolesterol. (11) Kedua penelitian ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Lancelloti *et al* tahun 2013 dimana terjadi penurunan volume semen, jumlah, viabilitas, dan motilitas sperma pada kelinci yang diberi pakan tinggi kolesterol. (12)

Banyak penelitian telah dilakukan untuk mengidentifikasi zat alami yang dapat melindungi tubuh dari stres oksidatif seperti penggunaan senyawa antioksidan yang terdapat dalam buah, sayur, dan tanaman bij-bijian. (13) Buah manggis (*Garciana mangostana*) yang merupakan buah yang sering dikonsumsi masyarakat Indonesia. (14) Buah manggis ini mengandung banyak komponen antioksidan *xanthones* yang menjadi agen kimia untuk menyerang ROS yang berperan dalam hiperkolesterol dan infertilitas. (13,15) Dalam penelitian yang dilakukan secara *invitro* oleh Weecharansan *et al* pada tahun 2006 terjadi peningkatan aktifitas penangkapan radikal bebas oleh antioksidan yang

terkandung dalam 50% ekstrak etanol kulit manggis. (16) Pada tahun 2007 dalam penelitian Chomnawang *et al* menunjukkan bahwa kulit manggis efektif dalam penguraian radikal bebas dan menekan produksi *pro-inflamatori sitokin* yaitu, TNF- α terhadap inflamasi yang disebabkan oleh *Propionibacterium acnes*. (17) Pemanfaatan buah manggis sebagai sebuah terapi alternatif terhadap infertilitas perlu dikaji dan diteliti, penelitian ini menggunakan pemberian ekstrak manggis (*Garciana mangostana*) terhadap kualitas sperma tikus putih (*Rattus novergicus*) jantan yang diberi pakan tinggi kolesterol.

Metode Penelitian

Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini adalah eksperimen laboratorik dengan menggunakan rancangan penelitian posttest dengan kelompok control (*post test control group design*). Penelitian ini menggunakan hewan coba berupa tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan strain wistar.

Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi Penelitian

Target populasi dari penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain Wistar yang diperoleh dari Laboratorium Hewan Coba Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara.

Sampel Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada hewan uji tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) strain wistar

Penelitian menggunakan hewan coba tikus *Rattus norvegicus* strain Wistar berjenis kelamin jantan dan berumur 3-4 bulan dengan berat 150-200 gram yang terbagi menjadi 6 kelompok.

Hewan uji yang dipilih adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan strain wistar sesuai dengan kriteria inklusi berupa ikusputih (*Rattusnorvegicus*) jantan strain wistar, umur 3-4 bulan, berat badan150-200 gram, kondisi sehat dan tidak terdapat kelainan anatomis makro, belum pernah mendapatkan perlakuan apapun. Kriteria eksklusi berupa tikus sakit dan tikus mati selama penelitian.

Pengolahan dan Analisa Data

Data yang diperoleh dari hasil pengamatan terhadap jumlah, persentase morfologi dan motilitas spermatozoa sebelumnya dilakukan uji normalitas dengan menggunakan uji *Saphiro-Wilk* dan homogenitas dengan menggunakan uji *Levene*. Data yang berdistribusi normal dianalisis dengan menggunakan *analysis of variance* (ANOVA) satu arah. Bila hasil menunjukkan perbedaan, maka analisis data akan dilanjutkan dengan metode *Duncan*. Hasil pengolahan data akan ditampilkan dalam bentuk gambar, grafik dan tabel.

Hasil Penelitian

*Evaluasi Jumlah Sel Spermatozoa Tikus Putih *Rattus norvegicus**

Dari hasil penelitian, didapatkan data jumlah sel spermatozoa tikus *Rattus norvegicus* yang disajikan pada tabel berikut:

Tabel 1 Data distribusi evaluasi jumlah sel spermatozoa tikus *Rattus norvegicus*

| Ulangan | Perlakuan (Jumlah dikali 10 ⁶ ml) | | |
|-----------|--|---------|---------|
| | Negatif | Positif | Manggis |
| Tikus I | 33 | 14 | 29 |
| Tikus II | 38 | 16 | 27 |
| Tikus III | 46 | 17 | 31 |
| Tikus IV | 42 | 20 | 28 |
| Tikus V | 35 | 18 | 34 |

Keterangan :

Negatif = Kelompok yang tidak mendapatkan perlakuan

Positif = Kelompok yang diberi pakan tinggi kolesterol

Manggis = Kelompok yang diberi pakan tinggi kolesterol dan ekstrak manggis

Berikut adalah hasil analisa data evaluasi jumlah sel spermatozoa menggunakan uji ANOVA satu arah pada tabel berikut:

Tabel 2 Hasil uji ANOVA satu arah jumlah sel spermatozoa

| | Jumlah Skor | Kuadrat Simpangan | df | Rerata Kuadrat Skor Simpangan | F | Sig. |
|----------------|-------------|-------------------|----|-------------------------------|--------|-------|
| Antar Kelompok | 2216.567 | | 5 | 443.313 | 26.678 | 0.000 |
| Dalam Kelompok | 384.400 | | 24 | 16.017 | | |
| Total | 2600.967 | | 29 | | | |

Keterangan : Nilai p dihitung menggunakan uji ANOVA satu arah p value < 0.05 (didapatkan perbedaan) dengan F tabel = 2,62

Berdasarkan uji statistik *Analysis of variance* (ANOVA) *one way* menunjukkan adanya perbedaan ($P < 0,005$) pada kelompok penelitian. Selanjutnya dilakukan uji lanjutan, yaitu uji *Duncan* untuk melihat perbedaan nyata antara kelompok kontrol negatif, kontrol positif, dan kelompok perlakuan manggis. Hasil analisa uji *Duncan* dapat dilihat pada tabel berikut:

Tabel 3 Hasil uji *Duncan* jumlah sel spermatozoa

| Kelompok | N | Subset for alpha = 0.05 | | |
|----------|---|-------------------------|-------|-------|
| | | 1 | 2 | 3 |
| Positif | 5 | 17.00 | | |
| Manggis | 5 | | 29.80 | |
| Negatif | 5 | | | 38.80 |
| Sig. | | 1.000 | 0.073 | 0.095 |

Keterangan : Nilai p dihitung menggunakan uji *Duncan*, dengan $p \text{ value} < 0.05$ (didapatkan perbedaan nyata)

Terdapat perbedaan nyata antara kelompok kontrol positif (KP) dengan kelompok ekstrak manggis,. Hal ini mengindikasikan bahwa pemberian makanan tinggi kolesterol dapat menurunkan jumlah sel spermatozoa.

Evaluasi Persentase Abnormalitas Morfologi Sel Spermatozoa Tikus Putih Rattus norvegicus

Data abnormalitas morfologi spermatozoa tikus *Rattus norvegicus* yang disajikan pada tabel berikut:

Tabel 4 Data distribusi evaluasi persentase abnormalitas morfologi spermatozoa

| Ulangan | Persentase abnormalitas sel spermatozoa | | |
|-----------|---|---------|---------|
| | Negatif | Positif | Manggis |
| Tikus I | 2,91 | 14,56 | 6,4 |
| Tikus II | 3,96 | 16,5 | 5,83 |
| Tikus III | 3,77 | 14,81 | 6,66 |
| Tikus IV | 2,60 | 14,15 | 6,86 |
| Tikus V | 4,46 | 16,36 | 5,5 |

Keterangan :

Negatif = Kelompok yang tidak mendapatkan perlakuan

Positif = Kelompok yang diberi pakan tinggi kolesterol

Tabel 5 Hasil uji ANOVA satu arah persentase abnormalitas morfologi sel spermatozoa.

| | Jumlah Skor | Kuadrat Simpangan | df | Rerata Skor | Kuadrat Simpangan | F | Sig. |
|----------------|-------------|-------------------|----|-------------|-------------------|---------|-------|
| Antar Kelompok | 468.066 | | 5 | 93.613 | | 148.706 | 0.000 |
| Dalam Kelompok | 15.108 | | 24 | 0.630 | | | |
| Total | 483.175 | | 29 | | | | |

Keterangan : Nilai p dihitung menggunakan uji ANOVA satu arah p value < 0.05 (didapatkan perbedaan) dengan F tabel = 2,62

Berdasarkan uji statistik *Analysis of variance*(ANOVA) *one way* didapatkan F hitung > F tabel (148,706>2,62) dan signifikasinya $0,000 < 0,005$, maka dapat disimpulkan bahwa hasil uji statistik *Analysis of variance*(ANOVA) satu arah menunjukkan adanya perbedaan ($P < 0,005$) pada kelompok penelitian.

Evaluasi Persentase Motilitas Progresif Sel Spermatozoa Tikus Putih Rattus norvegicus

Dari hasil penelitian, didapatkan data persentase motilitas progresif sel spermatozoa tikus *Rattus norvegicus* yang disajikan pada tabel berikut:

Tabel 6 Data distribusi persentase motilitas progresif sel spermatozoa tikus *Rattus norvegicus*

| | Motilitas dalam persentase | | |
|-----------|----------------------------|---------|---------|
| | Negatif | Positif | Manggis |
| Ulangan | | | |
| Tikus I | 68,18 | 39,44 | 56,48 |
| Tikus II | 65,71 | 45,53 | 58,92 |
| Tikus III | 66,94 | 47,7 | 61,25 |
| Tikus IV | 66,94 | 34,65 | 58,88 |
| Tikus V | 66,94 | 41,83 | 58,88 |

Keterangan :
Negatif = Kelompok yang tidak mendapatkan perlakuan
Positif = Kelompok yang diberi pakan tinggi kolesterol
Manggis = Kelompok yang diberi pakan tinggi kolesterol dan ekstrak manggis

Berikut adalah hasil uji normalitas data evaluasi jumlah sel spermatozoa yang disajikan dalam bentuk tabel berikut:

Tabel 7 Hasil uji normalitas data evaluasi spermatozoa

| Kelompok | Shapiro-Wilk |
|----------|--------------|
| | Sig. |
| Negatif | 0.325 |
| Positif | 0.913 |
| Manggis | 0.351 |

Berikut adalah hasil analisa data evaluasi jumlah sel spermatozoa menggunakan uji ANOVA satu arah pada tabel berikut:

Tabel 8 Uji ANOVA persentase motilitas progresif sel spermatozoa

| | Jumlah Skor Simpangan | Kuadrat df | Rerata Kuadrat Skor Simpangan | F | Sig. |
|-------------------|--------------------------|---------------|-------------------------------------|--------|-------|
| Antar Kelompok | 1875.047 | 5 | 375.009 | 37.568 | 0.000 |
| Dalam Kelompok | 239.574 | 24 | 9.982 | | |
| Total | 2114.621 | 29 | | | |

Keterangan : Nilai p dihitung menggunakan uji ANOVA satu arah p value < 0.05 (didapatkan perbedaan) dengan F tabel = 2,62

Berdasarkan uji statistik *Analysis of variance* (ANOVA) *one way* menunjukkan adanya perbedaan ($P < 0,005$) pada kelompok penelitian.

Pembahasan

Pada kelompok pemberian pakan tinggi kolesterol terjadi penurunan kualitas sperma yang meliputi jumlah, motilitas dan morfologi sel spermatozoa pada tikus putih strain wistar bila dilihat dari analisa data yang telah dilakukan. Kemudian jumlah kualitas sperma mengalami peningkatan kembali pada kelompok perlakuan pemberian pakan tinggi kolesterol secara bersamaan ekstrak kulit buah manggis 50 mg/kgbb/hari. Menurunnya kualitas sperma pada kelompok kontrol positif bila dibandingkan dengan seluruh kelompok perlakuan, diduga disebabkan karena pemberian pakan tinggi kolesterol kepada hewan coba dapat menyebabkan peningkatan produksi radikal bebas dan peroksidasi lipid yang berlebihan. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Ohara, Peterson, dan Harrison yang melaporkan bahwa pada kondisi hiperkolesterolemia akan terjadi peningkatan produksi radikal bebas di dalam tubuh dan tingkat peroksidasi lipid pada jaringan. Keadaan hiperkolesterolemia ini akan meningkatkan konsumsi oksigen dan NADPH dalam tubuh, yang kemudian akan meningkatkan radikal superoksida (O_2^-) yang dihasilkan. Kondisi tersebutlah yang menyebabkan hiperkolesterolemia menjadi salah satu pemicu terjadinya pembentukan radikal bebas atau *Reactive Oxygen Species* yang berlebih di dalam tubuh. (18,19)

Peningkatan produksi ROS ini dapat mempengaruhi jumlah, morfologi dan motilitas sel spermatozoa. Pada kondisi hiperkolesterolemia diketahui dapat menyebabkan terjadinya ketidakseimbangan antara peningkatan ROS dan antioksidan dan penurunan dari aktivitas enzim 17-beta *hydroxysteroid dehydrogenase* dan enzim antioksidan seperti *Catalase*, *glutathione peroksidase*, dan

lain-lain yang menyebabkan kerusakan sel Sertoli dan sel Leydig. Stress oksidatif ini mengganggu proses spermatogenesis dimana peningkatan produksi ROS menyebabkan degenerasi dari sel-sel gonad yang bersifat oksidan. Rusaknya sel-sel sertoli mengakibatkan terganggunya proses spermiogenesis sedangkan rusaknya sel-sel leydig akan mengakibatkan terganggunya sintesis hormon testosteron dan tentu saja hal ini akan berpengaruh pada spermatogenesis. (11,20)

Stress oksidatif tersebut juga akan mempengaruhi mempengaruhi keseimbangan poros hipotalamus-hipofisa-gonad sehingga akan mempengaruhi kerja *GnRH* sehingga pembentukan *FSH* dan *LH* akan terhambat. (21,22) Hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Bashandy tahun 2007 bahwa adanya penurunan jumlah sperma, persentase spermatozoa motil dan peningkatan abnormalitas morfologi sperma yang berhubungan dengan keadaan hiperkolesterolemia yang menyebabkan gangguan fungsi sekresi sel sertoli dan sel leydig sehingga membuat proses pembentukan dan pematangan spermatozoa terganggu. (11) Pada penelitian lainnya yang dilakukan oleh pramudito tahun 2009 bahwa adanya peningkatan abnormalitas morfologi spermatozoa. Hal ini diakibatkan karena kelebihan jumlah ROS akan mengakibatkan peroksidasi lipid yang luas sehingga mengakibatkan kerusakan DNA dan memodifikasi ekspresi genetik yang akhirnya akan mengakibatkan kelainan morfologi. (23)

Spermatozoa sangat rentan terhadap ROS dikarenakan pada membrannya yang terdiri dari *poly unsaturated fatty acids* (PUFAs) dan banyak mengandung elektron tunggal sehingga ROS dengan mudah berikatan dengan membran tersebut. Hal ini akan membentuk reaksi rantai peroksidasi lipid yang meluas yang akan merusak biokimiawi sel

sehingga terjadi kerusakan pada struktur membran sel serta membran mitokondria. Kerusakan mitokondria ini menyebabkan terganggunya produksi ATP sehingga menyebabkan rendahnya persentase motilitas. (1,21)

Sedangkan pada hasil penelitian ini membuktikan bahwa pemberian ekstrak kulit buah manggis dosis 50 mg/kgbb/ dimana ekstrak ini berfungsi sebagai antioksidan akan meningkatkan jumlah sel spermatozoa, motilitas progresif sperma dan morfologi normal sel spermatozoa tikus putih setelah pemberian pakan tinggi kolesterol dibandingkan dengan kelompok KP walaupun secara statistik tidak terdapat perbedaan yang nyata diantara ketiga perlakuan ini.

Selain antioksidan, buah manggis juga mengandung kandungan serat yang dapat menurunkan kadar kolesterol melalui beberapa cara seperti menurunkan absorpsi kolesterol dengan cara berikatan dengan kolesterol yang berasal dari makanan dan mengeluarkannya ke dalam feses dan menurunkan sintesis kolesterol dengan cara menurunkan rangsangan sintesis kolesterol melalui penurunan laju absorpsi karbohidrat. Hal ini menyebabkan terjadinya penurunan kadar LDL dan produksi radikal bebas sehingga tidak terjadi oksidasi LDL yang dapat menimbulkan terjadinya peroksidasi lipid penyebab kerusakan sel-sel tubuh. (24,25)

Simpulan

Berdasarkan hasil analisis dan pembahasan yang telah diuraikan oleh peneliti, dapat diambil kesimpulan beberapa hal sebagai berikut:

Ekstrak manggis (*Garciana mangostana*) dapat meningkatkan kualitas sperma pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diberi makanan tinggi kolesterol.

Saran

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disampaikan saran-saran sebagai berikut:

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui pengaruh pemberian pakan tinggi kolesterol, ekstrak kulit buah manggis terhadap fungsi fisiologis sel sperma tikus *Rattus norvegicus*.
2. Bagi peneliti selanjutnya perlu dilakukan evaluasi sel spermatozoa dengan menggunakan aplikasi komputer agar didapat hasil yang lebih objektif dan jauh dari bias.

Daftar Pustaka

1. Argawal A, Virk G, Ong C, du Pleiss S. Effect of Oxidative Stress on Male Reproduction. *World Journal of Mens Health*. 2014; 1: p. 1-17.
2. Zegers-Hochschild F, Adamson GD, Ishihara O, Mansour R, Nygren K, Sullivan E, et al. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) Revised Glossary of ART Terminology, 2009. World Health Organization. 2009 November; 92(5).
3. Mascarenhas MN, Flaxman SR, Boerma T, Vanderpoel S, Stevens GA. National, Regional, and Global Trends in Infertility Prevalence Since 1990: A Systemic Analysis of 277 Health Surveys. *Public Library of Science Medicine*. 2012 December; 9(12).
4. Shamsi M, Kumar R, Bhatt A, Bamezai R, Kumar R, Gupta N, et al. Mitochondrial DNA Mutations in Etiopathogenesis of Male Infertility. *Indian Journal of Urology*. 2008; 24(2): p. 150-154.
5. Prawirohardjo S. Ilmu Kebidanan Jakarta: PT. Bina Pustaka Sarwono Prawirohardjo; 2008.
6. Aitken RJ, Smith TB, Jobling MS, Baker MA, De Luliis GN. Oxidative Stress and Male Reproductive Health. *Asian Journal of Andrology*. 2014; 16: p. 31-38.
7. Kesehatan BPD. Laporan Nasional Riset Kesehatan Dasar 2010. [Online].; 2010 [cited 2014 Agustus 21. Available from:

- http://www.litbang.depkes.go.id/sites/download/rkd2010/Laporan_Riskesda2010.PDF.
8. (WHO) WHO. Global Health Observatory (GHO). [Online].; 2008 [cited 2014 Mei 21. Available from: http://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/cholesterol_text/en/.
 9. Kesehatan BPdP. Laporan Nasional Riset Kesehatan Dasar 2013. [Online].; 2013 [cited 2014 Agustus 21. Available from: http://www.litbang.depkes.go.id/sites/download/rkd2013/Laporan_Riskesda2013.PDF.
 10. Kasturi S, Tannir J, Brannigan R. The Metabolic Syndrome and Male Infertility. *Journal of Andrology*. 2008; 29: p. 251-259.
 11. Bashandy A. Effect of Fixed Oil Nigella Sativa on Male Fertility in Normal and Hyperlipidemic Rats. *International Journal of Pharmacology*. 2007; 3(1): p. 27-33.
 12. Lancellotti T, Boarelli P, Romero A, al e. Semen Quality and Sperm Function Loss by Hypercholesterolemic Diet Was Recovered by Addition of Olive Oil to Diet in Rabbit. *Public Library of Science One*. 2013; 8(1): p. 1-8.
 13. Kosem N, Han Y, Moongkarndi P. Antioxidant and Cytoprotective Activities of Methanolic Extract from Garciana mangostana Hulls. *ScienceAsia*. 2007; 33: p. 283-252.
 14. Nontamart N, Tongjaroebuangan W, Srisawat R. The Memory Enhancing Effects of The Extract from the Fruit Hull of Mangosteen (Garciana mangostana L.) in Helathy Adult Male Rats. *International Proceedings of Chemical, Biological and Enviromental Engineering*. 2013; 55: p. 117-121.
 15. Moongkarndi P, Kosem N, Kaslungka S, Luanratana O, Pongpan N, Neungton N. Antiproliferation, Antioxidation and Induction of Apoptosis by Garciana mangostana (Mangosteen) on SKBR3 Human Breast Cancer Cell Line. *Journal of Ethnopharmacology*. 2004; 90: p. 161-166.
 16. Weecharansan W, Opanosit P, Sukma M, Ngawhirunpat T, Sotanaphun U, Siripong P. Antioxidative and Neuroprotective Activities of Extracts from The Fruit Hull of Mangosteen (Garciana mangostana Linn.). *Medical Principles and Practice*. 2006; 15(4): p. 281-287.
 17. Chomnawang MT SSNVGW. Effect of Garcinia mangostana on inflammation caused by Propionibacterium acnes. *Fitoterapia*. 2007; 78: p. 401-408.
 18. Stapleton P, Goodwill A, James M, Brock R, Frisbee J. Hypercholesterolemia and Microvascular Dysfunction: Interventional Strategies. *Journal of Inflammation*. 2010; 7(54): p. 1-10.
 19. Aprioku J. Pharmacology of Free Radicals and The Impact of Reactive Oxygen Species on The Testis. *Journal of Reproduction and Infertility*. 2013; 14(4): p. 158-172.

20. Ohara Y, Peterson T, Harrison D. Hypercholesterolemia Increases Endothelial Superoxide Anion Production. *The Journal of Clinical Investigation*. 1993; 91: p. 2546-2551.
21. Sophia S. Pengaruh Pemberian Minyak Jintan Hitam (*Nigella Sativa*) terhadap Motilitas Sperma Tikus Wistar Hiperlipidemia. FK Universitas Diponegoro. 2009.
22. Argawal A, Sharma R, Nakella K, Thomas A, Alvarez J, Sikka S. Reactive Oxygen Species as an Independent Marker of Male Factor Infertility. *Fertil Steril*. 2006; 86(4): p. 878-885.
23. Pramudito H. Perbandingan Kualitas Spermatozoa Pada Tikus Wistar Diabetes Melitus dan Hiperlipidemia Artifisial. FK Univeristas Diponegoro. 2009.
24. Astawan M, Wresdiyati T, Hartanta A. Pemanfaatan Rumput Laut Sebagai Sumber Serat Pangan Untuk Menurunkan Kolesterol Darah Tikus. *Hayati*. 2005; 12(1): p. 23-27.
25. Maryanto S, Fatimah S, Sugiri , Marsono Y. Efek Pemberian Buah Jambu Biji Merah Terhadap Produksi SCFA dan Kolesterol Dalam Caecum Tikus Hiperkolesterolemia. *Agritechnology*. 2013; 33(3): p. 334-339.