

**MOLUCCA MEDICA (MM)**  
**JURNAL KEDOKTERAN DAN KESEHATAN**  
**ISSN 1979 – 6358, VOLUME 4, NOMOR 2, MARET 2014**

---

**DAFTAR ISI**

<b>HAL</b>	<b>NAMA</b>	<b>JUDUL</b>
97 – 100	Siti Umi Marhamah Polpoke, Farah Christina Noya, Rodrigo Limmon	THE EFFECT OF UPPER RESPIRATORY TRACT INFECTION ON THE INCIDENCE OF ACUTE OTITIS MEDIA IN CHILDREN OF ENT DEPARTMENT OF DR. M. HAULUSSY GENERAL HOSPITAL AMBON
101 – 109	Felmi Violita Ingrad de Lima, Amanda Gracia Manuputty	HUBUNGAN PAPARAN SINAR MATAHARI DENGAN ANGKA KEJADIAN PTERIGIUM DI DESA WAAI KABUPATEN MALUKU TENGAH TAHUN 2013
110 – 127	Jusuf Huningkor, Sri Wahyuni Djoko	PREVALENSI DAN KARAKTERISTIK PENDERITA HIPERTENSI SEBAGAI FAKTOR RISIKO PENYAKIT JANTUNG KORONER DI DESA ETI TAHUN 2013
128 – 131	Farah Christina Noya	DEVELOPMENT OF OBJECTIVE STRUCTURED CLINICAL EXAMINATION (OSCE) IN A NEW AND RESOURCE-LIMITED UNDERGRADUATE MEDICAL SCHOOL LIKE FACULTY OF MEDICINE PATTIMURA UNIVERSITY AMBON
132 – 136	Syahran Wael, Theopilus W. Watuguly, Winarto	PEMBERIAN MINYAK JINTAN HITAM ( <i>Nigella sativa</i> ) TERHADAP MOTILITAS DAN JUMLAH SPERMATOZOA TIKUS SPRAGUE DAWLEY YANG DIPAPAR MINUMAN TRADISIONAL ARAK AMBON (SOPI)
137 – 141	Titik H.Tanujaya, Indranila KS, Imam B.W	CORRELATION BETWEEN FE, HAEMOGLOBIN, TOTAL IRON BINDING CAPACITY AND GLYCATED HAEMOGLOBIN OR GLYCOSYLATED HAEMOGLOBIN (HbA1c) ELDERLY DIABETIC PATIENT IN DR.KARIADI HOSPITAL SEMARANG
142 – 149	Meis Malirmasele, Rodrigo Limmon, Amanda Gracia Manuputty	KARAKTERISTIK PENDERITA OTITIS MEDIA SUPURATIF KRONIS DI KLINIK TELINGA HIDUNG TENGGOROK RUMAH SAKIT UMUM DAERAH DR. M. HAULUSSY AMBON TAHUN 2012
150 – 157	Wahyuni Syukuriah Tatuhey, Helfi Nikijuluw, Josepina Mainase	KARAKTERISTIK KANKER KOLOREKTAL DI RSUD Dr. M HAULUSSY AMBON PERIODE JANUARI 2012 JUNI 2013
158 – 164	Vebiyanti, Rosdiana Perau, Pariyani Pangeran, Maya Ross Sopamena, Saleha Saiman, Faradilah Nasri, Frans Matatula	EFEKTIVITAS PENYULUHAN TERHADAP PENINGKATAN PENGETAHUAN TB ( <i>TUBERCULOSIS</i> ) DAN MDR-TB ( <i>MULTIDRUG RESISTANCE TUBERCULOSIS</i> ) PENDERITA SUSPEK TB-MDR DI BBKPM (BALAI BESAR KESEHATAN PARU MASYARAKAT) PROVINSI MALUKU TAHUN 2014

# **PEMBERIAN MINYAK JINTAN HITAM (*Nigella sativa*) TERHADAP MOTILITAS DAN JUMLAH SPERMATOZOA TIKUS SPRAGUE DAWLEY YANG DIPAPAR MINUMAN TRADISIONAL ARAK AMBON (SOPI)**

**Syahran Wael<sup>1</sup>, Theopilus W. Watuguly<sup>1</sup>, Winarto<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Program Pendidikan Biologi dan Program Pendidikan Dokter Universitas Pattimura

<sup>2</sup>Program Ilmu Biomedik Universitas Diponegoro

e-mail: sharan\_wael@yahoo.com

Diterima 15 Juli 2012/Disetujui 24 September 2012

## **Abstract**

**Background:** Sopi is traditional drink of Malucas province that often consumed in activities related to the customs event. Tradisional drink of sopi actually from fermented Arenga pinnata which has undergone distillation. *Nigella sativa* oil is antioxidant compound has the effect that serves to prevent cellular damage. **Objective:** The effect of *Nigella sativa* oil in the motility and total count of spermatozoa Sprague dawley rats exposed to traditional drink sopi. **Method:** Experimental research with the design of post test only control group design. Spraguey dawley rats consists of 24 head and divided into 4 groups consist of control group and treatment group. The first treatment was give sopi everydays as much 4 ml dose for 16 days, the second treatment was give sopi everydays as much 4 ml dose for 16 days followed by administratied of *Nigella sativa* oil everydays as much with 1 ml dose for 17 days, the three treatments were give sopi everydays as much 4 ml dose for 16 days followed by administratied distilled water for 17 days. Statistic test for sperm motility on Sprague dawley rats use the Kruskal-Wallis followed by Mann Whitney test, while total count of spermatozoa Sprague dawley rats use a test One Way Anova. **Result:** average value of motility in the treated group sopi (21.67) lower than controls (46.67) and the treatment of sopi+*Nigella sativa* oil (48.33) higher than sopi+aquades (36.67). Result of Kruskal-Wallis ( $p=0.011$ ) there were significant differences ( $p<0.05$ ). While the average total count of spermatozoa in the treated group sopi (145.83) lower than control (187.50) and sopi+*Nigella sativa* oil (191.67) higher than sopi+aquades (145.83). **Conclusion:** Administration of *Nigella sativa* oil occur to repair the motility and total count of spermatozoa Sprague dawley rats expose to tradisional drink sopi.

**Keywords:** minyak *nigella sativa*, motility spermatozoa, count spermatozoa

## **Abstrak**

**Latar Belakang:** Sopi adalah minuman tradisional provinsi Maluku yang sering dikonsumsi pada kegiatan-kegiatan yang kaitannya dengan acara adat. Minuman sopi berasal dari hasil fermentasi *Arenga pinnata* yang telah mengalami destilasi. Minyak *Nigella sativa* adalah senyawa yang mempunyai efek antioksidan yang berfungsi untuk mencegah kerusakan seluler. **Tujuan:** Membuktikan pengaruh pemberian minyak *Nigella sativa* terhadap motilitas dan jumlah spermatozoa tikus *Sprague dawley* yang dipapar minuman tradisional arak Ambon sopi. **Metode:** Penelitian eksperimental dengan rancangan *Post test only control*

*group design.* Tikus *Spraguey dawley* terdiri dari 24 ekor dan dibagi menjadi 4 kelompok yang terdiri dari kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Perlakuan pertama diberi sopi sebanyak 4 ml/hari, perlakuan kedua diberi sopi 4 ml/hari selama 16 hari kemudian dilanjutkan dengan pemberian minyak *Nigella sativa* dosis 1ml/hari selama 17 hari, perlakuan ketiga diberi sopi 4 ml/hari selama 16 hari kemudian dilanjutkan dengan pemberian aquades selama 17 hari. Uji beda untuk motilitas spermatozoa menggunakan *Kruskal-Wallis* yang dilanjutkan dengan *Uji Mann Whitney*, sedangkan jumlah spermatozoa menggunakan uji *One Way Anova*. Hasil: Nilai rata-rata motilitas pada kelompok perlakuan sopi (21.67) lebih rendah dari kontrol (46.67) dan perlakuan sopi+minyak *Nigella sativa* (48.33) lebih tinggi dari sopi+aquades (36.67). Hasil uji *Kruskal-Wallis* ( $p=0.011$ ) terdapat perbedaan yang bermakna ( $p<0.05$ ). Sedangkan nilai rata-rata jumlah spermatozoa pada kelompok perlakuan sopi (145.83) lebih rendah dari kontrol (187.50) dan sopi+minyak *Nigella sativa* (191.67) lebih tinggi dari sopi+aquades (145.83). Simpulan: Pemberian minyak *Nigella sativa* pada tikus *sprague dawley* yang dipapar minuman tradisional sopi terjadi perbaikan motilitas dan jumlah spermatozoa.

**Kata kunci:** *nigella sativa* oil, motility spermatozoa, count spermatozoa

## PENDAHULUAN

Alkohol yang terkandung dalam minuman tradisional sopi adalah etanol ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{-OH}$ ) dari fermentasi nira aren yang telah mengalami destilasi (Putuhena, dkk., 1998). Secara umum tingkat keamanan konsumsi minuman alkohol belum ditentukan, namun pemiminum minuman alkohol dapat digolongkan ke dalam 3 kelompok. Kelompok pertama adalah pemiminum ringan yaitu mereka yang menkonsumsi antara 0,28 sampai dengan 5,9 gram atau setara dengan minum 1 botol bir perhari atau kurang. Kelompok kedua adalah pemiminum menerengah yaitu mereka yang mengkonsumsi antara 6,2 sampai 27,7 gram alkohol atau setara dengan 1 sampai dengan 4 botol bir perhari. Kelompok ketiga adalah pemiminum berat yaitu mereka yang mengkonsumsi lebih dari 28 gram alkohol atau lebih dari 4 botol bir perhari. Kandungan alkohol pada berbagai minuman keras berbeda-beda. Bir mengandung alkohol 3–5%, anggur 10–15%, new port, sherry berkadar alkohol 20% sedangkan whisky, gin, rum dan vodka berkadar alkohol 40–45% (Anonim, 2008; Widianarko dan Pratiwi, 2000).

Alkohol dapat mengganggu metabolisme tubuh terutama dalam hati. Alkohol dalam tubuh akan dimetabolisme menjadi asetaldehid dengan bantuan *Enzim Alkohol Dehidrogenase (ADH)*. Selain itu hasil metabolisme alkohol (asetaldehid) berperan dalam pembentukan spesies oksigen reaktif (ROS). Asetaldehid dalam tubuh akan mengaktifasi enzim sitokrom P450s yang berperan dalam pembentukan spesies oksigen reaktif (ROS). Produksi ROS dan stres oksidatif dalam sel hati dapat mengakibatkan alkoholik. Meningkatnya senyawa ROS oleh radikal bebas pada jaringan yang memproduksi spermatozoa

dapat menyebabkan kerusakan membran spermatozoa, serta mengubah kestabilan dan fungsi membran. Apabila ROS dalam jumlah yang banyak dapat mengakibatkan toksik terhadap kualitas dan fungsi spermatozoa (Defeng, dkk., 2003; Albano, 2006).

Sistem reproduksi pria terdiri hipotalamus, hipofisis anterior dan testis. Alkohol dapat mengganggu fungsi dari masing-masing organ tersebut sehingga dapat menyebabkan infertilitas dan mengurangi karakteristik seksual sekunder. Pada testis alkohol dapat mempengaruhi sel leydig dan sel sertoli yang berperan dalam produksi testosteron dan pematangan sperma (Emanuele dan Nicholas, 1998). Pengaruh alkohol pada sistem reproduksi pria dilaporkan oleh Gomathi, dkk., bahwa pada pecandu alkohol kronis terjadi penurunan yang nyata pada jumlah sperma, motilitas dan morfologi sperma.<sup>7</sup> Infertilitas merupakan suatu keadaan dimana tidak terjadinya kehamilan pada istri setelah lebih dari satu tahun koitus dengan teratur tanpa menggunakan metode kontrasepsi. Penyebab utama infertilitas pada pria di beberapa negera berkembang yaitu karena faktor spermatogenesis (WHO, 2010).

Infertilitas pada pria disebabkan oleh rendahnya motilitas sperma (asthenozoospermia), jumlah sperma (oligoszoospermia), kelainan morfologi sperma (teratozoospermia). *Nigella sativa* termasuk senyawa yang mempunyai efek antioksidan. Fungsi fisiologis dari antioksidan adalah mencegah kerusakan komponen seluler akibat radikal bebas. Sedangkan produksi radikal bebas terjadi secara terus menerus pada semua sel sebagai bagian dari fungsi sel yang normal. Jika terjadi produksi radikal bebas yang berlebihan akan menyebabkan terjadinya stres oksidatif. Stres oksidatif berperan penting

dalam patofisiologi berbagai penyakit (Nehal dan Soliman, 2011; Cocuzza, et al., 2007).

Berdasarkan hasil penelitian *Nigella sativa* bermanfaat sebagai antioksidan, antikanker, antiinflamatori, antikolesterol, antihistamin, antibiotik, imunomodulator dan sebagainya. Kandungan minyak *nigella sativa* seperti alpha pinen (13.75%), limonen (2.55%), p-cymen (43.58%), carvacrol (2.53%), tymoquinone (1.65%), Linoleat acid (25%), oleat acid (12%), palmitat acid (2.84%), stearic acid (0.34%), linoleat acid (0.35%) dan meristid acid (0.35%), karbohidrat, lemak, vitamin, unsur mineral, protein, asam lemak tak jenuh seperti linoleat, oleat dan asam lemak esensial seperti fosfolipid, fosfatidilkolin, phospatidyletholamin, fosfatidil serin, kalsium, zat besi dan potasium (Bashandy, 2007; Toma, et al., 2010; Nehal dan Soliman, 2011).

Penelitian pemberian *Nigella sativa* ternyata mampu memperbaiki kualitas sperma pada beberapa hewan percobaan. Hal ini dibuktikan oleh penelitian yang menyebutkan adanya peningkatan kadar testosteron, motilitas sperma, berat vesikula seminalis, dan kualitas sperma pada tikus yang mengalami hiperlipidemia (Bashandy, 2007). Penelitian ini bertujuan untuk melihat pemberian minyak *Nigella sativa* terhadap motilitas dan jumlah spermatozoa pada tikus jantan *Sprague dawley* yang dipapar minuman tradisional sopi.

## MATERI DAN METODE PENELITIAN

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratorium. Rancangan penelitian menggunakan rancangan *Eksperimental Randomized post test only control group design* yang menggunakan binatang percobaan sebagai obyek penelitian. Proses penelitian berlangsung selama 40 hari dimulai 27 Januari sampai dengan 6 Maret 2012 menggunakan tikus *Sprague dawley* yang berjumlah 24 ekor yang diperoleh dari Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT IV) serta pemeriksaan motilitas dan jumlah spermatozoa pada laboratorium Bagian Reproduksi dan Obstetri Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada.

Hewan percobaan diadaptasi kandang selama 1 minggu dan dibagi menjadi 4 kelompok yang terdiri dari kelompok kontrol yang berjumlah 6 ekor tikus *Sprague dawley* yang diberi aquades dan kelompok perlakuan sebanyak 3 kelompok yang terdiri dari kelompok 1 sebanyak 6 ekor tikus *Sprague dawley* yang diberi minuman tradisional sopi 4 ml/

hari selama 16 hari, kelompok perlakuan 2 sebanyak 6 ekor tikus *Sprague dawley* yang diberi minuman tradisional sopi 4 ml/hari selama 16 hari kemudian dilanjutkan dengan pemberian minyak *Nigella sativa* 1 ml/hari selama 17 hari, kelompok perlakuan 3 sebanyak 6 ekor tikus *Sprague dawley* yang diberi minuman tradisional sopi 4 ml/hari selama 16 hari kemudian dilanjutkan dengan pemberian aquades selama 17 hari.

Minuman tradisional sopi diuji parameter alkohol dengan menggunakan metode gas Chromatography pada Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT-I) Universitas Gadjah Mada diperoleh kadar alkohol adalah 22.65%.

Hasil pemeriksaan dan penghitungan data penelitian dianalisis dengan menggunakan komputer program SPSS 16 for windows. Nilai kemaknaan pada penelitian ini adalah variabel yang dianalisis memiliki nilai  $p < 0.05$ .

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Hasil Penelitian

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada perlakuan tikus *Sprague dawley* yang diberi minuman tradisional sopi motilitas dan jumlah spermatozoa lebih rendah. Hasil analisis dapat dilihat pada tabel di bawah ini.

**Tabel 1. Hasil Analisis Motilitas Spermatozoa**

Perlakuan	Rata-Rata $\pm$ Std. Deviasi
Kontrol	46.67 $\pm$ 17.512
Sopi	21.67 $\pm$ 9.832
Sopi+ <i>Nigella sativa</i>	48.33 $\pm$ 13.292
Sopi+aquades	36.67 $\pm$ 8.165

Nilai rata-rata motilitas spermatozoa pada kelompok perlakuan pemberian minuman tradisional sopi lebih rendah (21.67 $\pm$ 9.832) dibandingkan dengan kelompok kontrol (46.67 $\pm$ 17.512). Hal ini mengindikasikan bahwa pemberian minuman tradisional sopi menyebabkan terjadinya penurunan motilitas spermatozoa pada tikus *Sprague dawley*. Sedangkan nilai rata-rata motilitas spermatozoa pada kelompok pemberian sopi+minyak *Nigella sativa* (48.33 $\pm$ 13.292) lebih tinggi dibandingkan dengan pemberian sopi+aquades (36.67 $\pm$ 8.167). Pada kelompok tersebut menandakan bahwa ternyata dengan pemberian minyak *Nigella sativa* terjadi perbaikan pada motilitas spermatozoa tikus *Sprague dawley*.

Untuk mengetahui perbedaan motilitas spermatozoa pada tikus *Sprague dawley* dari setiap kelompok dilanjutkan dengan uji Mann-Whitney.

**Tabel 2. Mann-Whitney Test Motilitas Spermatozoa**

Kelompok	Perlakuan	Nilai p
Kontrol	Sopi*	0.015
	Sopi+ <i>Nigella sativa</i>	0.937
	Sopi+aquades	0.240
	Sopi+Nigella sativa*	0.004
Sopi	Sopi+aquades*	0.026
	Sopi+aquades	0.132

$p<0.05$

Berdasarkan tabel di atas dapat dilihat bahwa pada kontrol dengan sopi ( $p=0.015$ ) terdapat perbedaan yang bermakna ( $p<0.05$ ), kontrol dengan sopi+*Nigella sativa* ( $p=0.937$ ) dan kelompok kontrol dengan sopi+aquades (0.240) tidak terdapat perbedaan yang bermakna. Pada kelompok sopi dengan sopi+Nigella sativa ( $p=0.004$ ) dan kelompok sopi dengan sopi+aquades ( $p=0.026$ ) terdapat perbedaan yang bermakna. Sedangkan pada kelompok sopi+Nigella sativa dengan sopi+aquades ( $p=0.132$ ) tidak terdapat perbedaan yang bermakna.

**Tabel 3. Hasil Analisis Jumlah Spermatozoa**

Perlakuan	Rata-Rata ± Std. Deviasi
Kontrol	187.50±94.538
Sopi	145.83±142.668
Sopi+Nigella sativa	191.67±43.780
Sopi+aquades	145.83±45.871

Nilai rata-rata jumlah spermatozoa pada kelompok perlakuan pemberian minuman tradisional sopi ( $145.83\pm142.668$ ) dan sopi+aquades ( $145.83\pm45.871$ ) sama rendah. Sedangkan rata-rata jumlah spermatozoa yang lebih tinggi terdapat pada kelompok pemberian sopi+minyak *Nigella sativa* ( $191.67\pm43.780$ ) dan diikuti oleh kelompok kontrol ( $187.50\pm94.538$ ). Pada kelompok perlakuan tersebut mengindikasikan bahwa dengan pemberian minuman tradisional sopi terjadi penurunan jumlah spermatozoa pada tikus *Sprague dawley*, tetapi setelah diberikan minyak *Nigella sativa* maka terjadi perbaikan jumlah spermatozoa tikus *Sprague dawley*. Hasil uji Anova ( $p=0.281$ ) menunjukkan jumlah spermatozoa tikus *Sprague dawley* tidak terdapat perbedaan bermakna ( $p>0.05$ ) sehingga tidak dapat dilanjutkan dengan uji Tukey.

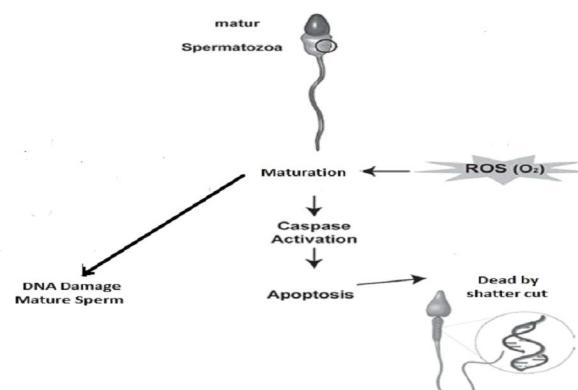
## Pembahasan

Kemungkinan rendahnya motilitas dan jumlah spermatoza pada tikus *Sprague dawley* yang

diberi minuman tradisional sopi diakibatkan karena senyawa asetaldehid dari minuman tradisional sopi merangsang enzim sitokrom P450s yang menyebabkan produksi ROS yang berlebihan (Albano, 2006; Emanuele dan Nicholas, 1998). Produksi ROS yang berlebihan menyebabkan stres oksidatif yang berpengaruh terhadap enzim antioksidan yang terdiri dari komponen enzimatik dari sistem pertahanan tubuh, seperti superoksida dismutase (SOD), katalase, glutation peroksidase (GPx) dan glutation-S-transferase (GST). Senyawa ROS yang paling berperan dalam stres oksidatif adalah superoksida ( $O_2^-$ ), hidrogen peroksid ( $H_2O_2$ ), peroksil ( $ROO^-$ ), hidroksil ( $OH^-$ ) dan derivat nitrogen oksida seperti ( $NO^-$ ), peroksinitrat ( $ONOO^-$ ). Peningkatan ROS pada jaringan yang memproduksi spermatozoa dapat menyebabkan abnormal spermatozoa (Aetken, dan Roman, 2008; Cocuzza, *et al.*, 2007).

Selain itu radikal bebas juga menstimulasi terjadinya apoptosis dengan cara melibatkan serangkaian peristiwa yang terjadi baik di sitoplasma maupun di dalam inti sel. Pada sitoplasma mengaktifkan caspase dan pada inti sel terjadi kondensasi kromatin, selubung inti pecah dan terjadi fragmentasi DNA untuk selanjutnya terjadi apoptosis. Stres oksidatif dan apoptosis terlibat dalam mediasi kerusakan DNA sperma (Cocuzza, *et al.*, 2007).

DNA sperma yang utuh merupakan syarat penting untuk terjadinya fertilisasi. Kerusakan DNA sperma berkaitan erat dengan fungsi sperma serta infertilitas pada pria. Spermatozoa pada pria infertil telah terbukti memiliki sperma abnormal (Moustafa, *et al.*, 2004).



**Gambar 1. Peran ROS pada Kerusakan DNA Sperma**

Tubuh mempunyai mekanisme sendiri yang dapat menetralkir bahaya radikal bebas dengan sistem antioksidan, namun apabila radikal bebas melebihi jumlah antioksidan dalam tubuh maka akan

menimbulkan kerusakan sel. Pemberian minyak *nigella sativa* pada tikus *Sprague dawley* yang telah dipapar minuman tradisional sopi (kelompok perlakuan sopi+minyak *Nigella sativa*) hasilnya lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok yang lain, diakibatkan karena minyak *Nigella sativa* mempunyai efek antioksidan dan immunodulator di mana fungsi fisiologis adalah mencegah kerusakan seluler akibat radikal bebas dan dapat memperbaiki kerusakan seluler.

Antioksidan berperan dengan cara mengkatalis radikal bebas oleh enzim SOD katalase dan peroksidase, mengikat pro-oksidan dan membersihkan ROS dalam metabolisme tubuh. Minyak *Nigella sativa* diduga mempunyai senyawa thymoquinon yang berperan sebagai immunodulator dan antioksidan dengan cara mengaktifasi enzim-enzim antioksidan seperti superokida dismutase (SOD), katalase, glutation peroksidase (GPx) dan glutation-S-transferase (GST).

## KESIMPULAN

Pemberian minuman tradisional sopi pada tikus *Sprague dawley* terbukti dapat menurunkan motilitas dan jumlah spermatozoa sedangkan pemberian minyak *Nigella sativa* dapat memperbaiki motilitas dan jumlah spermatozoa pada tikus *Sprague dawley* yang dipapar minuman tradisional sopi.

## DAFTAR PUSTAKA

- Aetken, J., dan Roman, S. 2008. *Antioxidant Systems and Oxidative Stress in the Testes*. 1 (1) 15–24. Oxidative Medicine and Cellular Longevity.
- Albano, E. 2006. Alcohol, Oxidative Stress, and Free Radical Damage. *Nutrition Society*. 6 (5) 278–290.
- Anonim. 2008. *Perda Maluku No 16. Pengawasan Pengendalian dan Peredaran Minuman Beralkohol*. Ambon: Pemda Maluku.
- Bashandy, S. 2007. Effect of Fixed Oil of *Nigella sativa* on Male Fertility in Normal and Hyperlipidemic Rats. *Pharmacology*. 3 (1) 27–33.
- Cocuzza, M., Sikka, S.C., Athayde, Agarwa, A. 2007. Clinical Relevance of Oxidative Stress and Sperm Chromatin Damage in Male Infertility. an Evidence based Analysis. *Jenero*. 33(5)1–15.
- Defeng, W., Arthur, dan Cederbaum. 2003. Alcohol, Oxidative Stress, and Free Radical Damage. *Alcohol Research & Health*. 27 (4) 277–284.
- Emanuele, M., dan Nicholas. 1998. Alcohol's Effects on Male Reproduction. *Alcohol Health & Research World*. 22 (3) 195–201.
- Gomathi, C., Balasubramanian, K., Bhanu, N., Srikanth, V. Effect of Chronic Alcoholism on Semen - Studies on Lipid Profile. *Andrology*. 1993:16 (3) 175–181.
- Moustafa, M., Sharma, R., Thorthon, J., Masche, M. 2004. Relationship between ROS Production, Apoptosis and DNA Denaturation in Spermatozoa from Patients Examined for Infertility. 19 (1) 129–138. *Human Reproduction*.
- Nehal, B., dan Soliman, G. 2011. Effect of *Nigella sativa* Supplementation in Diet on Metabolic Syndrome in Aged Rats. *American Science*. 7 (7) 577–583.
- Putuhena, M., Tamaela, L., Bacmid, Sahusilawane, A., Louhanapessy, J. 1986. *Makanan dan Minuman Tradisional, Wujud, Variasi dan Fungsinya serta Cara Penyajiannya di Daerah Maluku*. 98–107. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan, Jakarta.
- Toma, C., Simu, G., Hangani, D., Hammami, C. 2010. Chemical Composition of The Tunisian *Nigella sativa* Note Profile on Essential Oil. *Farmacia*. 58 (4) 458–464.
- WHO. 2010. Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. Fifth Edition. *World Health Organization*. 21–36.
- Widianarko, B., dan Pratiwi, R. 2000. Alkohol Memang Tak Berguna. Teknologi, Produk, Nutrisi dan Keamanan Pangan. *Seri Iptek Pangan*. 1-3. Volume 1. Semarang. Unika Soegijapranata.

# **PEMBERIAN MINYAK JINTAN HITAM (*Nigella sativa*) TERHADAP MOTILITAS DAN JUMLAH SPERMATOZOA TIKUS SPRAGUE DAWLEY YANG DIPAPAR MINUMAN TRADISIONAL ARAK AMBON (SOP)**

**Syahran Wael<sup>1</sup>, Theopilus W. Watuguly<sup>1</sup>, Winarto<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Program Pendidikan Biologi dan Program Pendidikan Dokter Universitas Pattimura

<sup>2</sup>Program Ilmu Biomedik Universitas Diponegoro

e-mail: sharan\_wael@yahoo.com

Diterima 15 Juli 2012/Disetujui 24 September 2012

## **Abstract**

**Background:** Sopi is traditional drink of Malucas province that often consumed in activities related to the customs event. Tradisional drink of sopi actually from fermented Arenga pinnata which has undergone distillation. *Nigella sativa* oil is antioxidant compound has the effect that serves to prevent cellular damage. **Objective:** The effect of *Nigella sativa* oil in the motility and total count of spermatozoa Sprague dawley rats exposed to traditional drink sopi. **Method:** Experimental research with the design of post test only control group design. Spraguey dawley rats consists of 24 head and divided into 4 groups consist of control group and treatment group. The first treatment was give sopi everydays as much 4 ml dose for 16 days, the second treatment was give sopi everydays as much 4 ml dose for 16 days followed by administratied of *Nigella sativa* oil everydays as much with 1 ml dose for 17 days, the three treatments were give sopi everydays as much 4 ml dose for 16 days followed by administratied distilled water for 17 days. Statistic test for sperm motility on Sprague dawley rats use the Kruskal-Wallis followed by Mann Whitney test, while total count of spermatozoa Sprague dawley rats use a test One Way Anova. **Result:** average value of motility in the treated group sopi (21.67) lower than controls (46.67) and the treatment of sopi+*Nigella sativa* oil (48.33) higher than sopi+aquades (36.67). Result of Kruskal-Wallis ( $p=0.011$ ) there were significant differences ( $p<0.05$ ). While the average total count of spermatozoa in the treated group sopi (145.83) lower than control (187.50) and sopi+*Nigella sativa* oil (191.67) higher than sopi+aquades (145.83). **Conclusion:** Administration of *Nigella sativa* oil occur to repair the motility and total count of spermatozoa Sprague dawley rats expose to tradisional drink sopi.

**Keywords:** minyak *nigella sativa*, motility spermatozoa, count spermatozoa

## **Abstrak**

**Latar Belakang:** Sopi adalah minuman tradisional provinsi Maluku yang sering dikonsumsi pada kegiatan-kegiatan yang kaitannya dengan acara adat. Minuman sopi berasal dari hasil fermentasi *Arenga pinnata* yang telah mengalami destilasi. Minyak *Nigella sativa* adalah senyawa yang mempunyai efek antioksidan yang berfungsi untuk mencegah kerusakan seluler. **Tujuan:** Membuktikan pengaruh pemberian minyak *Nigella sativa* terhadap motilitas dan jumlah spermatozoa tikus *Sprague dawley* yang dipapar minuman tradisional arak Ambon sopi. **Metode:** Penelitian eksperimental dengan rancangan *Post test only control*

*group design.* Tikus *Spraguey dawley* terdiri dari 24 ekor dan dibagi menjadi 4 kelompok yang terdiri dari kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Perlakuan pertama diberi sopi sebanyak 4 ml/hari, perlakuan kedua diberi sopi 4 ml/hari selama 16 hari kemudian dilanjutkan dengan pemberian minyak *Nigella sativa* dosis 1ml/hari selama 17 hari, perlakuan ketiga diberi sopi 4 ml/hari selama 16 hari kemudian dilanjutkan dengan pemberian aquades selama 17 hari. Uji beda untuk motilitas spermatozoa menggunakan *Kruskal-Wallis* yang dilanjutkan dengan *Uji Mann Whitney*, sedangkan jumlah spermatozoa menggunakan uji *One Way Anova*. Hasil: Nilai rata-rata motilitas pada kelompok perlakuan sopi (21.67) lebih rendah dari kontrol (46.67) dan perlakuan sopi+minyak *Nigella sativa* (48.33) lebih tinggi dari sopi+aquades (36.67). Hasil uji *Kruskal-Wallis* ( $p=0.011$ ) terdapat perbedaan yang bermakna ( $p<0.05$ ). Sedangkan nilai rata-rata jumlah spermatozoa pada kelompok perlakuan sopi (145.83) lebih rendah dari kontrol (187.50) dan sopi+minyak *Nigella sativa* (191.67) lebih tinggi dari sopi+aquades (145.83). Simpulan: Pemberian minyak *Nigella sativa* pada tikus *sprague dawley* yang dipapar minuman tradisional sopi terjadi perbaikan motilitas dan jumlah spermatozoa.

**Kata kunci:** *nigella sativa* oil, motility spermatozoa, count spermatozoa

## PENDAHULUAN

Alkohol yang terkandung dalam minuman tradisional sopi adalah etanol ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{-OH}$ ) dari fermentasi nira aren yang telah mengalami destilasi (Putuhena, dkk., 1998). Secara umum tingkat keamanan konsumsi minuman alkohol belum ditentukan, namun pemiminum minuman alkohol dapat digolongkan ke dalam 3 kelompok. Kelompok pertama adalah pemiminum ringan yaitu mereka yang menkonsumsi antara 0,28 sampai dengan 5,9 gram atau setara dengan minum 1 botol bir perhari atau kurang. Kelompok kedua adalah pemiminum menerengah yaitu mereka yang mengkonsumsi antara 6,2 sampai 27,7 gram alkohol atau setara dengan 1 sampai dengan 4 botol bir perhari. Kelompok ketiga adalah pemiminum berat yaitu mereka yang mengkonsumsi lebih dari 28 gram alkohol atau lebih dari 4 botol bir perhari. Kandungan alkohol pada berbagai minuman keras berbeda-beda. Bir mengandung alkohol 3–5%, anggur 10–15%, new port, sherry berkadar alkohol 20% sedangkan whisky, gin, rum dan vodka berkadar alkohol 40–45% (Anonim, 2008; Widianarko dan Pratiwi, 2000).

Alkohol dapat mengganggu metabolisme tubuh terutama dalam hati. Alkohol dalam tubuh akan dimetabolisme menjadi asetaldehid dengan bantuan *Enzim Alkohol Dehidrogenase (ADH)*. Selain itu hasil metabolisme alkohol (asetaldehid) berperan dalam pembentukan spesies oksigen reaktif (ROS). Asetaldehid dalam tubuh akan mengaktifasi enzim sitokrom P450s yang berperan dalam pembentukan spesies oksigen reaktif (ROS). Produksi ROS dan stres oksidatif dalam sel hati dapat mengakibatkan alkoholik. Meningkatnya senyawa ROS oleh radikal bebas pada jaringan yang memproduksi spermatozoa

dapat menyebabkan kerusakan membran spermatozoa, serta mengubah kestabilan dan fungsi membran. Apabila ROS dalam jumlah yang banyak dapat mengakibatkan toksik terhadap kualitas dan fungsi spermatozoa (Defeng, dkk., 2003; Albano, 2006).

Sistem reproduksi pria terdiri hipotalamus, hipofisis anterior dan testis. Alkohol dapat mengganggu fungsi dari masing-masing organ tersebut sehingga dapat menyebabkan infertilitas dan mengurangi karakteristik seksual sekunder. Pada testis alkohol dapat mempengaruhi sel leydig dan sel sertoli yang berperan dalam produksi testosteron dan pematangan sperma (Emanuele dan Nicholas, 1998). Pengaruh alkohol pada sistem reproduksi pria dilaporkan oleh Gomathi, dkk., bahwa pada pecandu alkohol kronis terjadi penurunan yang nyata pada jumlah sperma, motilitas dan morfologi sperma.<sup>7</sup> Infertilitas merupakan suatu keadaan dimana tidak terjadinya kehamilan pada istri setelah lebih dari satu tahun koitus dengan teratur tanpa menggunakan metode kontrasepsi. Penyebab utama infertilitas pada pria di beberapa negera berkembang yaitu karena faktor spermatogenesis (WHO, 2010).

Infertilitas pada pria disebabkan oleh rendahnya motilitas sperma (asthenozoospermia), jumlah sperma (oligoszoospermia), kelainan morfologi sperma (teratozoospermia). *Nigella sativa* termasuk senyawa yang mempunyai efek antioksidan. Fungsi fisiologis dari antioksidan adalah mencegah kerusakan komponen seluler akibat radikal bebas. Sedangkan produksi radikal bebas terjadi secara terus menerus pada semua sel sebagai bagian dari fungsi sel yang normal. Jika terjadi produksi radikal bebas yang berlebihan akan menyebabkan terjadinya stres oksidatif. Stres oksidatif berperan penting

dalam patofisiologi berbagai penyakit (Nehal dan Soliman, 2011; Cocuzza, et al., 2007).

Berdasarkan hasil penelitian *Nigella sativa* bermanfaat sebagai antioksidan, antikanker, antiinflamatori, antikolesterol, antihistamin, antibiotik, imunomodulator dan sebagainya. Kandungan minyak *nigella sativa* seperti alpha pinen (13.75%), limonen (2.55%), p-cymen (43.58%), carvacrol (2.53%), tymoquinone (1.65%), Linoleat acid (25%), oleat acid (12%), palmitat acid (2.84%), stearic acid (0.34%), linoleat acid (0.35%) dan meristid acid (0.35%), karbohidrat, lemak, vitamin, unsur mineral, protein, asam lemak tak jenuh seperti linoleat, oleat dan asam lemak esensial seperti fosfolipid, fosfatidilkolin, phospatidyletholamin, fosfatidil serin, kalsium, zat besi dan potasium (Bashandy, 2007; Toma, et al., 2010; Nehal dan Soliman, 2011).

Penelitian pemberian *Nigella sativa* ternyata mampu memperbaiki kualitas sperma pada beberapa hewan percobaan. Hal ini dibuktikan oleh penelitian yang menyebutkan adanya peningkatan kadar testosteron, motilitas sperma, berat vesikula seminalis, dan kualitas sperma pada tikus yang mengalami hiperlipidemia (Bashandy, 2007). Penelitian ini bertujuan untuk melihat pemberian minyak *Nigella sativa* terhadap motilitas dan jumlah spermatozoa pada tikus jantan *Sprague dawley* yang dipapar minuman tradisional sopi.

## MATERI DAN METODE PENELITIAN

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratorium. Rancangan penelitian menggunakan rancangan *Eksperimental Randomized post test only control group design* yang menggunakan binatang percobaan sebagai obyek penelitian. Proses penelitian berlangsung selama 40 hari dimulai 27 Januari sampai dengan 6 Maret 2012 menggunakan tikus *Sprague dawley* yang berjumlah 24 ekor yang diperoleh dari Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT IV) serta pemeriksaan motilitas dan jumlah spermatozoa pada laboratorium Bagian Reproduksi dan Obstetri Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada.

Hewan percobaan diadaptasi kandang selama 1 minggu dan dibagi menjadi 4 kelompok yang terdiri dari kelompok kontrol yang berjumlah 6 ekor tikus *Sprague dawley* yang diberi aquades dan kelompok perlakuan sebanyak 3 kelompok yang terdiri dari kelompok 1 sebanyak 6 ekor tikus *Sprague dawley* yang diberi minuman tradisional sopi 4 ml/

hari selama 16 hari, kelompok perlakuan 2 sebanyak 6 ekor tikus *Sprague dawley* yang diberi minuman tradisional sopi 4 ml/hari selama 16 hari kemudian dilanjutkan dengan pemberian minyak *Nigella sativa* 1 ml/hari selama 17 hari, kelompok perlakuan 3 sebanyak 6 ekor tikus *Sprague dawley* yang diberi minuman tradisional sopi 4 ml/hari selama 16 hari kemudian dilanjutkan dengan pemberian aquades selama 17 hari.

Minuman tradisional sopi diuji parameter alkohol dengan menggunakan metode gas Chromatography pada Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT-I) Universitas Gadjah Mada diperoleh kadar alkohol adalah 22.65%.

Hasil pemeriksaan dan penghitungan data penelitian dianalisis dengan menggunakan komputer program SPSS 16 for windows. Nilai kemaknaan pada penelitian ini adalah variabel yang dianalisis memiliki nilai  $p < 0.05$ .

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Hasil Penelitian

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada perlakuan tikus *Sprague dawley* yang diberi minuman tradisional sopi motilitas dan jumlah spermatozoa lebih rendah. Hasil analisis dapat dilihat pada tabel di bawah ini.

**Tabel 1. Hasil Analisis Motilitas Spermatozoa**

Perlakuan	Rata-Rata $\pm$ Std. Deviasi
Kontrol	46.67 $\pm$ 17.512
Sopi	21.67 $\pm$ 9.832
Sopi+ <i>Nigella sativa</i>	48.33 $\pm$ 13.292
Sopi+aquades	36.67 $\pm$ 8.165

Nilai rata-rata motilitas spermatozoa pada kelompok perlakuan pemberian minuman tradisional sopi lebih rendah (21.67 $\pm$ 9.832) dibandingkan dengan kelompok kontrol (46.67 $\pm$ 17.512). Hal ini mengindikasikan bahwa pemberian minuman tradisional sopi menyebabkan terjadinya penurunan motilitas spermatozoa pada tikus *Sprague dawley*. Sedangkan nilai rata-rata motilitas spermatozoa pada kelompok pemberian sopi+minyak *Nigella sativa* (48.33 $\pm$ 13.292) lebih tinggi dibandingkan dengan pemberian sopi+aquades (36.67 $\pm$ 8.167). Pada kelompok tersebut menandakan bahwa ternyata dengan pemberian minyak *Nigella sativa* terjadi perbaikan pada motilitas spermatozoa tikus *Sprague dawley*.

Untuk mengetahui perbedaan motilitas spermatozoa pada tikus *Sprague dawley* dari setiap kelompok dilanjutkan dengan uji Mann-Whitney.

**Tabel 2. Mann-Whitney Test Motilitas Spermatozoa**

Kelompok	Perlakuan	Nilai p
Kontrol	Sopi*	0.015
	Sopi+ <i>Nigella sativa</i>	0.937
	Sopi+aquades	0.240
	Sopi+Nigella sativa*	0.004
Sopi	Sopi+aquades*	0.026
	Sopi+aquades	0.132

$p<0.05$

Berdasarkan tabel di atas dapat dilihat bahwa pada kontrol dengan sopi ( $p=0.015$ ) terdapat perbedaan yang bermakna ( $p<0.05$ ), kontrol dengan sopi+*Nigella sativa* ( $p=0.937$ ) dan kelompok kontrol dengan sopi+aquades (0.240) tidak terdapat perbedaan yang bermakna. Pada kelompok sopi dengan sopi+Nigella sativa ( $p=0.004$ ) dan kelompok sopi dengan sopi+aquades ( $p=0.026$ ) terdapat perbedaan yang bermakna. Sedangkan pada kelompok sopi+Nigella sativa dengan sopi+aquades ( $p=0.132$ ) tidak terdapat perbedaan yang bermakna.

**Tabel 3. Hasil Analisis Jumlah Spermatozoa**

Perlakuan	Rata-Rata ± Std. Deviasi
Kontrol	187.50±94.538
Sopi	145.83±142.668
Sopi+Nigella sativa	191.67±43.780
Sopi+aquades	145.83±45.871

Nilai rata-rata jumlah spermatozoa pada kelompok perlakuan pemberian minuman tradisional sopi ( $145.83\pm142.668$ ) dan sopi+aquades ( $145.83\pm45.871$ ) sama rendah. Sedangkan rata-rata jumlah spermatozoa yang lebih tinggi terdapat pada kelompok pemberian sopi+minyak *Nigella sativa* ( $191.67\pm43.780$ ) dan diikuti oleh kelompok kontrol ( $187.50\pm94.538$ ). Pada kelompok perlakuan tersebut mengindikasikan bahwa dengan pemberian minuman tradisional sopi terjadi penurunan jumlah spermatozoa pada tikus *Sprague dawley*, tetapi setelah diberikan minyak *Nigella sativa* maka terjadi perbaikan jumlah spermatozoa tikus *Sprague dawley*. Hasil uji Anova ( $p=0.281$ ) menunjukkan jumlah spermatozoa tikus *Sprague dawley* tidak terdapat perbedaan bermakna ( $p>0.05$ ) sehingga tidak dapat dilanjutkan dengan uji Tukey.

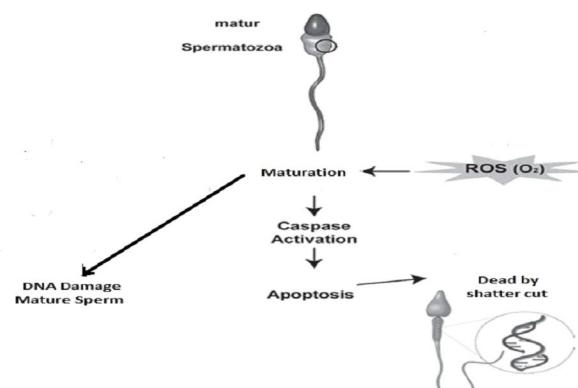
## Pembahasan

Kemungkinan rendahnya motilitas dan jumlah spermatoza pada tikus *Sprague dawley* yang

diberi minuman tradisional sopi diakibatkan karena senyawa asetaldehid dari minuman tradisional sopi merangsang enzim sitokrom P450s yang menyebabkan produksi ROS yang berlebihan (Albano, 2006; Emanuele dan Nicholas, 1998). Produksi ROS yang berlebihan menyebabkan stres oksidatif yang berpengaruh terhadap enzim antioksidan yang terdiri dari komponen enzimatik dari sistem pertahanan tubuh, seperti superoksida dismutase (SOD), katalase, glutation peroksidase (GPx) dan glutation-S-transferase (GST). Senyawa ROS yang paling berperan dalam stres oksidatif adalah superoksida ( $O_2^-$ ), hidrogen peroksid ( $H_2O_2$ ), peroksil ( $ROO^-$ ), hidroksil ( $OH^-$ ) dan derivat nitrogen oksida seperti ( $NO^-$ ), peroksinitrat ( $ONOO^-$ ). Peningkatan ROS pada jaringan yang memproduksi spermatozoa dapat menyebabkan abnormal spermatozoa (Aetken, dan Roman, 2008; Cocuzza, *et al.*, 2007).

Selain itu radikal bebas juga menstimulasi terjadinya apoptosis dengan cara melibatkan serangkaian peristiwa yang terjadi baik di sitoplasma maupun di dalam inti sel. Pada sitoplasma mengaktifkan caspase dan pada inti sel terjadi kondensasi kromatin, selubung inti pecah dan terjadi fragmentasi DNA untuk selanjutnya terjadi apoptosis. Stres oksidatif dan apoptosis terlibat dalam mediasi kerusakan DNA sperma (Cocuzza, *et al.*, 2007).

DNA sperma yang utuh merupakan syarat penting untuk terjadinya fertilisasi. Kerusakan DNA sperma berkaitan erat dengan fungsi sperma serta infertilitas pada pria. Spermatozoa pada pria infertil telah terbukti memiliki sperma abnormal (Moustafa, *et al.*, 2004).



**Gambar 1. Peran ROS pada Kerusakan DNA Sperma**

Tubuh mempunyai mekanisme sendiri yang dapat menetralkir bahaya radikal bebas dengan sistem antioksidan, namun apabila radikal bebas melebihi jumlah antioksidan dalam tubuh maka akan

menimbulkan kerusakan sel. Pemberian minyak *nigella sativa* pada tikus *Sprague dawley* yang telah dipapar minuman tradisional sopi (kelompok perlakuan sopi+minyak *Nigella sativa*) hasilnya lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok yang lain, diakibatkan karena minyak *Nigella sativa* mempunyai efek antioksidan dan immunodulator di mana fungsi fisiologis adalah mencegah kerusakan seluler akibat radikal bebas dan dapat memperbaiki kerusakan seluler.

Antioksidan berperan dengan cara mengkatalis radikal bebas oleh enzim SOD katalase dan peroksidase, mengikat pro-oksidan dan membersihkan ROS dalam metabolisme tubuh. Minyak *Nigella sativa* diduga mempunyai senyawa thymoquinon yang berperan sebagai immunodulator dan antioksidan dengan cara mengaktifasi enzim-enzim antioksidan seperti superokida dismutase (SOD), katalase, glutation peroksidase (GPx) dan glutation-S-transferase (GST).

## KESIMPULAN

Pemberian minuman tradisional sopi pada tikus *Sprague dawley* terbukti dapat menurunkan motilitas dan jumlah spermatozoa sedangkan pemberian minyak *Nigella sativa* dapat memperbaiki motilitas dan jumlah spermatozoa pada tikus *Sprague dawley* yang dipapar minuman tradisional sopi.

## DAFTAR PUSTAKA

- Aetken, J., dan Roman, S. 2008. *Antioxidant Systems and Oxidative Stress in the Testes*. 1 (1) 15–24. Oxidative Medicine and Cellular Longevity.
- Albano, E. 2006. Alcohol, Oxidative Stress, and Free Radical Damage. *Nutrition Society*. 6 (5) 278–290.
- Anonim. 2008. *Perda Maluku No 16. Pengawasan Pengendalian dan Peredaran Minuman Beralkohol*. Ambon: Pemda Maluku.
- Bashandy, S. 2007. Effect of Fixed Oil of *Nigella sativa* on Male Fertility in Normal and Hyperlipidemic Rats. *Pharmacology*. 3 (1) 27–33.
- Cocuzza, M., Sikka, S.C., Athayde, Agarwa, A. 2007. Clinical Relevance of Oxidative Stress and Sperm Chromatin Damage in Male Infertility. an Evidence based Analysis. *Jenero*. 33(5)1–15.
- Defeng, W., Arthur, dan Cederbaum. 2003. Alcohol, Oxidative Stress, and Free Radical Damage. *Alcohol Research & Health*. 27 (4) 277–284.
- Emanuele, M., dan Nicholas. 1998. Alcohol's Effects on Male Reproduction. *Alcohol Health & Research World*. 22 (3) 195–201.
- Gomathi, C., Balasubramanian, K., Bhanu, N., Srikanth, V. Effect of Chronic Alcoholism on Semen - Studies on Lipid Profile. *Andrology*. 1993:16 (3) 175–181.
- Moustafa, M., Sharma, R., Thorthon, J., Masche, M. 2004. Relationship between ROS Production, Apoptosis and DNA Denaturation in Spermatozoa from Patients Examined for Infertility. 19 (1) 129–138. *Human Reproduction*.
- Nehal, B., dan Soliman, G. 2011. Effect of *Nigella sativa* Supplementation in Diet on Metabolic Syndrome in Aged Rats. *American Science*. 7 (7) 577–583.
- Putuhena, M., Tamaela, L., Bacmid, Sahusilawane, A., Louhanapessy, J. 1986. *Makanan dan Minuman Tradisional, Wujud, Variasi dan Fungsinya serta Cara Penyajiannya di Daerah Maluku*. 98–107. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan, Jakarta.
- Toma, C., Simu, G., Hangani, D., Hammami, C. 2010. Chemical Composition of The Tunisian *Nigella sativa* Note Profile on Essential Oil. *Farmacia*. 58 (4) 458–464.
- WHO. 2010. Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. Fifth Edition. *World Health Organization*. 21–36.
- Widianarko, B., dan Pratiwi, R. 2000. Alkohol Memang Tak Berguna. Teknologi, Produk, Nutrisi dan Keamanan Pangan. *Seri Iptek Pangan*. 1-3. Volume 1. Semarang. Unika Soegijapranata.