

EFEK EKSTRAK *BLACK GARLIC* TERHADAP KUALITAS SPERMATOZOA TIKUS SETELAH DIPAPAR ASAP ROKOK

Amida N¹, Lisdiana¹, W Christijanti¹, R S Iswari¹

¹Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Negeri Semarang
Jl. Raya Sekaran, Gunungpati, Semarang 50229.

*Email: nurulamida2499@gmail.com

Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek ekstrak *Black garlic* terhadap kualitas spermatozoa tikus setelah dipapar asap rokok. Asap rokok mengandung nikotin dan senyawa berbahaya lain yang menjadi sumber eksogen radikal bebas dalam tubuh. Radikal bebas atau sering disebut *Reactive Oxygen Species (ROS)* dengan kadar tinggi menyebabkan stress oksidatif yang bisa menyebabkan kerusakan pada sperma. ROS yang tinggi akibat paparan asap rokok juga berpengaruh terhadap regulasi endokrin yang berakibat pada terganggunya proses spermatogenesis. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan rancangan acak lengkap yang dilaksanakan selama 30 hari. Subyek penelitian ini adalah 25 ekor tikus jantan galur wistar yang dibagi dalam lima kelompok. Kelompok pertama adalah kontrol negatif, kedua adalah kontrol positif (K+) yang hanya dipapar asap rokok, sedangkan tiga kelompok lainnya adalah KP1, KP2, dan KP3 yang merupakan kelompok perlakuan yang dipapar asap rokok dan diberi ekstrak *Black garlic* secara berurutan dengan dosis 250 mg, 500 mg, dan 1000 mg. Analisis data menggunakan uji *One Way Anova* yang dilanjutkan dengan uji *LSD*. Data yang diamati dalam penelitian ini adalah kualitas spermatozoa yang mencakup konsentrasi, viabilitas, dan motilitas spermatozoa. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian ekstrak *Black garlic* dapat mencegah dan menurunkan kerusakan spermatozoa tikus setelah dipapar asap rokok.

Kata kunci: asap rokok, *black garlic*, kualitas sperma, radikal bebas

1. PENDAHULUAN

Rokok merupakan tembakau kering yang apabila dibakar akan mengeluarkan asap atau emisi. Asap tersebut mengandung senyawa kimia berupa karbonil dan partikulat total yang dapat bersifat karsinogenik (Sara and Hanriko, 2017). Rokok konvensional berupa rokok kretek dibuat dalam bentuk lintingan seperti tabung silinder yang dalamnya berisi campuran tembakau dengan bahan tambahan lain. Merokok sudah menjadi perilaku yang menjadi kebiasaan masyarakat. Populasi remaja Indonesia yang merupakan perokok aktif mencapai 32,20% (Badan Pusat Statistik, 2018). Definisi merokok menurut Menkes RI (2013), yaitu merupakan kegiatan menghisap, membakar, menghirup produk tembakau atau bentuk lainnya yang dihasilkan dari tanaman *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana rustica*, dan spesies lainnya atau sintetisnya yang menghasilkan asap mengandung nikotin dan tar, dengan atau tanpa bahan tambahan.

Asap rokok dengan bahan baku tembakau mengandung lebih dari 4000 macam konstituen termasuk nikotin, tar, karbon monoksida, senyawa polisiklik aromatik hidrokarbon, zat radioaktif dan logam berat Dai *et al.*, (2015). Nikotin dalam asap rokok memberikan dampak buruk pada beberapa parameter kualitas spermatozoa, mencakup viabilitas, motilitas dan konsentrasi spermatozoa (Condorelli *et al.*, 2013). Komponen partikel dan gas dari asap rokok yang dihirup maupun terhirup oleh makhluk hidup berpotensi memicu radikal bebas pada tubuh. Radikal bebas bersifat reaktif dengan kecenderungan menarik elektron dari molekul lain dan mengubah suatu molekul menjadi radikal hingga menyebabkan kerusakan sel (Retno Triandhini *et al.*, 2013). Radikal bebas berlebih dalam tubuh dapat mengakibatkan stress oksidatif. Stress oksidatif adalah keadaan dimana terjadi peningkatan kerusakan sel yang dipicu oleh radikal bebas yang diturunkan dari oksigen yang dikenal sebagai *Reactive Oxygen Species (ROS)*. ROS dan metabolitnya dapat menyebabkan kematian sel dan menyebabkan penurunan parameter semen yang terkait dengan infertilitas pada organisme jantan. Efek patologis yang disebabkan oleh radikal bebas atau ROS yang dihasilkan asap rokok pada sperma meliputi terjadinya peroksidasi lipid, penurunan motilitas, menyebabkan kerusakan DNA dan protein serta apoptosis pada spermatozoa (Agarwal *et al.*, 2014). Radikal bebas dapat diatasi dengan adanya antioksidan. Bila paparan radikal bebas berlebih,

maka diperlukan pemberian antioksidan yang berasal dari luar tubuh atau disebut juga antioksidan eksogen untuk menetralkan radikal bebas.

Black garlic merupakan produk bawang putih yang difermentasi dengan kontrol tinggi pada suhu 70 °C dan kelembaban relatif 90% dalam jangka waktu sekitar satu bulan. *Black garlic* menunjukkan sifat antioksidan yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan bawang putih mentah biasa. Jumlah kandungan senyawa antioksidan, terutama polifenol dan total flavonoid *Black garlic* meningkat secara signifikan selama perlakuan panas (Choi *et al.*, 2014). Selain itu senyawa antioksidan lain dalam *Black garlic* adalah *S-allyl cystein (SAC)* dan *tetrahydro-β-carbolines*. *S-allyl cystein (SAC)* yaitu asam amino yang terbentuk dalam senyawa *Black garlic* dengan konsentrasi lima sampai tujuh kali lebih tinggi dibandingkan bawang putih biasa (Bae *et al.*, 2014). Sehingga dari kandungan yang dimiliki oleh *Black garlic* menjadikannya suatu bahan alami yang berpotensi dapat menangkalkan radikal bebas dari asap rokok. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh ekstrak *Black garlic* terhadap kualitas spermatozoa tikus setelah dipaparkan asap rokok.

2. METODOLOGI

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari - April 2021 di Laboratorium Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Semarang. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental. Subyek pada penelitian ini adalah 25 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur wistar berkelamin jantan, umur 2-3 bulan, berat badan 180-200 gram dan dalam kondisi sehat.

Pembuatan ekstrak *Black garlic* menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%. Sebanyak 440 gr *Black garlic* yang telah dikeringkan diblender sampai halus kemudian dilarutkan dalam 2,2 L etanol 96%. Proses perendaman *Black garlic* dilakukan selama 5 hari. Selama proses perendaman, larutan diaduk sekali setiap hari. Setelah selesai perendaman dilakukan penyaringan untuk mendapatkan maserat. Hasil maserat dipekatkan hingga membentuk endapan *Black garlic* yang pekat dan kental seperti bentuk Karamel. Karamel *Black garlic* ini dilarutkan dalam 600 ml aquades hingga diperoleh ekstrak *Black garlic* 100% kemudian didapatkan dosis ekstrak masing-masing yaitu 250 mg/KgBB, 500 mg/KgBB, dan 1000 mg/KgBB.

Semua sampel tikus yang digunakan dibagi secara acak menjadi 5 kelompok. Kelompok tikus normal (K-) hanya diberi pakan standar, kelompok kontrol positif (K+) hanya dipaparkan asap rokok, KP1, KP2 dan KP3 merupakan kelompok perlakuan yang dipaparkan asap rokok dan diberi ekstrak *Black garlic* dengan dosis bertingkat yaitu, 250 mg/KgBB, 500 mg/KgBB, dan 1000 mg/KgBB. Penelitian ini dilaksanakan selama 30 hari. Pemberian paparan asap rokok menggunakan rokok kretek dengan dosis 2 batang rokok per hari. Pada hari ke 31 dilakukan proses pembedahan tikus yang dilanjutkan dengan pengambilan dan penilaian kualitas spermatozoa.

Parameter yang digunakan untuk menentukan kualitas spermatozoa dalam penelitian ini mencakup konsentrasi, viabilitas dan motilitas spermatozoa. Uji analisis data menggunakan One Way Anova yang dilanjutkan dengan uji LSD.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil uji kualitas sperma meliputi beberapa parameter mencakup konsentrasi, viabilitas dan motilitas spermatozoa tersaji dalam Tabel 1.

Tabel 1. Hasil penelitian efek ekstrak *Black garlic* terhadap 3 parameter kualitas spermatozoa setelah dipaparkan asap rokok selama 30 hari

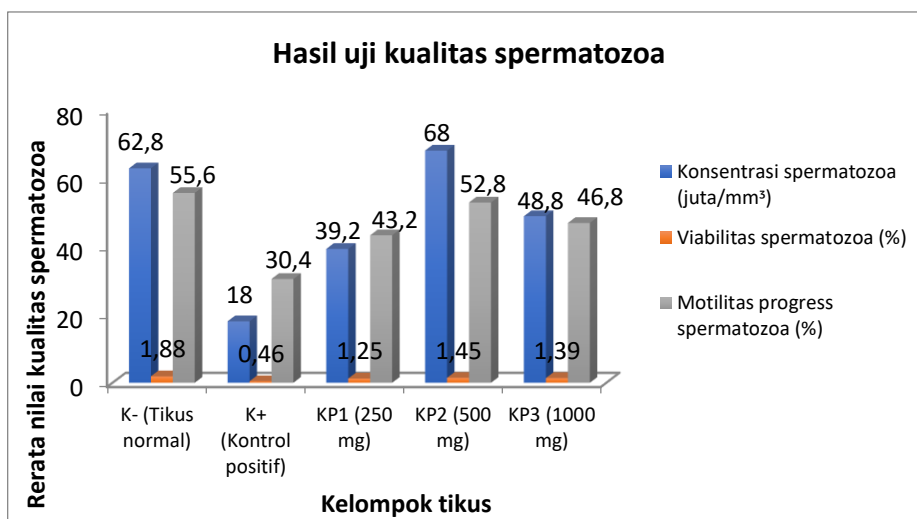
Kelompok	Rerata konsentrasi spermatozoa (juta/mm ³)	Rerata viabilitas spermatozoa (%)	Rerata motilitas progressif spermatozoa (%)
K0	62,8x10 ⁶ ±7823042,886 ^c	1,8818±0,09517 ^c	55,60±4,561 ^c
K-	18x10 ⁶ ±6324555,320 ^a	0,4644±0,33259 ^a	30,40±2,608 ^a
KP1	39,2x10 ⁶ ±593295,790 ^b	1,2499±0,15671 ^b	43,20±2,280 ^b
KP2	68x10 ⁶ ±9797958,971 ^c	1,4516±0,17421 ^b	52,80±6,099 ^c
KP3	48,8x10 ⁶ ±6099180,273 ^b	1,3892±0,20663 ^b	46,80±3,633 ^b

Keterangan: angka yang diikuti oleh notasi huruf berbeda menunjukkan perbedaan pada setiap kelompok perlakuan.

Spermatozoa memainkan peran yang sangat penting dalam kelanjutan spesies melalui transmisi gen dan terus menerus diproduksi di testis organisme selama hidup. Spermatogenesis merupakan serangkaian proses yang memproduksi spermatozoa dengan dikendalikan oleh sekresi *Follicle Stimulating Hormone* (FSH), *Luteinizing Hormone* (LH), dan testosteron oleh rangsangan hipotalamus-hipofisis pada testis (Tomita *et al.*, 2016). Salah satu faktor yang berpotensi mengganggu spermatogenesis adalah paparan asap rokok (Schattman *et al.*, 2015).

Asap rokok mengandung beberapa konstituen dengan senyawa utama berupa nikotin. Selain nikotin, senyawa lain yang juga berbahaya diantaranya tar, karbonmonoksida, senyawa polisiklik aromatik hidrokarbon, logam berat dan turunan pirolisis lainnya. Senyawa senyawa berbahaya yang terkandung dalam asap rokok merupakan sumber eksogen radikal bebas (Ramadhan, 2021). Radikal bebas bersifat reaktif dengan merusak molekul sekitarnya seperti lipid, protein, karbohidrat dan asam nukleat. Radikal bebas berkaitan erat dengan kerusakan oksidatif yang menyebabkan kerusakan sel melalui peroksidasi lipid, kerusakan DNA dan protein (Aprioku *et al.*, 2013).

Radikal bebas disebut juga dengan istilah *Reactive Oxygen Species* (ROS). Setiap kepulan asap rokok mengandung sekitar 1014 *Reactive Oxygen species* (ROS), seperti superoksida (O_2^-), hidrogen peroksida (H_2O_2), hidroksil (OH) dan peroksil radikal (ROO^\cdot) (Rasheed and Al-Rubayee, 2012). Produksi ROS atau radikal bebas dari asap rokok dapat memicu stress oksidatif yang menyebabkan terjadinya peroksidasi lipid dan penurunan kualitas spermatozoa (Akbari and Jelodar, 2013). Peroksidasi lipid terjadi ketika ROS dengan konsentrasi tinggi menyerang membran plasma spermatozoa yang mengandung lipid tingkat tinggi dalam bentuk asam lemak tak jenuh / *Poly Unsaturated Fatty Acids* (PUFA). Peroksidasi lipid dapat merusak membran sel spermatozoa, mengganggu transportasi berbagai ion yang penting untuk proliferasi dan pertumbuhan sel germinal serta menyebabkan apoptosis berlebihan pada sel spermatozoa (Hoesada *et al.*, 2016).



Gambar 1. Grafik rerata hasil penilaian kualitas spermatozoa

Paparan asap rokok dapat mempengaruhi konsentrasi, viabilitas dan motilitas spermatozoa. Hasil uji analisis menunjukkan perbedaan signifikan antara kelompok K+ (hanya diberi paparan asap rokok) dengan kelompok lainnya. Kelompok K+ memiliki kualitas spermatozoa yang paling rendah dibandingkan dengan kelompok lainnya pada semua parameter yang meliputi konsentrasi, viabilitas dan motilitas spermatozoa. ROS yang tinggi akibat paparan asap rokok dapat mengganggu regulasi endokrin pada testis sehingga menghambat spermatogenesis. Mekanisme kerja endokrin yang mencakup sumbu hipotalamus-hipofisis-testis menjadi terganggu akibat pengaruh ROS dalam asap rokok. Hal ini mengakibatkan terhambatnya pelepasan androgen, *Luteinizing Hormone* (LH) dan *Follicle-Stimulating Hormone* (FSH) (Darbandi *et al.*, 2018). Terhambatnya sekresi FSH dan LH berdampak pada penurunan hormone testosteron yang berakibat pada terganggunya proses spermatogenesis sehingga menyebabkan penurunan jumlah spermatozoa (Salahshoor *et al.*, 2016).

Nikotin yang masuk dalam tubuh meningkatkan produksi ROS yang berpengaruh terhadap viabilitas spermatozoa (La Maestra *et al.*, 2015). Kandungan ROS yang tinggi dapat mengurangi daya viabilitas dan motilitas spermatozoa melalui pengurangan potensial membran mitokondria dan

integritas DNA kromatin pada spermatozoa (Mohammadghasemi *et al.*, 2018). Efektivitas spermatogenesis tidak hanya dilihat dari jumlah spermatozoa yang diproduksi melainkan juga pada motilitas dan kemampuan fungsional spermatozoa. Motilitas sangat penting untuk pergerakan spermatozoa dalam saluran kelamin wanita. Motilitas membutuhkan pelepasan energi besar yang dapat diperoleh dari hidrolisis ATP. Bagian tengah flagel sperma memiliki banyak mitokondria untuk mensintesis energi dalam jumlah besar guna motilitas. Penurunan motilitas spermatozoa dapat disebabkan oleh kerusakan membran mitokondria akibat pengaruh ROS (Condorelli *et al.*, 2013).

Pada KP1, KP2, KP3, terdapat peningkatan kualitas spermatozoa dibandingkan pada kelompok K+ karena adanya pemberian ekstrak *Black garlic* kepada sampel tikus setelah pemberian paparan asap rokok. *Black garlic* merupakan umbi bawang putih yang mengalami proses pemanasan pada suhu 60-70° dalam kelembaban relatif 80-90% selama kurang lebih satu bulan (Ai and Huong, 2018). *Black garlic* memiliki aktivitas antioksidan tinggi yang ditentukan oleh aktivitas menangkalkan radikal bebas dan kandungan senyawa fenolik (Lu *et al.*, 2017). Komponen bioaktif *Black garlic* yaitu meliputi senyawa fenolik, *sulfur organic*, β -*carboline*, alkaloid dan melanoidin. Senyawa fenolik yang didalamnya termasuk flavonoid, *S-allylcystein* (SAC), *hydroxycinnamic acids*, *cycloalliin* dan *tetrahydro- β -carboline* yang memiliki aktivitas pemulungan radikal bebas yang kuat (Zou *et al.*, 2017). Kandungan senyawa fenol dan total flavonoid dalam *Black garlic* lebih tinggi dibandingkan pada bawang putih segar (Kim *et al.*, 2013). Aktivitas pemulungan radikal bebas dari senyawa fenol dipengaruhi oleh jumlah dan posisi hidrogen fenolik dalam molekul. Semakin tinggi kelompok hidroksil yang dimiliki senyawa fenol, semakin tinggi aktivitas antioksidan yang dihasilkan (Harmita *et al.*, 2020). Selain itu, *Black garlic* dipercaya sebagai sumber antioksidan eksogen yang mampu menangkalkan radikal bebas dengan meningkatkan enzim antioksidan tubuh seperti Superoksida dismutase (SOD), GSH-Px, dan katalase (Kimura *et al.*, 2017).

Flavonoid memiliki kemampuan untuk bertindak sebagai antioksidan. Adanya kandungan flavonoid dari *Black garlic* yang dikonsumsi akan membantu meningkatkan enzim antioksidan tubuh dalam proses menangkalkan radikal bebas. Flavonoid yang teroksidasi oleh senyawa radikal menyebabkan senyawa radikal menjadi lebih stabil dan kurang reaktif. Beberapa flavonoid dapat secara langsung melawan superoksida, sedangkan flavonoid lainnya dapat melawan oksigen reaktif tinggi yang berupa turunan senyawa radikal yang disebut *peroxynitrite*. Flavonoid juga dapat mengatasi stress oksidatif dengan cara menghambat terjadinya peroksidasi lipid (Panche *et al.*, 2016). Flavonoid bisa secara langsung mendonasikan atom hidrogen kepada radikal bebas, ataupun melakukan transfer elektron tunggal. Selain itu aksi flavonoid dalam melawan radikal bebas juga melalui *chelating* dari transisi elemen logam. Flavonoid memiliki *chelating agent* untuk mengikat ion logam pada tubuh manusia supaya logam-logam tersebut tidak dapat dioksidasi dan membentuk senyawa radikal bebas (Banjarnahor *et al.*, 2014). Sifat antiradikal flavonoid (FIO-H) berkaitan dengan kemampuannya dalam mentransfer H-atom fenolik kepada senyawa radikal bebas (Amic *et al.*, 2013).

Kadar serum Malondialdehyde (MDA) dalam darah tikus mengalami penurunan setelah diberi ekstrak *Black garlic*. Malondialdehyde (MDA) adalah salah satu produk akhir dari peroksidasi lipid yang secara tidak langsung mencerminkan tingkat kerusakan sel akibat peroksidasi. Hal ini berarti menekankan bahwa pemberian ekstrak *Black garlic* dapat menghambat terjadinya stress oksidatif dan menekan peningkatan ROS akibat paparan asap rokok (Wang *et al.*, 2017).

Pemberian ekstrak *Black garlic* dinilai efektif dalam menangkalkan radikal bebas asap rokok sehingga dapat mencegah penurunan kualitas spermatozoa. Dari hasil penelitian ini, dapat diketahui jika ekstrak *Black garlic* dosis 250 mg telah mampu mencegah kerusakan pada spermatozoa. Sedangkan dosis 500 mg/kg BB merupakan dosis paling efektif untuk menurunkan kerusakan yang terjadi pada spermatozoa akibat paparan asap rokok. Terjadi penurunan hasil pada dosis 1000 mg/kg BB, dimungkinkan karena kadar antioksidan yang berlebih sehingga menyebabkan ketidakseimbangan yang kemudian memicu keadaan stress antioksidatif. Asupan antioksidan berlebih yang melebihi kadar batas yang dibutuhkan oleh tubuh dapat menjadikannya sebagai pro-oksidan yang berbahaya dan berpotensi merusak sel (Villaneuva and Kross, 2012).

4. KESIMPULAN

Dari hasil penelitian dan pembahasan dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak *Black garlic* dapat mencegah penurunan kualitas spermatozoa tikus setelah dipapar asap rokok. Dosis paling efektif untuk menurunkan kerusakan yang terjadi pada spermatozoa akibat paparan asap rokok adalah 500 mg/KgBB.

DAFTAR PUSTAKA

- Agarwal, A., Virk, G., Ong, C., & du Plessis, S. S. (2014). Effect of Oxidative Stress on Male Reproduction. *The World Journal of Men's Health*, 32(1), 1. <https://doi.org/10.5534/wjmh.2014.32.1.1>
- Ai, T. T., & Huong, N. T. (2018). Research on the Production of Black Garlic Juice. *International Journal of Pharmaceutical Science Invention* ISSN, 7(5), 7–14. www.ijpsi.org
- Akbari, A., & Jelodar, G. (2013). the Effect of Oxidative Stress and Antioxidants on Men Fertility. June. <http://en.journals.sid.ir/ViewPaper.aspx?ID=336264>
- Amić, D., Stepanić, V., Lučić, B., Marković, Z., & Dimitrić Marković, J. M. (2013). PM6 study of free radical scavenging mechanisms of flavonoids: Why does O-H bond dissociation enthalpy effectively represent free radical scavenging activity? *Journal of Molecular Modeling*, 19(6), 2593–2603. <https://doi.org/10.1007/s00894-013-1800-5>
- Aprioku, J. S. (2013). Pharmacology of free radicals and the impact of reactive oxygen species on the testis. *Journal of Reproduction and Infertility*, 14(4), 158–172.
- Badan Pusat Statistik. (2018). Persentase Merokok Pada Penduduk Usia ≤ 18 Tahun Menurut Kelompok Umur (Persen). Bps.go.id. Jakarta.
- Bae, S. E., Cho, S. Y., Won, Y. D., Lee, S. H., & Park, H. J. (2014). Changes in S-allyl cysteine contents and physicochemical properties of black garlic during heat treatment. *LWT - Food Science and Technology*, 55(1), 397–402. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.05.006>
- Banjarnahor, S. D. S., & Artanti, N. (2014). Antioxidant properties of flavonoids. *Medical Journal of Indonesia*, 23(4), 239–244. <https://doi.org/10.13181/mji.v23i4.1015>
- Choi, I. S., Cha, H. S., & Lee, Y. S. (2014). Physicochemical and antioxidant properties of black garlic. *Molecules*, 19(10), 16811–16823. <https://doi.org/10.3390/molecules191016811>
- Condorelli, R. A., La Vignera, S., Giacone, F., Iacoviello, L., Vicari, E., Mongioi, L., & Calogero, A. E. (2013). In vitro effects of nicotine on sperm motility and bio-functional flow cytometry sperm parameters. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 26(3), 739–746. <https://doi.org/10.1177/039463201302600317>
- Dai, J. B., Wang, Z. X., & Qiao, Z. D. (2015). The hazardous effects of tobacco smoking on male fertility. *Asian Journal of Andrology*, 17(6), 954–960. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.150847>
- Darbandi, M., Darbandi, S., Agarwal, A., Sengupta, P., Durairajanayagam, D., Henkel, R., & Sadeghi, M. R. (2018). Reactive oxygen species and male reproductive hormones. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 16(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12958-018-0406-2>
- Harmita, H., Suryadi, H., Syarif, M., & Liksasa, L. D. (2020). Gas Chromatography Analysis of Diallyl Disulphide and Diallyl Trisulphide and Antioxidant Activity in Black Garlic. *International Journal of Pharmaceutical Investigation*, 10(1), 17–23. <https://doi.org/10.5530/ijpi.2020.1.4>
- Hoesada, I., Nasihun, T., & Isradji, I. (2016). The Effect of Propolis Extract on MDA Levels (Malondialdehyde) and Sperm Quality on Epididimis (Experimental Study on Wistar Strain Male Rats Exposed to Kretek Cigarettes). *Sains Medika: Jurnal Kedokteran Dan Kesehatan*, 7(1), 09–14. <http://jurnal.unissula.ac.id/index.php/sainsmedika/article/view/1165>
- Kim, J. S., Kang, O. J., & Gweon, O. C. (2013). Comparison of phenolic acids and flavonoids in black garlic at different thermal processing steps. *Journal of Functional Foods*, 5(1), 80–86. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2012.08.006>
- Kimura, S., Tung, Y. C., Pan, M. H., Su, N. W., Lai, Y. J., & Cheng, K. C. (2017). Black garlic: A critical review of its production, bioactivity, and application. *Journal of Food and Drug Analysis*, 25(1), 62–70. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.11.003>

- La Maestra, S., De Flora, S., & Micale, R. T. (2015). Effect of cigarette smoke on DNA damage, oxidative stress, and morphological alterations in mouse testis and spermatozoa. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 218(1), 117–122. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2014.08.006>
- Lu, X., Li, N., Qiao, X., Qiu, Z., & Liu, P. (2017). Composition analysis and antioxidant properties of black garlic extract. *Journal of Food and Drug Analysis*, 25(2), 340–349. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.05.011>
- Menteri Kesehatan RI. (2013). Peraturan Menteri Kesehatan RI Nomor 28 Tahun 2013 tentang Pencantuman Peringatan Kesehatan dan Informasi Kesehatan Pada Kemasan Produk Tembakau. Jakarta: Kemenkes RI.
- Mohammadghasemi, F., & Jahromi, S. K. (2018). Melatonin ameliorates testicular damages induced by nicotine in mice. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 21(6), 639–644. <https://doi.org/10.22038/IJBMS.2018.28111.6829>
- Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: An overview. *Journal of Nutritional Science*, 5. <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>
- Ramadhan, A. (2021). The effectiveness of binahong (*Anredera cordifolia* (ten.) steenis) extract in promoting fertility in male wistar rats after exposure to cigarette smoke. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*, 9, 123–128. <https://doi.org/10.3889/oamjms.2021.5881>
- Rasheed, O., & Al-Rubayee, W. (2012). Effects of Cigarette Smoking on Lipid Peroxidation and Antioxidant Status in Iraqi Men at Baghdad City. *International Journal of Basic and Applied Sciences*, 2(1). <https://doi.org/10.14419/ijbas.v2i1.516>
- Retno Triandhini, R., Mangimbulude, J. C., Karwur, F. F., Biologi, M., Kristen Satya Wacana, U., & Ilmu Kesehatan, F. (2013). Merokok dan Oksidasi DNA. Juli-Desember, 5(2), 113–120. <http://jurnal.unissula.ac.id/index.php/sainsmedika/article/view/352>
- Salahshoor, M. R., Khazaei, M., Jalili, C., & Keivan, M. (2016). Crocin improves damage induced by nicotine on a number of reproductive parameters in male mice. *International Journal of Fertility and Sterility*, 10(1), 71–78. <https://doi.org/10.22074/ijfs.2016.4771>
- Sara, G., & Hanriko, R. (2017). Efektivitas Activated Charcoal Cigarette Filter dalam Menurunkan Risiko Kejadian Kanker Paru. *Medula*, 7(5), 9–13.
- Schattman, G. L., Esteves, S. C., & Agarwal, A. (2015). Unexplained infertility: Pathophysiology, evaluation and treatment. *Unexplained Infertility: Pathophysiology, Evaluation and Treatment*, March 2016, 1–347. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2140-9>
- Tomita, K., Tanaka, H., Kageyama, S., Nagasawa, M., Wada, A., Murai, R., Kobayashi, K., Hanada, E., Agata, Y., & Kawauchi, A. (2016). The effect of D-aspartate on spermatogenesis in mouse testis. *Biology of Reproduction*, 94(2). <https://doi.org/10.1095/biolreprod.115.134692>
- Villanueva, C., & Kross, R. D. (2012). Antioxidant-induced stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(2), 2091–2109. <https://doi.org/10.3390/ijms13022091>
- Wang, W., & Sun, Y. (2017). In vitro and in vivo antioxidant activities of polyphenol extracted from black garlic. *Food Science and Technology*, 37(4), 681–685. <https://doi.org/10.1590/1678-457x.30816>
- Zou, Y., Zhao, M., Yang, K., Lin, L., & Wang, Y. (2017). Enrichment of antioxidants in black garlic juice using macroporous resins and their protective effects on oxidation-damaged human erythrocytes. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1060, 443–450. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.06.026>