

JUS *Punica granatum* MEMULIHKAN MOTILITAS SPERMATOZOA TIKUS PUTIH PADA KONDISI STRES OKSIDATIF

Putu Oky Ari Tania¹, Emilia Devi D. Rianti¹, Indra Firismanda Dermawan²,
Nur Sri Wahyuni²

¹Bagian Biomedik Penelitian Biomolekuler Fakultas Kedokteran

²Fakultas Kedokteran Universitas Wijaya Kusuma Surabaya

Jl. Dukuh Kupang XXV/ 54, Surabaya

¹ Email: putu.oky@gmail.com

Diterima 27 Agustus 2018, Disetujui 24 Oktober 2018

ABSTRACT

Fast food consumption including used of repeated heating-oil, causing various of health problems, especially the formation of free radicals characterized by elevated MDA levels. Pomegranates have many therapeutic functions, especially as antioxidants that scavenges free radical of oxidative stress thus improving the quality of spermatozoa. The aim of this study was to see the effect of pomegranate juice to reduce oxidative stress and improve sperm motility. This study used 24 rats divided into 4 groups, namely KN, KP, JD1 and JD2. The mean MDA content (nmol / ml) in KN, KP, JD1 and JD2 was 23.35; 8,53; 12.15; and 12,83 followed by Kruskal-Wallis test obtained p value 0,021 ($p < 0,05$). The quality of spermatozoa includes the motility of spermatozoa which distinguished 4 criteria: fast moving spermatozoa and straight forward (criteria 1), spermatozoa move slowly / difficult to go straight (criteria 2), street spermatozoa (criteria 3) and immobile spermatozoa (criteria 4). Mean percentage (%) number of spermatozoa criteria 1 on KN, KP, JD1, and JD2 among others 41,6; 18,2; 38; and 62,2. Mean percentage (%) number of spermatozoa criteria 2 on KN, KP, JD1, and JD2 among others 4,4; 21,8; 15,6 and 14,2. Mean of percentage (%) motility of spermatozoa criteria 3 on KN, KP, JD1, and JD2 among others 10,6; 24,8; 11,2 and 15,2, while for criteria 4 is 21,8; 37,2; 40,4; and 13,8. Statistical test for sperm motility using ANOVA one way, on criteria 1, 2, 3 and 4 each got p value 0,000; 0,010; 0,000; and 0,000, which means the administration of pomegranate juice shows the effect on the motility of spermatozoa.

Keywords: *pomegranate juice; malondialdehyde level; sperm motility*

PENDAHULUAN

Gaya hidup masyarakat modern cenderung mengonsumsi makanan yang praktis dan cepat saji seperti *junk food*, yang ketika dikonsumsi dalam jangka panjang menimbulkan berbagai masalah bagi kesehatan. Salah satu bentuk *junk food* yang sering dijumpai adalah gorengan. Proses penggorengan pada pembuatan *junk food* menggunakan minyak goreng yang sama berulang kali sehingga akan menghasilkan radikal bebas (Fajrin, 2010). Minyak yang digoreng berulang kali kaya akan asam lemak tak jenuh. Konsumsi minyak tersebut terjadi hampir tiap hari dengan alasan menghemat biaya, padahal diketahui terdapat beberapa

masalah kesehatan yang terjadi akibat konsumsi minyak pemanasan berulang. Proses pemanasan suhu tinggi pada minyak melalui serangkaian poses kimia yaitu oksidasi yang menghasilkan produk radikal bebas (Jaarin *et al*, 2016).

Pengaruh patologis dari radikal bebas akan menginduksi peroksidasi lipid, kerusakan DNA dan apoptosis termasuk mengganggu spermatogenesis (Kothari *et al*, 2010). *Reactive Oxygen Stress* (ROS) merupakan agen pengoksidasi yang sangat reaktif dan termasuk dalam golongan radikal bebas (Dkhil *et al*, 2013). Minyak yang dilakukan pemanasan berulang akan

mengalami proses oksidasi dan mengalami kerusakan, juga merupakan toksikan bagi liver, termasuk menghasilkan radikal bebas berupa asam lemak bebas (Fajrin, 2010). Peristiwa peroksidasi ini menghasilkan senyawa *Malondialdehyde* (MDA) yang merupakan salah satu produk dari ROS. *Reactive Oxygen Species* (ROS) adalah oksidator yang sangat reaktif, perubahan dalam sintesis radikal bebas dapat merangsang oksidasi dan kerusakan DNA sel. Membran plasma spermatozoa mengandung asam lemak tidak jenuh yang rentan terhadap kerusakan peroksidatif (Turk *et al*, 2007).

Radikal bebas dapat teratasi oleh antioksidan dalam tubuh, namun antioksidan endogen tersebut tidak cukup untuk menghilangkan radikal bebas secara sempurna dan tidak cukup untuk menjaga keseimbangan radikal bebas dan oksidan dalam tubuh (Li, 2010). Untuk itu perlu tambahan antioksidan dari luar, salah satu usaha untuk menangkal tingginya radikal bebas, dapat dilakukan dengan memperbaiki pola makan yaitu konsumsi makanan sehat seperti buah dan sayur yang kaya antioksidan. Buah yang memiliki banyak khasiat terutama sebagai antioksidan potensial yang dipercaya sejak jaman dulu adalah *Punica granatum* atau *pomegranate*. Nama lokal Indonesia tanaman ini disebut delima, yang tersebar merata di seluruh Indonesia. Tanaman ini memiliki berbagai fungsi antara lain sebagai antiarterogenik, antikarsinogenik, antioksidan, dan berperan sebagai antiinflamasi (Bhandari, 2012).

Sejak dahulu delima telah dikenal sebagai pengobatan tradisional di beberapa bangsa terutama di daerah timur tengah. Khasiat yang paling menonjol dari tanaman ini adalah aktivitasnya sebagai antioksidan. Aktivitas antioksidan dalam delima berasal dari golongan polifenol yaitu tanin, antosianin, dan flavonoid (Dkhal *et al*, 2013). Antioksidan dalam darah, sel dan cairan jaringan memiliki peran yang penting dalam menetralkan kerusakan oksidatif akibat radikal bebas (Saleh *et al*, 2010). Aktivitas antioksidan diartikan sebagai

kemampuan suatu bahan untuk menghambat proses oksidasi (Tirzitis and Bartosz, 2010).

Berdasarkan uraian tersebut dipandang perlu adanya upaya untuk mengatasi berbagai kondisi akibat konsumsi makanan yang tidak sehat seperti *junk food* beserta penggunaan minyak pemanasan berulang (MPB). Salah satunya dengan menggunakan bahan alam yang memiliki aktivitas antioksidan tinggi seperti delima atau *Punica granatum* atau *pomegranate* atau delima.

METODE

Penelitian ini adalah penelitian *true experimental* dengan rancangan acak *post testonly control group*. Bahan yang diperlukan adalah buah delima, minyak goreng dengan pemanasan berulang sebanyak 27 kali (Fajrin, 2010), reagen untuk pengukuran kadar MDA, NaCl fisiologis 0,9 %, aquades. Alat : blender, gelas ukur, jarum untuk sonde, *sputit*, bak untuk kandang pemeliharaan tikus, spektrofotometer, mikroskop, *dissecting set*, *Cover glass*, *Objek glass* dan *petridish*, dan *handcounter*. Bak plastik berukuran 40 x 30 x 13 cm dengan tutup dari kawat kasa.

Hewan coba dibagi menjadi 4 kelompok yaitu KN, KP, JD1 dan JD2. KN adalah kelompok normal yang diberikan aquades selama 28 hari. KP kelompok kontrol positif yang diberikan Minyak pemanasan berulang (MPB) selama 14 hari dilanjutkan aquades selama 14 hari. Sedangkan JD1 dan JD2 diberikan MPB selama 14 hari, dilanjutkan dengan jus buah delima masing-masing Delima : Aquades sebesar 1 : 3 dan 3 : 1, selama 14 hari sebanyak 2 ml/200g BB.

Pembuatan jus delima (JD)

Buah delima atau *pomegranate* segar sebanyak 10 kg dicuci bersih, dikuliti dan disimpan dalam suhu 4°C. Buah delima diperas beserta bijinya dan dihancurkan menggunakan *blender*. Jus yang terbentuk

lalu disaring dan diambil sarinya, segera setelah disaring ditambahkan *distilled* aquades sampai volume 1 : 3 dan 3 : 1 . Jus dapat disimpan dalam lemari es suhu -20⁰C dalam botol gelap, sampai digunakan tidak lebih dari 2 bulan. (Moneim *et al*, 2011). Pada kelompok perlakuan dosis I diberikan pemberian Jus Delima : Aquades sebesar 1 : 3 sebanyak 2 ml/ 200g BB/ hari (JD1), dosis II diberikan diberikan pemberian Jus Delima : Aquades sebesar 3 : 1 sebanyak 2 ml/ 200g BB/ hari (JD2).

Pembuatan Minyak Pemanasan Berulang (MPB)

Pembuatan MPB mengacu pada penelitian Fajrin (2010).Minyak goreng curah digunakan untuk menggoreng tahu sampai tahu matang (kering dan berkerak), lalu minyak dibiarkan sampai suhu menurun seperti suhu sebelum penggorengan. Penggorengan ke-2 sampai ke 27 diulangi dengan proses yang sama, dan menggunakan minyak yang sama, metode penggorengan dengan *deep frying*. Minyak Pemanasan Berulang disimpan dalam vial Ditempat yang gelap, untuk selanjutnya digunakan sebagai induksi hiperkolesterolemia pada hewan coba.

Pemberian perlakuan

1. Pemberian Minyak Pemanasan berulang (MPB) selama 14 hari,

pemberian Jus Delima (JD) selama 14 hari.

2. Terminasi atau pengorbanan hewan coba pada KP, KN, JD1, dan JD2: dilakukan pada hari ke-29 (keesokan hari setelah akhir pemberian jus delima) untuk didapatkan serum darah sehingga dapat dilanjutkan untuk pengukuran kadar MDA, dan semen yang diambil dari metode pencacahan pada bagian cauda epididimis untuk penghitungan motilitas spermatozoa.
3. Pengukuran kadar *Reactive Oxidative Species* (ROS) dan jumlah prosentase motilitas spermatozoa pada semua kelompok (KP, KN, JD1, dan JD2) : dilakukan pada hari ke-29 (keesokan hari setelah akhir pemberian perlakuan jus delima (JD)).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian yang didapatkan berupa kadar MDA dan jumlah motilitas spermatozoa dapat dipaparkan pada hasil dibawah ini.

Kadar *Malondialdehyde* (MDA)

Rerata kadar *Malondialdehyde* (MDA) dari 4 kelompok KP, KN, JD1 dan JD2 dapat diamati pada tabel di bawah ini.

Tabel 1. Tabel rerata kadar MDA (mmol/dL)

No.	Kelompok	Rerata Kadar MDA (nmol/ mL)
1.	Kontrol Positif (KP)	23,35 ± 10,6 ^a
2.	Kontrol Negatif (KN)	8,53 ± 1,1 ^b
3.	Jus Delima 1 (JD1)	12,15 ± 4,3 ^a
4.	Jus Delima 2 (JD2)	12,83 ± 4,4 ^{ab}

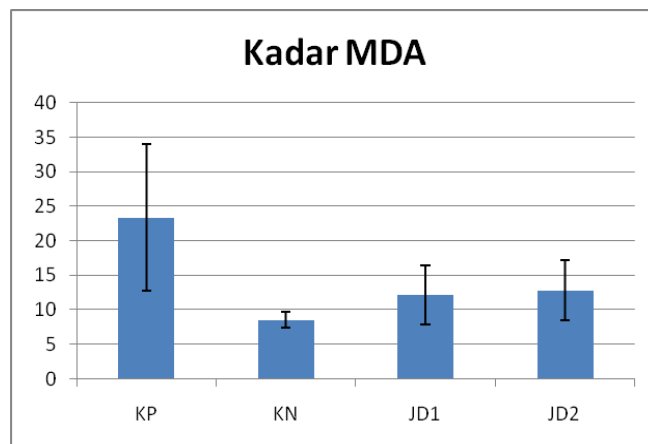
*Superscript berbeda menunjukkan perbedaan bermakna dengan uji Mann-Whitney U

Tabel 1. Menunjukkan kadar MDA terendah ditunjukkan pada kelompok kontrol negatif (KN) yaitu sebesar 8,53 mmol/dL, sedangkan kadar MDA tertinggi pada kelompok kontrol positif (KP) sebesar 23,35 mmol/dL.

Pada KP merupakan kelompok yang diberikan minyak pemanasan berulang (MPB)jus delima terhadap kadar *Malondialdehyde* (MDA).

Pengaruh pemberian perlakuan pada semua kelompok menggunakan uji Kruskal-Wallis didapatkan *p value* 0,021 (<0,05), sehingga terdapat pengaruh pemberian perlakuan (minyak pemasan berulang dan Untuk mengetahui perbedaan kadar MDA antara kelompok dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney U*. Perbedaan

antara kelompok dapat diamati pada Tabel 1. Uji tersebut menunjukkan adanya beda bermakna dengan *superscript* yang berbeda. Kadar MDA antara KP dan KN menunjukkan beda yang bermakna, begitu pula antara KN dan JD1. Grafik rerata kadar MDA antara KP, KN, JD1 dan JD2.



Gambar 1. Rerata Kadar MDA (mmol/dL)

Motilitas spermatozoa

Pengamatan spermatozoa dalam penelitian ini meliputi motilitas spermatozoa yang dikategorikan menjadi 4 kriteria yaitu spermatozoa bergerak cepat dan maju lurus (kriteria 1), spermatozoa bergerak lambat dan sulit maju (kriteria 2), spermatozoa jalan di tempat (kriteria 3) dan spermatozoa tidak bergerak (kriteria

4). Masing-masing data pada kelompok diamati dengan mikroskop 100x. Pengamatan dilakukan dengan menghitung total sebanyak 100 ekor spermatozoa yang dibagi menjadi 4 kriteria tiap pengamatan. Hasil rerata jumlah spermatozoa tiap kriteria pada kelompok KP, KN, JD1 dan JD2 dapat diamati pada Tabel 2.

Tabel 2. Tabel rerata jumlah spermatozoa tiap kategori (%)

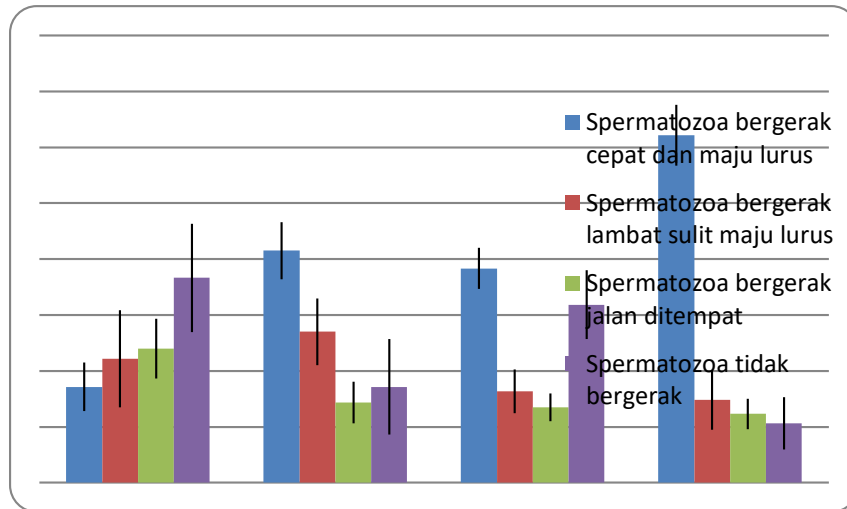
No.	Kelompok	Rerata Jumlah Spermatozoa Bergerak Cepat dan Maju Lurus \pm SD (%)	Rerata Jumlah Spermatozoa Bergerak Lambat dan Sulit Maju \pm SD (%)	Rerata Jumlah Spermatozoa Jalan Di Tempat \pm SD (%)	Rerata Jumlah Spermatozoa Tidak Bergerak \pm SD (%)
1.	Kontrol Negatif (KN)	41,5 \pm 5,1 ^a	27 \pm 5,9 ^a	14,3 \pm 3,7 ^a	17,2 \pm 8,5 ^a
2.	Kontrol Positif (KP)	17,2 \pm 4,3 ^b	22,2 \pm 8,7 ^{ab}	24 \pm 5,4 ^b	36,7 \pm 9,7 ^b
3.	Jus Delima 1 (JD1)	38,3 \pm 3,7 ^{ac}	16,3 \pm 3,9 ^b	13,5 \pm 2,5 ^{ac}	31,8 \pm 6,1 ^b
4.	Jus Delima 2 (JD2)	62,2 \pm 5,4 ^d	14,8 \pm 5,3 ^{bc}	12,3 \pm 2,7 ^{ad}	10,7 \pm 4,7 ^{ac}

Tabel 2. Menunjukkan bahwa pada kelompok KN prosentase jumlah spermatozoa tertinggi didapatkan spermatozoa dengan kriteria 1 (41,5%)

yaitu spermatozoa bergerak cepat dan maju lurus. Pada KP, prosentase jumlah spermatozoa tertinggi dapat diamati pada

spermatozoa kriteria 4 (36,7%). Prosentase jumlah spermatozoa tertinggi pada kelompok JD1 dan JD1 pada kriteria 1 masing-masing 38,3% dan 62,2%. Grafik

prosentase jumlah spermatozoa masing-masing kelompok tiap kriteria disajikan pada Gambar 2.



Gambar 2. Rerata prosentase jumlah spermatozoa dengan 4 kriteria; (1) spermatozoa bergerak cepat dan maju lurus; (2) spermatozoa bergerak lambat sulit maju lurus; (3) spermatozoa bergerak jalan ditempat; (4) spermatozoa tidak bergerak.

Kadar MDA terendah ditunjukkan pada kelompok kontrol negatif (KN) yaitu sebesar 8,53 mmol/dL. Pada KN merupakan kelompok yang hanya diberikan aquades selama 28 hari, sehingga kadar stres minimal yang ditunjukkan dengan rendahnya kadar MDA. Sedangkan kadar MDA tertinggi pada kelompok kontrol positif (KP) sebesar 23,35 nmol/ml. Pada KP merupakan kelompok yang diberikan minyak pemanasan berulang (MPB) selama 14 hari dilanjutkan dengan pemberian aquades selama 14 hari. Pengaruh pemberian perlakuan pada semua kelompok menggunakan uji *Kruskal-Wallis* didapatkan *p value* 0,021, sehingga disimpulkan terdapat pengaruh pemberian perlakuan (minyak pemanasan berulang dan jus delima) terhadap kadar *Malondialdehyde* (MDA).

Untuk melihat perbedaan kadar MDA antara kelompok dilakukan dengan uji *Mann Whitney U*. Pengaruh pemberian MPB terhadap MDA dapat diamati antara KP dan KN. Perbedaan kadar MDA antara KP dan KN didapatkan *p value* 0,010 yang artinya ada perbedaan kadar MDA antara kedua

kelompok tersebut. Pada KP, perlakuan menggunakan minyak jagung yang digoreng berulang kali. Minyak goreng jika dipanasi berulang kali memiliki berbagai pengaruh bagi kesehatan seperti mempengaruhi fungsi hati, kadar enzim serum transaminase dan kadar kolesterol total. Minyak yang dipanaskan berulang kali akan membentuk radikal bebas berupa asam lemak bebas yang terbentuk melalui proses oksidasi dari pemecahan ikatan rangkap (Fajrin, 2010).

Ketika terjadi pemanasan berulang pada minyak, terjadi perubahan fisik dari minyak termasuk peningkatan kekentalan dan warna menjadi lebih gelap, yang juga merubah komposisi asam lemak pada minyak. Pemanasan juga mengakibatkan reaksi kimia seperti oksidasi, hidrolisis dan polimerasi yang menghasilkan beberapa produk oksidatif (Jaarin and Kamisah, 2012). Akibat pemanasan dan penggorengan menghasilkan radikal bebas yang dapat membahayakan membran lipid melalui proses peroksidasi lipid yang pada gilirannya

mengakibatkan stres oksidatif (Leong *et al*, 2015).

Bahan-bahan biologikal yang teroksidasi akan mengawali terjadinya ROS yang cepat seperti superoksida, hydrogen peroksida dan hidrosil yang dihasilkan karena molekul air yang terionisasi (Moneim *et al*, 2011). Radikal bebas ini juga dapat menghasilkan produk-produk yang tidak stabil dan sangat mudah menjadi produk sekunder seperti aldehid (4-hidroksil-2,3-nonenal) dan malondialdehydes (MDA) (Birben *et al*, 2012) yang terbukti pada penelitian ini kadar MDA paling tinggi terdapat pada KP (23,35 nmol/ml).

Pada kelompok KP, rerata prosentase jumlah spermatozoa paling tinggi terdapat pada kriteria 4 yaitu spermatozoa yang tidak bergerak yaitu sebesar $36,7 \pm 9,7$ % yang berbeda signifikan dengan KN sebesar $17,2 \pm 8,5$ % (*p value* 0,000) dan JD2 sebesar $10,7 \pm 4,7$ % (*p value* 0,000). Kriteria 4 diasumsikan sebagai spermatozoa yang mati atau imotil akibat kadar MDA yang tinggi. Spermatozoa merupakan jenis sel yang rentan terhadap stres oksidatif, yang tidak dapat memulihkan kerusakan yang diinduksi stres oksidatif tersebut karena kurangnya enzim untuk sistem perbaikan sitoplasmik (Agarwal *et al*, 2014).

Membran sel dari spermatozoa kaya akan asam lemak yang tidak jenuh / *polyunsaturated fatty acids* (PUFAs) yang rentan terhadap peroksidasi lipid, karena kemampuan radikal bebas dalam menangkap elektron dari asam nukleat, lipid dan protein, sehingga menyebabkan kerusakan sel. Spermatozoa merupakan sel yang kaya akan mitokondria karena memerlukan energi untuk motilitasnya, sehingga tingginya ROS akan mempengaruhi fungsi mitokondria yang pada gilirannya menurunkan fungsi motilitasnya (Agarwal *et al*, 2014; Zeitoun and Al-Damegh, 2015). Selain itu peroksidasi lipid dapat menghancurkan struktur matriks lipid pada membran spermatozoa dan menyebabkan hilangnya motilitas dan kerusakan integritas membran spermatozoa, penurunan kadar ATP yang menurunkan

viabilitas sehingga menyebabkan kerusakan aksonemal dan meningkatkan kecacatan morfologi pada bagian *mid-piece* (Atilgan *et al*, 2014; Turk *et al*, 2007).

Pemberian jus delima 1 (JD1) dan JD2 menunjukkan nilai MDA masing-masing sebesar $12,15 \pm 4,3$ dan $12,83 \pm 4,4$ mmol/ml, yang menurun dibandingkan dengan pada kelompok KP. Hal ini berarti jus delima dapat memperbaiki kondisi stres oksidatif akibat MPB. Delima merupakan buah yang tinggi akan polifenol dan menunjukkan kemampuan dalam membersihkan radikal bebas (Aviram *et al*, 2004). Potensi antioksidan dalam delima selain polifenol juga mengandung sebagian elagitanin dan vitamin C. Elagitanin dan polifenol lainnya dihidrolisis menjadi asam elagik yang bertanggungjawab terhadap aktivitas antioksidan secara *in vivo*. (Moneim *et al*, 2011; Atilgan *et al*, 2014).

Kemampuan delima dalam mengurangi molekul oksidan dengan cara membersihkan (*scavenge*) oksigen radikal yang reaktif. Pemberian ekstrak kulit delima dapat mengurangi peroksidasi lipid dan meningkatkan aktivitas antioksidan endogen seperti CAT dan SOD yang menghancurkan hydrogen peroksida sehingga mencegah pembentukan OH yang reaktif (Moneim *et al*, 2011).

Prosentase rerata jumlah spermatozoa paling tinggi pada JD1 adalah kriteria 1 yaitu spermatozoa yang bergerak cepat dan maju lurus, sebesar $38,3 \pm 3,7$ %, begitu pula pada kelompok JD2 rerata jumlah spermatozoa terbesar adalah kriteria 1 sebesar $62,2 \pm 5,4$ %. Ketika dibandingkan dengan kelompok dengan kondisi stres oksidatif (KP), maka terdapat perbedaan yang nyata jumlah spermatozoa dengan motilitas baik (kriteria 1). Pemberian jus delima dapat meningkatkan jumlah spermatozoa yang bergerak cepat dan maju lurus (motilitas baik), karena jus delima merupakan antioksidan potensial yang dapat memulihkan keadaan dari kondisi stres oksidatif, yang ditunjukkan pula dengan MDA yang meningkat.

Menurut penelitian yang dilakukan Turk *et al*, 2007 menyatakan bahwa konsumsi

jus delima selama tujuh minggu dapat meningkatkan kepadatan sel spermatogenik, konsentrasi spermatozoa di epididimis, motilitas spermatozoa dan penurunan spermatozoa yang abnormal juga penurunan peroksidasi lipid pada tikus jantan. Atilgan *et al*, 2014 menyebutkan bahwa pada kondisi normal spermatozoa juga memproduksi sejumlah banyak ROS pada metabolisme fisiologinya, namun jaringan testicular memiliki enzim antioksidan dan *scavenger* ROS yang melindungi fungsi spermatogenik dari stres oksidatif. Kondisi stres oksidatif yang tinggi dari pemaparan MPB dapat menurunkan enzim-enzim antioksidan endogenus testicular. Aktivitas jus delima sebagai antioksidan eksogen dapat mempertahankan sistem *scavenger* untuk melindungi spermatozoa, sehingga motilitas spermatozoa dapat pulih kembali.

Pada JD2 dengan konsentrasi jus delima yang ditingkatkan kekentalannya yaitu 3 : 1 (delima : aquades) nampak motilitas spermatozoa kriteria 4 sangat rendah, yaitu $10,7 \pm 4,7\%$ yang paling rendah dibandingkan 3 kelompok lainnya. Dosis tinggi jus delima akan menurunkan spermatozoa yang abnormal (kriteria 4) secara signifikan ketika dibandingkan kelompok kontrol (Tabel 2.) (Turk *et al*, 2007). Flavonoid memiliki efek farmakologi sebagai aktivitas antioksidan karena kemampuannya dalam menghilangkan (*scavenge*) OH^* dan O_2^{*-} untuk mengikat ion-ion besi dan menekan efek sinergis dengan metabolit antioksidan yang lain (Al olayan *et al*, 2014). Jus delima menunjukkan aktivitas antioksidan yang tinggi sekitar 3 kali lebih banyak dibanding antioksidan pada teh hijau dan anggur merah/ *red wine* (Elfaleh *et al*, 2012).

SIMPULAN

Pemberian jus delima dosis 1 dan 2 mampu menurunkan kadar MDA dan mampu meningkatkan jumlah motilitas spermatozoa pada kondisi stres oksidatif.

DAFTAR PUSTAKA

- Agarwal A, Virk G, Ong C, and du Plessis SS, 2014. Effect of Oxidative Stress on Male Reproduction. *Word J Mens Health* Vol 32 (1) : 1-17
- Al-Olayan EM, El-Khadragy MF, Metwally DM, and Moneim AEA, 2014. Protective Effect of Pomegranate (*Punica granatum* Juice on Testes Against Carbon Tetrachloride Intoxication in Rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14 : 164
- Atilgan D, Parlaktas B, Uluocak N, Gencten Y, Erdemir F, Ozyurt H, Erkorkmaz U and Aslan H, 2014. Pomegranate (*Punica granatum*) Juice Reduces Oxidative Injury and Improves Sperm Concentration in a Rat Model of Testicular Torsion- Detorsion. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 8 : 478-482
- Aviram M, Rosenblat M, Gaitini D, Nitecki S, Hoffman A, Dornfeld L, Vokova N, Presse D, Attias J, Iker H, and Hayek T, 2004. Pomegranate Juice Consumption for 3 Years by Patients With Carotid Artery Stenosis Reduces Common Carotid Intima-Media Thickness, Blood Pressure and LDL oxidation. *Clinical Nutrition* Vol 23 : 423-433
- Bhandari P, 2012. Pomegranate (*Punica granatum L*). Ancient Seeds for Modern Cure? Review of Potential Therapeutic Applications. *International Journal of Nutrition, Pharmacology, Neurological Diseases*, 2(3), 171. doi:10.4103/2231-0738.99469
- Bierben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S and Kalayci O, 2012. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *WAO Journal*, 5 : 5 – 19
- Dkhil MA, Al-Quraishy S, and Al-Khalifa MS, 2014. The Effect of *Babesia*

- divergens* Infection on the Spleen of Mongolian Gerbils. *BioMed Research International Vol 2014 : 1-7*
- Elfalleh W, Hannachi H, Tlili N, Yahlia Y, Nasri N, and Ferchichi A, 2012. Total Phenolic Contents and Antioxidant Activities of Pomegranate Peel, Seed, Leaf and Flower. *Journal of Medicine Plants Research Vol 6 (xx) : 4724-4730*
- Fajrin, FA, 2010. Aktivitas Ekstrak Etanol Ketan Hitam Untuk Menurunkan Kadar Kolesterol. *Jurnal Farmasi Indonesia 5(2) : 63–69*
- Jaarin K and Kamisah Y, 2012. Repeatedly Heated Vegetable Oils and Lipid Peroxidation, *chapter 10 : 211-228*
- Jaarin K, Masbah N, and Nordin SH, 2016. Heated Cooking Oil and Its effect on Blood Pressure and Possible Mechanism: a Review. *Int J Clin Exp Med. 9(2): 626-636*
- Kothari S, Thompson A, Agarwal A and du Plessis SS, 2010. Free Radicals : Their Beneficial and Detrimental Effects on Sperm Function. *Indian Journal of Experimental Biology Vol 48 : 425-435*
- Leong XF, Ng CY, Jaarin K, and Mustafa MR, 2015. Effects of Repeated Heating of Cooking Oils on Antioxidant Content and Endothelial Function. *Austin J Pharmacol Ther Vol 3 (2) : 1068*
- Li P, Huo L, Su W, Lu R, Deng C, Liu L, He C, 2011. Free Radical-Scavenging Capacity, Antioxidant Activity and Phenolic Content of *Pouzolzia zeylanica*. *Journal of the Serbian Chemical Society, 76(5), 709–717. doi:10.2298/JSC100818063L*
- Moneim AEA, Dkhil MA, and Al-quraishy S, 2011. Studies on The Effect of Pomegranate (*Punica granatum*) juice and Peel On Liver and Kidney in Adult Male Rats, *Journal of Medicinal Plants Research Vol 5(20) : 5083–5088*
- Saleh MA, Clark S, Woodard B, and Deolusobogun SA, 2010. Antioxidant and Free Radical Scavenging Activities of Essential Oil. *Ethnicity & Disease 20 : s78-82*
- Tirzitis G, and Bartosz G, 2010. Determination of Antiradical and Antioxidant Activity: Basic Principles and New Insights, *57(1), 139–142*
- Turk G, Sonmez M, Aydin M, Yuce A, Gur S, Yuksel M, Aksu EH, and Aksoy H, 2008. Effect of Pomegranate Juice Consumption on Sperm Quality, Spermatogenic Cell Density, Antioxidant Activity and Testosterone Level in Male Rats. *Clinical Nutrition, 27 : 289 – 296*
- Zeitoun M and Al-Damegh MA, 2015. Effect of Nonenzymatic Antioxidants on Sperm Motility and Survival Relative to Free Radicals and Antioxidant Enzymes of Chilled-Store Ram Semen. *Open Journal of Animals Sciences Vol 5 : 50-58*