

Pemberian Buah Merah (*Pandanus conoideus* Lam) sebelum Dipapar Timah Hitam Menekan Ekspresi *Caspase-8* dan Jumlah Sel *Hofbauer* Mencit (*Mus musculus*) Bunting

*(THE PROVISION OF RED FRUIT (*Pandanus conoideus* Lam) BEFORE EXPOSED BY LEAD DECREASE EXPRESSION OF CASPASE-8 AND THE NUMBER OF HOFBAUER CELLS IN PREGNANT MICE)*

**Ika Wahyuni¹, Widjiati²,
Sri Pantja Madyawati³, Fedik Abdul Rantam⁴**

¹Mahasiswa Magister, ²Departemen Anatomi, ³Lab Virologi dan Imunologi

⁴Departemen Mikrobiologi Veteriner,

Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga

Kampus-C Unair, Jalan Mulyorejo, Surabaya, Jawa Timur, Indonesia

Email: ikka_fkh@yahoo.co.id (081335590596/085732650655)

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian buah merah pada plasenta mencit bunting sebelum dipapar timah hitam. Variabel yang diamati adalah ekspresi *caspase-8* dan jumlah sel *hofbauer*. Buah merah dapat menurunkan ekspresi *caspase-8* dan jumlah sel *hofbauer*. Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL). Setiap kelompok perlakuan menggunakan empat mencit bunting sebagai kelompok kontrol negatif (K-), untuk kelompok ini diberi aquades pada kebuntingan hari ke-6 sampai 15. Kelompok kontrol positif (K+) diberi timah hitam dosis 0,011 mg/20 g BB dalam 1 mL aquades selama kebuntingan hari ke-6 sampai 15. Kelompok perlakuan (P1, P2 dan P3) diberi minyak buah merah dengan dosis yang berbeda yaitu 8,29 mg/20 g BB, 23,98 mg/20 g BB dan 25,68 mg/20 g BB. Data dianalisis dengan Kruskal-Wallis dan Mann Whitney untuk menghitung ekspresi *caspase-8*, sidik ragam dan uji Duncan digunakan untuk menghitung jumlah sel *hofbauer*. Hasil penelitian menunjukkan kelompok perlakuan yang diberi buah merah 23,98 mg/20 g BB dan 25,68 mg/20 g BB dapat menurunkan ekspresi *caspase-8* dan jumlah sel *hofbauer* dibandingkan dengan kelompok kontrol positif dan P1. Simpulan penelitian ini adalah bahwa minyak buah merah dapat menurunkan ekspresi *caspase-8* dan jumlah sel *hofbauer* yang berarti menekan terjadinya apoptosis.

Keywords: timah hitam; buah merah; *caspase-8*; sel *hofbauer*

ABSTRACT

The research aims to observed the provision of red fruit in placenta pregnant mice before exposed by lead. The observed case are expression of *caspase-8* and number of *hofbauer* cells. Red fruit was expected to decrease expression of *caspase-8* and number of *hofbauer* cells. The study design used was complete randomized design. Each treatment utilized four pregnant mice as negative control group (K-), for this group given distilled water orally during gestation 6th-15th. Positive control group (K+) given lead (0.011 mg/20 g BW in 1 mL distilled water) orally during gestation 6th-15th. The treatment group namely P1, P2 and P3) treated by red fruit with different doses i.e., 8.29 mg/20 g BW, 23.98 mg/20 g BW dan 25.68 mg/20 g BW, respectively, during gestation 6th-15th, then one hour later exposed with lead. The obtained data were analyzed by Kruskal-Wallis and Mann Whitney test for calculate *caspase-8* expression, ANOVA and Duncan for calculate the number of *hofbauer* cells. The result indicated that treatment groups which provided by red fruit of 0.8 mL/20 g BW and 0.9 mL/20 g BW showed decline expression of *caspase-8* and number of *hofbauer* cells compare control group without admission of red fruit antioxidant and P1. In conclusion red fruit can decrease expression of *caspase-8* and number of *hofbauer* cell that means decrease apoptosis.

Keywords: lead; red fruit; *caspase-8*; *hofbauer* cell.

PENDAHULUAN

Timah hitam atau plumbum (Pb) merupakan logam berat yang bersifat racun dan berbahaya bagi kesehatan tubuh. Target organ timah hitam adalah sistem saraf, ginjal, sistem endokrin, jantung, dan sistem reproduksi yang masing-masing menimbulkan efek berbeda (Isradji, 2010). Paparan timah hitam dapat melalui sistem pernafasan maupun gastrointestinal. Timah hitam dapat melewati barier plasenta yang selanjutnya masuk dalam sistem peredaran darah fetus sehingga plasenta dapat terpapar. Timah hitam merupakan salah satu pemicu terjadinya stres oksidatif. Stres oksidatif yang terbentuk akibat paparan timah hitam dapat menginduksi perubahan plasenta dan mengakibatkan bobot plasenta dan bobot lahir menjadi lebih ringan maupun terlambatnya perkembangan kognitif (Papanikolaou *et al.*, 2005). Secara mikroskopik perubahan plasenta dapat diamati melalui proses apoptosis dengan melihat ekspresi *caspase*. *Caspase-8* merupakan indikator apoptosis melalui jalur ekstrinsik, jalur ini diinisiasi oleh reseptor permukaan sel atau *death receptor* yaitu *tumor necrosis factor* (TNF). Selain *caspase-8*, sel lain yang dapat diamati secara mikroskopik adalah makrofag plasenta yang disebut sel *hofbauer*. Apabila terdapat infeksi atau paparan logam berat, maka yang berperan utama adalah makrofag. Sel *hofbauer* dapat ditemukan pada plasenta dan uterus selama kebuntingan (Chang *et al.*, 1993).

Saat ini tanaman banyak dimanfaatkan sebagai antioksidan alami, salah satunya adalah buah merah (*Pandanus conoideus* LAM). Buah merah tersebar di Papua, Papua Nugini dan secara sporadis terdapat di daerah Maluku, Sulawesi, Kalimantan, Jawa dan Sumatra. Kandungan yang tinggi dalam buah merah adalah karotenoid dan tokoferol (Palupi dan Martosupono, 2009). Buah merah yang berfungsi sebagai antioksidan dapat menghambat radikal bebas yang masuk ke dalam tubuh. Radikal bebas merupakan atom atau molekul yang memiliki satu atau lebih struktur bebas pada struktur kimianya. Radikal bebas dalam tubuh dengan kadar yang tinggi dapat mengakibatkan kerusakan oksidasi sel. Nitrogen dan oksigen aktif spesies dapat memicu kerusakan tubuh. Radikal oksigen dan *non free radical* dapat menimbulkan stres oksidatif. Stres oksidatif dimediasi oleh *reactive oxygen species* atau ROS (Mcdonald *et al.*, 2003). Oleh karena itu

penelitian ini bertujuan mengetahui pengaruh pemberian minyak buah merah sebagai antioksidan terhadap mencit bunting yang dipapar logam berat timah hitam.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan sampel sebanyak empat ekor mencit betina bunting setiap kelompok perlakuan. Pemberian buah merah dan timah hitam dilakukan secara per oral pada kebuntingan ke-6 sampai 15 hari. Dosis timah hitam yaitu 0,011 mg/20 g BB mencit dalam aquades 0,1 mL. Rentang waktu pemberian minyak buah merah dan timah hitam adalah satu jam.

Ada pun pelaksanaannya adalah K-: Mencit bunting disonde dengan aquades 0,1 mL; K+: Mencit bunting diberi timah hitam 0,011 mg/20 g BB; P1: Mencit bunting diberi minyak buah merah sebanyak 8,29 mg/20 g BB dan dipapar timah hitam 0,011 mg/20 g BB; P2: Mencit bunting diberi minyak buah merah sebanyak 23,98 mg/20 g BB dan dipapar timah hitam 0,011 mg/20 g BB; dan P3: Mencit bunting diberi minyak buah merah sebanyak 25,68 mg/20 g BB dan dipapar timah hitam 0,011 mg/20 g BB.

Prosedur Sinkronisasi Birahi dan Pengawinan Mencit

Mencit disuntik hormon *pregnant mare serum gonadotropin* (PMSG) 5 IU dan *human chorionic gonadotropin* (HCG) 5 IU secara intraperitoneal untuk sinkronisasi birahi. Pemberian HCG 48 jam setelah pemberian PMSG (Widjiati, 1997 ; Madyawati dan Rimayanti, 2013). Mencit dikawinkan secara *monomating*, selanjutnya dilakukan pemeriksaan *vaginal plug* 17 jam setelah dikawinkan. Apabila terdapat sumbat vagina pada mencit tersebut maka dianggap kopulasi telah terjadi dan dianggap kebuntingan hari ke-0.

Prosedur Pemberian Paparan Timah Hitam

Timah hitam diberikan secara per oral dengan dosis 4 mg/kg BB, dosis ini dikonversikan menjadi dosis mencit yaitu 0,011 mg/20 g BB. Perlakuan diberikan pada kebuntingan hari ke-6 sampai 15, sebelum pemberian timah hitam setiap kelompok perlakuan P1, P2, dan P3 diberi minyak buah merah secara per oral.

Prosedur Pemberian Minyak Buah Merah

Minyak buah merah diberikan satu jam sebelum pemberian timah hitam. Minyak buah merah yang diberikan untuk masing-masing perlakuan P1, P2 dan P3 adalah 8,29 mg/20 g BB; 23,98 mg/20 g BB; dan 25,68 mg/20 g BB. Jarak pemberian minyak buah merah dan paparan timah hitam adalah satu jam.

Pengamatan Ekspresi *Caspase-8* dan Jumlah Sel *Hofbauer*

Preparat plasenta dibuat pada gelas objek, selanjutnya dicelup dalam *xylol* dua kali, alkohol bertingkat (100%, 90%, 80%, 70%, 30%) dan aquadest. Preparat dicuci dengan *phosphate buffer saline* (PBS) (pH 7,4) sebanyak tiga kali masing-masing selama lima menit. Preparat direndam dalam hidrogen peroksidase (H_2O_2) 3% selama 5-10 menit. Preparat kemudian direndam dengan 1% *bovine serum albumin* (BSA) dalam PBS selama 10-30 menit pada suhu ruangan, ditambahkan antibodi primer anti-*caspase-8* IgG Biotin *labelled* selama satu jam pada suhu ruang. Preparat dicuci dalam PBS pH 7,4 selama 3x5 menit, ditambahkan *streptavidin-horse radish peroksidase* (SA-HRP) selama 30-60 menit pada suhu ruang. Preparat dicuci dalam PBS pH 7,4 selama 3x5 menit kemudian ditambahkan Cromogen 3,3-*diaminbenzidine tetrahydrochloride* (DAB) selama 10-20 menit. Preparat dicuci dengan aquadest selama 3x5 menit pada suhu ruang, ditambahkan *counterstain* (*Methylen Blue*/*Methylen Green*) selama tiga menit. Preparat *dimounting* menggunakan *entellan*, dilakukan pengamatan dengan mikroskop pembesaran 40, 100, 400, 1000 kali. Penentuan jumlah ekspresi *caspase-8* diketahui dari jumlah perubahan warna kecoklatan pada sel plasenta dibandingkan dengan kontrol (Bressenot, 2009).

Pengamatan Jumlah Sel *Hofbauer* dengan Pewarnaan Hematoksin Eosin (HE)

Jaringan plasenta mencit difiksasi dengan buffer formalin 10%. Proses pewarnaan menggunakan pewarnaan HE. Gelas objek direndam ke dalam *xylol* I dan *xylol* II, masing-masing selama dua menit, selanjutnya direndam dalam alkohol absolute 100%, 95%, 90%, 80%, 70%, dan 50% masing-masing selama dua menit. Gelas objek dimasukkan ke dalam pewarnaan HE selama tujuh menit dan dicuci dengan air mengalir dengan tujuan untuk menghilangkan kelebihan zat warna yang tidak diserap. Gelas objek selanjutnya direndam dalam pewarnaan

eosin selama tiga menit dan dicuci kembali menggunakan aquadest. Preparat direndam dalam alkohol 50%, 70%, 85%, 90%, 100%, *xylol* I, *xylol* II masing-masing selama dua menit. Preparat yang sudah jadi diperiksa dengan mikroskop untuk melihat perubahan plasenta secara mikroskopik dan jumlah sel *hofbauer* (Muntha, 2001).

Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis secara non parametrik menggunakan Uji Kruskal-Wallis dan analisis parametrik. Apabila diperoleh hasil signifikan maka dilanjutkan dengan uji Mann Whitney. Data parametrik diuji dengan analisis varian (ANOVA) satu arah dan apabila berbeda nyata dilanjutkan dengan uji Duncan. Analisis dilakukan dengan asumsi populasi yang diuji berdistribusi normal, homogen dan sampel tidak berhubungan satu sama lain.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Perhitungan ekspresi *caspase-8* menggunakan metode semikuantitatif *indeks skala remmele* (ISR) yang dimodifikasi. Hasil uji Mann-Whitney yaitu kelompok K- berbeda nyata dibandingkan dengan kontrol positif ($p < 0,05$), namun tidak berbeda nyata dengan kelompok perlakuan P2 dan P3. Hal itu menunjukkan bahwa pada kelompok perlakuan P2 dan P3 pemberian minyak buah merah berpengaruh terhadap penurunan ekspresi *caspase-8* karena mendekati kontrol negatif, sedangkan kelompok kontrol positif menunjukkan hasil yang berbeda nyata dengan semua kelompok perlakuan ($p < 0,05$), demikian juga kelompok P2 dengan P3 menunjukkan tidak berbeda nyata. Pemberian minyak buah merah sebagai antioksidan pada plasenta mencit bunting sebelum dipapar timah hitam dapat menurunkan ekspresi *caspase-8* pada sel trofoblas plasenta. Ditinjau berdasarkan dosis, terlihat bahwa dosis pada kelompok P2 dan P3 yang menunjukkan pengaruh nyata dapat menurunkan ekspresi *caspase-8* pada sel trofoblas plasenta (Tabel 1 dan Gambar 1).

Hal tersebut menunjukkan bahwa minyak buah merah yang diberikan sebagai senyawa preventif mampu menurunkan ekspresi *caspase-8*. Kandungan antioksidan pada buah merah bersifat *imunosupresor* yang mampu menurunkan ekspresi *caspase-8* pada sel trofoblas plasenta yang diakibatkan oleh paparan timah hitam, sehingga apoptosis sel dapat

Tabel 1. Hasil uji Mann-Whitney ekspresi *caspase-8* sel trofoblas pada mencit bunting yang diberi minyak buah merah sebelum dipapar timah hitam.

Ekspresi <i>Caspase-8</i>	Kelompok	Kelompok Banding	Signifikansi
<i>Caspase-8</i>	K-	K+	0,020*
		P1	0,020*
		P2	0,369
		P3	0,058
<i>Caspase-8</i>	K+	P1	0,076
		P2	0,019*
		P3	0,019*
<i>Caspase-8</i>	P1	P2	0,019*
<i>Caspase-8</i>	P2	P3	0,019*
<i>Caspase-8</i>	P2	P3	0,106

Keterangan : *Signifikansi pada $p < 0,05$

K- : Kontrol negatif, hanya diberi *aquadest*.

K+ : Kontrol positif, pemberian timah hitam 0.011 mg/20 g BB per oral dengan diberi *aquadest* selama kebuntingan hari ke 6-15.

P1 : Kelompok induk mencit bunting yang diberi minyak buah merah 8,29 mg/20 g BB dan dipapar timah hitam selama kebuntingan hari ke-6 sampai 15.

P2 : Kelompok induk mencit bunting yang diberi minyak buah merah 23,98 mg/20 g BB dan dipapar timah hitam selama kebuntingan hari ke-6 sampai 15.

P3 : Kelompok induk mencit bunting yang diberi minyak buah merah 25,68 mg/20 g BB dan dipapar timah hitam selama kebuntingan hari ke-6 sampai 15.

Tabel 2. Rataan jumlah sel *hofbauer* pada plasenta mencit bunting yang diberi minyak buah merah sebelum dipapar timah hitam.

Perlakuan	Jumlah Sel <i>Hofbauer</i> (X±SD)
Kontrol Negatif (K-)	2.40 ^a ± 1.143
Kontrol Positif (K+)	11.15 ^b ± 5.082
Perlakuan 1 (P1)	7.59 ^b ± 1.291
Perlakuan 2 (P2)	3.40 ^a ± 0.500
Perlakuan 3 (P3)	2.75 ^a ± 0.476

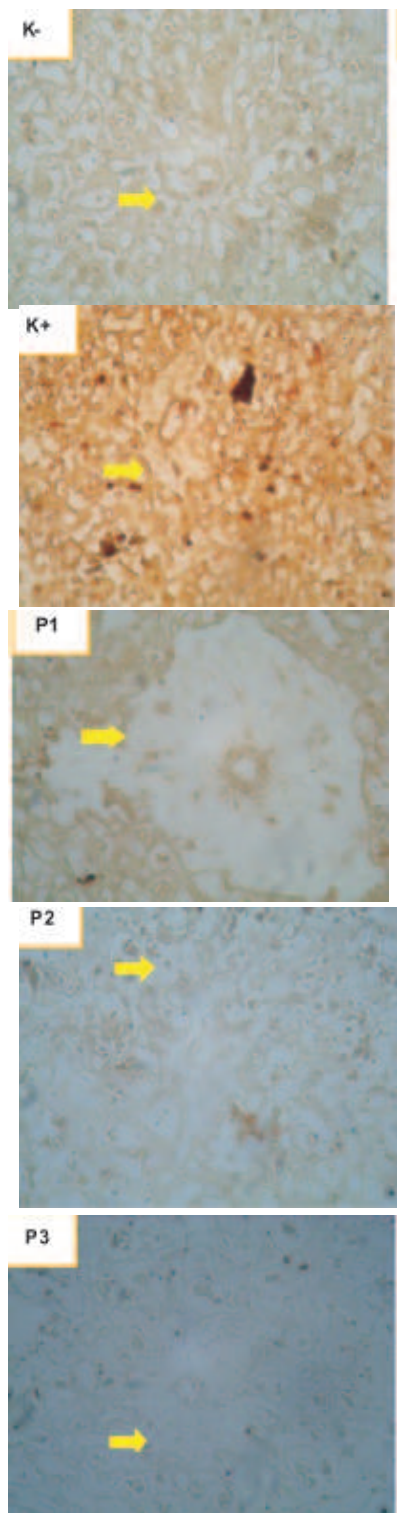
Keterangan: Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($p < 0,05$).

menurun dan sel trofoblas normal akan meningkat. Buah merah yang mengandung karotenoid dan tokoferol mampu menurunkan ekspresi *caspase-8* sebagai indikator terjadinya apoptosis jalur ekstrinsik. Kandungan antioksidan pada buah merah dapat menurunkan konsentrasi proinflamatori sitokin TNF-Q yang terjadi melalui penghambatan ROS dan menghambat sintesis lipid peroksidase. Menurut Agarwal *et al.* (2012) karotenoid mampu menurunkan sekresi sitokin anti-inflamatori.

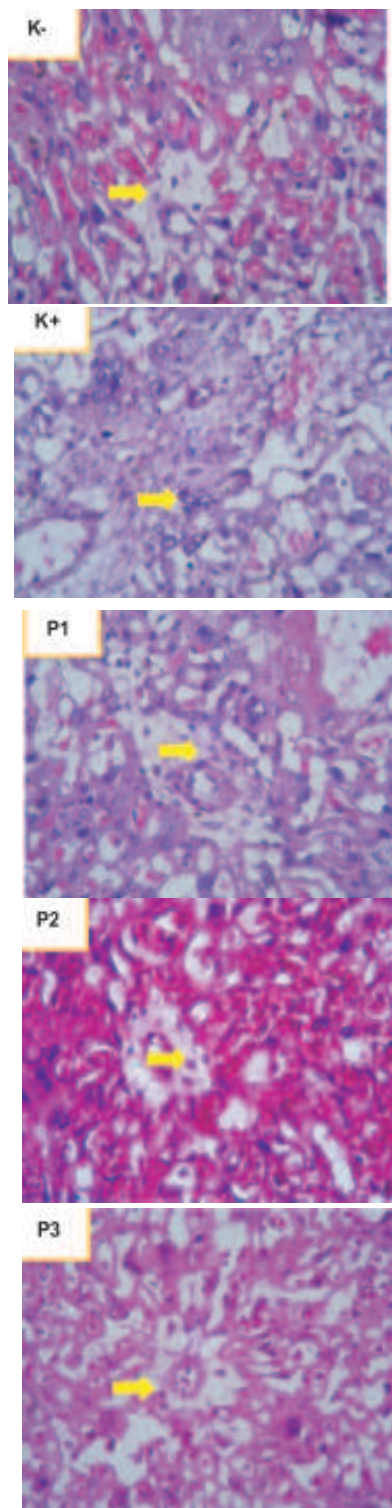
Hasil uji Duncan terhadap jumlah sel *hofbauer* menunjukkan bahwa pada kelompok K- memberikan perbedaan yang signifikan dengan kelompok K+, sedangkan kelompok K- dengan kelompok perlakuan P2 dan P3 memberikan perbedaan yang tidak signifikan. Kelompok K+ memberikan perbedaan yang signifikan dengan kelompok perlakuan P2 dan P3, namun tidak signifikan dengan kelompok perlakuan P1 (Tabel 2 dan Gambar 2).

Jumlah sel *hofbauer* meningkat ketika terjadi proses patogenesis sebagai reaksi inflamasi. Apabila plasenta terpapar radikal bebas, maka jumlahnya akan lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol. Pada penelitian ini sumber radikal bebas berasal dari logam berat timah hitam. Menurut Karakaya dan Ozer (2013) sel *hofbauer* berperan pada banyak reaksi biologis plasenta seperti keseimbangan cairan, imunologik, dan proses inflamatori. Efek biologik lainnya yaitu sel *hofbauer* berhubungan dengan reaksi imunologi yang berfungsi sebagai jaringan makrofag oleh ekspresi *human leukocyte antigen* (HLA) kelas II antigen dan sekresi interleukin-1 (IL-1).

Buah merah yang diberikan sebelum paparan timah hitam mampu menurunkan jumlah sel *hofbauer*. Buah merah utamanya tokoferol mampu menghambat produksi sitokin



Gambar 1. Tanda panah menunjukkan hasil pengamatan ekspresi *caspase-8* menggunakan mikroskop cahaya pembesaran 400 kali dengan pewarnaan IHK. K-) Gambaran normal histopatologi plasenta mencit bunting. K+) Menunjukkan ekspresi *caspase-8* yang tinggi. P1) Menunjukkan ekspresi *caspase-8* mendekati K+. P2) dan P3) Menunjukkan ekspresi *caspase-8* yang lebih rendah dibandingkan K+ dan P1



Gambar 2. Tanda panah menunjukkan hasil pengamatan sel *hofbauer* menggunakan mikroskop cahaya pembesaran 400 kali dengan pewarnaan HE. K-) Gambaran normal histopatologi plasenta mencit bunting. K+) Menunjukkan jumlah sel *hofbauer* yang tinggi. P1) Menunjukkan jumlah sel *hofbauer* mendekati K+. P2) dan P3) Menunjukkan jumlah sel *hofbauer* yang lebih rendah dibandingkan K+ dan P1

proinflamatori melalui penghambatan ROS. Tokoferol menekan ekspresi dari molekul adhesi pada sel endotel dan ligand pada sel *hofbauer* serta mengurangi interaksi adesif. Tokoferol juga menghambat produksi kemokin yang dihasilkan oleh sel *hofbauer* (Meydani, 2001).

Mekanisme karotenoid dalam menekan ekspresi *caspase-8* dan jumlah sel *hofbauer* yaitu mencegah terbentuknya lipid peroksidase dan mengikat radikal bebas. Karotenoid sebagai antioksidan sangat penting untuk mengikat radikal bebas (Mates, 2000). Karotenoid memecah singlet oksigen dan radikal peroksil yang dihasilkan oleh timah hitam. Di antara beberapa radikal yang terbentuk akibat oksidatif pada suatu organisme, karotenoid lebih efisien dengan radikal peroksi yang dihasilkan dalam proses lipid peroksidase. Aktivitas antioksidan karotenoid berkaitan deaktivasi dari radikal peroksi kemungkinan tergantung pada susunan radikal (Stahl dan Sies, 2003). Tokoferol mencegah terbentuknya lipid peroksida pada membran dengan cara merusak rantai radikal bebas. Tokoferol dapat menghentikan lipid peroksida dengan cara menyumbangkan satu atom hidrogennya dari gugus OH pada lipid peroksil yang bersifat radikal sehingga lipid peroksida kurang reaktif dan tidak merusak sel. Sajitha *et al.* (2010) melaporkan bahwa tokoferol yang diberikan pada tikus akibat paparan timah hitam mampu menetralkan efek buruk timah hitam dengan cara memecah radikal bebas dan mencegah terjadinya stres oksidatif.

SIMPULAN

Pemberian buah merah dapat menurunkan ekspresi *caspase-8* dan jumlah sel *hofbauer* pada plasenta mencit bunting sebelum dipapar timah hitam yang berarti menekan terjadinya apoptosis.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian lanjutan berkaitan biokompatibiliti pemberian buah merah pada plasenta mencit bunting sebelum dipapar timah hitam, di samping penelitian lanjutan berkaitan dengan purifikasi buah merah untuk melihat kemurniannya.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada ketua proyek penelitian Dr. Widjiati, drh., M.Si atas fasilitas yang diberikan untuk penelitian. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada mereka yang telah memberi saran dan bimbingannya sampai selesainya penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Agarwal M, Royapuram PH, Hannah RV, Dipak KD. 2012. Dynamic Action of Carotenoids in Cardioprotection and Maintenance of Cardiac Health. *Journal Molecules* 17(4): 4755-4769.
- Bressenot, A., S. Marchal, L. Bezdetnaya, J. Garrier, F. Gullemin and F. Plenat. 2009. Assessment of Apoptosis by Immunohistochemistry to Active Caspase-3, Active Caspase-7, or Cleaved PARP in Monolayer Cells and Spheroid and Subcutaneous Xenografts of Human Carcinoma. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 57(4): 289-300
- Chang MY, Pollard JW, Khalili H, Goyert SM, Diamond B. 1993. Mouse Placental Macrophages Have A Decreased Ability to Present Antigen. *JSci USA* 90: 462-466.
- Isradji I. 2010. Pengaruh Pemberian Pb-Asetat Terhadap Fertilitas Mencit Jantan, Dimonitor Melalui Jumlah Kebuntingan dan Jumlah Anak Sekelahiran. *Journal Of The Medical Research Institute* 2 (2).
- Karakaya YA, Ozer E. 2013. The Role of Hofbauer Cells on The Pathogenesis of Early Pregnancy Loss. *Journal of Pathology* 34(12): 1211-5.
- Macdonald J, Galley HF, Webster NR. 2003. Oxidative Stress and Gene Expression in Sepsis. *British Journal of Anaesthesia* 90(2): 221-232
- Madyawati SP, Rimayanti. 2013. Efektivitas Terapi Rat Bone Marrow Stem Cell pada Tikus (*Rattus Novergicus*) Model Teratogenik Particulat Matter Terhadap Cacat Kongenital, Ekspresi TNF α , Kadar Progesteron dan Apoptosis Plasenta [Laporan Penelitian]. Surabaya. Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga.

- Mates JM. 2000. Effects of Antioxidant Enzymes in The Molecular Control of Reactive Oxygen Species Toxicology. *Journal Toxicology* 153(1-3): 83-104.
- Meydani M. 2001. Symposium: Molecular Mechanisms of Protective Effects of Vitamin E in Atherosclerosis. *Journal of Nutritional* 131: 366S-368S
- Muntha M. 2001. Teknik Pembuatan Preparat Histopatologi dari Jaringan Hewan dengan Pewarnaan Hematoksilin dan Eosin (H&E)
- Palupi IA, Martanto M. 2009. Buah Merah : Potensi dan Manfaatnya sebagai Antioksidan. *Journal of Indonesian Medicinal Plant* 2(1).
- Papanikolaou NC, Eleftheria GH, Stamatis B, George NT, Aristidis MT. 2005. Lead Toxicity Update. *Med Sci Monit* 11(10): 329-336
- Sajitha, G. R., R. Jose, A. Andrews, K. G Ajantha, P. Augustine And K. T. Augusti. 2010. Garlic Oil and Vitamin E Prevent The Adverse Effects of Lead Acetate and Ethanol Separately As Well As in Combination in The Drinking Water of Rats. *Indian Clin Biochem* 25: 280–288
- Stahl W, H. Sies. 2004. Bioactivity and Protective Effects of Natural Carotenoids. *Journal Biochimica Et Biophysica Acta* 1740: 101–107.
- Widjiati. 1997. Pengaruh Fosfat, Glukosa dan Kombinasinya dalam Medium Kultur In-Vitro Terhadap Perkembangan Embrio Mencit [Tesis]. Bogor. Institut Pertanian Bogor.