



Pengaruh Pemberian Extra Virgin Olive Oil terhadap jumlah Sel Granulosa dan Kadar 17 Estradiol Tikus yang di Papar Rhodamin B



¹Fera Yuli Setyaningsih, ²Pande Made Dwi Jayasa, ³Hidayat Sujuti, ⁴Diah Prabawati Retnani

^{1,2} Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya Malang

^{3,4} Fakultas Kedokteran, STIKES Insan Cendekia Medika Jombang

Info Artikel

Abstrak

Sejarah Artikel:

Diterima, 24/10/2018

Disetujui, 28/12/2018

Di Publikasi, 28/12/2018

Kata kunci:

Pengetahuan, Perilaku, luka Diabetik, kekambuhan, sel granulosa, 17 estradiol, rhodamin B, stress oksidatif

Penambahan pewarna tersebut akan berdampak pada kesehatan. Penelitian bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian extra virgin olive oil terhadap jumlah sel granulosa dan kadar 17 estradiol pada *Rattus norvegicus* yang dipapar rhodamin B. Metode: Desain penelitian ini true experimental dengan pendekatan *post test control group design*. Subyek penelitian 30 ekor tikus putih *Rattus norvegicus* umur 12 minggu berat rata-rata 220 gram dan kondisi sehat. Tikus dibagi dalam 5 kelompok. Kelompok kontrol tanpa perlakuan, kontrol positif perlakuan dengan rhodamin B 18 mg/200gr. Perlakuan 1 pemberian rhodamin B 18 mg/200gr dan EVOO 1,5 ml/KgBB, perlakuan 2 pemberian rhodamin B 18 mg/200gr dan EVOO 3 ml/KgBB, perlakuan 3 pemberian rhodamin B 18 mg/200gr dan EVOO 4,5 ml/KgBB. Jumlah sel granulosa ditentukan dengan pewarnaan HE, kadar 17 estradiol dengan ELISA. Data dianalisis menggunakan uji Kruskal Wallis, Rank Spearman dan Regresi Linier Sederhana dengan derajat kemaknaan < 0.05. Hasil: Rata-rata jumlah sel granulosa dan kadar 17 estradiol terendah terdapat pada kelompok kontrol positif dan rata-rata tertinggi terdapat pada kelompok perlakuan 3. Terdapat satu dosis yang bisa secara signifikan bisa meningkatkan sel granulosa dan kadar 17 beta estradiol dibandingkan dengan kelompok perlakuan yang lain dengan nilai < 0.05. Kesimpulan: pemberian EVOO mempengaruhi jumlah sel granulosa ovarium dan kadar 17 estradiol pada tikus yang dipapar rhodamin B.

✉ Correspondence Address:

Universitas Brawijaya Malang - East Java, Indonesia

Email: fera.yuli@gmail.com

This is an Open Access article under

The CC BY-SA license (<http://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>)

DOI: [10.26699/jnk.v5i3.ART.p241-248](https://doi.org/10.26699/jnk.v5i3.ART.p241-248)

P-ISSN : 2355-052X

E-ISSN : 2548-3811

The Effectiveness of the Administration of Extra Virgin Olive Oil to the Number of Granulosa Cell and 17 β Estradiol Level of Rats Exposed by Rhodamin B

Article Information

Abstract

History Article:

Received, 24/10/2018

Accepted, 28/12/2018

Published, 28/12/2018

Keywords:

Granulosa Cells, Estradiol,
Rhodamin B, Oxidative Stress

*The addition of the dye will have an impact on health. The aim of this research was to know the effectiveness of the administration of extra virgin olive oil to the number of granulosa cell and 17 β estradiol level of Rats exposed by rhodamin B. The design of this study was true experimental with post test approach of group design control. The subject of the study was 30 white mice *Rattus novergicus* in the age of 12 weeks weight average 220 grams and in healthy condition. Rats were divided into 5 groups. Control group without treatment, positive control treatment with rhodamine B 18 mg / 200gr. Treatment 1 administration of rhodamine B 18 mg / 200gr and EVOO (Extra Virgin Olive Oil) 1.5 ml / KgBB, treatment 2 rhodamine B 18 mg / 200gr and EVOO 3 ml / KgBB, treatment 3 rhodamine B 18 mg / 200gr and EVOO 4,5 ml / KgBB. The number of granulosa cells was determined by HE staining, the level of 17 β estradiol with ELISA. The data was analyzed by Kruskal Wallis test, Spearman Rank and Simple Linear Regression with degree of significance $\alpha < 0.05$. The average number of granulosa cells and the lowest levels of 17 β estradiol were found in the positive control group and the highest average was in the treatment group 3. There was one dose that could significantly increase granulosa cells and the beta estradiol levels compared with the treatment group the other with niali $\alpha < 0.05$. The administration of EVOO affected the number of granulosa cells and the levels of 17 β estradiol in rats exposed by rhodamine B.*

PENDAHULUAN

Infertil merupakan suatu hasil biologik suami istri yang tidak menghasilkan kehamilan dan kelahiran bayi (Rahmatullah, 2016). Frekuensi dan penyebab infertilitas bervariasi, 40%–50% etiologi infertilitas yang sudah diteliti adalah karena penyebab dari perempuan (Duckitt, 2003). Infertilitas yang disebabkan oleh faktor pria 30%, infertilitas yang disebabkan oleh faktor dari pria dan wanita yaitu 20–30%, infertilitas yang tidak dapat dijelaskan 15% (De Cherney *et al.*, 2003). Berdasarkan hasil penelitian penyebab infertilitas berhubungan dengan pihak istri adalah tuba, penyebab yang tidak diketahui, masalah yang berhubungan dengan menstruasi, uterus, ovarium dan kelainan seksual (Roupa *et al.*, 2008). Penyebab infertilitas yang paling sering dilaporkan adalah masalah ovarium (39,7%) (Kazemijalish *et al.*, 2015). Gangguan ovulasi disebabkan oleh gangguan folikulogenesis, folikel tidak berkembang dan mengalami atresia. Atresia pada folikel disebabkan oleh adanya apoptosis (Karuputhula *et al.*, 2012). Apoptosis folikel disebabkan rendahnya kadar estradiol yang mempengaruhi proses ovulasi (Djuwantono *et al.*, 2008). Peroksida lipid menyebabkan terjadinya atresia pada folikel (Devine *et al.*, 2012).

Radikal bebas eksogen berasal dari lingkungan yang tercemar oleh beberapa zat kimia misalnya asap kendaraan, limbah, asap rokok, radiasi sinar UV, ozon dan senyawa kimia beracun (Yuliarti, 2009). Pewarna makanan yang paling banyak digunakan dalam industri makanan adalah rhodamin B. Rhodamin B termasuk dalam pewarna sintesis yang mengandung senyawa kimia beracun berbahaya (Alsuhendra dan Ridawati, 2013). Makanan yang dikonsumsi oleh anak-anak Sekolah dasar di kota Batu adalah 18,5% dari 27 sampel mengandung rhodamin B (Kristianto *et al.*, 2013).

Dampak rhodamin B pada sistem reproduksi tikus melalui stress oksidatif yang berakibat pada menurunnya jumlah folikel, menurunnya kadar 17β -estradiol (Maryanti, *et al.*, 2014). Sel granulosa sangat peka terhadap *spesies oksigen reaktif* (ROS). H_2O_2 termasuk dalam ROS yang mempunyai peranan penting dalam apoptosis sel granulosa (Devine *et al.*, 2012). Antioksidan merupakan senyawa yang bisa menghambat proses oksidasi dalam tubuh (Handrawan, 2012).

Zaitun termasuk dari lima makanan yang kaya akan kandungan polifenol yang memiliki manfaat untuk kesehatan (Roder, 2016). Polifenol dari *extra*

virgin olive oil memberikan efek protektif dan manfaat sebagai antioksidan. Efek biologis *in vivo* dari makanan yang kaya akan fenolat *extra virgin olive oil*, terutama *hydroxytyrosol*, dipelajari pada tikus (Lopez *et al.*, 2007). Polifenol juga telah terbukti mempengaruhi kesuburan, perkembangan seksual dan kesehatan janin (Chirstina *et al.*, 2015). *Extra Virgin Olive Oil* mengandung 36 polifenol, EVOO mengandung 6 polifenol (Morris, 2015). Dengan Latar belakang ini, tujuan dari penelitian ini adalah untuk menilai efek protektif EVOO sebagai antioksidan pada tikus betina yang diberi paparan rhodamin B.

Tujuan penelitian ini adalah untuk membuktikan pengaruh pemberian *extra virgin olive oil* terhadap jumlah sel granulosa ovarium pada tikus yang dipapar rhodamin B. Membuktikan pengaruh pemberian *extra virgin olive oil* terhadap kadar 17β estradiol pada tikus yang dipapar rhodamin B. Membuktikan pengaruh peningkatan dosis *extra virgin olive oil* terhadap jumlah sel granulosa ovarium pada tikus yang dipapar rhodamin B. Membuktikan pengaruh peningkatan dosis *extra virgin olive oil* terhadap kadar 17β estradiol pada tikus yang dipapar rhodamin B

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini menggunakan desain *true experimental* dengan pendekatan *post test control group design*. Penelitian dilakukan di laboratorium farmakologi, patologi anatomi dan biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Subyek penelitian ini adalah tikus putih *Rattus norvegicus* usia 12 minggu berat rata-rata 220 gram yang berjumlah 30 ekor yang terbagi dalam 5 kelompok perlakuan ($n = 6$). Aklimatisasi dilakukan selama 15 hari setelah aklimatisasi tikus kemudian di kelompokkan secara random. Kelompok kontrol tanpa perlakuan apapun, kelompok kontrol positif dengan pemberian rhodamin B dosis 18 mg/200 gr, kelompok perlakuan 1 dengan pemberian rhodamin B 18 mg/200gr dan EVOO 1,5 ml/KgBB, kelompok perlakuan 2 dengan pemberian rhodamin B 18 mg/200gr dan EVOO 3 ml/KgBB, kelompok perlakuan 3 dengan pemberian rhodamin B 18 ml/200gr dan EVOO 4,5 ml/KgBB.

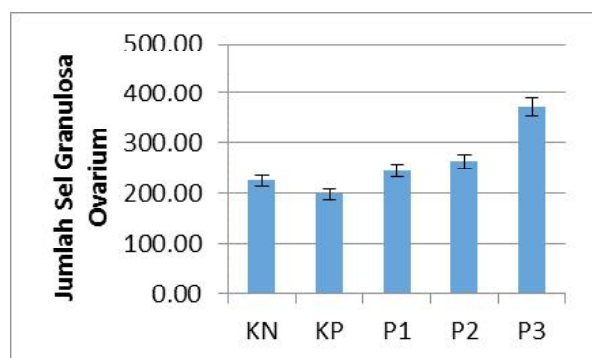
Rhodamin B *vetecTM regent grade* yang dibeli dari perusahaan Sigma-Aldrich. EVOO yang digunakan adalah dengan presentase murni 100% minyak zaitun murni merk Borges. Setelah perlakuan 36 hari dilakukan pemeriksaan apusan vagina untuk menentukan estrus tikus. Pembedahan dilaku-

kan pada saat tikus pada fase proestrus. Tikus yang akan dibedah terlebih dahulu diinjeksi dengan ketamin dosis 0.2 mg/200 gram secara *intra muscular*. Tikus yang sudah tidak bergerak kemudian dibedah diambil darah sebanyak 3 ml dari bagian jantung dan organ ovarium.

Darah yang sudah diambil kemudian dikirim ke laboratorium biomedik dan diperiksa kadar 17 β estradiol dengan ELISA (ELISA Kit Rat 17 β Estradiol). Ovarium dikirim ke laboratorium patologi anatomi untuk proses pewarnaan HE. Analisa data menggunakan *kruskal wallis, mann whitney* dan *rank spearman*.

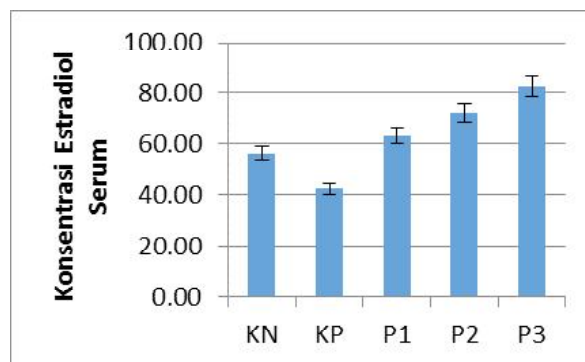
Penelitian ini sudah mendapatkan ijin dari komisi etik Universitas Brawijaya Malang No. 45/EC/KEPK-S2/03/2018.

HASIL PENELITIAN



Gambar 1 Grafik rata-rata jumlah sel granulosa

- KN : Kelompok negatif tanpa paparan apapun
- KP : Kontrol positif pemberian rhodamin B 18 mg/200gr
- P1 : Perlakuan 1 pemberian rhodamin B 18mg/200gr dan EVOO 1,5 ml/KgBB
- P2 : Perlakuan 2 pemberian rhodamin B 18mg/200gr dan EVOO 3 ml/KgBB



Gambar 2 Grafik kadar 17 β Estradiol

- KN : Kelompok negatif
- KP : Kontrol positif
- P1 : Perlakuan 1 pemberian rhodamin B 18mg/200gr dan EVOO 1,5 ml/KgBB
- P2 : Perlakuan 2 pemberian rhodamin B 18mg/200gr dan EVOO 3 ml/KgBB
- P3 : Perlakuan 3 pemberian rhodamin B 18mg/200gr dan EVOO 4,5 ml/KgBB

Analisis Perbedaan

Tabel 1 Uji Normalitas dan Homogenitas Jumlah Sel Granulosa pada Tikus yang Dipapar Rhodamin B dan EVOO

Perlakuan	Rata-rata	Standard Deviasi	Notasi
KN (Tanpa dipapar rhodamin B dan tanpa pemberian EVOO)	225.033	35.987	abc
KP (dipapar rhodamin B, tanpa pemberian EVOO)	198.200	20.658	a
P1 (Rhodamin B 18 mg/200gr, EVOO 1.5 ml/kgBB, lama paparan 36 hr)	244.600	9.556	b
P2 (Rhodamin B 18 mg/200gr, EVOO 3 ml/kgBB, lama paparan 36 hr)	263.350	5.026	c
P3 (Rhodamin B 18 mg/200gr, EVOO 4.5 ml/kgBB, lama paparan 36 hr)	372.467	33.373	d
Signifikansi normalitas	=0.004		
Signifikansi homogenitas	=0.001		

Untuk melihat perbedaannya, dilakukan uji lanjut dengan uji *mann whitney* dengan hasil notasi pada tabel 1 Dari kolom notasi tersebut diperoleh hasil sebagai berikut:

1. Perlakuan KN (abc) berbeda nyata dengan perlakuan P3. Perlakuan KN tidak berbeda nyata dengan perlakuan KP (a), P1 (b), dan P2 (c).

2. Perlakuan KP (a) berbeda nyata dengan P1, P2, dan P3. Perlakuan KP tidak berbeda nyata dengan perlakuan KN.
3. Perlakuan P1 (b) berbeda nyata dengan KP, P2, dan P3. Perlakuan P1 tidak berbeda nyata dengan perlakuan KN.
4. Perlakuan P2 (c) berbeda nyata dengan KP, P1, dan P3. Perlakuan P2 tidak berbeda nyata dengan perlakuan KN.
5. Perlakuan P3 (d) berbeda nyata dengan KP, P1, P2, dan P3.

Tabel 2 Hasil uji Kruskal Wallis Jumlah Sel Granulosa pada Tikus yang Dipapar Rhodamin B dan EVOO

<i>Chi-square</i> hitung	Signifikansi	<i>Chi-square</i> tabel	Kesimpulan
22.585	0.000	9.488	Signifikan

Keterangan: jika nilai $\alpha < 0,05$ maka dapat disimpulkan bahwa data tersebut adalah signifikan. Nilai *chi-square* hitung > Nilai *chi-square* tabel maka data tersebut signifikan.

Tabel 3 Tabel Uji Normalitas dan Homogenitas Kadar 17 β Estradiol pada Tikus yang Dipapar Rhodamin B dan EVOO

Perlakuan	Rata-rata	Standard Deviasi	Notasi
KN (Tanpa dipapar rhodamin B dan tanpa pemberian EVOO)	56.221	13.346	abc
KP (dipapar rhodamin B, tanpa pemberian EVOO)	42.310	11.366	a
P1 (Rhodamin B 18 mg/200gr, EVOO 1.5 ml/kgBB, lama paparan 36 hr)	63.354	2.918	b
P2 (Rhodamin B 18 mg/200gr, EVOO 3 ml/kgBB, lama paparan 36 hr)	72.210	4.184	c
P3 (Rhodamin B 18 mg/200gr, EVOO 4.5 ml/kgBB, lama paparan 36 hr)	82.611	4.232	d
Signifikansi normalitas	=0.313		
Signifikansi homogenitas	=0.006		

Untuk melihat perbedaannya, dilakukan uji *mann whitney* dengan hasil notasi pada Tabel 2. Dari kolom notasi tersebut diperoleh hasil sebagai berikut:

1. Perlakuan KN (abc) berbeda nyata dengan perlakuan P3. Perlakuan KN tidak berbeda nyata dengan perlakuan KP (a), P1 (b), dan P2 (c).
2. Perlakuan KP (a) berbeda nyata dengan P1, P2, dan P3. Perlakuan KP tidak berbeda nyata dengan perlakuan KN.
3. Perlakuan P1 (b) berbeda nyata dengan KP, P2, dan P3. Perlakuan P1 tidak berbeda nyata dengan perlakuan KN.
4. Perlakuan P2 (c) berbeda nyata dengan KP, P1, dan P3. Perlakuan P2 tidak berbeda nyata dengan perlakuan KN.
5. Perlakuan P3 (d) berbeda nyata dengan KP, P1, P2, dan P3.

Tabel 4 Hasil uji kruskal wallis Kadar 17 β Estradiol pada Tikus yang Dipapar Rhodamin B dan EVOO

<i>Chi-square</i> hitung	Signifikansi	<i>Chi-square</i> tabel	Kesimpulan
23.330	0.000	9.488	Signifikan

Keterangan: jika nilai $\alpha < 0,05$ maka dapat disimpulkan bahwa data tersebut adalah signifikan. Nilai *chi-square* hitung > Nilai *chi-square* tabel maka data tersebut signifikan.

Analisis hubungan**Tabel 5 Hasil Analisis korelasi rank spearman jumlah sel granulosa**

Correlation Coefficient	Signifikansi	Kesimpulan
0.964	0.000	Signifikan

Keterangan: Hubungan searah antara dosis dengan angka jumlah Sel Granulosa Ovarium pada taraf nyata 5% ditunjukkan dengan nilai *correlation* yang positif.

Tabel 6 Hasil Analisis korelasi rank spearman EVOO dan 17 β Estradiol

Correlation Coefficient	Signifikansi	Kesimpulan
0.964	0.000	Signifikan

Keterangan: Hubungan searah antara dosis dengan angka konsentrasi estradiol Serum pada taraf nyata 5% ditunjukkan dengan nilai *correlation* yang positif.

Analisis Pengaruh**Tabel 7 Uji Regresi Linier Sederhana EVOO dengan Jumlah Sel Granulosa**

Variabel	B	t _{hitung}	Signifikansi	Keterangan
Konstanta	188.422			
dosis evoo (X)	36.103	10.267	0.000	Signifikan
α		=0.050		
Koefisien Determinasi (R ²)		=0.827		
t tabel (0.05,22)		=2.074		

Tabel 8 Uji Regresi Linier Sederhana Extra Virgin Olive Oil dengan Kadar 17 β Estradiol

Variabel	B	t _{hitung}	Signifikansi	Keterangan
Konstanta	45.657			
dosis evoo (X)	8.651	10.087	0.000	Signifikan
α		= 0.050		
Koefisien Determinasi (R ²)		= 0.822		
t tabel (0.05,22)		= 2.074		

Berdasarkan Tabel 1 bisa dijelaskan bahwa rata-rata yang paling tinggi jumlah sel granulosa terdapat pada kelompok perlakuan 3 yaitu 372.467±33.373, dan rata-rata angka jumlah sel granulosa ovarium terendah pada kelompok perlakuan positif (KP) yaitu sebesar 198.200±20.658. gambar 2 menunjukkan bahwa rerata kadar 17 β estradiol tertinggi terdapat pada kelompok perlakuan 3 sebesar 82.611±4.232, dan rata-rata kadar 17 β Estradiol Serum terendah pada kelompok kontrol positif yaitu sebesar 42.310±11.346.

Hasil uji *Kruskal Wallis* nilai $\alpha < 0.05$ bisa disimpulkan bahwa terdapat perbedaan signifikan rerata jumlah sel granulosa dan kadar 17 estradiol pada setiap kelompok perlakuan. *Rank Spearman*

diperoleh nilai $\alpha < 0.05$ yang berarti terdapat hubungan yang signifikan antara dosis dengan jumlah sel granulosa dan Estradiol Serum pada tikus yang dipapar rhodamin B. Hubungan searah antara dosis dengan angka konsentrasi estradiol serum dan jumlah sel granulosa pada taraf nyata 5% ditunjukkan dengan nilai *correlation* yang positif.

Berdasarkan uji regresi linier sederhana pada tabel 7 variabel X (dosis EVOO) memiliki statistik uji t sebesar 10.267 dengan signifikansi sebesar 0.000. Nilai |t_{hitung}| lebih besar dari t tabel, dan nilai *signifikan* t lebih kecil dari α (0.05). Sehingga variabel dosis berpengaruh positif dan signifikan terhadap variabel jumlah Sel Granulosa. Tabel 8 didapatkan bahwa variabel X (dosis EVOO) memi-

liki statistik uji t sebesar 10.087 dengan signifikansi sebesar 0.000. Nilai $|t \text{ hitung}|$ lebih besar dari t tabel, dan nilai *signifikan* t lebih kecil dari α (0.05). Variabel dosis berpengaruh positif dan signifikan terhadap kadar 17β estradiol.

PEMBAHASAN

Hasil penelitian rhodamin B dan EVOO pada kelompok penelitian memiliki perbedaan dimana kelompok positif memiliki jumlah sel granulosa dan kadar 17β estradiol paling rendah dibandingkan dengan kelompok yang lain. Jumlah sel granulosa dan kadar 17β estradiol tertinggi terdapat pada kelompok perlakuan 3.

Rhodamin B mengandung senyawa kimia klorin yang bersifat reaktif, jika klorin tersebut tertelan maka akan meracuni tubuh (BPOM, 2012). Rhodamin B yang masuk ke dalam tubuh bisa merusak sel dengan cara menembus sel dan tertimbun di mitokondria sehingga mengakibatkan gangguan sistem pernapasan sel yang pada akhirnya akan meningkatkan ROS (Mottram *et al.*, 2012).

Rhodamin B juga meningkatkan terjadinya apoptosis sel di hipotalamus sehingga berdampak pada keseimbangan hormon pada tikus (Sulistina *et al.*, 2014).

Berdasarkan penelitian Mariyanti *et al* (2014), zat kimia yang terkandung dalam rhodamin B menyebabkan terjadinya penurunan kadar 17β estradiol pada kelompok positif dari pada kelompok negatif. Berdasarkan penelitian Lai, et al (2017) menunjukkan bahwa adanya peningkatan ROS pada sel granulosa mempengaruhi apoptosis sel sehingga akan berdampak pada kualitas oosit. Liu (2010) menyatakan bahwa adanya peningkatan kadar MDA berpengaruh pada apoptosis sel granulosa ovarium. Kadar MDA merupakan senyawa reaktif sebagai tanda terjadinya stres oksidatif yang terjadi dalam tubuh.

EVOO mengandung asam lemak tak jenuh tunggal yang tinggi termasuk asam oleat, asam oleat adalah kelompok dari famili minyak yang kaya akan asam lemak tak jenuh polifenol (Berrougui *et al.*, 2015). EVOO memiliki peran sebagai antioksidan karena mempunyai sifat biologi yang bisa menghambat terjadinya proses oksidasi. Olive phenols adalah bagian dari EVOO yang berfungsi sebagai penghambat oksidasi, bertindak sebagai pemutus rantai dengan cara menyumbangkan radikal-radikal yang diproduksi oleh oksidasi lipid dan pembentukan turunan stabil selama proses reaksi (Servili *et al.*,

2013). EVOO kaya biophenol (366 mg / kg) memodulasi keseimbangan antara GSH dan glutathion teroksidasi (GSSG). Dengan demikian, EVOO biophenol memberikan efek antioksidan sebagai bagian dari induksi Nrf2 (Kouka *et al.*, 2017).

Pemberian EVOO bisa menyebabkan peningkatan rata-rata jumlah sel granulosa dan kadar 17β estradiol pada tikus yang di papir rhodamin B. Hal itu disebabkan karena EVOO mempunyai sifat sebagai antioksidan yang diperankan oleh olive phenol. Adanya antioksidan didalam tubuh akan menghambat atau bahkan bisa mencegah terjadinya stress oksidatif yang disebabkan oleh zat-zat radikal yang bisa merusak fungsi sel. Efek antioksidan yang terdapat dalam EVOO berperan penting sebagai penghambat terjadinya ROS.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Pemberian EVOO berpengaruh pada jumlah sel granulosa dan kadar 17β estradiol dengan nilai signifikansi. Peneliti selanjutnya disarankan untuk meneliti pengaruh pemberian EVOO dan CVO.

Saran

Penelitian ini membuktikan bahwa Efek antioksidan yang terdapat dalam EVOO berperan penting sebagai penghambat terjadinya ROS. Sehingga disarankan untuk meneliti ke subyek manusia atau dosis EVOO ditambahkan lg pada tikus yang terpapar Rhodamin B

DAFTAR PUSTAKA

- Alsuhendra dan Ridawati (2013). *Bahan Toksik Dalam Makanan*. Bandung: PT. Remaja Rosdakarya.
- Berrougui, H., Ikhlef, S. dan Khalil, A (2015). Extra Virgin Olive Oil Polyphenols Promote Cholesterol Efflux and Improve HDL Functionality. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*. Vol. 15. 1-9.
- BPOM. (2012). *Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia Nomor HK.03.1.33.12.12.8915 Tahun 2012 tentang Penerapan Pedoman Cara Pembuatan Obat yang Baik*. Jakarta: Badan Pengawas Obat dan Makanan.
- Christina, L., Lelievre, J.Y., Ferraro, Z.M., Arnason, J.T., Ferrier, J., dan Gruslin, A (2015). The effects of dietary polyphenols on reproductive health and early development. *Human Reproduction Update*. 21(2). 228-248.
- DeCherney (2003). *Anatomy of the Female Reproduction System*. In: *Current Diagnosis and Treatment*

- Obstetrics & Gynecologist*. 10th edition. New York: McGraw Hill Companies.
- Devine, P.J., S.D. Perreault, and U. Luderer. (2012). Roles of Reactive Oxygen Species and Antioxidant in Ovarian Toxicity. *Biology of Reproduction Journal* 86(2):27.
- Duckitt, K. (2003). Infertility and Subfertility. *Clin Evid*. 2044-20733.
- Djuwantono, T., Hartanto, B., dan Wiryawan, P. (2008). *Step By Step Penanganan Endokrinologi Reproduksi dan Fertilitas Dalam praktik Sehari-hari*. Jakarta: Sagung.
- Handrawan. (2012). *Keajaiban Antioksidan*. Jakarta : PT. Gramedia Pustaka Utama.
- Karuputhula, N.B., Chattopaghyay, R., Chakravarty, B., dan Chaudhury, K. (2012). Oxidative status in granulosa cell of infertile women undergoing IVF. *System Biology in Reproductive Medicine*. 1-8.
- Kazemijaliseh, H., Tehrani, F.R., Gandevani, S.B., Hosseinpanah, F., Khalili, D., dan Azizi, F. (2015). The prevalence and causes of primary infertility in Iran: A population based study. *Global Journal of Health Science*. 7(6). 206-232.
- Kouka, P., Priftis, A., Stagos, D., Angelis A., Stathopoulos, P., Xinos, N., Skaltsounis, A.L., Mamoulakis, C., Tsatsakis, A., Spandidos, D.A. dan Kouretas, D. (2017). Assessment of the antioksidan Activity of an Olive Oil Total Polyphenolic Fraction and Hydroxytyrosol from a Greek *Olea europea* Variety in Endothelial Cell and Myoblasts. *International Journal of Molecular Medicine*. 40. 703-712.
- Kristianto, Y., Riyadi, D.B. dan Mustafa, A (2013). Faktor Determinan Pemilihan Makanan Jajanan pada Siswa Sekolah Dasar. *Jurnal*.
- Lai, Q., Xiang, W., Li, Q., Zhang, H., Li, Y., Zhu, G, Xiong, C. dan Jin, L. (2017). *Oxidative Stress in Granulosa Cells Contribute to Poor Oocyte Quality and IVF-ET out come in Women with Polycystic Ovary Syndrome*. Tronsters of Medicine. PMID: 29260383.
- Liu, J. dan Li, Y. (2010). Effect Oxidative Stress and Apoptosis in Granulosa Cells on the Outcome of IVF-EF. *Journal of Central South University Medical Sciences*. 35(9). 990-994
- Lopez, M.J.O., Berna, G., Carneiro, E.M., Serrana, H.L.G., Martin, F. dan Lopez, C. (2007). An Extra-Virgin Olive Oil Rich in Polyphenolic Compounds Has Antioxidant Effects in Of1 Mice. *Journal of Ntrition*. 138. 1074-1078.
- Maryanti, S.A., Suciati, S., Wahyuni, E.S., Santoso, S., dan Wiyasa, I.W.A. (2014). Rhodamin B Triggers Ovarian Toxicity Through Oxidative Stress. *Cucurova Medical Journal*. 39(3). 451-457.
- Morris, Traccy. (2015). Fat Face Off : *Extra Virgin Olive Oil VS Virgin Coconat Oil*. <https://blog.fitbit.com/fat-face-off-olive-oil-vs-coconut-oil>. Diakses tanggal 7 Februari 2018.
- Mottram, Laurie, F., Forbes, S., Ackley, Brian, D., and Peterson, Blake, R. (2012). Hidrophobic Analogues of Rhodamin B and Rhodamin 101 : Potent Flourescent Probes of Mitochondria in Living C. *Elegans*. 8. 2156-2165.
- Rahmatullah, Irfan. (2016). *9 Bulan Dibuat Penuh Cinta Dibuai Penuh Harap*. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Roder, Susan M.S (2016). *5 foods containing potentially heart-healthy polyphenols*. <http://www.utsmedicine.org/stories/articles/year-2016/polyphenols.html>. Diakses tanggal 29 Januari 2017.
- Roupa, Z., Polikandrioti, M., Sotiropoulou, P., Faros, E., Koulouri, A., Woznial, G, dan Gourni, M. (2008). Cause of infertility in women at reproductive age. *Health Science Journal*. 3. 80-87.
- Servili, M., Sordini, B., Esposito, S., Urbani, S., Venezziani, G, Maio, Di Ilona., Selvaggini, R., and Taticchi., A. (2013). Biological Activities of Phenolic Compounds of Extra Virgin Olive Oil. *Antioxidant*. 3. 1-23.
- Sulistina, D. R., Ratnawati, R., & Wiyasa, I. W. A (2014). Rhodamine B increases hypothalamic cell apoptosis and disrupts hormonal balance in rats. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 3(3), 180–183. [https://doi.org/10.1016/S2305-0500\(14\)60023-3](https://doi.org/10.1016/S2305-0500(14)60023-3).
- Yuliarti, Nurheti. (2009). *Sehat, Cantik, Bugar dengan Herbal dan Obat Tradisional*. Yogyakarta : Andi Yogyakarta.