

Perbedaan Jumlah Sel Sertoli Pasca Pemberian Ekstrak Etanol Akar Purwoceng (*Pimpinella alpina*)

ANNISA FARAH FADHILAH^{1*}, FITRANTO ARJADI¹, DAN NUR SIGNA AINI GUMILAS¹

¹ Fakultas Kedokteran Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto, Jawa Tengah, Indonesia

* alamat email korespondensi: anfardhilah@gmail.com

Informasi Artikel

Abstrak/Abstract

Kata kunci: Sel sertoli; *paradoxical sleep deprivation*; ekstrak etanol akar purwoceng; stres oksidatif.

Latar belakang: Paradoxical Sleep Deprivation (PSD) adalah salah satu bentuk stres pada hewan coba yang mengakibatkan stres oksidatif. Stres oksidatif mampu menurunkan jumlah sel Sertoli. Ekstrak etanol akar purwoceng mengandung zat aktif untuk proliferasi sel Sertoli yang diharapkan mampu meningkatkan kembali jumlah sel Sertoli. **Tujuan:** Mengetahui perbedaan jumlah sel Sertoli pasca pemberian ekstrak etanol akar purwoceng pada tikus putih jantan yang diberi model stres PSD. **Metode:** Desain penelitian yang digunakan adalah *posttest only with control group*. Tiga puluh ekor tikus dibagi menjadi enam kelompok yaitu kelompok A (kontrol negatif), kelompok B (PSD dengan *sleep recovery* 7 hari), kelompok C (PSD), kelompok D (PSD dengan ekstrak etanol akar purwoceng 16,75 mg/ml/200grBB), kelompok E (PSD dengan ekstrak etanol akar purwoceng 33,50 mg/ml/200grBB), dan kelompok F (PSD dengan ekstrak etanol akar purwoceng 50,25 mg/ml/200grBB). Induksi PSD dilakukan selama 96 jam dan dilanjutkan dengan pemberian ekstrak etanol akar purwoceng selama 7 hari setelah induksi PSD. **Hasil:** Jumlah sel Sertoli kelompok A memiliki rerata tertinggi (29,17±3,58), diikuti oleh kelompok D (28,77±3,16), kelompok E (27,66±2,51), kelompok B (27,45±1,45), kelompok F (27,44±1,71), dan kelompok C (27,29±1,54). Uji Kruskal-Wallis menunjukkan nilai $p=0,858$. **Kesimpulan:** Tidak terdapat perbedaan signifikan rerata jumlah sel Sertoli tikus putih jantan pasca pemberian berbagai dosis ekstrak etanol akar purwoceng.

Keywords: Sertoli cells; *paradoxical sleep deprivation*; ethanol extract of purwoceng roots; oxidative stress.

Background: *Paradoxical Sleep Deprivation (PSD)* is one form of stress models in laboratory animals resulting in oxidative stress. Oxidative stress can decrease the number of Sertoli cells. Ethanol extract of purwoceng roots containing active substances for proliferation of Sertoli cells is expected to increase the number of Sertoli cells. **Objective:** To determine differences in the number of Sertoli cells after administration of ethanol extract of purwoceng roots in male rats after stress model of PSD induction. **Method:** This was an experimental research with *posttest only with control group* design. Thirty rats were divided into six groups: group A (negative control), group B (PSD with 7 days sleep recovery), group C (PSD), group D (PSD with 16.75 mg/ml/200grBB of ethanol extract of purwoceng roots), group E (PSD with 33.50 mg/ml/200grBB of ethanol extract of purwoceng roots), and group F (PSD with 50.25 mg/ml/200grBB of ethanol extract of purwoceng roots). Induction of PSD conducted for 96 hours and followed by administration of ethanol extract of purwoceng roots for 7 days. **Result:** The number of Sertoli cells in group A had the highest rates (29,17±3,58), followed by group D (28,77±3,16), group E (27,66±2,51), group B (27,45±1,45), group F (27,44±1,71), and group C (27,29±1,54). Kruskal-Wallis test showed the value of $p=0,858$. **Conclusion:** There was no significant difference in the mean number of Sertoli cells of male white rats after administration of various doses of ethanol extract of purwoceng roots.

PENDAHULUAN

Di Indonesia, waktu tidur yang kurang merupakan salah satu penyebab terbesar bagi stres kerja. Stres akibat waktu tidur yang kurang pada manusia bisa dianalogikan stres kerja model *Paradoxical Sleep Deprivation* (PSD) pada hewan coba [1]. Gangguan fungsi reproduksi yang

diakibatkan oleh PSD salah satunya adalah penurunan jumlah sel Sertoli sebagai penyokong kehidupan sel germinal [2] oleh karena berkurangnya proliferasi sel Sertoli [3] dan stres oksidatif [4]. Penurunan proliferasi sel Sertoli bisa diakibatkan oleh karena PSD mampu menurunkan kadar hormon yang berguna untuk proliferasi sel Sertoli, yaitu *Follicle Stimulating Hormone* (FSH)

dan *Luteinizing Hormone* (LH) [3]. Sementara itu, stres oksidatif timbul oleh karena PSD mampu meningkatkan jumlah zat radikal bebas [4].

Beberapa kandungan aktif purwoceng yang diharapkan mampu memperbaiki spermatogenesis, dalam hal ini kerusakan sel Sertoli, diantaranya adalah stigmasterol dan β -sitosterol yang dikonversi menjadi testosteron (Te), eurikomalakton dan amarolinda yang bisa memperbaiki membran sel pituitari [5]. Berdasarkan fakta bahwa pemberian stres kerja model PSD mampu menimbulkan kerusakan sampai penurunan jumlah sel Sertoli dan pemberian ekstrak etanol akar purwoceng diharapkan bisa memperbaiki kondisi ini, maka peneliti tertarik untuk meneliti perbedaan jumlah sel Sertoli tikus putih jantan yang diberi model stres PSD pasca pemberian ekstrak etanol akar purwoceng.

EKSPERIMEN

Penelitian ini menggunakan metode eksperimental *post test only with control group design* terhadap tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Wistar. Rancangan Acak Lengkap (RAL) digunakan untuk mengelompokkan hewan coba ke dalam enam kelompok perlakuan. Analisis normalitas data jumlah sel Sertoli dilakukan dengan uji *Saphiro-Wilk* dilanjutkan dengan uji komparatif menggunakan uji *Kruskal Wallis*. Semua uji dilakukan dengan tingkat kepercayaan 95% ($\alpha=0,05$) (Dahlan, 2009).

Material dan Bahan

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Wistar berumur 2-3 bulan, memiliki berat badan 150-250 gram, dalam keadaan sehat sebanyak 30 ekor sesuai besaran sampel dari rumus *Federer* [6].

Alat yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari timbangan analitik, timbangan digital, tangki berisi air ukuran 123 x 44 x 44 cm dengan metode MMPM, kandang tikus ukuran 60 x 30 x 30 cm, set alat bedah, wadah penampung organ testis, seperangkat alat pembuatan sediaan preparat histologi dengan metode parafin dan pewarnaan hematoksin eosin, mikroskop cahaya Nikon Eclipse E100[®], Optilab[®], sonde lambung untuk tikus berukuran 1,5 x 80 mm, gelas ukur 10 ml, dan alat dekapitasi.

Adapun bahan yang digunakan diantaranya pakan hewan cobat pallet 526, minum hewan coba air mineral AQUA, larutan NaCl

fisiologis, larutan *Phosphate Buffer Saline* (PBS), Hematoksin Eosin, ekstrak etanol akar purwoceng, dan aquadest.

Instrumen

Sel Sertoli didapatkan dari testis kanan yang telah dipotong menjadi 3 irisan dengan masing-masing irisan berjarak 10 μ m. Sel Sertoli kemudian dihitung pada 10 tubulus seminiferus yang dipilih secara acak pada tiap potongan testis [7], sehingga total dilakukan perhitungan jumlah sel Sertoli pada 30 tubulus seminiferus/hewan coba dengan perbesaran 400x. Pengamatan dilakukan di Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Unsoed dengan bantuan interobserver menggunakan mikroskop Nikon Eclipse E100[®] yang dilengkapi dengan Optilab[®] dan *software Image Raster v 2.1*. Sebelum data dapat digunakan, terlebih dahulu dilakukan uji validasi dengan menggunakan uji *Spearman*.

Prosedur

Langkah yang dilakukan dalam penelitian ini dijelaskan dalam beberapa tahapan.

Persiapan hewan coba

Hewan coba dibagi menjadi enam kelompok, yaitu A, B, C, D, E, dan F yang terdiri atas lima ekor tikus putih pada tiap kelompok perlakuan. Tiap hewan coba pada kelompok diberi tanda 1, 2, 3, 4, dan 5.

Aklimatisasi hewan coba

Aklimatisasi tikus putih dilakukan dalam kandang tikus selama satu minggu agar tikus putih dapat beradaptasi dengan kondisi laboratorium. Kandang diletakkan dalam tempat dengan suhu ($22 \pm 3^{\circ}\text{C}$) dan kelembaban ($75 \pm 5\%$) yang dipertahankan konstan. Kandang hewan coba memiliki bahan, bentuk, dan ukuran yang sama. Pencahayaan dilakukan dengan 12 jam terang (07.00-19.00) dan 12 jam gelap (19.00-07.00). Pengaturan cahaya dilakukan karena cahaya mempengaruhi fungsi testis tikus putih yang berkaitan dengan pengeluaran hormon melatonin pada saat keadaan gelap [8].

Asupan makanan akan mempengaruhi berat badan dan pertumbuhan hewan coba. Pengendalian dilakukan dengan cara memberi makanan dan minuman pada hewan coba dengan

jenis, jumlah, dan komposisi yang sama secara *ad libitum*. Pemberian nutrisi tikus putih diusahakan cukup karena malnutrisi pada tikus dapat menurunkan FSH, LH, kadar testosteron, dan meningkatkan probabilitas kelainan bentuk sperma [9].

Induksi Paradoxical Sleep Deprivation

Tikus pada kelompok B, C, D, E, dan F dimasukan ke dalam tangki air selama 96 jam untuk diinduksi stres PSD. Selama perlakuan, tikus diberikan makan dan minuman secara *ad libitum*. Tempat pakan terbuat dari bahan alumunium yang digantungkan pada dinding tangki PSD. Setelah induksi PSD, hewan coba pada kelompok B, D, E, dan F diberi waktu *sleep recovery* selama 7 hari. Tikus pada kelompok A tetap berada di kandang selama tikus pada kelompok B, C, D, E, dan F diinduksi PSD. Tikus pada kelompok C langsung diterminasi setelah pemberian induksi PSD.

Pemberian Ekstrak Etanol Akar Purwoceng

Ekstrak etanol akar purwoceng diberikan selama 7 hari pada kelompok D, E, dan F bersamaan dengan *sleep recovery*. Ekstrak etanol akar purwoceng ini dilarutkan dalam aquadest dengan konsentrasi yang berbeda. Dosis I yang digunakan pada kelompok D adalah 16,75 mg/ml/200grBB/hari. Dosis II yang digunakan pada kelompok E adalah 33,5 mg/ml/200grBB/hari. Dosis III yang digunakan pada kelompok F adalah 50,25 mg/ml/200grBB/hari. Untuk kelompok A dan B diberikan placebo berupa aquadest.

Pengambilan testis kanan

Testis kanan diambil setelah tikus putih diterminasi dengan cara inhalasi kloroform dan dekapitasi. Testis kanan dibilas dalam larutan NaCl, ditimbang, kemudian jaringan testis kanan yang diambil dimasukkan ke dalam tabung berisi larutan PBS Formalin untuk diawetkan.

Pembuatan preparat mikroskopis

Testis kanan tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Wistar yang telah difiksasi kemudian diambil sampel potongan dengan ketebalan kurang lebih 5 μ m, lalu diberi pewarnaan HE.

Pengamatan mikroskopis

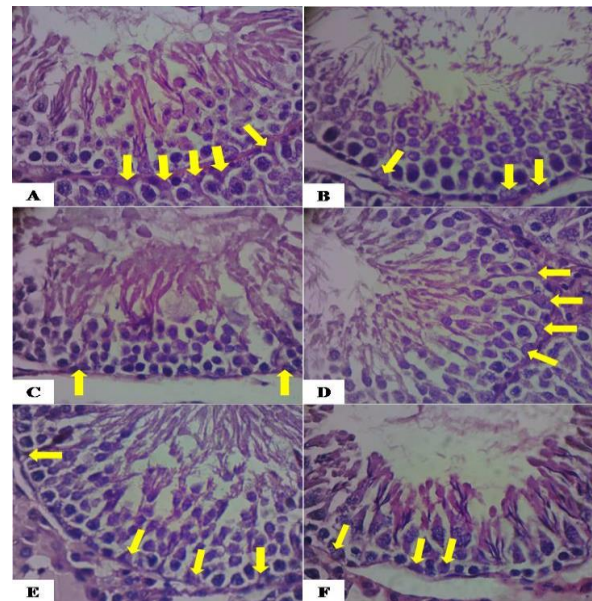
Pengamatan jumlah sel Sertoli dilakukan oleh peneliti dan dibantu oleh interobserver. Sel sertoli diamata pada 10 tubulus seminiferus yang diambil secara acak pada tiap 3 potongan testis masing-masing hewan coba dengan pembesaran 400x. Hasil perhitungan antara peneliti dan *interobserver* diuji secara statistik menggunakan perangkat lunak komputer dengan uji *Spearman*.

Dokumentasi

Dokumentasi data terkait jumlah sel Sertoli.

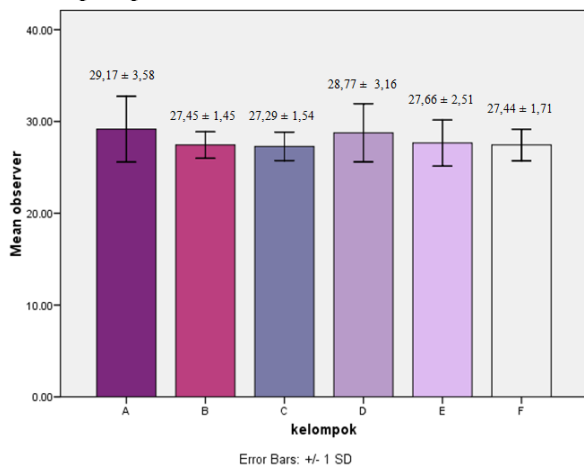
HASIL DAN PEMBAHASAN

Gambaran mikroskopis sel Sertoli pada masing-masing kelompok dapat dilihat pada Gambar 1. Melalui Gambar 1, dapat diamati tidak adanya perbedaan yang cukup signifikan diantara tubulus seminiferus pada masing-masing kelompok kecuali adanya pelepasan pada tubulus seiniferus dengan lamina basalis yang nampak pada kelompok B, C, dan F.



Gambar 1. Hasil Gambaran Histologis Sel Sertoli pada Tubulus Seminiferus. Pewarnaan: HE, Perbesaran 400x. Keterangan: (A) Kelompok A (kontrol negatif); (B) Kelompok B (kontrol positif dengan *sleep recovery*); (C) Kelompok C (kontrol positif tanpa *sleep recovery*); (D) Kelompok D (PSD dan ekstrak etanol akar purwoceng dosis I); (E) Kelompok E (PSD dan ekstrak etanol akar purwoceng dosis II) (F) Kelompok F (PSD dan ekstrak etanol akar purwoceng dosis I); Panah kuning : sel Sertoli dengan inti berbentuk lonjong atau memanjang, mengandung kromatin yang jarang dan halus, dan terlihat nukleolus yang lebih mencolok daripada sel-sel germinal di sekitarnya

Pada **Gambar 2** dapat diamati rerata jumlah sel Sertoli yang paling tinggi dimiliki oleh kelompok A selaku kelompok kontrol negatif dan rerata jumlah sel Sertoli yang paling rendah dimiliki oleh kelompok C selaku kelompok kontrol positif yang diberi induksi PSD, tetapi tidak diberi waktu *sleep recovery*. Di antara ketiga kelompok yang diberikan ekstrak etanol akar purwoceng, kelompok dengan dosis ekstrak etanol akar purwoceng terendah, yaitu kelompok D dengan dosis pemberian sebanyak 16,75 mg/ml/200 gr BB, memiliki rata-rata jumlah sel Sertoli paling tinggi dibandingkan dengan dua kelompok lainnya. Hasil uji normalitas data jumlah sel Sertoli menggunakan *Shapiro-Wilk* menunjukkan ada beberapa kelompok data yang tidak berdistribusi normal ($p < 0,05$). Hasil uji *Kruskal Wallis* didapatkan $p = 0,858$ ($p > 0,05$), yang berarti tidak terdapat perbedaan signifikan rerata jumlah sel Sertoli pada minimal dua kelompok perlakuan.



Gambar 2. Rerata Jumlah Sel Sertoli Pada Enam Kelompok Perlakuan. Keterangan: (A) Kelompok A (kontrol negatif); (B) Kelompok B (kontrol positif dengan *sleep recovery*); (C) Kelompok C (kontrol positif tanpa *sleep recovery*); (D) Kelompok D (PSD dan ekstrak etanol akar purwoceng dosis I); (E) Kelompok E (PSD dan ekstrak etanol akar purwoceng dosis II) (F) Kelompok F (PSD dan ekstrak etanol akar purwoceng dosis III)

Kelompok kontrol positif, yaitu kelompok B dan kelompok C, memiliki rerata jumlah sel Sertoli yang lebih rendah dibandingkan dengan kelompok A selaku kelompok kontrol negatif. Perbedaan ini bisa diakibatkan oleh pemberian stres kerja model PSD yang diberikan pada kelompok kontrol positif. Stres kerja model PSD memiliki efek negatif berupa aktivasi aksis *Hipotalamus Pituitary Axis* (HPA) yang memicu terjadinya stres oksidatif. Aksis HPA yang teraktivasi oleh stres kerja model PSD

menyebabkan terjadinya peningkatan kadar glukokortikoid sistemik [8]. Glukokortikoid yang berlebihan ini akan berikatan dengan reseptor glukokortikoid di hipotalamus untuk meningkatkan efek inhibisi GnIH terhadap sekresi GnRH [9] [10] dan sensitivitas pituitari [9] sehingga terjadi hambatan sekresi FSH, LH, dan Te [10] yang berperan penting dalam memberikan stimulus terhadap kinerja dan proliferasi sel Sertoli [11] [12].

Glukokortikoid diketahui dapat meningkatkan kadar Ca^{2+} mitokondria yang memicu peningkatan pembentukan radikal bebas [13] [14] dan gangguan membran potensial mitokondria [15]. Disfungsi mitokondria yang diakibatkan oleh efek glukokortikoid tersebut akan meningkatkan kadar elektron bebas yang akan bereaksi dengan oksigen molekular membentuk radikal bebas *Reactive Oxygen Species* (ROS). Keberadaan ROS menginduksi permeabilitas membran luar mitokondria [16] dan memicu peroksidase *cardiolipin* di membran dalam mitokondria [17] sehingga mengakibatkan aktivasi *apoptosis caspase cascade* yang berakhir dengan apoptosis sel Sertoli.

Perbedaan yang ada di antara kelompok A, B, dan C tidak signifikan secara statistik. Perbedaan yang tidak signifikan ini dimungkinkan terjadi oleh karena pemberian stres kerja model PSD pada hewan coba belum mampu menurunkan jumlah sel Sertoli secara signifikan mengingat sel Sertoli memiliki berbagai mekanisme defensif terhadap stres oksidatif yang ditimbulkan stres kerja model PSD [18]. Mekanisme defensif sel Sertoli terhadap stres oksidatif adalah berupa keberadaan Laktat Dehidrogenase (LDH) [19] yang mampu menjaga permeabilitas membran sel Sertoli, keberadaan zat antioksidan yang akan mencegah terjadinya peningkatan jumlah ROS di dalam sel Sertoli [20], adanya protein anti-apoptosis yang bekerja secara kompetitif inhibitor dengan protein pro-apoptosis [21], serta mekanisme mitokondria autofag (mitofag) yang mampu mencegah pelepasan sitokrom c dan mencegah terjadinya apoptosis sel Sertoli [18].

Kelompok B yang merupakan kelompok kontrol positif dengan pemberian waktu *sleep recovery* selama tujuh hari memiliki rerata jumlah sel Sertoli yang lebih tinggi daripada kelompok C selaku sesama kelompok kontrol positif yang tidak diberi waktu *sleep recovery* selama tujuh hari. Secara statistik, perbedaan yang ada di antara kelompok B dan kelompok C ini tidak signifikan. Beda yang tidak signifikan antara kelompok B dan C ini bisa diakibatkan oleh keterbatasan proliferasi sel Sertoli pada tikus putih [12]. Keterbatasan

yang terjadi yakni proliferasi sel Sertoli pada tikus terjadi secara masif pada fase-fase tertentu, yaitu fase fetal, fase neonatal, dan fase prepubertal [22]. Apabila bukan pada fase-fase tersebut, maka proliferasi sel Sertoli tidak akan masif dan hanya terjadi pada sel Sertoli yang memiliki reseptor terhadap FSH dan Te [22].

Kelompok D, E, dan F memiliki rata-rata jumlah sel Sertoli yang lebih besar dari kelompok C. Keadaan ini diakibatkan karena pemberian ekstrak etanol akar purwoceng mampu meningkatkan kembali jumlah Te yang berkurang dengan cara mengkonversi Te dari prekursor Te yang dimiliki purwoceng, yaitu stigmasterol dan β -sitosterol [5]. Peningkatan jumlah Te ini akan menurunkan kadar *Caspase₃* yang merupakan protein penginduksi apoptosis. Triterpenoid yang dimiliki purwoceng, yaitu eurikomalakton dan amarolinda, juga mampu memperbaiki aktivitas membran pituitari, sehingga sensitifitas pituitari terhadap GnRH yang dihasilkan oleh hipotalamus meningkat. Peningkatan sensitifitas ini berbanding lurus dengan peningkatan jumlah LH dan FSH yang dikeluarkan oleh pituitari. Hal inilah yang kemudian memungkinkan proliferasi sel Sertoli meningkat kembali [5]. Antioksidan flavonoid dan tanin yang terkandung di dalam ekstrak etanol akar purwoceng juga akan menurunkan kadar ROS sehingga stres oksidatif yang ditimbulkan oleh pemberian stres kerja model PSD akan berkurang [11].

Setelah dilakukan uji statistik, perbedaan yang ada antara kelompok D, E, F dengan kelompok C ternyata tidak signifikan. Perbedaan yang tidak signifikan antara kelompok D, E, dan F dengan kelompok C ini bisa disebabkan oleh karena konversi Te yang kurang maksimal akibat dari berkurangnya cadangan energi pada sel Sertoli setelah pemberian PSD [23] yang dibutuhkan untuk proses konversi Te [24], efek Te hasil konversi yang tidak lebih baik dari Te standar [24], kurangnya efek peningkatan FSH setelah pemberian ekstrak etanol akar purwoceng [5], dan adanya keterbatasan proliferasi sel Sertoli yang hanya terjadi secara masif pada fase-fase tertentu [22].

Di antara ketiga kelompok yang diberi ekstrak etanol akar purwoceng, kelompok D memiliki rerata jumlah sel Sertoli paling tinggi meskipun tidak berbeda secara statistik. Perbedaan yang tidak signifikan secara statistik ini bisa diakibatkan oleh efek *feedback* negatif. Dosis ekstrak etanol akar purwoceng berbanding lurus dengan jumlah Te yang dihasilkan dari konversi stigmasterol dan β -sitosterol [5]. Kadar Te yang semakin meningkat ini akan menstimulasi sel

Sertoli untuk mengeluarkan inhibin sehingga pengeluaran GnRH oleh hipotalamus akan diturunkan [25].

Pemberian stres kerja model PSD selama 96 jam, meskipun belum mampu menurunkan jumlah sel Sertoli secara signifikan, dapat diamati telah menimbulkan kerusakan pada perlekatan antara tubulus seminiferus dengan lamina basalis seperti terlihat pada kelompok B, C, dan F. Pelepasan ini diakibatkan oleh penebalan dan pelipatan lamina basalis. Pelepasan ini juga, apabila terus menerus terjadi, berkolerasi sangat kuat dengan apoptosis sel Sertoli. Sel Sertoli yang terlepas dari lamina basalis akan kehilangan integrin dan laminin yang berakibat pada induksi apoptosis yang semakin besar [7]. Sampai saat ini, belum ditemukan dosis toksik ekstrak etanol akar purwoceng yang bisa mengakibatkan kerusakan pada testis, akan tetapi pemberian ekstrak etanol akar purwoceng sebanyak 50,25 mg/ml/200grBB/hari pada kelompok F bisa mengindikasikan adanya kerusakan pada tubulus seminiferus.

Keterbatasan penelitian ini adalah stres kerja model PSD yang diberikan belum mampu menimbulkan stres oksidatif yang bisa menimbulkan penurunan jumlah sel Sertoli secara signifikan. Hal ini dikarenakan mekanisme defensif sel Sertoli yang cukup besar dalam mencegah terjadinya apoptosis [18]. Pada penelitian ini juga tidak dilakukan pengamatan terhadap apoptosis sel Sertoli yang dapat dilakukan dengan pewarnaan TUNEL. Ekstrak etanol akar purwoceng yang diberikan juga belum mampu meningkatkan kembali jumlah sel Sertoli sehingga didapatkan hasil yang tidak signifikan di antara kelompok kontrol negatif dengan kelompok yang diberi ekstrak etanol akar purwoceng.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian, diperoleh kesimpulan bahwa tidak terdapat perbedaan jumlah sel Sertoli pasca pemberian berbagai dosis ekstrak etanol akar purwoceng pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan yang diberi model stres PSD.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada penyelenggara kegiatan Dana Hibah Bersaing tahun 2013 atas dana penelitian dan dr. Fitranto Arjadi, M.Kes sebagai ketua tim penelitian sekaligus pembimbing bersama dengan dr. Nur Signa Aini Gumilas, M.Biotech yang telah memberikan bimbingan, saran dan nasihat

berkaitan dengan penelitian ini. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada Kepala Laboratorium Patologi Anatomi FK UGM, Kepala Laboratorium Hewan Coba serta Kepala Laboratorium Histologi FK UNSOED sebagai tempat penelitian.

REFERENSI

- [1] M. L. Andersen, M. Bignotto, R. B. Machado dan S. Tufik, "Different Stress Modalities Result in Distinct Steroid Hormone Responses by Male Rats," *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, vol. 37 (6), pp. 791-797, 2004.
- [2] I. A. Kopera, C. Billinska, C. Y. Cheng dan D. D. Mruk, "Sertoli-Germ Cell Junction in the Testis : A Review of Recent Data," *Philosophical Transaction of The Royal Society of London Series B Biological Science*, vol. 365, pp. 1593-1605, 2010.
- [3] S. Whirledge dan J. A. Chadowski, "Glucocorticoids, Stress, and Fertility," *Minerva Endocrinology*, vol. 35 (2), pp. 109-125, 2010.
- [4] S. Tufik, M. L. Andersen, L. R. A. Bittencourt dan M. T. D. Mello, "Paradoxical Sleep Deprivation: Neurochemical, Hormonal and Behavioural Alterations. Evidence from 30 Years of Research," *Annals of the Brazilian Academy of Science*, vol. 81 (3), pp. 521-538, 2009.
- [5] T. Nasihun, "Pengaruh Pemberian Ekstrak Purwoceng (*Pimpinella alpina* Molke) terhadap Indikator Vitalitas Pria : Studi Eksperimental pada Tikus Jantan Sprague Dawley," *Sains Medika*, vol. 1 (1), pp. 53-62, 2009.
- [6] W. T. Federer, *Experimental Design - Theory and Application*, New Delhi: Oxford and IBH Publishing Co, 1963.
- [7] E. Sasso - Cerri dan P. S. Cerri, "Morphological Evidences Indicate the Interference of Cimetidine on the Peritubular Components is Responsible for Detachment and Apoptosis of Sertoli Cells," *Reproductive Biology and Endocrinology*, vol. 6 (18), pp. 1-10, 2008.
- [8] M. M. Oh, J. W. Kim, M. H. Jin, J. J. Kim dan D. G. Moon, "Influence of Paradoxical Sleep Deprivation and Sleep Recovery on Testosterone Level in Rats of Different Ages," *Asian Journal of Andrology*, vol. 14 (2), pp. 330-334, 2012.
- [9] E. D. Kirby, A. C. Geraghty, T. Ubuka, G. E. Bentley dan D. Kaufer, "Stress Increases Putative Gonadotropin Inhibitory Hormone and Decreases Luteinizing Hormone in Male Rats," *Proceedings of the National Academy of Science*, vol. 106 (207), pp. 11324-11329, 2009.
- [10] S. S. Plessis, A. Kashou, A. Vaamonde dan A. Agarwal, "Is there a Link between Exercise and Male Factor Infertility?," *The Open Reproductive Science Journal*, vol. 3, pp. 105-113, 2011.
- [11] H. Johnston, P. J. Baker, M. Abel, H. M. Charlton, G. Jackson, L. Fleming, T. R. Kumar dan P. J. O'shaughnessy, "Regulation of Sertoli Cell Number and Activity by Follicle-Stimulating Hormone and Androgen During Postnatal Development in the Mouse," *Endocrinology*, vol. 145 (1), pp. 318-329, 2004.
- [12] W. H. Walker dan J. Cheng, "FSH and Testosterone Signaling in Sertoli Cells," *Reproductive*, vol. 130 (1), pp. 15-28, 2005.
- [13] A. L. Lee, W. O. Ogle dan R. M. Sapolsky, "Stress and Depression : Possible Links to Neuron Death in the Hippocampus," *Bipolar Disorder*, vol. 4 (2), pp. 117-128, 2002.
- [14] O. W. Wolkowitz, E. S. Epel, V. I. Reus dan S. H. Mellon, "Depression Gets Old Fast: Do Stress and Depression Accelerate Cell Aging?," *Depression and Anxiety*, vol. 27 (4), pp. 327-338, 2010.
- [15] T. Takahashi, T. Kimoto, N. Tanabe, T. Hattori, N. Yasumatsu dan S. Kawato, "Corticosterone Acutely Prolonged N-Methyl-d-Aspartate Receptor-Mediated Ca²⁺ Elevation in Cultured Rat Hippocampal Neurons," *Journal of Neurochemistry*, vol. 83 (6), pp. 1441-1451, 2022.
- [16] P. P. Mathur, L. Huang, A. Kashou, S. Vaithinathan dan A. Agarwal, "Environmental Toxicants and Testicular Apoptosis," *The Open Reproductive Science Journal*, vol. 3, pp. 114-124, 2011.
- [17] Y. Gong dan X. D. Han, "Nonlyphenol-induced Oxidative Stress and Citotoxicity in

- Testicular Sertoli Cells,” *Reproductive Toxicology*, vol. 22 (4), pp. 625-630, 2006.
- [18] N. Eid, Y. Ito dan Y. Otsuki, “Anti-Apoptotic Mechanism of Sertoli Cells Against Ethanol Toxicity,” *Journal Alcoholism and Drug Dependence*, vol. 1 (1), pp. 1-2, 2013.
- [19] D. Yi, X. Liu, F. Zhang, J. Wang, Y. Zhao, D. Sun, J. Ren dan H. Zhang, “Oxidative Stress on Sertoli Cells of Rats Induced by Microcystin-LR,” *Life Science Journal*, vol. 8 (2), pp. 249-253, 2011.
- [20] R. J. Aitken dan S. D. Roman, “Antioxidant Systems and Oxidative Stress in Testes,” *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 1 (1), pp. 15-24, 2008.
- [21] L. R. Franca, S. A. Auharek, R. A. Hess, J. M. Dofour dan B. T. Hinton, “Blood-Tissue Barriers : Morphofunctional and Immunological Aspects of the Blood-Testis and Blood-Epididymal Barriers,” *Landes Bioscience and Springer*, vol. 2, pp. 237-259, 2012.
- [22] R. M. Sharpe, C. McKinnell, C. Kivlin dan J. S. Fisher, “Proliferation and Functional Maturation of Sertoli Cells, and Their Relevance to Disorders of Testis Function in Adulthood,” *Society for Reproduction and Fertility*, vol. 125 (6), pp. 769-784, 2003.
- [23] D. C. Hipolide, D. Suchecki, A. P. Pinto, E. C. Faria, S. Tufik dan J. Luz, “Paradoxical Sleep Deprivation and Sleep Recovery: Effects on the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Activity, Energy Balance and Body Composition of Rats,” *Journal of Neuroendocrinology*, vol. 18 (4), pp. 231-238, 2006.
- [24] Y. Usmiati dan S. Yuliani, “Efek Androgenik dan Anabolik Ekstrak Akar Pimpinella Alipna Molk (Purwoceng) pada Anak Ayam Jantan,” *Seminar Nasional Teknologi Peternakan*, vol. 81 (3), pp. 743-755, 2010.
- [25] L. Sherwood, *Fisiologi Manusia dari Sel ke Sistem*, Jakarta: EGC, 2011.