

Jumlah Sel Leydig dan Mikroanatomi Testis Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Setelah Pemberian Teh Kombucha Konsentrasi 50% Waktu Fermentasi 6, 9 dan 12 Hari

The Number of Leydig Cells and Testicular Microanatomy Structure of *Rattus Norvegicus* After Consumption Fermented Kombucha Tea 6, 9 And 12 Days on 50% Level

Sri Isdadiyanto*, Silvana Tana

Departemen Biologi Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro

*Email : isdadiyanto@yahoo.com

Diterima 13 Mei 2019 / Disetujui 20 Februari 2020

ABSTRAK

Tujuan penelitian ini untuk mengkaji potensi teh Kombucha kadar 50% dengan variasi waktu fermentasi dalam mempengaruhi jumlah sel leydig dan struktur mikroanatomi testis tikus putih (*Rattus norvegicus*). Penelitian ini menggunakan Tikus putih jantan sebanyak 16 ekor umur 2 bulan, dengan perlakuan Teh kombucha yang difermentasi selama 6, 9 dan 12 hari pada suhu 25°C per oral. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap dengan 4 perlakuan (selama 28 hari) dan 4 ulangan, yaitu : P0 = kontrol, tanpa tambahan teh kombucha, P1 = air minum + 1,8 ml teh kombucha pagi dan sore fermentasi 6 hari, P2 = air minum + 1,8 ml teh kombucha pagi dan sore fermentasi 9 hari, P3 = air minum + 1,8 ml teh kombucha pagi dan sore fermentasi 12 hari. Variabel yang diukur adalah diameter tubulus seminiferus dan jumlah sel Leydig. Data yang diperoleh dianalisis menggunakan ANOVA yang dilanjutkan dengan Uji Duncan dengan taraf kepercayaan 95% dengan menggunakan perangkat lunak SPSS 16.0. Penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian teh kombucha fermentasi 6, 9, dan 12 hari menurunkan diameter tubulus seminiferus sehingga berpotensi mengganggu proses spermatogenesis, tetapi tidak mempengaruhi jumlah sel Leydig tikus putih (*Rattus norvegicus*).

Kata kunci: *Rattus norvegicus*, teh kombucha, tubulus seminiferus, sel leydig

ABSTRACT

The objective of this study was to analyze the number of leydig cells and testicular microanatomy structure of *Rattus norvegicus* after treatment by 50% kombucha tea with variation of fermentation time. Sixteen male of rats, 2 months of age were used as experimental animals treated with kombucha tea that had been fermented for 6, 9 and 12 days at the temperature of 25°C per oral. This research was using completely randomized design with 4 treatment (for 4 weeks) and 4 replications, namely: P0 = control, without of kombucha tea, P1 = water + 1,8 ml kombucha tea that had been fermented for 6 days in the morning and afternoon, P2 = water + 1,8 ml kombucha tea that had been fermented for 9 days in morning and afternoon, P3 = water + 1,8 ml kombucha tea that had been fermented for 12 days in morning and afternoon. The variables measured were seminiferous tubule diameter and Leydig cell counts. Data were analyzed with ANOVA followed by Duncan test at 95% significance level were performed using SPSS version 16,0. The results showed that kombucha tea decreased the diameter of the seminiferous tubule, showing the potentation of spermatogenesis disturbance, but did not affect Leydig cell counts of *Rattus norvegicus*.

Keywords: *Rattus norvegicus*, kombucha tea, seminiferous tubule, leydig cell

PENDAHULUAN

Minuman teh kombucha menyegarkan dengan rasa sedikit manis dan sedikit asam yang dikonsumsi secara mendunia. Teh kombucha

diperoleh dari hasil fermentasi simbiosis bakteri dan ragi membentuk “jamur teh” (Chen and Liu, 2000). Lapisan selulotik tipis terapung dan cairan seduhan asam merupakan 2 bagian dari teh kombucha (Dufrense and Farnworth, 2000). Teh

kombucha dipersiapkan dengan menaruh kultur kombucha (jamur teh) kedalam seduhan teh manis untuk fermentasi. Jika kultur kombucha dibudidayakan sesuai dengan resep standar menggunakan teh hitam, dipermanis dengan sukrosa, maka substansi ini akan berubah menjadi minuman teh jamur menyegarkan dengan nilai gizi tinggi dan kandungan berkhasiat medis (Loncar *et al.*, 2000).

Chen and Liu (2000) menyatakan kandungan ethanol pada kombucha meningkat seiring waktu dan mencapai nilai tertinggi pada sekitar 5,5 g/L, diikuti dengan penurunan yang lambat. Kusumah dan Ismail (2010) menunjukkan pemberian teh kombucha dengan dosis bertingkat dapat menyebabkan perubahan gambaran struktur histologis hepar mencit Balb/c berupa degenerasi parenkimatososa, degenerasi hidropik, dan nekrosis sesuai dosisnya. Hasil penelitian Yuanita dan Ismail (2010) juga menunjukkan pemberian teh kombucha dosis bertingkat menyebabkan perubahan struktur histologis ginjal mencit Balb/c berupa penutupan lumen tubulus proksimal. Isdadiyanto dan Tana (2019) menyatakan bahwa pemberian teh kombucha kadar 75% menurunkan diameter tubulus seminiferus hingga berpotensi mengganggu proses spermatogenesis dan tidak mempengaruhi sel Leydig tikus putih.

Penelitian menunjukkan alkohol merupakan zat yang bersifat sitotoksik pada testis. Luka pada jaringan testis dapat berakibat pada menurunnya produksi sperma atau mengurangi sekresi testosteron dari testis dan gangguan transportasi sperma melalui sistem saluran atau pengiriman ke dalam saluran kelamin betina. Kualitas sperma yang tersedia untuk fertilisasi juga dapat terganggu (Creasy, 2001).. Menurut El-Sokkary (2001) pemberian alkohol secara kronik mampu menyebabkan penurunan diameter tubulus seminiferus, jumlah sel spermatogenik, dan kemunculan sel-sel germinal yang mati serta mengalami vakuolasi berbagai ukuran. Alkohol juga mampu menyebabkan penurunan jumlah dan volume inti sel Leydig secara signifikan. Keragaman fungsional dari sistem reproduksi jantan dan kompleksitas regulasi hormonnya memberikan lokasi potensial untuk gangguan kimiawi. Tujuan penelitian ini untuk mengkaji potensi teh kombucha

kadar 50% dengan variasi waktu fermentasi dalam mempengaruhi jumlah sel Leydig dan struktur mikroanatomi testis tikus putih (*Rattus norvegicus*).

METODE PENELITIAN

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biologi Struktur dan Fungsi Hewan Departemen Biologi Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro Semarang. Hewan percobaan menggunakan tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan sebanyak 16 ekor umur 2 bulan, sedang untuk bahan perlakuan yaitu teh kombucha kadar 50% yang difermentasi selama 6, 9 dan 12 hari pada suhu 25°C *per oral* dengan spuit injeksi ujung berkanul. Adapun alat-alat yang digunakan yaitu 20 kandang individu yang dilengkapi dengan tempat minum dan pakan, gelas ukur, timbangan digital, disetting set.

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap dengan 4 perlakuan dan 4 ulangan yaitu : P0 = kontrol, tanpa tambahan teh kombucha, P1 = air minum + 1,8 ml teh kombucha kadar 50% pagi dan sore fermentasi 6 hari, P2 = air minum + 1,8 ml teh kombucha kadar 50% pagi dan sore fermentasi 9 hari, P3 = air minum + 1,8 ml teh kombucha kadar 50% pagi dan sore fermentasi 12 hari. Pakan dan minum diberikan secara *ad libitum*. Preparat histopatologi testis dibuat dengan metode parafin dan fiksatif yang digunakan adalah larutan 10% *neutral buffered formalin*. Tahapan yang dilakukan setelah proses fiksasi adalah melakukan pemotongan tipis jaringan setebal kurang lebih 4 mm dengan orientasi sesuai dengan organ yang akan dipotong (*trimming*). Pisau yang digunakan untuk *trimming* adalah pisau skalpel No. 22-24. Jumlah potongan jaringan yang dapat dimuat dalam *embedding cassette* berkisar antara 1-5 buah disesuaikan dengan ukuran organ. Dehidrasi jaringan dilakukan setelah *trimming* menggunakan *tissue processor* (Leica, Germany), ini dimaksudkan untuk mengeluarkan air yang terkandung dalam jaringan dengan menggunakan cairan dehidran seperti etanol atau iso propyl alkohol. Cairan dehidran kemudian dibersihkan dari dalam jaringan dengan menggunakan reagen pembersih (*clearing agent*) yaitu xylol. Reagen pembersih ini akan diganti dengan parafin dengan

cara dimasukkan dalam larutan parafin cair sehingga parafin terpenetrasi ke dalam jaringan; proses ini disebut impregnasi. Parafin yang digunakan mempunyai titik cair 56-58°C. Pengaturan waktu dehidrasi pada *tissue processor* diberikan pada pada Tabel 1. Setelah melalui proses dehidrasi, jaringan yang berada di dalam *embedding cassette* dipindahkan ke dalam *base mold*, kemudian diisi dengan parafin cair dan dilekatkan pada *embedding cassette* yang disebut blok. Jaringan dalam blok yang telah dingin, selanjutnya dipotong pada ketebalan irisan 4 µ dengan *rotary microtome*. Irisan tersebut ditempel

pada gelas objek yang sebelumnya diolesi *Mayer's egg albumin* dan ditetesi aquades kemudian dibiarkan kering pada suhu kamar. Selanjutnya setelah preparat mikroanotomi kering dilakukan pewarnaan dengan metode pewarnaan Hematoxylin Ehrlich-Eosin, kemudian dilakukan *mounting* dengan meneteskan entelan secukupnya dan ditutup dengan *coverglass*. Pengamatan preparat pada setiap perlakuan dilakukan dengan mikroskop cahaya untuk menentukan jumlah sel leydig dan diameter tubulus seminiferus antar kelompok perlakuan.

Tabel 1. Pengaturan waktu dehidrasi pada *tissue processor*

Proses	Cairan	Waktu
Dehidrasi	Alkohol 80%	2 jam
	Alkohol 95%	2 jam
	Alkohol 95%	1 jam
	Alkohol absolut	1 jam
	Alkohol absolut	1 jam
	Alkohol absolut	1 jam
Clearing	Xylol	1 jam
	Xylol	1 jam
	Xylol	1 jam
Impregnasi	Parafin	2 jam
	Parafin	2 jam
	Parafin	2 jam

Variabel yang diukur adalah jumlah sel Leydig dan diameter tubulus seminiferous. Data yang diperoleh dianalisis dengan ANOVA, berdasarkan Rancangan Acak Lengkap (RAL) pada taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$) (Mattjik dan Sumertajaya, 2006). Analisis keseluruhan menggunakan perangkat lunak software SPSS 10,0.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian tentang pengaruh pemberian teh kombucha dengan waktu fermentasi berbeda terhadap jumlah sel Leydig dan diameter tubulus seminiferus tikus pada taraf kepercayaan 95% dapat dilihat di Tabel 2. Rata-rata jumlah sel Leydig (Gambar 1) tidak menunjukkan beda nyata pada perlakuan P0, P1, P2, dan P3, demikian juga dengan kenampakan mikroanatominya. Hasil ini menunjukkan teh

kombucha dengan fermentasi 6, 9, dan 12 hari konsentrasi 50% tidak menyebabkan perubahan pada struktur sel Leydig. Fungsi sel Leydig menurut Dong and Hardy (2004) adalah sumber utama dari hormon androgenik testosteron, yang penting untuk diferensiasi seksual jantan, produksi gamet dan pematangan, dan pengembangan karakteristik seksual sekunder. Menurut Creasy (2001) fungsi utama sel Leydig adalah steroidogenesis, sehingga zat apa pun yang mengganggu jalur metabolismenya akan menghasilkan gangguan fungsional dalam keseimbangan hormon. El-Sokarry (2011) menyatakan bahwa sel leydig rentan terhadap beberapa toksikan melalui efek langsung atau gangguan sumbu hipotalamus-hipofisis.

Menurut Dong and Hardy (2004), toksisitas dapat merusak sel Leydig dengan tiga cara: stimulasi berlebih atau penghambatan

steroidogenesis, induksi pembentukan tumor, dan promosi kematian sel. Teh kombucha mengandung alkohol (Chen and Liu, 2000; Pratiwi dan Aryawati, 2012) dan alkohol dapat menurunkan jumlah sel Leydig (El-Sokarry, 2011) serta menurunkan tingkat testosteron (Dong and Hardy, 2004). Peluang toksisitas alkohol pada teh kombucha berdasarkan hasil pengamatan tidak terlihat secara kuantitatif pada jumlah sel Leydig. Sel Leydig berkaitan dengan spermatogenesis karena menurut Holstein *et al.* (2003) sel Leydig mensekresikan testosteron dan zat neuroendokrin tambahan dan *growth factor* yang terlibat dalam

pemeliharaan sel Sertoli dan sel jaringan peritubular; mempengaruhi kontraktilitas myofibroblasts dan mengatur pergerakan peristaltik tubulus seminiferus dan pengangkutan spermatozoa. Hasil pengukuran diameter tubulus seminiferus (Tabel 1) menunjukkan adanya perubahan berupa penurunan diameter tubulus seminiferus pada tikus yang diberi teh kombucha. Penurunan diameter menunjukkan adanya penurunan jumlah sel germinal (Lanning *et al.*, 2002) yang bisa diasumsikan adanya gangguan pada siklus spermatogenik yang diregulasi oleh hormon androgenik dari sel Leydig.

Tabel 2. Hasil analisis rata-rata jumlah sel Leydig dan diameter tubulus seminiferus tikus.

	P0	P1	P2	P3
Jumlah Sel Leydig (Sel)	14,70 ^a ±2,65	12,35 ^a ±0,96	13,25 ^a ±2,36	13,75 ^a ±2,36
Diameter tubulus seminiferus (µm)	291,856 ^b ±4,37	253,078 ^a ±15,61	252,212 ^a ±10,38	240,372 ^a ±6,54

Keterangan: Angka yang ditunjukkan dengan superskrip yang sama pada baris yang sama menunjukkan perbedaan tidak nyata (P>0,05). P0: Perlakuan Kontrol, P1: Pemberian teh kombucha fermentasi 6 hari, P2: Pemberian teh kombucha fermentasi 9 hari, P3: Pemberian teh kombucha fermentasi 12 hari. Data yang ditampilkan berupa rerata ± SD

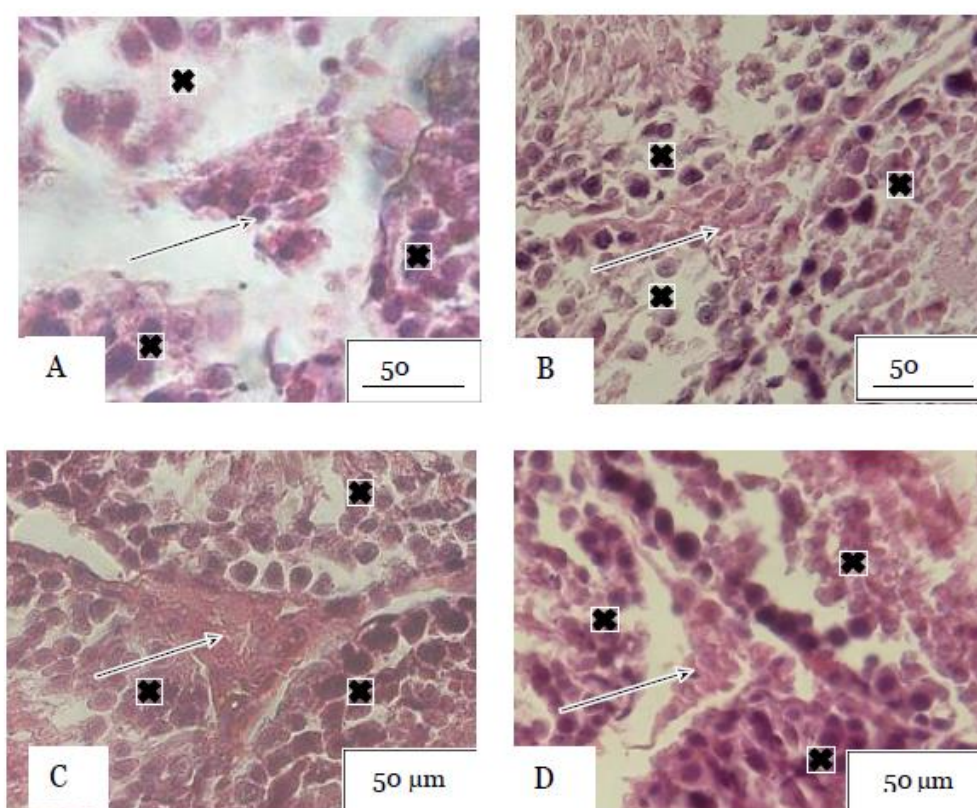
Nugroho (2009) menyatakan gangguan sintesis dan sekresi GnRH hipotalamus yang disebabkan oleh alkohol akan menyebabkan kegagalan hipofisis untuk melakukan sintesis dan sekresi FSH maupun LH. Gangguan hormon selanjutnya akan diikuti oleh kegagalan sel Leydig untuk mensintesis testosteron dan sel Sertoli tidak mampu melakukan fungsinya sebagai *nurse cell*. Alkohol menimbulkan gangguan pada hipotalamus dan hipofisis, selain itu juga bertindak sebagai inhibitor bagi enzim 5 α-reduktase. Enzim ini digunakan untuk mengubah prohormon (testosteron) menjadi bentuk aktifnya yaitu 5 α-dihidrotestosteron. Testosteron dalam bentuk aktif yang tidak dihasilkan akhirnya menyebabkan proses spermatogenesis tidak terjadi dan menyebabkan penurunan jumlah lapisan sel spermatogenik. Menurut Lanning *et al.* (2002) penurunan diameter tubulus seminiferus merupakan indikasi penurunan jumlah lapisan sel spermatogenik atau sel germinal.

Penelitian ini belum dapat dipastikan apakah teh kombucha yang tidak memberikan perubahan signifikan pada jumlah sel Leydig menunjukkan adanya penurunan hormon androgenik juga berpengaruh pada fertilitas. Untuk mengetahui pengaruh teh kombucha pada kesuburan secara langsung diperlukan penelitian lanjutan seperti jumlah spermatozoa dan kondisi hormonal hewan uji. Hasil analisis pengaruh pemberian teh kombucha berbeda hari fermentasi pada diameter tubulus seminiferus tikus dengan *Analysis of Variance* (ANOVA) menunjukkan hasil berbeda nyata (P<0,05) antara P0 (kontrol) dan P1 (fermentasi 6 hari) berupa penurunan diameter tubulus seminiferus testis, demikian juga dengan P0 dan P2 (fermentasi 9 hari), serta P0 dan P3 (fermentasi 12 hari). Hasil ini menunjukkan bahwa pemberian teh kombucha berpengaruh pada diameter tubulus seminiferus tikus.

Menurut Lanning *et al.* (2002), penurunan ukuran diameter tubulus seminiferus merupakan

salah satu indikasi adanya kerusakan jaringan akibat dari penurunan jumlah sel germinal dan penurunan sekresi cairan tubular. Cairan tubulus seminiferus disekresikan oleh sel Sertoli dan berfungsi mempertahankan ukuran lumenal, yang bervariasi dengan tahap spermatogenesis. Sekresinya adalah bagian dari fungsi androgen yang bergantung pada sel Sertoli dan akan terpengaruh oleh sekresi testosteron yang berubah. Perubahan ini juga terlihat pada pengamatan mikroskopis. Hasil fotomikrograf (Gambar 1) menunjukkan adanya perbedaan berupa struktur tubulus seminiferus P0 memiliki susunan sel

spermatogenik yang rapat dan kompak, sedangkan tikus dengan perlakuan P1, P2, dan P3 menunjukkan struktur sel spermatogenik yang semakin renggang seiring pertambahan waktu fermentasi dengan lumen yang tidak terisi penuh oleh spermatozoa. Menurut Waty *et al.* (2017), struktur mikroanatomi tubulus seminiferus yang normal akan menunjukkan asosiasi sel spermatogenik tersusun sesuai dengan tingkat perkembangannya dari membran basalis menuju ke arah lumen tubulus, yakni spermatogonia, spermatosit, dan spermatid.



Gambar 1. Hasil Fotomikrograf Sel Leydig. Sel Leydig (ditunjukkan oleh panah) di antara tubulus seminiferus (ditunjukkan oleh tanda silang) pada perlakuan kontrol (A), pemberian teh kombucha fermentasi 6 hari (B), pemberian teh kombucha fermentasi 9 hari (C), dan pemberian teh kombucha fermentasi 12 hari (D) Perbesaran 400x dengan pewarnaan

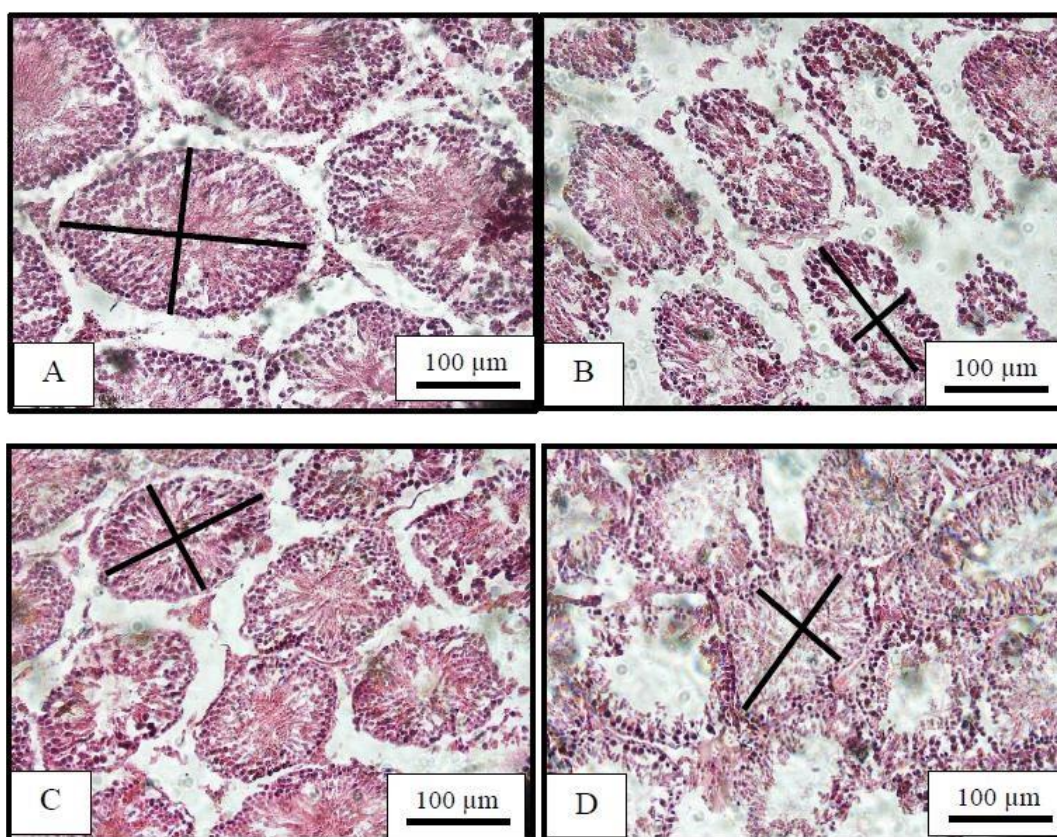
Hasil pengukuran diameter tubulus seminiferus dan pengamatan mikroskopis menunjukkan teh kombucha mempengaruhi struktur mikroanatomi testis tikus. Perubahan struktur mikroanatomi menunjukkan adanya zat berpotensi toksik yang terkandung dalam teh kombucha, dan salah satu yang sudah diketahui

adalah alkohol atau ethanol. Chen and Liu (2000) menyatakan kandungan etanol pada teh kombucha mencapai nilai tertinggi pada sekitar 0,55% pada hari ke-20 diikuti dengan penurunan yang lambat, sedangkan menurut Pratiwi dan Aryawati (2012) mencapai 0,4683% pada hari ke 12.

El-Sokarry (2011) menyatakan bahwa

ukuran tubulus seminiferus bisa berkurang pada tikus yang mengkonsumsi alkohol. Rachadoul dan Sarkar (2013) menyatakan bahwa tingkat hormon testosteron menurun pada tikus dengan paparan alkohol yang diasosiasikan dengan penurunan FSH (Follicle Stimulating Hormone) dan LH (Luteinizing Hormone). Rachadoul dan Sarkar (2013) juga menyatakan bahwa asetaldehid, metabolit dari alkohol, bisa menghambat produksi testosteron dengan inhibisi protein Kinase C yang merupakan enzim kunci pada sintesis testosteron. Produksi sel germinal dan proses spermatogenesis pada testis sangat berkaitan dengan aktivitas

hormonal. Holstein *et al.* (2003) menyatakan regulasi spermatogenesis membutuhkan rangsangan ekstrapituitaria dari hipotalamus dan hipofisis. Sekresi Gonadotropin-releasing Hormone (GnRH) dari hipotalamus menginisiasi pelepasan Luteinizing Hormone (LH) dari hipofisis dan sebagai hasilnya menstimulasi sel Leydig untuk memproduksi testosteron. Testosteron tidak hanya mempengaruhi spermatogenesis pada tubulus seminiferus testis tetapi juga didistribusikan ke seluruh tubuh dan memberikan umpan balik terhadap hipofisis yang terkait dengan aktivitas sekretori sel Leydig.



Gambar 2. Hasil fotomikrograf tubulus seminiferus *Rattus norvegicus*. Perlakuan kontrol (A), pemberian teh kombucha fermentasi 6 hari (B), pemberian teh kombucha fermentasi 9 hari (C), dan pemberian teh kombucha fermentasi 12 hari (D). Garis menunjukkan pengukuran diameter tubulus seminiferus. Pewarnaan H&E perbesaran 100×.

Perubahan struktur tubulus seminiferus menghasilkan dugaan awal bahwa bahwa pemberian teh kombucha yang mengandung ethanol bisa memberikan pengaruh buruk pada tingkat fertilitas kelamin jantan, akan tetapi menurut Creasy (2001) apabila ada zat bersifat toksik yang merusak sel germinal, kematian sel

yang benar-benar mempengaruhi kesuburan bergantung pada populasi sel germinal yang terkena dampak toksiknya. Semisal, apabila spermatogonia pada tikus mati, kesuburan tidak akan terpengaruh hingga 8-10 minggu semenjak paparan zat toksin. Maka dari itu, masih ada kemungkinan bahwa sel germinal pada tubulus

seminiferus tikus yang diberi teh kombucha untuk kembali pulih. Kemungkinan pemulihan sel germinal ini menunjukkan perlu adanya penelitian kualitas dan kuantitas sperma dari tikus yang diberi teh kombucha.

KESIMPULAN

Penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian teh kombucha fermentasi 6, 9, dan 12 hari menurunkan diameter tubulus seminiferus sehingga berpotensi mengganggu proses spermatogenesis, tetapi tidak mempengaruhi jumlah sel Leydig tikus putih (*Rattus norvegicus*).

DAFTAR PUSTAKA

- Chen and Liu. (2000). Changes in major components of tea fungus metabolites during prolonged fermentation. *Journal Applied Microbiology* 89(5):834-839.
- Creasy, D.M. (2001). Pathogenesis of Male Reproductive Toxicity. *Toxicologic Pathology*, 29(1), 64–76
- Cunningham, J.G. and Klein, B.G. (2007) *Textbook of Veterinary Physiology*. London: Saunders/Elsevier
- Dong, Q. and Hardy, M.P. (2004). Leydig Cell Function in Man. In Winters, S & Huthaniemi, I.T (Ed.). *Male Hypogonadism: Basic, Clinical, and Therapeutic Principle*. New Jersey: Humana Press Inc.
- Dufrense and Farnworth. (2000). Tea, kombucha, and health: a review. *Food Research International*, 33(6), 409–21
- El-Sokarry, G.H. (2001). Quantitative Study on The Effects of chronic Ethanol Administration on Testis of Adult Male Rat. *Neuroendocrinology Letters*, 22(2),93- 99
- Hughes, I.A. and C.L. Acerini. 2008. Factors controlling testis descent. *European Journal of Endocrinology*, 159, 575–582.
- Isdiyanto, S. dan Tana, S. (2019). Struktur mikroanatomi testis tikus putih (*rattus norvegicus*) setelah pemberian teh kombucha konsentrasi 75% waktu fermentasi 6, 9 dan 12 hari. *J. Bioma: Berkala ilmiah Biologi* 21(1).
- Jayabalan, R. Malbasa, R. Loncar, E. Vitas, J. and Sathiskumar, M. (2014). A Review on Kombucha Tea–Microbiology, Composition, Fermentation, Beneficial Effects, Toxicity, and Tea Fungus. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(4), 538-55
- Kusumah, L.P. dan Ismail A. (2010). *Pengaruh Pemberian Teh Kombucha Per Oral Dengan Dosis Bertingkat Terhadap Gambaran Histologis Hepar Mencit Balb/C*. 02 Desember 2010. Universitas Diponegoro Semarang, Fakultas Kedokteran <http://eprints.undip.ac.id/24315/>
- Mattjik, A.A. dan Sumertajaya, I.M. 2006. *Perancangan Percobaan dengan Aplikasi SAS dan Minitab*. Ed. Ke-3. IPB-Press. Bogor.
- Lanning, L.L. Creasy, D.M. Chappin, R.M. Mann, P.C. Barlow, N.J. Regan, K.S. and Goodman, D.G. (2002). Recommended Approaches for the Evaluation of Testicular and Epididymal Toxicity. *Toxicologic Pathology*, 30(4), 507-520
- Loncar, E.S. Petrovic, S.E. Malbasa, R.V. and Verac, R.M. (2000). Biosynthesis of glucuronic acid by means of tea fungus. *Nahrung*, 44(2),138–9.
- Nugroho, C.A. (2009). Pengaruh Minuman Beralkohol Terhadap Jumlah Lapisan Sel Spermatogenik dan Berat Vesikula Seminalis Mencit. *Widya Warta*, 33(1), 41-52
- Pratiwi, A.E. dan Aryawati, R. (2012). Pengaruh Waktu Fermentasi terhadap sifat fisik dan kimia pada pembuatan minuman kombucha dari Rumput Laut *Sargassum sp. Maspari Journal*, 4(1), 131-136.
- Rachadoul, N. and Sarkar, D.K. (2013). Effects of Alcohol on the Endocrine System. *Endocrinology Metabolism Clinics of North America*, 42(3), 593–615

- Waty, M. Tana, S., & Saraswati, T. (2017). Histologis Testis pada Keturunan F1 dari Induk Puyuh (*Coturnix coturnix japonica* L.) yang diberi Suplemen Serbuk Kunyit (*Curcuma longa* L.) dalam Pakan. *Bioma : Berkala Ilmiah Biologi*, 19(1), 13-17. doi:<http://dx.doi.org/10.14710/bioma>, 19, 1, 13-17
- Yuanita, D.A dan Ismail, A. (2010). *Pengaruh Pemberian Teh Kombucha Dosis Bertingkat Per Oral Terhadap Gambaran Histologi Ginjal Mencit Balb/C*. 02 Desember 2010, Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro Semarang. <http://eprints.undip.ac.id/24332/>