

**Pengaruh Ekstrak Etanol Bit Merah (*Beta vulgaris L.*)
terhadap Jumlah Arteriole Endometrium pada
Tikus (*Rattus norvegicus*) yang dipapar Asap Rokok**

**Effect of Red Bit Ethanol Extract (*Beta vulgaris L.*)
on and Number of Endometrial Arteriole in Mice
(*Rattus norvegicus*) Exposed to Cigarette Smoke**

Zulfa Hanum¹, Siti Saleha²

Dosen Program Diploma III Kebidanan Universitas Almuslim, Bireuen, Aceh
zulfahanum89@gmail.com, saleha89aly@gmail.com

Abstrak

Paparan asap rokok sering terjadi dikalangan masyarakat, ini dapat menyebabkan terjadinya peningkatan ROS sehingga antioksidan dalam tubuh menurun. ROS yang meningkat akan menyebabkan gangguan pada organ reproduksi seperti endometrium dan ovarium. Akibat gangguan ini maka akan berpengaruh pada tingkat kesuburan (infertilitas) pada wanita. Bit merah mengandung senyawa betalain yang tinggi akan antioksidan yang dapat menetralsir ROS yang ada didalam tubuh yang dapat mengganggu organ reproduksi wanita yang dapat menyebabkan salah penyebab ketidaksuburan pada wanita. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak etanol bit merah (*Beta vulgaris L.*) dengan berbagai dosis terhadap jumlah arteriole pada endometrium tikus yang dipapar asap rokok. Jenis penelitian ini adalah *true experiments* dengan rancangan *post test only control group design*. Menggunakan 25 ekor tikus betina yang dibagi menjadi 5 kelompok yaitu kelompok kontrol negatif (tanpa perlakuan), kelompok kontrol positif (tikus yang dipapar asap rokok 2 batang/hari) selama 56 hari, kelompok perlakuan I (dipapar asap rokok 2 batang/hari dan diberi ekstrak etanol bit merah dengan dosis 125 mg/kgBB/hari) selama 56 hari, perlakuan II (dipapar asap rokok 2 batang/hari dan diberi ekstrak etanol bit merah dengan dosis 250 mg/kgBB/hari) selama 56 hari dan perlakuan III (dipapar asap rokok 2 batang/hari dan diberi ekstrak etanol bit merah dengan dosis 500 mg/kgBB/hari) selama 56 hari. Metode yang digunakan untuk melihat jumlah arteriole pada endometrium tikus dengan menggunakan pewarnaan Haematoksin Eosin. Kemudian masing-masing slide diamati dibawah mikroskop Manual Dot Slide Olympus XC 10 yang dilihat per lapang pandang. Data dianalisis dengan menggunakan One Way Anova, hasil nilai p-value jumlah arteriole ($p=0.000$). Hasil penelitian membuktikan bahwa pemberian ekstrak etanol bit merah dengan dosis 500 mg/kgBB/hari dapat meningkatkan jumlah arteriole pada endometrium tikus yang dipapar asap rokok. Penelitian ini membuktikan bahwa pemberian ekstrak etanol bit merah dapat meningkatkan jumlah arteriole pada endometrium tikus yang dipapar asap rokok. Kesimpulan pada penelitian ini adalah terjadi peningkatan jumlah arteriole pada kelompok yang diberi ekstrak etanol bit merah dengan berbagai dosis. Tetapi dosis ekstrak etanol bit merah yang dianggap paling cepat meningkatkan jumlah arteriole adalah kelompok perlakuan III dengan dosis 500 mg/kgBB/hari.

Kata Kunci: Jumlah Arteriole, *Rattus norvegicus*, Bit Merah (*Beta vulgaris L.*)

Abstract

*Exposure to cigarette smoke often occurs among the community, this can cause an increase in ROS so that antioxidants in the body decrease. Increased ROS will cause disturbances in reproductive organs such as the endometrium and ovaries. As a result of this disorder it will affect the level of fertility (infertility) in women. Red beets contain betalain compounds which are high in antioxidants which can neutralize ROS in the body which can interfere with the female reproductive organs which can cause one of the causes of infertility in women. This study aims to determine the effect of red beet (*Beta vulgaris L.*) ethanol extract with various doses on the number of arterioles in the endometrium of rats exposed to cigarette smoke. This type of research is true experiments with a post test only control group design. Using 25 female rats divided into 5 groups namely negative control group (no treatment), positive control group (rats exposed to cigarette smoke 2 cigarettes/day) for 56 days, treatment group I (exposed to cigarette smoke 2 cigarettes/day and given red beet ethanol extract at a dose of 125 mg/kgBW/day) for 56 days, II treatment (exposed to cigarette smoke 2 sticks/day and given red beet ethanol extract at a dose of 250 mg/kgBW/day) for 56 days and treatment III (exposed to cigarette smoke 2 sticks/day and given red beet ethanol extract at a dose of 500 mg/kg/day) for 56 days. The method used to see the number of arterioles in the rat endometrium using Haematoxylin Eosin staining. Then each slide was observed under a Manual Dot Slide Olympus XC 10 microscope which was viewed per field of view. Data were analyzed using One Way Anova, the results of the p-value of the number of arterioles ($p=0.000$). The results of the study proved that administration of red beetroot ethanol extract at a dose of 500 mg/kgBW/day could increase the number of arterioles in the endometrium of rats exposed to cigarette smoke. This study proves that administration of red beetroot ethanol extract can increase the number of arterioles in the endometrium of rats exposed to cigarette smoke. The conclusion in this study was that there was an increase in the number of arterioles in the group given red beet ethanol extract at various doses. But the dose of red beet ethanol extract that was considered the fastest to increase the number of arterioles was the treatment group III at a dose of 500 mg/kg/day.*

Keywords: *Number of Arterioles, Rattus norvegicus, Red Beet (*Beta vulgaris L.*)*

PENDAHULUAN

Ketidaksuburan merupakan ketidakmampuan seorang wanita untuk mengandung, dan melahirkan. Di dunia, terdapat 10 sampai 15 persen pasangan yang mengalami infertilitas dengan usia reproduksi. Dalam beberapa tahun terakhir, jumlah pasangan yang mencari pengobatan untuk infertilitas meningkat secara drastis. Ada yang mengatakan perawatan psikiatri efektif untuk menangani hal ini. Secara umum, wanita menunjukkan tingkat kesuburan yang lebih rendah dibandingkan laki-laki. Berbagai penelitian mendukung teori tersebut bahwa wanita memiliki tingkat kehamilan yang lebih rendah dibandingkan dengan laki-laki. Salah satu faktor penyebab ketidaksuburan yaitu faktor psikologi (Deka KP dan Sarma S, 2010).

Suatu studi mengemukakan bahwa hubungan antara penurunan kesuburan dan merokok belum diketahui secara pasti, tetapi peneliti melibatkan perokok tidak subur dan yang subur, dimana didapatkan hasil bahwa 47% pasien tidak subur dan 14% pasien hamil, mereka percaya bahwa merokok secara signifikan dapat mengganggu tingkat kesuburan. Penelitian yang melibatkan prosedur *In Vitro Fertilization* (IVF) menunjukkan bahwa asap rokok memiliki efek buruk pada semua tahap seperti sensitivitas ovarium, penurunan jumlah oosit, gangguan pembuahan dan implantasi (Dechanet *et al.*, 2011).

Stres oksidatif adalah reaksi *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang meningkat lebih tinggi dibandingkan dengan antioksidan yang terdapat didalam tubuh sehingga menyebabkan terjadinya suatu masalah, kondisi ini dapat menyebabkan terjadinya suatu reaksi yang buruk antara radikal bebas dengan protein, asam nukleat dan lemak sehingga akan terjadi kerusakan atau disfungsi organ tertentu.

Buah bit merah (*Beta vulgaris L.*) adalah salah satu sumber utama akan serat pangan dan terdapat berbagai vitamin serta mineral yang berfungsi sebagai antioksidan yang potensial dan membantu mencegah infeksi dalam tubuh. Buah bit memiliki senyawa polifenol, betalain, flavonoid, asam folat juga vitamin. Antioksidan terbanyak terdapat dalam senyawa betalain dan berguna untuk mengendalikan radikal bebas (Mroczek *et al.*, 2012).

METODE PENELITIAN

Jenis penelitian ini adalah eksperimental atau *true experiments*, didesain dengan mengikuti Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan rancangan *post test only control group*.

Penelitian ini dilakukan dengan teknik analisa data yaitu 3 tahapan perhitungan, pertama uji normalitas menggunakan uji *Spiro-Wilk*, lalu uji homogenitas dengan uji *Leuvene's* dan uji hipotesa dengan uji *One Way Anova*. Semua perhitungan dihitung dengan *software SPSS for Windows 23*.

Penelitian ini menggunakan sampel berupa hewan coba tikus putih dengan jenis kelamin betina (*Rattus novergicus strain wistar*) sebanyak 25 ekor. Tikus didapatkan dari Laboratorium Farmakologi Universitas Brawijaya. Alasan diambil tikus putih dalam penelitian ini karena diketahui dengan jelas bentuk organ, fungsi, proses biokimia dan

biofisik yang memiliki kemiripan dengan manusia, serta mudah dipelihara dan merupakan hewan yang sehat dan cocok untuk digunakan dalam penelitian ini.

Paparan asap rokok yang diberikan pada tikus betina (*Rattus novvergicus*) diperoleh dari rokok kretek tanpa filter yang memiliki kandungan 2,90 mg/batang dan tar 44,30 mg/batang, dengan paparan 2 batang rokok per hari dan diberikan selama 56 hari (8 minggu) dan terbukti memiliki pengaruh terhadap endometrium. Proses paparan asap rokok menggunakan alat *smoking pump* pada Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, yang terbuat dari *fibreglass* dengan ukuran 26x36x12 cm. Alat ini memiliki klep yang berfungsi untuk masuk dan keluarnya asap rokok selama proses paparan.

Bahan untuk pemeriksaan jumlah arteriole (pembuluh darah) Jaringan endometrium tikus, acetone, xylon, mikrotan Rotali, es balok, waterbath, alkohol 96%, eosin.

Buah bit kering dihaluskan dengan menggunakan blender, kemudian masukkan bit kering kedalam gelas beker ukuran 1 liter air. Tuangkan pelarut etanol dengan perbandingan 1:9 (100 gram serbuk buah bit dan 900 ml etanol 70%). Kemudian campuran tersebut dikocok selama 30 menit lalu biarkan selama 1 malam pada suhu ruangan sehingga mengendap. Saring bahan yang telah tercampur untuk memperoleh campuran pelarut dan zat aktif dengan menggunakan kertas saring *whatman* no 40. Kemudian lanjutkan dengan proses evaporasi, dimana campuran pelarut dan zat aktif yang telah disaring sebanyak 1 liter dimasukkan kedalam labu kemudian dipasang pada evaporator. Isi *water bath* hingga penuh kemudian atur suhu hingga 90°C. Tunggu sampai larutan etanol memisah dengan zat aktif yang sudah ada dalam labu evaporasi. Tampung pelarut kedalam labu penampung hingga terpisah dengan zat aktif ($\pm 1,5$ sampai 2 jam) sebanyak ± 900 ml. Hasil ekstraksi yang didapat melalui proses maserasi kurang lebih 1/5 dari bahan kering, kemudian masukkan kedalam botol plastik dan simpan pada suhu ruangan.

Dosis bit merah yang digunakan yaitu 125 mg/kgBB/hari, 250 mg/kgBB/hari dan 500 mg/kgBB/hari.

HASIL

Perbandingan jumlah arteriole setiap kelompok		
Kelompok pengamatan	Rerata \pm SD	<i>p-value</i>
kontrol negatif	2.76 \pm 0.27 ^a	
kontrol positif	1.82 \pm 0.26 ^b	
PI (eks. Bit 125 mg/KgBB/hari)	2.16 \pm 0.15 ^b	0.000 $<$ α
PII (eks. Bit 250 mg/KgBB/hari)	2.40 \pm 0.07 ^c	
PIII (eks. Bit 500 mg/KgBB/hari)	2.88 \pm 0.22 ^a	

Keterangan: Pada rerata \pm sd menunjukkan hasil uji LSD jika memuat huruf yang berbeda berarti ada perbedaan yang bermakna (*p*-

value<0.05) dan jika memuat huruf yang sama berarti tidak ada perbedaan yang bermakna (*p-value*>0.05).

Pada diatas didapatkan hasil perbandingan berganda uji *LSD* yang menunjukkan bahwa ada perbedaan yang bermakna rerata jumlah arteriole antara kelompok negatif (2.76 ± 0.27^a) dengan kelompok kontrol positif (tikus dengan paparan asap rokok) (1.82 ± 0.26^b). Tampak nilai rerata jumlah arteriole kelompok kontrol positif lebih kecil bila dibandingkan dengan rerata jumlah arteriole pada kelompok kontrol negatif. Hal ini berarti bahwa tikus dengan paparan asap rokok akan menurunkan jumlah arteriole. Demikian pula kelompok kontrol negatif (2.76 ± 0.27^a) berbeda bermakna dengan kelompok PI (2.16 ± 0.15^b) dan dengan kelompok PII (2.40 ± 0.07^c). Tetapi tidak berbeda bermakna jumlah arteriole kelompok kontrol negatif (2.76 ± 0.27^a) dengan kelompok PIII (2.88 ± 0.22^a). Tampak nilai rerata jumlah arteriole pada kelompok PIII mirip dengan rerata jumlah arteriole kelompok kontrol negatif.

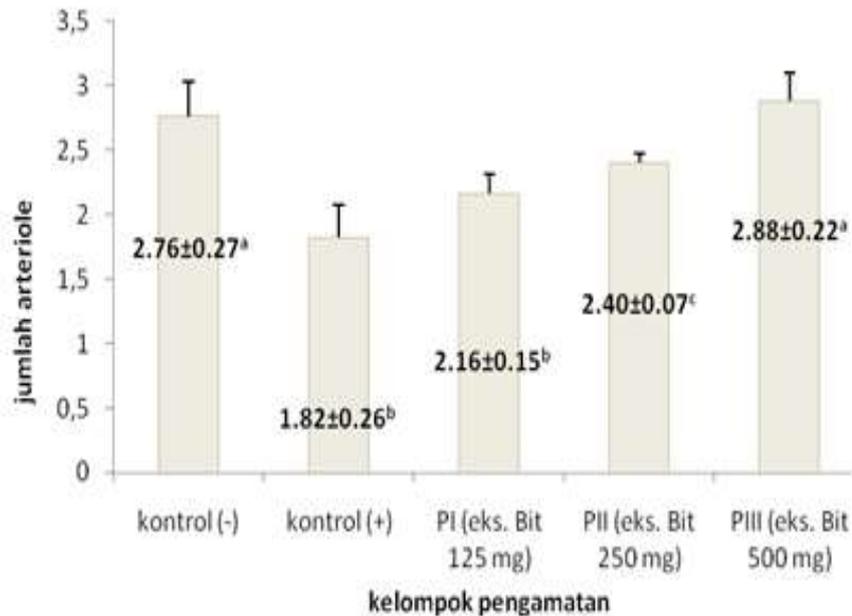
Tampak pada tabel menunjukkan ada perbedaan yang bermakna rerata jumlah arteriole antara kelompok kontrol positif (tikus dengan paparan asap rokok) (1.82 ± 0.26^b) dengan kelompok PI atau kelompok perlakuan paparan asap rokok dan diberi ekstrak etanol bit merah (*Beta vulgaris L.*) dosis 125 mg/kgBB/hari (2.16 ± 0.15^b). Tampak nilai rerata jumlah arteriole kelompok kontrol positif lebih kecil bila dibandingkan dengan rerata jumlah arteriole pada kelompok PI. Hal ini berarti bahwa tikus dengan paparan asap rokok yang diberi ekstrak etanol bit merah 125 mg/kgBB/hari dapat meningkatkan jumlah arteriole bila dibandingkan dengan tikus yang terpapar asap rokok saja. Dengan kata lain paparan asap rokok dan diberi ekstrak etanol bit merah 125 mg/kgBB/hari pada tikus *Rattus norvegicus* dapat meningkatkan jumlah arteriole.

Hasil analisis *LSD* juga terlihat bahwa ada perbedaan yang bermakna rerata jumlah arteriole antara kelompok kontrol positif (1.82 ± 0.26^b) dengan kelompok PII atau kelompok perlakuan paparan asap rokok yang diberi ekstrak etanol bit merah (*Beta vulgaris L.*) 250 mg/KgBB/hari (2.40 ± 0.07^c). Hal ini berarti bahwa tikus yang terpapar asap rokok dan diberi ekstrak etanol bit merah 250 mg/KgBB/hari akan meningkatkan jumlah arteriole bila dibandingkan dengan tikus yang terpapar asap rokok saja. Dengan kata lain paparan asap rokok dan diberi ekstrak etanol bit merah 250 mg/KgBB/hari pada tikus *Rattus norvegicus* dapat meningkatkan jumlah arteriole.

Masih dihasil tabel diatas menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna rerata jumlah arteriole antara kelompok kontrol positif (tikus dengan paparan asap rokok) (1.82 ± 0.26^b) dengan kelompok PIII atau kelompok perlakuan paparan asap rokok yang diberi ekstrak etanol bit merah (*Beta vulgaris L.*) dosis 500 mg/KgBB/hari (2.88 ± 0.22^a). Tampak nilai rerata jumlah arteriole kelompok kontrol positif lebih kecil bila dibandingkan dengan rerata jumlah arteriole pada kelompok PIII. Hal ini berarti bahwa tikus yang dipapar asap rokok dan diberi ekstrak etanol Bit merah 500 mg/KgBB/hari akan meningkatkan jumlah arteriole bila dibandingkan dengan tikus yang terpapar asap rokok saja. Dengan kata lain paparan asap rokok dan diberi ekstrak etanol bit merah 500 mg/KgBB/hari pada tikus *Rattus norvegicus* dapat meningkatkan jumlah arteriole.

Berdasarkan penjelasan hasil di tabel diatas maka dapat diartikan bahwa pemberian ekstrak etanol bit merah dosis 125 mg/KgBB/hari, 250 mg/KgBB/hari, dan 500 mg/KgBB/hari untuk tikus *Rattus norvegicus* yang sebelumnya telah terpapar asap rokok berpengaruh bermakna terhadap peningkatan jumlah arteriole. Jadi hipotesis khusus keempat terbukti, yaitu pemberian ekstrak etanol bit merah (*Beta vulgaris L.*) dapat meningkatkan jumlah arteriole endometrium pada tikus yang dipapar asap rokok.

Selanjutnya rerata jumlah arteriole pada kelima kelompok sampel tersebut disajikan secara lengkap tampak pada gambar histogram (diagram batang) di bawah ini.



Gambar Histogram rerata jumlah arteriole

Gambar 5.4 memperlihatkan histogram rerata jumlah arteriole pada tikus *Rattus norvegicus* dan tidak diberi apapun (kontrol negatif), tikus *Rattus norvegicus* dipapar dengan asap rokok (kontrol positif), dan 3 kelompok tikus *Rattus norvegicus* yang dipapar asap rokok dan pemberian ekstrak etanol bit merah (*Beta vulgaris L.*) dengan dosis 125 mg/KgBB/hari, 250 mg/KgBB/hari, dan 500 mg/KgBB/hari. Tampak rerata jumlah arteriole tertinggi pada kelompok perlakuan III dan yang terendah pada batang rerata jumlah arteriole pada kelompok kontrol positif. Hal ini berarti bahwa paparan asap rokok pada tikus mengakibatkan jumlah arteriolenya meningkat. Sedangkan rerata jumlah arteriole tampak meningkat pada kelompok PI, PII, dan PIII bila dibandingkan dengan kelompok kontrol positif. Peningkatan jumlah arteriole seiring dengan meningkatnya dosis ekstrak etanol bit merah (*Beta vulgaris L.*) yang diberikan. Jadi pemberian ekstrak etanol bit merah (*Beta vulgaris L.*) ketiga dosis tersebut mampu meningkatkan jumlah arteriole pada tikus *Rattus norvegicus* yang dipapar asap rokok sebelumnya. Sedangkan dosis ekstrak etanol bit merah (*Beta vulgaris L.*) yang dianggap paling cepat mampu meningkatkan jumlah arteriole adalah dosis 500 mg/KgBB/hari.

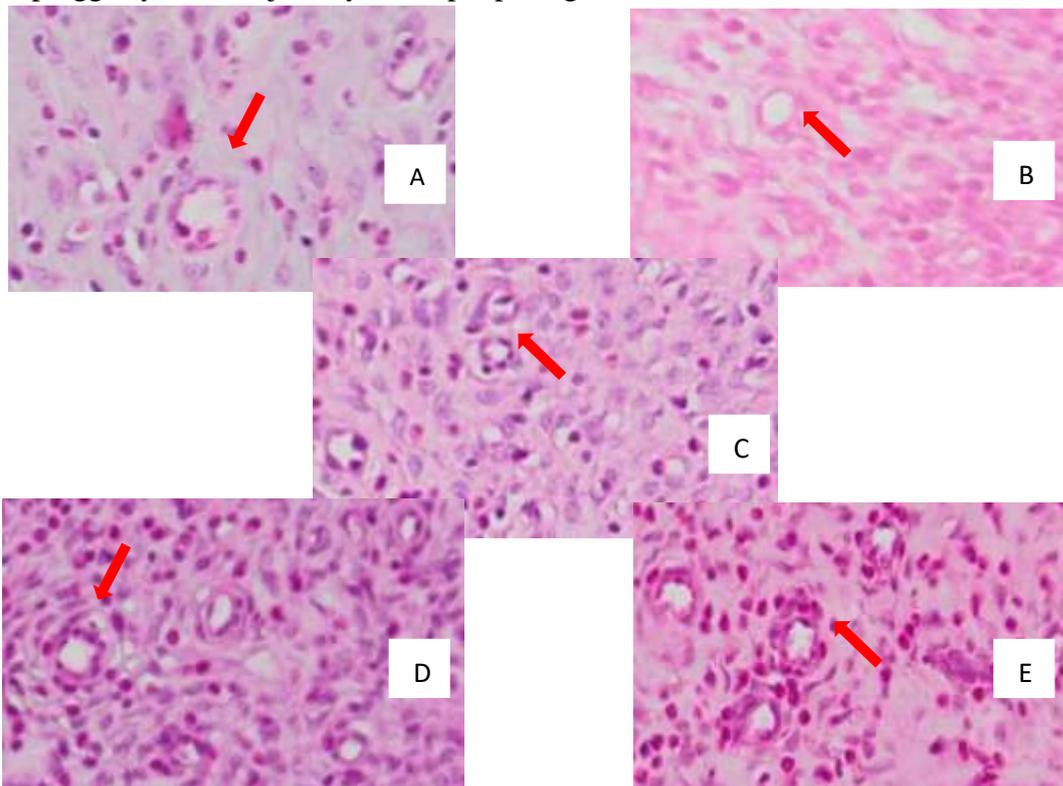
PEMBAHASAN

Penelitian ini menggunakan ekstrak bit merah dikarenakan senyawa yang terkandung didalamnya yaitu berupa betalain mengandung banyak antioksidan yang dibutuhkan oleh tubuh untuk menangkal radikal bebas yang menyebabkan terjadinya gangguan pada organ reproduksi.

Pengaruh ekstrak etanol bit merah (*Beta vulgaris L.*) terhadap jumlah arteriole di endometrium tikus yang dipapar asap rokok

Berdasarkan hasil uji *Anova one way* terlihat dengan jelas data jumlah arteriole ada perbedaan yang bermakna rerata antara kelompok kontrol negatif (tanpa perlakuan) dengan kelompok kontrol positif atau kelompok yang dipapar asap rokok 2 batang/hari tanpa diberikan ekstrak bit merah dengan kelompok perlakuan I yaitu kelompok yang dipapar asap rokok 2 batang/hari dan diberi ekstrak etanol bit merah dengan dosis 125 mg/kgBB/hari, kelompok perlakuan II yang dipapar asap rokok dan diberikan ekstrak etanol bit merah dengan dosis 250 mg/kgBB/hari dan kelompok perlakuan III atau kelompok yang dipapar asap rokok 2 batang/hari dan diberikan ekstrak etanol bit merah dengan dosis 500 mg/kgBB/hari.

Untuk jumlah arteriole dilakukan pemeriksaan dengan menggunakan metode *Haemotoxilin* dan *Eosin* yang dilihat dibawah mikroskop dengan pembesaran 400 kali. Arteriole berbentuk bulat dan mempunyai tunika intima yang terdiri atas endotel dan membrane elastika interna, arteriole ditunjukkan dengan bulatan yang agak tebal dipinggirnya. Lebih jelasnya terdapat pada gambar dibawah ini.



Gambar Arteriole pada endometrium tikus yang dipapar asap rokok dan diberi ekstrak etanol bit merah yang dilihat dibawah mikroskop dengan pembesaran 400 kali

Keterangan: Gambar A (kontrol negatif atau tanpa perlakuan), gambar B (kontrol positif atau hanya dipapar dengan asap rokok saja), gambar C (perlakuan I atau dipapar asap rokok 2 batang/hari lalu diberi ekstrak etanol bit merah dengan dosis 125 mg/kgBB/hari), gambar D (perlakuan II atau dipapar asap rokok 2 batang/hari dan diberi ekstrak etanol bit merah dengan dosis 250 mg/kgBB/hari), dan gambar E (perlakuan III atau dipapar asap rokok 2 batang/hari dilanjutkan diberi ekstrak etanol bit merah dengan dosis 500 mg/kgBB/hari).

Hampir sama dengan penelitian yang pernah dilakukan di Eropa dan Amerika Serikat, dimana akibat merokok lebih dari 10 batang perhari dapat menyebabkan penundaan hasil konsepsi dan kejadian prematur (Soares dan Melo, 2008). Ini dikarenakan gangguan yang terjadi pada organ reproduksi wanita tersebut dikarenakan kandungan yang terdapat pada rokok. Penelitian yang dilakukan oleh peneliti yaitu menggunakan hewan coba yang dipapar asap rokok selama 56 hari dengan paparan asap rokok 2 batang per hari. Hasil dari pada penelitian meneliti menunjukkan bahwa terjadi penurunan jumlah arteriole pada kelompok kontrol positif yang hanya dipapar dengan asap rokok saja, dan mulai terjadi peningkatan jumlah arteriole pada kelompok yang diberi ekstrak bit merah dengan berbagai dosis. Hampir sama dengan penelitian yang dilakukan oleh Kawashima *et al* (2004) mengatakan bahwa merokok dapat menyebabkan gangguan pada plasenta selama kehamilan awal, ini dikaitkan dengan hipoksia vili yang dapat mempengaruhi angiogenesis dan apoptosis.

Angiogenesis mempunyai peran penting pada siklus endometrium, ini dipengaruhi oleh hormon ovarium. Pada saat terjadinya menstruasi, angiogenesis berperan untuk mempertahankan jaringan endometrium dan pertumbuhan pembuluh darah yang luruh setelah fase menstruasi. Pada fase proliferasi endometrium dibutuhkan proses angiogenesis, dimana hal tersebut berguna untuk implantasi dan perkembangan embrio (Frisca *et al.*, 2009).

Terjadinya gangguan angiogenesis pada endometrium salah satunya diakibatkan karena gaya hidup yang tidak sehat misalnya seseorang yang menjadi perokok pasif. Asap rokok diketahui dapat mempengaruhi sekresi estrogen dalam tubuh, walaupun beberapa peneliti mengatakan efek asap rokok dapat menurunkan kejadian kanker yang diduga karena asap rokok dapat mengurangi estrogen.

Untuk mencegah terjadinya penurunan jumlah arteriole pada endometrium, keseimbangan antioksidan sangat dibutuhkan guna untuk menyeimbangkan radikal bebas yang ada dalam tubuh akibat paparan asap rokok. Salah satu bahan alami yang mengandung banyak antioksidan adalah bit merah. Bit mengandung pigmen bioaktif dan dikenal sebagai betalain. Penelitian lainnya mengemukakan bahwa betalain mempunyai antioksidan yang sangat tinggi dan berfungsi juga sebagai antiinflamasi yang tinggi. Bit

merah dapat mempertahankan antioksidan endogen yang membantu melindungi kerusakan oksidatif (Clifford *et al.*, 2015).

KESIMPULAN

Pemberian ekstrak etanol bit merah dengan dosis 125, 250 dan 500 mg/kgBB/hari selama 56 hari terbukti dapat meningkatkan jumlah arteriole pada endometrium tikus yang dipapar asap rokok sebanyak 2 batang/hari.

DAFTAR PUSTAKA

- Clifford, T., Howatson, G., West, J.D., Stevenson, J.E. 2015. 'The potential benefits of red beetroot supplementation in health and disease', *Nutrients*, 7(4), pp. 2801–2822. doi: 10.3390/nu7042801.
- Dechanet, C., Anahory, T., Daude M.C.J., Quantin. X., Reyftmann. L., Hamamah., et al. 2010. Effects of cigarette smoking on reproduction', *Human Reproduction Update*, Vol.17, No.1 pp. 76–95, 2011 Advanced Access publication on August 4, 2010 doi:10.1093/humupd/dmq033.
- Deka, K.P., Sarma, S. 2010. Psychological aspects of infertility. *British Journal of Medical Practitioners*, September 2010, Volume 3, Number 3.
- Frisca, C.T., Sarjhono dan Sandra, F. 2009. Angiogenesis : patofisiologi dan aplikasi klinis. *JKM*. 8 (2) : 174-187
- Kawashima, A., Koide, K., Ventura, W., Hori, K., Takenaka, S., Maruyama, D., Matsuoka, R., Ichizuka, K., Sekizawa, A. 2014. Effects of maternal smoking on the placental expression of genes related to angiogenesis and apoptosis during the first trimester. <http://sci-hub.tw/https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106140>
- Mroczek, A., Kapusta, I., Janda, B., Janiszowska, W. 2012. 'Triterpene saponin content in the roots of red beet (*Beta vulgaris* L.) cultivars', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(50), pp. 12397–12402. doi: 10.1021/jf303952x.
- Soares, R.S and Melo, A.M. 2008. Cigarette smoking and reproductive function. Instituto Valenciano de Infertilidad, IVI-Lisboa, Lisbon, Portugal and Instituto Valenciano de Infertilidad, Instituto Universitario IVI, Valencia, Spain