

KUALITAS SPERMATOZOA MENCIT (*Mus musculus* L.) SETELAH PERLAKUAN INFUS KAYU AMARGO (*Quassia amara* Linn.) DAN PEMULIHANNYA

THE SPERM QUALITY OF MICE (*Mus musculus* L.) AFTER THE TREATMENT OF AMARGO WOOD (*Quassia amara* Linn.) INFUSION AND ITS REVERSIBILITY

NI GUSTI AYU MANIK ERMAYANTI, NI MADE RAI SUARNI

*Jurusan Biologi, Fakultas MIPA Universitas Udayana,
Kampus Bukit Jimbaran*

INTISARI

Berbagai jenis tanaman sudah diteliti dapat mengganggu kesuburan pria. Telah dilakukan penelitian yang bertujuan untuk mengetahui pengaruh infus kayu amargo terhadap kualitas spermatozoa mencit dan pemulihannya. Rancangan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap Faktorial. Tigapuluh ekor mencit jantan dikelompokkan menjadi dua kelompok pengamatan, yaitu pengamatan I (35 hari setelah pemberian infus) dan pengamatan II (14 hari setelah pemberian infus dihentikan). Selanjutnya, masing-masing kelompok dibagi lagi menjadi lima sub kelompok perlakuan dosis, yaitu 0 (kontrol), 0 (plasebo), 1000, 2000, dan 4000 mg/kgBB. Infus diberikan secara oral, sekali sehari, selama 35 hari dengan volume 1ml. Kualitas spermatozoa yang diamati adalah motilitas, viabilitas, dan morfologi. Data-data yang diperoleh diuji dengan Anova. Hasil analisis menunjukkan bahwa perlakuan infus kayu amargo berpengaruh nyata ($P < 0,05$) terhadap kualitas spermatozoa dan terdapat perbedaan yang nyata antara pengamatan I dan pengamatan II. Pada pengamatan I semakin besar dosis infus yang diberikan akan menyebabkan penurunan kualitas spermatozoa dan untuk pengamatan II pengaruh infus semakin berkurang dan menunjukkan peningkatan kualitas spermatozoa tetapi belum pulih ke kondisi semula. Dapat disimpulkan bahwa infus kayu amargo dapat menurunkan kualitas spermatozoa mencit dan dapat pulih kembali.

Kata kunci: kayu amargo, kualitas spermatozoa, epididimis, fertilitas

ABSTRACT

Some studies have indicated that different types of plants can impair male fertility. The research aims to determine the effect of amargo wood intravenous feeding on the quality of mice sperm and its reversibility. The research design used was Random Full Factorial Design. Thirty male mice were divided into two groups of observations, i.e. group I (35 days after infusion) and group II (14 days after administration of infusion discontinued). Furthermore, each group was further subdivided into five sub-dose treatment groups, namely 0 (control), 0 (placebo), 1000, 2000, and 4000 mg/kg. Infusion was administered orally, once daily, for 35 days with a volume of 1 ml. The quality of sperm observed includes motility, viability, and morphology. The data obtained were tested by Anova. The result showed that amargo wood intravenous treatment has significant effect ($P < 0,05$) on sperm quality and there are significant differences between group I and group II. For the observation of group I, the greater the infusion dose given will cause a decrease in sperm quality and for group II infusion decreases the effect and shows an improvement of sperm quality, but not yet recovered to its first condition. It was concluded that amargo wood infusion can reduce the sperm quality of mice and reversible in nature.

Keywords: amargo wood, sperm quality, epididymis, fertility

PENDAHULUAN

Mencari metode kontrasepsi yang efektif dan tepat merupakan riset yang panjang dan luas selama 50 tahun lalu (Parandin *et al.*, 2008). Berbagai jenis tanaman sudah diteliti memiliki pengaruh terhadap sistem reproduksi hewan jantan, sehingga dapat digunakan sebagai bahan kontrasepsi pria. Menurut Soehadi dan Arsyad (1983) metode kontrasepsi pria yang digunakan saat ini, adalah kondom, vasektomi, dan senggama

terputus. Akan tetapi, hasilnya masih belum sepenuhnya diterima masyarakat, karena memberikan efek samping dan belum 100% dapat mencegah kehamilan.

Quassia amara Linn. adalah tumbuhan tropis yang mempunyai potensi untuk dikembangkan sebagai bahan kontrasepsi pria. Menurut Kohler (1996) nama umum untuk *Q. amara* adalah amargo tetapi di beberapa negara dikenal juga sebagai *bitter wood*, *quassia*, *simaruba*, dan *gubo*. Menurut Hyne (1987) tumbuhan ini berasal dari Amerika tropis dan dikenal di Indonesia dengan nama

daerah Sunda, yaitu *genteng peujit* dan *ki congcorang*. Tumbuhan amargo (*Q. amara*) merupakan perdu tegak yang tingginya 2-3 meter dan termasuk famili Simaroubaceae. Dari tumbuhan ini yang berkhasiat obat adalah kayunya yaitu akar dan batangnya dan mengandung senyawa bioaktif kuasinoid, terutama kuasin.

Kayu amargo digunakan oleh masyarakat secara tradisional untuk pengobatan malaria. Selain itu, juga sebagai obat hipertensi, diabetes, konstipasi, anemi, cacangan, diuretik, dan disentri. Untuk pengobatan tradisional kayu amargo ini biasanya diolah dengan teknik infus dengan maserasi di dalam air dingin atau panas dan dijadikan sebagai jamu-jamuan dan diminum 1-1/2 cangkir setiap 2 hari sekali (Kohler, 1996). Berdasarkan kajian toksisitas kayu amargo yang dilakukan pada tikus dan mencit didapatkan hasil tidak ada tanda-tanda toksisitas pada dosis oral hingga 1000 mg/kg BB (Gonzales *et al.*, 1997).

Kayu amargo sangat efektif untuk obat antimalaria. Dengan meningkatnya perhatian kepada pengembangan kuasinoid sebagai obat antimalaria dipandang penting untuk mengevaluasi apakah kuasinoid memiliki kemampuan sebagai bahan antifertilitas sehingga dapat dikembangkan sebagai bahan kontrasepsi pria. Beberapa penelitian yang telah dilakukan yang berkaitan dengan tumbuhan yang mempunyai kemampuan sebagai bahan antimalaria mempunyai kemampuan sebagai bahan antifertilitas, adalah *Carica papaya* (Loyiha *et al.*, 1994), *Q. amara* (Raji *et al.*, 1995), *Q. amara* (Raji dan Bolarinwa, 1997), dan *Azadirachta indica* (Raji *et al.*, 2003).

Sampai saat ini, analisis kualitas spermatozoa masih merupakan salah satu alat terpenting untuk mengevaluasi kesuburan seorang pria (Soehadi dan Arsyad, 1983). Berdasarkan hal tersebut, maka dilakukan penelitian yang bertujuan untuk mengetahui pengaruh infus kayu amargo terhadap kualitas (motilitas, viabilitas, morfologi) spermatozoa mencit, selain itu juga diamati bagaimana pemulihannya setelah perlakuan infus kayu amargo dihentikan.

MATERI DAN METODE

Proses Infusum

Penelitian dilakukan di Unit Pengembangan Hewan Percobaan (UPHP) UGM dan Laboratorium Anatomi Hewan Fakultas Biologi UGM Yogyakarta. Bahan infus adalah kayu amargo, bagian yang digunakan adalah batangnya yang telah dikupas kulitnya dan diserut. Bahan diperoleh dari Balai Penelitian Rempah dan Obat (Balitro) Bogor.

Pembuatan infus dimulai dengan pengeringan bahan di udara terbuka. Bahan setelah kering dijadikan serbuk dengan alat *grainer* sampai halus dan diayak dengan ukuran penyaringan 360 *mesh* sehingga diperoleh serbuk yang homogen. Selanjutnya, masing-masing serbuk yang akan digunakan oleh masing-masing kelompok

dimasukkan ke dalam tabung Erlenmeyer dan diberi aquades 100 ml, kemudian dipanaskan selama 15 menit terhitung sejak suhu mencapai 90°C serta sekali-kali diaduk, larutan yang masih panas selanjutnya disaring dengan kertas saring (Kohler, 1996).

Hewan Uji dan Pembuatan Suspensi Spermatozoa

Hewan uji adalah mencit jantan *strain* Swiss dengan berat badan antara 25 sampai 30 gram yang berumur 10 minggu. Hewan uji diperoleh dari Unit Pengembangan Hewan Percobaan (UPHP) UGM.

Pembuatan suspensi spermatozoa dilakukan sehari setelah perlakuan berakhir dengan cara hewan uji dinarkose selanjutnya dibedah kemudian spermatozoa diambil dari *cauda epididimis*. *Cauda epididimis* dimasukkan ke dalam cawan petri yang berisi 1,0 ml garam fisiologis 0,9% bersuhu 37-40°C kemudian dipotong dengan gunting kecil sampai halus dan diaduk dengan gelas pengaduk sehingga diperoleh suspensi spermatozoa yang homogen. Suspensi spermatozoa yang diperoleh dapat digunakan untuk analisis kualitas spermatozoa (Soehadi dan Arsyad, 1983).

Rancangan Percobaan

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) berpola faktorial. Faktor pertama adalah waktu pengamatan dan faktor kedua adalah perlakuan variasi dosis.

Tigapuluh ekor mencit jantan dikelompokkan menjadi dua kelompok pengamatan, yaitu pengamatan I (35 hari setelah pemberian infus) dan pengamatan II (14 hari setelah pemberian infus dihentikan). Selanjutnya, masing-masing kelompok dibagi menjadi lima sub kelompok perlakuan dosis, yaitu A=0 (kontrol), B=0 (plasebo), C=1000mg/kgBB, D=2000mg/kgBB, dan E=4000mg/kgBB dan masing-masing sub kelompok terdiri atas tiga ekor hewan uji sebagai ulangan. Infus diberikan secara oral, sekali sehari, selama 35 hari dengan volume satu ml.

Variabel Kualitas Spermatozoa yang Diamati.

Kualitas spermatozoa yang diamati dalam penelitian ini, adalah motilitas, viabilitas, dan morfologi. Untuk mengetahui perubahan kualitas spermatozoa maka dilakukan pengamatan terhadap spermatozoa dalam epididimis dengan membuat suspensi spermatozoa.

Motilitas spermatozoa dihitung berdasarkan katagori 0 (tidak baik), 1 (kurang baik), 2 (baik), 3 (sangat baik). Persentase jumlah spermatozoa yang motil ditentukan dengan cara menjumlahkan katagori 2,3 dibagi dengan jumlah katagori 0,1,2,3 dikalikan 100%. Analisis viabilitas dilakukan dengan membuat preparat apus dengan pewarnaan Eosin-Y 0,5%. Spermatozoa hidup tidak berwarna sedangkan spermatozoa mati akan berwarna merah. Analisis morfologi dapat diamati pada sediaan apusan yang menggunakan pewarnaan Eosin-Y 1% dan nigrosin 10% (Soehadi dan Arsyad, 1983).

Analisis Data

Data disajikan dalam bentuk *mean* dan *standard deviation*. Untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh perlakuan terhadap parameter yang diukur, dilakukan pengujian dengan *Analysis of Variance* (Anova, $\alpha = 0,05$). Apabila terdapat perbedaan yang nyata maka dilakukan uji lanjut dengan *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT, $\alpha = 0,05$) (Sokal & Rohlf, 1996).

HASIL

Pengaruh infus kayu amargo terhadap kualitas spermatozoa menunjukkan hasil sebagai berikut untuk rata-rata motilitas, viabilitas dan morfologi spermatozoa berbeda nyata antar perlakuan ($P < 0,05$) dan antar waktu pengamatan ($P < 0,05$) (Tabel 1,2,3).

Tabel 1. Rata-rata Motilitas spermatozoa (%)

Perlakuan	Pengamatan I	Pengamatan II
A=0 (Kontrol)	75,56 ± 0,39a	76,04 ± 0,94a
B=0 (Plasebo)	76,07 ± 1,94a	76,04 ± 1,67a
C=1000mg/kgBB	70,74 ± 1,41b	74,11 ± 0,00a
D=2000mg/kgBB	61,74 ± 1,56c	67,15 ± 1,11e
E=4000mg/kgBB	41,30 ± 2,57d	52,11 ± 2,17f

Keterangan: Uji Anova ($\alpha = 0,05$) dilanjutkan dengan uji DMRT
Huruf sama menunjukkan tidak ada perbedaan yang nyata

Tabel 2. Rata-rata Viabilitas Spermatozoa (%)

Perlakuan	Pengamatan I	Pengamatan II
A=0 (Kontrol)	74,59 ± 2,21ab	75,44 ± 1,39a
B=0 (Plasebo)	74,19 ± 0,85ab	76,33 ± 0,80a
C=1000mg/kgBB	68,89 ± 1,44c	72,19 ± 1,06b
D=2000mg/kgBB	58,11 ± 1,68d	66,26 ± 1,81f
E=4000mg/kgBB	42,11 ± 1,17e	60,11 ± 0,89d

Keterangan: Uji Anova ($\alpha = 0,05$) dilanjutkan dengan uji DMRT
Huruf sama menunjukkan tidak ada perbedaan yang nyata

Tabel 3. Rata-rata Morfologi Normal Spermatozoa (%)

Perlakuan	Pengamatan I	Pengamatan II
A=0 (Kontrol)	78,30 ± 1,17ab	79,33 ± 1,17ab
B=0 (Plasebo)	79,37 ± 0,79ab	80,11 ± 0,19ab
C=1000mg/kgBB	74,74 ± 2,18c	77,14 ± 1,06b
D=2000mg/kgBB	64,85 ± 0,46d	72,49 ± 1,56f
E=4000mg/kgBB	55,07 ± 0,13e	60,44 ± 2,22g

Keterangan: Uji Anova ($\alpha = 0,05$) dilanjutkan dengan uji DMRT
Huruf sama menunjukkan tidak ada perbedaan yang nyata

Pada pengamatan I (35 hari setelah pemberian infus) terjadi penurunan rata-rata persentase motilitas, viabilitas dan morfologi normal spermatozoa mencit dengan semakin besarnya dosis infus kayu amargo yang diberikan.

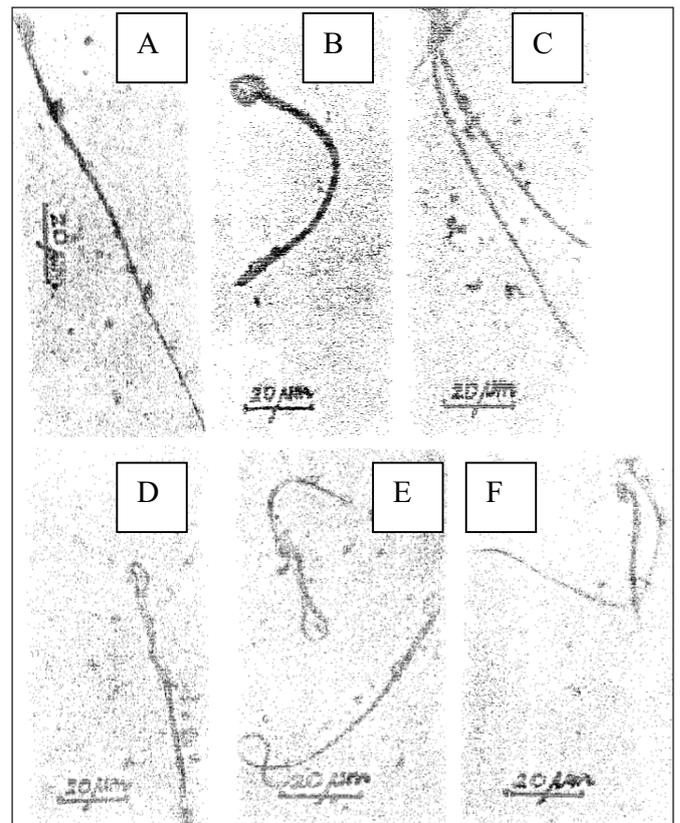
Rata-rata persentase spermatozoa motil, viabel dan normal menurun sedangkan non-motil, non-viabel dan spermatozoa abnormal meningkat (Tabel 1,2,3). Persentase spermatozoa motil dalam penelitian ini didapatkan hasil A(75,56); B(76,07); C(70,74); D(61,74); E(41,30). Persentase spermatozoa viabel dalam penelitian ini didapatkan hasil A(74,59); B(74,19); C(68,89); D(58,11); E(42,11). Persentase spermatozoa

normal dalam penelitian ini didapatkan hasil A(78,30); B(79,37); C(74,74); D(64,85); E(55,07). Gambar 1 menunjukkan berbagai kelainan morfologi spermatozoa mencit setelah perlakuan infus kayu amargo.

Persentase kualitas spermatozoa (motilitas, viabilitas, morfologi) dengan kelompok C, D dan E berbeda nyata dengan kontrol dan plasebo. Menurunnya kualitas spermatozoa sangat tampak pada kelompok D dan E. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa bioaktif kayu amargo menimbulkan pengaruh yang berarti dalam menurunkan kualitas spermatozoa.

Perbedaan yang nyata juga terlihat antara pengamatan I dan pengamatan II. Pada pengamatan II, yaitu 14 hari setelah perlakuan dihentikan, pengaruhnya semakin berkurang sehingga terjadi peningkatan kembali rata-rata persentase motilitas, viabilitas, dan morfologi spermatozoa.

Rata-rata persentase spermatozoa motil, viabel, normal mulai meningkat sedangkan non-motil, non-viabel, dan spermatozoa abnormal mulai menurun (Tabel 1,2,3). Persentase spermatozoa motil dalam penelitian ini didapatkan hasil A(76,04); B(76,04); C(74,11); D(67,15); E(52,11). Persentase spermatozoa



Keterangan:
A. Normal
B. Kepala ganda
C. Kepala besar dan ekor ganda
D. Kepala taper
E. Ekor melingkar
F. Ekor patah

Gambar 1. Berbagai kelainan morfologi spermatozoa mencit setelah perlakuan infus kayu amargo

viabel dalam penelitian ini didapatkan hasil A(75,44); B(76,33); C(72,19); D(66,26); E(60,11). Persentase spermatozoa normal dalam penelitian ini didapatkan hasil A(79,33); B(80,11); C(77,45); D(72,49); E(60,44).

Pada pengamatan II persentase kualitas spermatozoa (motilitas, viabilitas, morfologi) pada kelompok C tidak berbeda nyata dengan kelompok A dan B sedangkan kelompok D dan E berbeda nyata dengan kelompok A dan B. Ini berarti, pada kelompok C kualitas spermatozoa dapat pulih kembali dalam kondisi normal sedangkan untuk kelompok D dan E belum pulih dalam kondisi normal tapi menunjukkan perbaikan.

PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil penelitian diperoleh terjadi penurunan kualitas (motilitas, viabilitas, dan morfologi) spermatozoa setelah perlakuan infus kayu amargo. Menurunnya spermatozoa motil dan meningkatnya yang non-motil kemungkinan disebabkan oleh menurunnya kadar testoteron. Hal ini, sesuai dengan pendapat Raji *et al.*, (1995) yang mengatakan bahwa *quassinoid* yang terdapat pada kayu amargo dapat menghambat aktivitas sel Leydig dengan mempengaruhi LH adenohipofisis. Lebih lanjut, dikatakan pula bahwa *quassinoid* yang terdapat pada kayu amargo bekerja secara kompetitif pada lokasi reseptor LH sehingga menghambat sekresi LH akibatnya akan mengganggu kerja sel Leydig untuk menghasilkan testoteron.

Dengan menurunnya kadar testoteron akan mengakibatkan terjadinya gangguan proses maturasi spermatozoa dalam epididimis, terutama gangguan dalam proses glikolisis. Menurut Souhoka *et al.*, (2009) proses glikolisis ini akan menghasilkan energi berupa adenosine trifosfat (ATP). ATP dimanfaatkan oleh spermatozoa sebagai sumber energi dalam proses pergerakan sehingga dapat tetap motil dan sekaligus untuk mempertahankan daya hidupnya.

Saluran alat kelamin jantan yang sangat tergantung pada adanya testoteron adalah epididimis. Epididimis berfungsi sebagai penampung produksi spermatozoa dan cairan testis. Epididimis juga merupakan gudang dari spermatozoa karena merupakan tempat penimbunan maka haruslah ada yang menjamin bahwa spermatozoa yang ditimbun itu harus tetap hidup (Partodihardjo, 1992).

Berdasarkan hasil penelitian diperoleh setelah perlakuan dengan infus kayu amargo terjadi penurunan viabilitas spermatozoa. Menurunnya viabilitas spermatozoa kemungkinan disebabkan oleh berkurangnya cairan bagi spermatozoa sehingga maturasi spermatozoa di epididimis terganggu. Menurut Malini (2000) fungsi epididimis terganggu disebabkan oleh menurunnya testoteron. Testoteron dibutuhkan oleh epididimis untuk transport elektrolit.

Pada penelitian ini juga terjadi penurunan spermatozoa normal dan peningkatan spermatozoa

abnormal setelah perlakuan dengan infus kayu amargo. Menurunnya spermatozoa normal kemungkinan disebabkan oleh abnormalitas primer dan abnormalitas sekunder. Berdasarkan hasil pengamatan, abnormalitas primer yang banyak dijumpai adalah kelainan pada kepala seperti kepala ganda, terlampau besar, dan kepala taper, sedangkan abnormalitas sekunder yang banyak ditemukan adalah patahan pada ekor.

Ditemukannya abnormalitas primer diduga karena adanya gangguan spermatogenesis pada fase spermiogenesis, yaitu saat pembentukan spermatozoa dari spermatid sedangkan abnormalitas sekunder terjadi diduga karena adanya gangguan maturasi spermatozoa dalam epididimis sehingga mengakibatkan ditemukannya spermatozoa abnormal.

Senyawa bioaktif kayu amargo dapat menyebabkan berkurangnya berat testis, epididimis, vesikula seminalis dan berkurangnya jumlah spermatozoa epididimis tikus secara *in vivo* (Raji dan Bolarinwa, 1997). Terjadinya gangguan spermatogenesis kemungkinan disebabkan oleh menurunnya berat testis, yang mana spermatogenesis terjadi di dalam tubulus seminiferus testis sedangkan terjadinya gangguan maturasi spermatozoa di dalam epididimis kemungkinan disebabkan terjadinya penurunan berat epididimis sehingga mengakibatkan adanya gangguan terhadap perkembangan maupun fungsi epididimis. Menurut Sujoko dkk., (2009) bentuk morfologi sel spermatozoa berpengaruh terhadap pembuahan, jika jumlah abnormalitas spermatozoa terlalu tinggi maka akan menurunkan fertilitasnya.

Beberapa tanaman yang dilaporkan mempunyai pengaruh terhadap fungsi testis seringkali mempengaruhi kualitas dan kuantitas sel sperma, seperti jumlah, motilitas, viabilitas, morfologi dan potensial mempengaruhi fertilitasnya (Aladakatti *et al.*, 2002). Kundra and Pereira (2002) melaporkan bahwa *Q. amara* potensial untuk digunakan sebagai bahan antifertilitas karena dapat menurunkan jumlah spermatozoa serta motilitas, viabilitas, dan morfologi spermatozoa. Demikian juga, yang dilaporkan Parandin *et al.*, (2008) terjadinya penurunan jumlah spermatozoa, serta motilitas, viabilitas dan morfologi spermatozoa dapat menunjukkan adanya infertilitas hewan uji.

Berdasarkan hasil penelitian tentang pemulihannya maka pengaruh infus kayu amargo terhadap kualitas spermatozoa adalah sementara karena setelah perlakuan infus kayu amargo dihentikan maka terjadi peningkatan kembali kualitas spermatozoa, meliputi motilitas, viabilitas, dan morfologi.

Terjadinya peningkatan kualitas spermatozoa diduga karena sel Leydig aktif memproduksi testoteron lagi. Dari pengukuran terhadap kadar testoteron dengan metode RIA menunjukkan adanya peningkatan kadar testoteron kembali dalam plasma darah mencit setelah perlakuan infus kayu amargo dihentikan (Ermayanti dkk., 2005). Hal ini, sesuai dengan yang dilaporkan Raji *et al.*, (1992) terjadi peningkatan kembali aktivitas

sel Leydig tikus secara *in vitro* setelah perlakuan ekstrak kayu amargo dihentikan.

SIMPULAN

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa infus kayu amargo pada dosis 1000, 2000, dan 4000 mg/kgBB dapat menurunkan kualitas spermatozoa mencit dan infus kayu amargo bersifat dapat pulih kembali.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih penulis ucapkan kepada Dirjen DIKTI yang telah memberikan dana penelitian dan juga kepada semua pihak yang telah membantu terlaksananya penelitian ini

KEPUSTAKAAN

- Aladakatti, R.H., R.N. Ahmed, and G. Ghosewar. 2002. Sperm Parameters Changes Induced by *Azadirachta indica* Root on Albino Rat. *J. Basic and Clin Physiol. Pharmacol.* 12(1):3-9.
- Ermayanti, N.G.A.M., A.A.S.A. Sukmaningsih, dan D.A. Yulihastuti. 2005. Pengaruh Infus Kayu Amargo (*Quassia amara* Linn.) terhadap Testosteron mencit (*Mus musculus* L.) dan Reversibilitasnya. *J. Biol. Unud.* IX(2):62-64
- Gonzales, M.G., G. Camacho, and P.Sanou. 1997. Pharmacologic Activity of the Aqueous Wood Extract from *Quassia amara* (Simarubaceae) on Albino Rats and Mice. *Rev. Biol. Trop.* 44-45.
- Hyne. 1987. Tumbuhan Berguna Indonesia II. Badan Penelitian dan Pengembangan Kehutanan. Sarana Warna Jaya, Jakarta. 1094-1095.
- Kohler. 1996. Amargo. Medicinal Plants. Raintree Nutrition Inc, Austin, Texas. 1-4
- Kundra, P. and B.M. Pereira. 2002. A Comprehensive Evaluation of the Reproductive Toxicity *Quassia amara* in Male Rats. *J. Physiol. Sci.* 24:45-50
- Loyiha, N.K., R.B. Goyal., D. Jayaprakash., A.S. Ansari and S. Sharma. 1994. Antifertility Effects of Aqueous Extract of *Carica papaya* Seed in Male Rats. *J. Planta. Med.* 66:400-404.
- Malini, D.M. 2000. Pengaruh Ekstrak Biji Nimba (*Azadirachta indica* A. Juss) terhadap Laju Pertambahan Berat Badan dan Organ Reproduksi Tikus (*Rattus norvegicus*) Wistar Jantan. *J. Biol. Unud* IV(2):78-83.
- Parandin, R., H.R. Sadeghipour, and S.A.H. Rohani. 2008. Evaluation of Antifertility Effect and Recovery of the Seed Oil Constituents of Iranian Species of *Melia azadrach* L. *J. Word Medicine* 7(1):1-5.
- Partodihardjo, | S. 1992. Ilmu Reproduksi Hewan. Mutiara Sumber Widya 149-394
- Raji, Y., A.F.Bolarinwa dan E.U.Nduka. 1995. Antifertility Activity of *Quassia amara*: Quassin Inhibits the Steroidogenesis in Rat Leydig Cells *in vitro* *J. Planta Med.* 61(2):180-182.
- Raji, Y. dan A.F.Bolarinwa. 1997. Antifertility Activity of *Quassia amara* in Male Rats-*in vivo* Study. *Life Sci.* 61(11):1067-1074
- Raji, Y., U.S. Udoh., O.O. Mowoyeka., F.C. Ononye, and A.F. Bolarinwa, 2003. Implication of Reproductive Endocrine Malfunction in Male Anti-fertility Efficacy of Azaridichtha *indica* Extract in Rats. *African J. Med. Sci.* 32: 159 – 165.
- Soehadi, K. dan K.M. Arsyad. 1983. Analisa Sperma. Airlangga University Press. Surabaya. 12-31.
- Sokal, R.R. dan F.J. Rohlf. 1996. Pengantar Biostatistika. (Introduction to Biostatistic). ed. ke-2. Diterjemahkan oleh Nasrullah, Gadjah Mada University Press, Yogyakarta. 235-252
- Souhoka., D.F., M.J. Matatula., W.M. Mesang-Nalley, dan M. Rizal. 2009. Lakosa Mempertahankan Daya Hidup Spermatozoa Kambing Peranakan Etawah yang Dipreservasi dengan Plasma Semen Domba Priangan. *J. Veteriner Unud* 10(3):135-142.
- Sujoko, H., M.A. Setiadi dan A. Boediono. 2009. Seleksi Domba Garut dengan Metode Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll. *J. Veteriner Unud* 10(3):125-134.