

FRACTIONS OF THE HEXANE EXTRACT OF YOUNG CARICA PAPAYA SEEDS CAN INHIBIT SPERMATOGENESIS IN MALE MICE MORE THAN FRACTION OF THE METHANOL EXTRACT OF YOUNG CARICA PAPAYA SEEDS

Bagus Komang Satriyasa
Departement of pharmacology, Medical school, Udayana University
Denpasar-Bali

Fraction of hexane extract contains glycosides and triterpenoids, which is assumed to have an anti fertility ingredient, so it can be used as a male contraceptive, although the mechanism of action is not yet clear.

This study used the pre-test and post-test control group design, using 30 male mice of balb C strain, aged 12 weeks, weight 20-22 gram, subsequently grouped by random into 3 groups each consisting of 10 male mice. One control group (P0 = control group) was given double distilled water, and two treatment groups (P1 = treatment group) was given fraction of the hexane extract of young Carica papaya seed 20 mg/20gram/day, P2 = treatment group) was given fraction of the methanol extract of young Carica papaya seed 20 mg/20 gram/day). After 36 days of treatment, evaluation of the testis and blood, of the male mice was conducted.

Data were analysed by normality test of Kolmogorov Smirnov Goodness of Fit, homogeneity test, and Anova test. This study showed that cells of spermatogonia A, primary pachiten spermatocyte, spermatid, and Sertoli cells, decreased significantly ($p < 0,05$) but Leydig cells and testosterone were not decreased significantly ($p > 0,05$).

It is concluded that fraction of hexane extract of carica papaya seeds can decrease the mean number of cells spermatogonia A, spermatocyte of primary pachiten, spermatid, Sertoli, and Leydig cells and the level of testosterone hormone better than fraction of methanol extract of young Carica papaya seeds.

Keyword : Spermatogenesis, testosterone, fraction hexane extract of young Carica papaya seeds and fraction methanol extract of young Carica papaya seeds, male mice.

FRAKSI HEKSAN EKSTRAK BIJI PEPAYA MUDA DAPAT MENGHAMBAT PROSES SPERMATOGENESIS MENCIT JANTAN LEBIH BESAR DARIPADA FRAKSI METANOL EKSTRAK BIJI PAPAYA MUDA

Fraksi ekstrak heksan mengandung dua golongan zat aktif yang bersifat antifertilitas yaitu golongan steroid dan golongan triterpenoid yang diperkirakan bersifat antifertilitas, walaupun mekanisme kerjanya belum jelas.

Rancangan penelitian yang digunakan ialah ‘‘ *Pre-test post-test control group design*’’. Penelitian ini memakai 30 ekor mencit jantan strain balb C , umur sekitar 12 minggu dengan berat 20-22 gram, kemudian dikelompokkan secara random menjadi 3 kelompok yang masing-masing terdiri dari 10 ekor. Satu kelompok kontrol (P0 = yang

diberikan aquabides), dan dua kelompok perlakuan (P1 = kelompok perlakuan yang diberikan fraksi heksan ekstrak 20 mg/20 gram/hari, P2 = kelompok perlakuan yang diberikan fraksi ekstrak metanol 20 mg/20 gram/hari). Setelah 36 hari perlakuan lalu dilakukan pemeriksaan testis dan darah mencit.

Data yang diperoleh dianalisis secara statistik dengan menggunakan uji normalitas Kolmogorov Smirnov Goodness of Fit test, uji homogenitas, dan uji anova. Didapatkan hasil bahwa fraksi heksan ekstrak maupun metanol dapat menurunkan jumlah sel spermatogonia A, sel spermatosit primer pakhten, sel spermatid, dan sel Sertoli secara sangat bermakna ($p < 0,01$), sedangkan jumlah sel Leydig dan kadar hormon testosteron menurun tidak bermakna ($p > 0,05$).

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa fraksi heksan ekstrak biji pepaya dapat menurunkan jumlah rata-rata sel spermatogonia A, spermatosit primer pakhten, spermatid, sel Sertoli, sel Leydig dan kadar hormon testosteron lebih besar dari pada fraksi metanol ekstrak biji pepaya muda.

Kata kunci : spermatogenesis, testosteron, fraksi heksan ekstrak biji pepaya muda dan fraksi metanol ekstrak biji pepaya muda, mencit jantan

Pendahuluan

Untuk menghindari terjadinya ledakan jumlah penduduk, maka program keluarga berencana (KB) harus dilakukan oleh semua pihak baik pria maupun wanita. Pada kenyataannya, program keluarga berencana masih didominasi oleh wanita sedangkan pria belum banyak berpartisipasi..

Salah satu alasan rendahnya partisipasi pria dalam keluarga berencana karena kontrasepsi pria yang tersedia sangat terbatas jenisnya. Masalah tersebutlah yang menjadi landasan mengapa perkembangan teknologi kontrasepsi perlu lebih mengarah pada pria (Wilopo, 2006). Kontrasepsi pria yang ada saat ini sangat terbatas, sehingga diupayakan pengembangan obat-obat kontrasepsi pria yang ideal, salah satu di antaranya dengan mencari bahan alternatif dari bahan-bahan alam.

Biji pepaya muda merupakan salah satu bahan alam yang mempunyai khasiat antifertilitas. Penelitian ini dilakukan untuk membuktikan bahwa fraksi heksan ekstrak biji pepaya muda mempunyai efek menghambat proses spermatogenesis lebih kuat daripada fraksi metanol ekstrak biji pepaya muda. Biji pepaya yang dipakai dalam penelitian ini adalah biji pepaya muda (*Carica papaya, Linn*) lokal Bali.

Metode Penelitian

Penelitian ini ialah penelitian eksperimental dengan rancangan *Pre-test Post-test Control Group Design* (Campbell and Stanley, 1968). Jumlah sampel dalam penelitian ini didapatkan dengan rumus Frederer $(t-1)(n-1) \geq 15$. Sebanyak 30 ekor mencit jantan Balb/C, kemudian dikelompokkan secara *simple random sampling* menjadi tiga kelompok: kelompok kontrol (P0) yang diberikan aquabides; kelompok perlakuan 1 (P1) yang diberikan fraksi heksan ekstrak biji pepaya; kelompok perlakuan 2 (P2) yang diberikan fraksi metanol ekstrak biji pepaya.

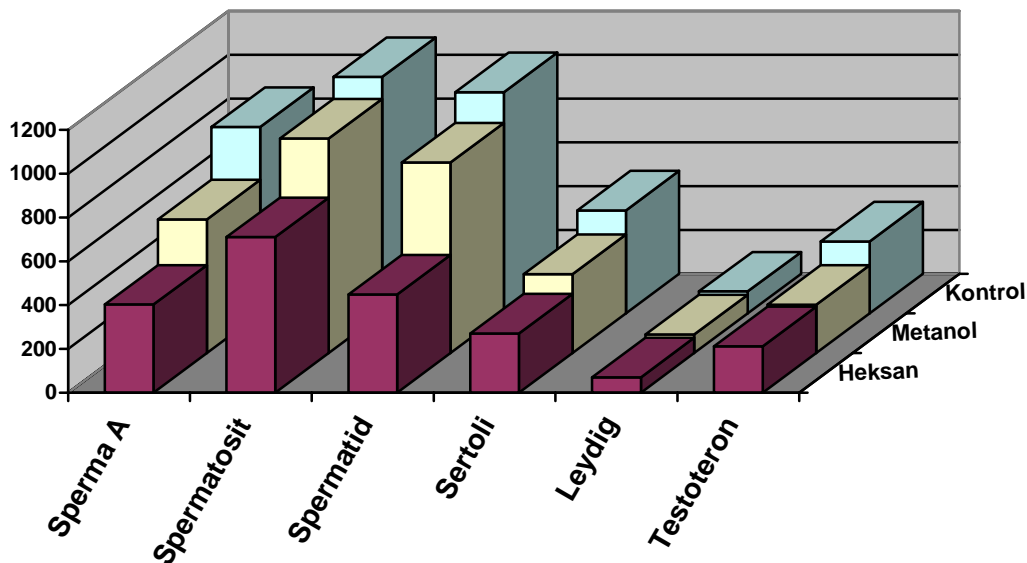
Pada awal percobaan dari masing-masing kelompok diambil 5 ekor mencit secara acak kemudian diambil darah dari subkunjunctiva matanya untuk memeriksa hormon testosteron. Setelah diambil darahnya kemudian mencit dibunuh, testisnya diambil untuk pemeriksaan sel-sel spermatogonia A, sel-sel spermatosit primer pakhtien, sel-sel spermatid, sel-sel Sertoli dan sel-sel Leydig.

Setelah perlakuan selama 36 hari, kelompok kontrol, kelompok perlakuan pertama (yang diberikan fraksi heksan ekstrak biji pepaya) dan kelompok perlakuan kedua (yang diberikan fraksi metanol ekstrak biji pepaya) diambil lagi masing-masing 5 ekor mencit untuk diambil darah dan testisnya. Darah diambil untuk pemeriksaan hormon testosteron sedangkan testisnya untuk pemeriksaan sel-sel spermatogonia A, spermatosit primer pakhtien, spermatid, sel Sertoli dan sel Leydig

Data yang diperoleh dari pemeriksaan terhadap 60 tubulus (30 tubulus dari testis kanan dan 30 tubulus dari testis kiri). Evaluasi dilakukan pada stadium VII siklus spermatogenesis mencit. Data kuantitatif: dihitung jumlah sel-sel spermatogonia A, sel-sel spermatosit primer pakhtien, sel-sel spermatid, sel-sel Sertoli, sel-sel Leydig dan kadar hormon testosteron.

Analisis Anova untuk mengetahui perbedaan rerata antar kelompok dan analisis komparasi untuk mengetahui perbedaan antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan. Derajat kemaknaan ditetapkan dengan $\alpha \leq 0,05$.

HASIL PENELITIAN



Gambar 1. Histogram jumlah sel spermatogonia A, sel spermatosit primer pakhtien, spermatid, Sertoli, Leydig dan testosteron pada mencit Balb/C setelah diberikan 0,5 ml fraksi heksan ekstrak dan fraksi ekstrak metanol selama 36 hari

1. Peran Fraksi Ekstrak Biji Pepaya Muda terhadap Jumlah Sel Spermatogonia A

Dari hasil analisis *oneway* Anova didapatkan jumlah rata-rata sel spermatogonia A kelompok kontrol 852, kelompok perlakuan pertama 402, kelompok perlakuan kedua 610. Ketiga kelompok mempunyai perbedaan yang sangat bermakna ($p=0,000$). Hasil analisis LSD (*Least Significant Difference*) didapatkan jumlah sel spermatogonia A kelompok kontrol berbeda sangat bermakna dengan kelompok pertama ($p=0,000$) dan dengan kelompok kedua ($p=0,002$). Kelompok perlakuan pertama berbeda sangat bermakna dengan kelompok perlakuan kedua ($p=0,006$). Terlihat kelompok perlakuan yang diberikan fraksi heksan ekstrak biji pepaya muda mengalami penurunan jumlah rata-rata sel spermatogonia A lebih banyak dibandingkan dengan kelompok perlakuan yang diberikan fraksi metanol ekstrak biji pepaya muda.

2. Peran Fraksi Ekstrak Biji Pepaya Muda terhadap Jumlah Sel Spermatisit Primer

Pakhiten

Dengan analisis uji *oneway* Anova didapatkan jumlah sel spermatisit primer pakhiten pada kelompok kontrol 1080, pada kelompok perlakuan pertama 710, pada kelompok perlakuan kedua 980. Ketiga kelompok mempunyai perbedaan yang sangat bermakna ($p=0,000$). Hasil analisis LSD (*Least Significant Difference*) mendapatkan jumlah sel spermatisit primer pakhiten kelompok kontrol berbeda sangat bermakna dengan kelompok perlakuan pertama ($p=0,000$) dan dengan kelompok perlakuan kedua ($p=0,002$). Kelompok perlakuan pertama dengan kelompok perlakuan kedua terdapat perbedaan yang sangat bermakna ($p=0,000$). Kelompok perlakuan yang diberikan fraksi heksan ekstrak biji pepaya muda menurunkan jumlah spermatisit primer pakhiten lebih banyak dibandingkan dengan kelompok yang diberikan fraksi metanol ekstrak biji pepaya muda.

3. Peran Fraksi Ekstrak Biji Pepaya Muda terhadap Jumlah Sel Spermatid

Dengan analisis *oneway* Anova didapatkan jumlah sel spermatid pada kelompok kontrol adalah 1010, pada kelompok perlakuan pertama adalah 448, pada kelompok perlakuan kedua adalah 870. Ketiga kelompok mempunyai perbedaan yang sangat bermakna ($p=0,000$). Hasil analisis LSD (*Least Significant Difference*) mendapatkan kelompok kontrol berbeda sangat bermakna dengan kelompok perlakuan pertama ($p=0,000$) dan berbeda bermakna dengan kelompok perlakuan kedua ($p=0,037$). Antara kelompok perlakuan pertama dengan perlakuan kedua terdapat perbedaan yang sangat bermakna ($p=0,000$). Kelompok perlakuan yang diberikan fraksi heksan ekstrak biji pepaya muda mengalami penurunan jumlah sel spermatid lebih banyak dibandingkan dengan kelompok perlakuan yang diberikan fraksi metanol ekstrak biji pepaya muda.

4. Peran Fraksi Ekstrak Biji Pepaya Muda terhadap Jumlah Sel Sertoli

Dengan analisis *oneway* Anova didapatkan jumlah sel Sertoli pada kelompok kontrol adalah 470, pada kelompok perlakuan pertama adalah 270, pada kelompok perlakuan kedua adalah 360. Ketiga kelompok mempunyai perbedaan yang sangat bermakna ($p=0,000$). Hasil analisis LSD (*Least Significant Difference*) mendapatkan jumlah sel Sertoli kelompok kontrol berbeda sangat bermakna dengan perlakuan pertama ($p=0,000$) dan dengan kelompok perlakuan kedua ($p=0,007$). Kelompok perlakuan pertama terdapat perbedaan yang bermakna dengan perlakuan kedua ($p=0,022$). Kelompok perlakuan yang diberikan fraksi heksan ekstrak biji pepaya muda menurunkan

jumlah sel Sertoli lebih banyak dibandingkan dengan kelompok perlakuan yang diberikan fraksi metanol ekstrak biji pepaya muda.

5. Peran Fraksi Ekstrak Biji Pepaya Muda terhadap Jumlah Rata-rata Sel Leydig

Dengan analisis *oneway* Anova mendapatkan jumlah sel Leydig pada kelompok kontrol adalah 100, pada kelompok perlakuan pertama adalah 70, pada kelompok perlakuan kedua adalah 84. Ketiga kelompok tidak mempunyai perbedaan yang bermakna ($p=0,476$). Kelompok perlakuan yang diberikan fraksi heksan ekstrak biji pepaya muda mengalami penurunan jumlah rata-rata sel Leydig lebih banyak dibandingkan dengan kelompok perlakuan yang diberikan fraksi metanol ekstrak biji pepaya muda

6. Peran Fraksi Ekstrak Biji Pepaya Muda terhadap Kadar Hormon Testosteron

Dengan analisis *oneway* Anova mendapatkan kadar hormon testosteron pada kelompok kontrol adalah 329 ng/dl, pada kelompok perlakuan pertama adalah 211 ng/dl, pada kelompok perlakuan kedua adalah 220 ng/dl. Ketiga kelompok tidak mempunyai perbedaan yang bermakna ($p=0,640$). Kelompok perlakuan yang diberikan fraksi heksan ekstrak biji pepaya muda mengalami penurunan kadar hormon testosteron lebih banyak dibandingkan dengan kelompok perlakuan yang diberikan fraksi metanol ekstrak biji pepaya muda.

PEMBAHASAN

1. Peran Fraksi Ekstrak Biji Pepaya Muda terhadap Penurunan Sel Spermatogonia

A

Penurunan jumlah sel spermatogonia A tersebut kemungkinan disebabkan oleh zat aktif yang terkandung dalam fraksi heksan ekstrak biji pepaya (steroid dan triterpenoid) maupun yang terkandung dalam fraksi metanol ekstrak biji pepaya muda lokal Bali (alkaloid), zat tersebut diduga bersifat antifertilitas.

Penurunan jumlah spermatogonia A ini diduga juga karena hormon estradiol (E2) maupun hormon progesteron (P4) yang terdapat dalam fraksi heksan ekstrak. Kedua hormon tersebut akan menyebabkan terganggunya sekresi FSH dan LH. Estradiol akan menyebabkan penekanan terhadap hipotalamus dan hipofisis anterior sehingga menyebabkan GnRH dan hormon gonadotropin (FSH dan LH) terhambat (Turek, 2005). Sedangkan hormon progesteron akan menghambat sekresi FSH yang mengakibatkan gangguan proses spermatogenesis (Golub *et al.* 2004).

Terhambatnya FSH ini akan menyebabkan terganggunya pula proses mitosis dan proliferasi spermatogonia A, karena FSH sangat diperlukan dalam aktivitas proliferasi jumlah sel spermatogonia A. Bila pengangkutan glukosa terhambat maka sintesis protein akan terhambat juga, yang mengakibatkan perkembangan jumlah sel spermatogonia A terganggu.

2. Peran Fraksi Ekstrak Biji Pepaya Muda terhadap Penurunan Rata-Rata Sel Spermatis Primer Pakhiten

Penurunan jumlah spermatis primer pakhiten ini diduga karena hormon estradiol (E2) maupun hormon progesteron (P4) yang terdapat dalam fraksi heksan ekstrak. Kedua hormon tersebut akan menyebabkan terganggunya sekresi FSH dan LH. Estradiol akan menyebabkan penekanan terhadap hipotalamus dan hipofisis anterior sehingga menyebabkan GnRH dan hormon gonadotropin (FSH dan LH) terhambat. FSH juga berperan penting dalam menunjang tahap pematangan maupun reduksi meiosis dari

spermatisit primer pakhiten (Turek, 2005). Sedangkan hormon progesteron akan menghambat sekresi FSH yang mengakibatkan gangguan proses spermatogenesis (Golub *et al.* 2004).

Penurunan sel spermatisit ini mungkin juga karena terganggunya fungsi dari sel Sertoli sehingga menyebabkan suplai laktat dan piruvat menurun, laktat dan piruvat tersebut merupakan sumber energi dari spermatisit primer pakhiten. Lohiya *et al.* (2002) melaporkan bahwa pemberian ekstrak kloroform biji pepaya dapat menyebabkan terjadinya penurunan secara signifikan sel spermatisit, kehilangan organel-organel sitoplasma dan terjadi kerusakan membran sel. Bila jumlah sel spermatisit mengalami kerusakan dan mengalami degenerasi maka sel spermatisit ini akan difagositosis oleh sel Sertoli sehingga menyebabkan jumlah sel spermatisit berkurang.

Pemberian MCP 1 dan ECP 1 (biji pepaya yang telah dimurnikan) selama 90 hari didapatkan terjadinya vacuolisasi dari spermatisit dan hilangnya sel spermatisit. Dilaporkan bahwa kedua bahan tersebut (MCP 1 dan ECP 1) yang berasal dari biji pepaya efektif sebagai kontrasepsi pada rat jantan karena bersifat reversibel dan tanpa efek samping (Lohiya *et al.* 2005).

3. Peran Fraksi Ekstrak Biji Pepaya Muda terhadap Penurunan Rata-Rata Sel Spermatid

Penurunan spermatid ini mungkin karena terganggunya fungsi dari sel Sertoli yang menyebabkan suplai laktat dan piruvat akan menurun. Laktat dan piruvat merupakan sumber energi dari spermatid (Jutte *et al.* 1978). Penurunan sel spermatid ini kemungkinan melalui beberapa mekanisme seperti adanya gangguan dalam proses meiosis, mungkin karena gangguan dalam proses spermiogenesis awal, kemungkinan karena lepasnya spermatid ke lumen tubulus seminiferus dan mungkin karena terjadinya apoptosis spermatid.

Penurunan FSH akan menyebabkan perubahan struktur sitoskeletal sel Sertoli sehingga mengurangi kemampuan dalam mengikat spermatid, sedangkan penurunan hormon testosteron akan menyebabkan penurunan daya adhesi antara spermatid dengan sel Sertoli yang menyebabkan sel spermatid terlepas ke dalam lumen tubulus seminiferus (Donnel *et al.* 1996). FSH juga turut membantu pematangan spermatid menjadi spermatozoa selama proses spermatogenesis. Penurunan FSH dan testosteron tersebut akan menyebabkan sintesis protein spermatid terganggu yang akhirnya menyebabkan sel spermatid degenerasi (Nakamura *et al.* 1997).

4. Peran Fraksi Ekstrak Biji Pepaya Muda terhadap Penurunan Rata-Rata Sel Sertoli

Penurunan jumlah sel Sertoli tersebut kemungkinan disebabkan oleh zat aktif yang terkandung dalam fraksi heksan ekstrak (steroid dan triterpenoid) maupun yang terkandung dalam fraksi metanol ekstrak (alkaloid) biji pepaya muda lokal Bali yang diduga bersifat antifertilitas. Zat aktif yang terkandung dalam biji pepaya tersebut bisa berefek sitotoksik, anti androgen atau berefek estrogenik (Lohiya *et al.* 2002).

Lohiya *et al.* (2002) yang melaporkan bahwa pemberian ekstrak kloroform biji pepaya dapat menyebabkan terjadinya penurunan dan vakuolisasi sel sertoli dan *germ cell*. Jumlah sel Sertoli ini juga membentuk *blood testis barrier* sehingga akan mencegah mengalirnya cairan interstitiil ke dalam lumen dan begitu juga sebaliknya, menahan pemindahan bahan-bahan antar sel dengan jumlah sel dengan sel Sertoli, mencegah protein tertentu keluar masuk kompartemen adluminal, mencegah masuknya antigen-

antigen. Adanya *blood testis barrier* ini akan menyebabkan terbentuk *microenvironment* yang optimal untuk berlangsungnya proses spermatogenesis, jika jumlah sel Sertoli ini terganggu maka proses spermatogenesis akan terganggu pula.

5. Peran Fraksi Ekstrak Biji Pepaya Muda terhadap Penurunan Rata-Rata Sel Leydig dan Kadar Hormon Testosteron

Fraksi heksan ekstrak biji pepaya lokal Bali yang muda tidak dapat menurunkan secara bermakna sel Leydig maupun kadar hormon testosteron, kemungkinan disebabkan karena sel-sel Leydig tersebut paling kuat terhadap pengaruh dari luar dibandingkan sel-sel spermatogenik, hal ini sesuai dengan pernyataan Johnson and Everitt (1990) yang melaporkan bahwa sel-sel dalam tubulus seminiferus mempunyai sensitivitas yang berbeda-beda terhadap pengaruh dari luar. Sedangkan Lohiya *et al* (2005) dalam kesimpulannya menyatakan bahwa ekstrak biji pepaya bekerja secara selektif pada sel-sel tubulus seminiferus rat albino.

Dari hasil penelitian tersebut di atas dapat disimpulkan bahwa pemberian fraksi heksan ekstrak biji pepaya muda tidak menurunkan jumlah sel Leydig dan kadar hormon testosteron. Jadi hipotesis ke 5 yang menyatakan bahwa fraksi heksan ekstrak biji pepaya (*Carica pepaya, Linn*) lokal Bali yang berumur sekitar 10 minggu mengalami penurunan jumlah sel Leydig pada mencit jantan (*Mus musculus*) strain Balb/C lebih besar daripada fraksi metanol ekstrak tidak terbukti. Hipotesis ke 6 yang menyatakan bahwa fraksi heksan ekstrak biji pepaya (*Carica pepaya, Linn*) lokal Bali yang berumur sekitar 10 minggu mengalami penurunan kadar hormon testosteron pada mencit jantan (*Mus musculus*) strain Balb/C lebih besar daripada fraksi metanol ekstrak biji pepaya muda juga tidak terbukti.

6. Temuan baru pada penelitian ini

Temuan baru pada penelitian ini adalah fraksi heksan ekstrak biji pepaya (*Carica papaya, Linn*) lokal Bali yang masih muda menghambat proses spermatogenesis mencit jantan (*Mus musculus*) BalbC lebih kuat daripada fraksi metanol ekstrak biji pepaya muda. Penelitian ini merupakan temuan baru yang belum pernah dilaporkan oleh peneliti lainnya.

7. SIMPULAN DAN SARAN

7.1 Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian serta pembahasan dapat disimpulkan hal-hal sebagai berikut:

1. Fraksi heksan ekstrak biji pepaya muda menurunkan jumlah sel spermatogonia A dengan sangat bermakna dan penurunannya lebih besar daripada fraksi metanol ekstrak biji pepaya muda.
2. Fraksi heksan ekstrak biji pepaya dapat menurunkan jumlah sel spermatosit primer pakhiten dengan sangat bermakna dan penurunannya lebih besar daripada fraksi metanol ekstrak biji pepaya muda.
3. Fraksi heksan ekstrak biji pepaya dapat menurunkan jumlah sel spermatid dengan sangat bermakna dan penurunannya lebih besar daripada fraksi metanol ekstrak biji pepaya muda.
4. Fraksi heksan ekstrak biji pepaya dapat menurunkan jumlah sel Sertoli dengan sangat bermakna dan penurunannya lebih besar daripada fraksi metanol ekstrak biji pepaya muda .
5. Fraksi heksan ekstrak biji pepaya tidak dapat menurunkan jumlah sel Leydig.
6. Fraksi ekstrak biji pepaya tidak dapat menurunkan kadar hormon testosteron.

7.1 Saran

- 1 Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang efek samping dari pemberian fraksi heksan ekstrak biji pepaya muda.
- 2 Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang efek reversibilitas dari pemberian fraksi heksan ekstrak biji pepaya muda.
- 3 Perlu dilakukan penelitian pemberian fraksi heksan ekstrak biji pepaya muda terhadap manusia, apabila penelitian terhadap binatang percobaan sudah dianggap cukup

HEXANE FRACTION OF UNRIPE PAPAYA SEED EXTRACT (*CARICA PAPAYA*, *LINN*) INHIBITS SPERMATOGENESIS OF MALE MICE (*MUS MUSCULUS*) STRONGER THAN METHANOL FRACTION OF UNRIPE PAPAYA SEED EXTRACT

INTRODUCTION

In the effort to prevent population explosion, Family Planning should involve the participation of both males and females. In reality, however, the program is greatly more dominated by female participants than their male counterparts.

The low participation of men in Family Planning Program is partly due to the fact that only a limited number of male contraceptive devices are currently in existence. Therefore, it is extremely important that appropriate technology be developed to produce contraceptives that can be used specifically by men (Wilopo, 2006). As male contraceptives are very limited in types, efforts to develop more ideal male contraceptive drugs is crucial; particularly the effort to find alternative effective substances derived from natural resources.

Unripe papaya seeds are known to be one of the natural substances that have anti-fertility effect. The purpose of this study is to investigate whether hexane fraction of unripe papaya seed extract has a stronger effect to inhibit the process of spermatogenesis than the methanol fraction. In this study, unripe seeds were collected from local Balinese papaya fruits.

STUDY METHOD

This study was an experimental research using *pre-test post-test control group design* (Campbell and Stanley, 1968). The study used 30 male mice strain Balb-C which were allocated by simple random sampling into three groups: control group (P0); treatment Group 1 (P1); treatment group 2 (P2).

In the early study from each groups taken 5 male mice at random later then taken blood of its eye subkunjunctiva to check hormone of testosterone. After taken its blood later then mice murdered, its is taken for the inspection of cells of spermatogonia A, cells of spermatocyte primary of pakhiten, cells of spermatid, cells of Sertoli and cells of Leydig. After treatment during 36 day, control groups, first treatment groups (which given by fraction of hexane extract) and second treatment groups (which given by fraction methanol extract) taken again each 5 male mice to be taken blood. Blood taken for the inspection of hormone of testosterone, cells of spermatogonia A, primary spermatocyte of pakhiten, spermatid, cell of Sertoli and cell of Leydig

Data of inspection to 60 tubules (30 tubules of right testis and 30 tubules of left testis). Evaluation at stadium of VII cycle of spermatogenesis mice. Quantitative data: counted of cells of spermatogonia A, cells of spermatocyte primary of pachiten, cells of spermatid, cells of Sertoli, cells of Leydig and testosterone hormone level

Anova analysis to find out the average differences among groups and comparative analysis to find out the differences between control group and treatment groups. Significance level was determined with $\alpha \leq 0.05$

RESULTS

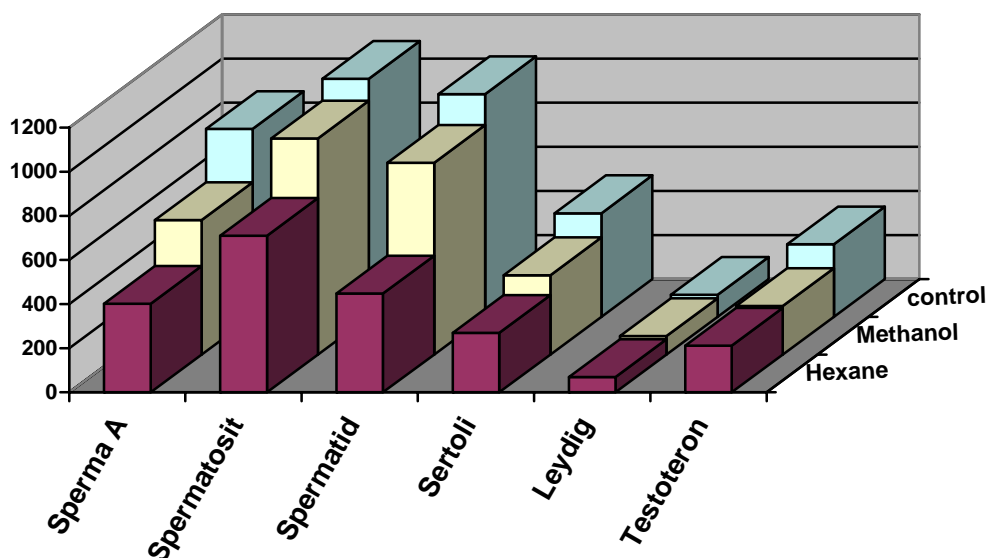


Figure 4.1 Histogram showing the level of spermatogonia A, pachiten primary spermatocyte, spermatid, Sertoli and Leydig cells and testosterone in mice strain Balb-C after given 0.5 ml hexane and methanol fraction extract for 36 days.

1. Effect of Fractions of Unripe Papaya Seed Extract on the Number of Spermatogonia A Cells

The analysis of *one-way Anova* showed that the average number of Spermatogonia A cells in the control group was 852, treatment group 1 was 402, and treatment group 2 was 610. The analysis result by LSD (Least Significant Difference) showed the number of spermatogonia A cells in the control group differed significantly from that of group 1 ($p=0.000$) and group 2 (0.002). Treatment group 1 was significantly different from treatment group 2 ($p=0.006$). The treatment group given hexane fraction of unripe papaya seed extract showed greater decrease in the number of spermatogonia A cells than in the treatment group given methanol fraction of unripe papaya seed extract.

2. Effect of Fractions of Unripe Papaya Seed Extract on the Number of Primary Pachiten Cells Spermatocyte

The result of *one-way Anova* analysis showed that the number of primary pachiten spermatocyte cells in the control group was 1080, in treatment group 1 was 710 and in treatment group 2 was 980. The three groups showed significant differences ($p=0.000$). The result of LSD (Least Significant Difference) analysis showed the number of primary pachiten spermatocyte cells in the control group differed significantly from that in the treatment group 1 ($p=0.000$) and group 2 ($p=0.002$). The difference was significant between both treatment groups ($p=0.000$). The treatment group given hexane fraction of unripe papaya seed extract showed a greater decrease of primary pachiten spermatocyte cells than the treatment group given methanol fraction.

3. Effect of Fractions of Unripe Papaya Seed Extract on Average Number of Spermatid Cells

One-way Anova analysis showed that the average number of spermatid cells in the control group was 1010, in the treatment group 1 was 448, and in treatment group 2 was 870. It clearly showed that the three groups had significant differences (0,000).

The result of LSD (Least Significant Difference) analysis showed significant difference between the control group and treatment group 1 ($p=0.000$) and between control group and treatment group 2 ($p=0.037$). The result of comparison between treatment group 1 and 2 was significant ($p=0.000$). Hexane fraction of unripe papaya seed extract given to treatment group 1 reduced spermatid cells more significantly than methanol fraction given to group 2.

4. Effect of Fractions of Unripe Papaya Seed Extract on the Average Number of Sertoli Cells

The result of one-way Anova analysis showed that the number of Sertoli cells in the control group was 470, in the treatment group 1 was 270 and in treatment group 2 was 360. The three groups had significant differences ($p=0.000$). The result of LSD (Least Significant Difference) analysis showed the number of Sertoli cells in control group differed significantly from that in treatment group 1 ($p=0.000$) and group 2 ($p=0.007$) respectively. The difference was significant between both treatment groups ($p=0.022$). Hexane fraction of unripe papaya seed extract given to the treatment group caused a greater decrease of Sertoli cells than methanol fraction.

5. Effect of Fractions of Unripe Papaya Seed Extract on the Average number of Leydig Cells

The one-way Anova analysis showed that the number of Leydig cells in the control group was 100, in treatment group 1 was 70 and in treatment group 2 was 84. The difference between control group and treatment group 1 was 30, also between control group and treatment group 2 was 16, and there occurred a decrease of Leydig cells. Difference was found between treatment group 1 and group 2 (14); however, the three groups had no significant differences ($p=0.476$). The analysis result was shown in Table 4.3. The treatment group given hexane fraction of unripe papaya seed extract showed a greater decrease in Leydig cells than when given methanol fraction.

6. Effect of Fractions of Unripe Papaya Seed Extract on Testosterone Level

The result of one-way Anova analysis showed that the level of testosterone in control group was 329 ng/dl, in treatment group 1 was 211 ng/dl and in treatment group 2 was 220 ng/dl. The three groups had no significant differences (0.640). Hexane fraction of unripe papaya seed extract given to treatment group caused a greater decrease in testosterone level than methanol fraction given to the same group.

V. DISCUSSION

1. Effect of Fractions of Unripe Papaya Seed Extract on the Average Decrease of Spermatogonia A Cells

Reduction of spermatogonia A cells might be due to the active substances contained in the hexane fraction of unripe papaya seed extract (steroid and triterpenoid) and in the methanol fraction of the same unripe papaya seed extract. These substances are thought to have anti-fertility features.

Reduction of the number of spermatogonia A cells was probably due to the effect of estradiol (E2) as well as progesteron (P4) contained in the hexane extract. Both hormones are responsible in the inhibition of FSH and LH secretion. Estradiol supresses the hypothalamus and anterior hypophysis and inhibits GnRH and gonadotropin (FSH and LH) (Turek, 2005). On the other hand, progesteron inhibits FSH secretion and causes disturbance in the process of spermatogenesis (Golub et al. 2004).

Inhibition of FSH further disturbs the process of mytosis and poliferation of spermatogonia A cells, because FSH is vital in the latter process. If there is disturbance in FSH, there will occur disturbance in both spermatogenia and subsequent spermatogenesis process.

2 Effect of Fractions of Unripe Papaya Seed Extract on the Average Decrease of Primary Pachiten Spermatocyte Cells

Decrease of the number of primary pachiten spermatocyte cells was suspected to be due to the effect of estradiol (E2) and progesteron (P4) contained in hexane fraction of the extract. Both hormones inhibit FSH and LH secretion. Estradiol supresses hypothalamus and anterior hypophysis, thus inhibit GnRH and gonadotropin (FSH and LH). FSH also has a very important role in enhancing the maturation stage and slowing meiosis of primary pachiten spermatocyte cells (Turek, 2005). Meanwhile, progesteron can inhibit FSH secretion, resulting in disturbance of spermatogenesis process (Golub et al, 2004).

Spermatocyte cells may decrease because of the disturbance in Sertoli cells function, which initiate the decrease of lactate and piruvate supplies, which are energy sources for primary pachiten spermatocytes. Lohiya et al (2002) report that administration of chloroform extract of papaya seeds may lead to a significant decrease in spermatocyte cells, loss of cytoplasm organelles and cell membranes damage. If spermatocytes are disrupted and degenerated, the cells will be phagocitized by Sertoli cells and thus reduce the number of spermatocyte cells.

Administration of MCP 1 and ECP 1 (purified papaya seeds) for 90 days caused vacuolisation and absence of spermatocyte cells. It was reported that both substances (MCP 1 and ECP 1) derived from papaya seeds were effective as contraceptives in male mice because they were reversible and cause no untoward effects (Lohiya et al, 2005).

3. Effect of Fractions Unripe Papaya Seed Extract on the Average Decrease of Spermatid Cells.

The decrease of spermatid cells may be caused by the inhibited function of Sertoli cells, which caused reduction of lactate and piruvate supplies. Lactate and piruvate were energy sources of spermatid cells (Jutte et al, 1978). Spermatid cells are decreased by several mechanisms such as disturbance in meiosis process, disturbance in primary process of spermiogenesis, the escape of spermatid into lumen of *seminiferous tubules* and apoptosis of spermatid cells.

Reduction of FSH damages the cytoskeletal structure of Sertoli cells, to decrease the power to adhere spermatid cells with Sertoli cells, which then causes the release of spermatid cells into lumen of seminiferous tubules (Donnel et al, 1996). FSH also facilitates maturation of spermatid cells to become spermatozoa during the process of spermatogenesis. The decrease of FSH and testosterone will inhibit the protein synthesis and finally initiate degeneration of the spermatid cells (Nakamura et al. 1997).

4 Effect of Fractions of Unripe Papaya Seed Extract on the Average Decrease of Sertoli Cells

The reduction of spermatid cells was probably caused by active substances present in hexane fraction extract (steroid and triterpenoid) as well as in methanol fraction extract (alkaloid) of local unripe Balinese papaya seeds, which was suspected of having anti-fertility effect. These active substances also have cytotoxic, anti androgenic and estrogenic effects (Lohiya et al, 2002).

Lohiya et al (2002) who reported that administration of chloroform extract of papaya seeds can significantly decrease spermatid cells and cause vacuolisation of Sertoli and germ cells. The number of Sertoli cells also form blood testis barrier and avoids interstitial liquid to get into the lumen and on the contrary, blood testis barrier restrains the transportation of interstitial substances, avoids certain proteins to move in and out of the adluminal compartment, and prevents any antigens to enter. Blood testis barrier generates optimum microenvironment, which takes place during the process of spermatogenesis. So if Sertoli cells are disturbed, it will also disturb the process of spermatogenesis.

5. Effect of Fractions of Unripe Papaya Seed Extract on the Average Decrease of Leydig Cells and Testosterone Level.

The hexane fraction of local ripe papaya seed extract cannot decrease the number of Leydig cells and level of testosterone significantly and it may be caused the Leydig cell has the strongest deficiency to external factors among the spermatogenic cells. This result is similar to that of Johnson and Everitt (1990), who reported that the cells within tubulus seminiferus had different sensitivity to external factors. Lohiya *et al.* also concluded that papaya seed extract worked selectively in tubulus seminiferus cells of albino mice.

It can be concluded that administration of hexane fraction of papaya seeds extract does not reduce the average number of Leydig cells and level of testosterone. Thus the fifth and sixth hypothesis have not been proven.

VI. NEW FINDING OF THE STUDY

The new finding of this study is the fact that hexane fraction of the extract of ripe local Balinese papaya seeds inhibit the process of spermatogenesis on male mice strain Balp-C stronger than the methanol fraction of ripe papaya seed extract. This study has obtained a new finding that has not been reported before by other researchers.

VII CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS

7.1 Conclusions

Based on the results and discussions of this study, it can be concluded as follows:

- 7.1.1 Hexane fraction of ripe papaya seed extract reduces spermatogonia A cells significantly and the reduction is greater than that caused by methanol fraction of ripe papaya seed extract.

- 7.1.2 Hexane fraction of ripe papaya seed extract reduces primary pachiten spermatocyte cells significantly and the reduction is greater than that caused by methanol fraction of ripe papaya seed extract.
- 7.1.3 Hexane fraction of ripe papaya seed extract reduces spermatid cells significantly and the reduction is greater than that caused by methanol fraction of ripe papaya seed extract.
- 7.1.4 Hexane fraction of ripe papaya seed extract reduces Sertoli cells significantly and the reduction was greater than that caused by methanol fraction of ripe papaya seed extract.
- 7.1.5 Hexane fraction of ripe papaya seed extract does not reduce Leydig cells
- 7.1.6 Hexane fraction of ripe papaya seeds extract does not reduce testosterone level.

7.2 Recommendations

1. A further study on the untoward effects of the administration of hexane fraction of unripe papaya seed extract needs to be carried out
2. A further study on reversibility effect of the administration of hexane fraction of unripe papaya seed extract needs to be carried out
3. A study on the administration of hexane fraction of unripe papaya seed extract to humans needs to be carried out after the study on animals has been considered sufficient.

REFERENCES

- Arsyad, K.M. 1990. "Kemungkinan Pengembangan Kontrasepsi Pria". Medika 12. (4). 42-51
- Campbell, D.T., and Stanley, J. D. 1968. "Experimental and Experiment quasi Experimental Design for Reasarch". Chicago.
- Chinoy, N. J., D'Souza, J. M., Padman, P. 1994. "Effects of Crude Aqueous Extract of *Carica papaya* seeds in Male Albino Mice." Reprod Toxicol. 8 (1) : 75 – 9.
- Donnell, L.O., McLachlan, R.L., Wreford, N.G., de Kretser, D.M., and Robertson, D.M. 1996. "Testosterone Withhdawal Promotes Stage-Spesific Detachment of Round Spermatids from the Rat Seminiferous Ephithelium". Biol. Reprod. (55): 895-900.
- Dupan, M.R. and Campana. 1993. "Phisiopathology of Spermatogenesis Arrest. Fertil. Steril. 60 (6) : 37-51.
- Fora. M.A. 2006. "Interrelationship Beetwen The Hypothalamus, Pituitary and Testis". Endrocrinology of Male Reproductive Sytem.
- Fransworth, N. R., Bingel, A. S., Cordell, G. A., Crane, F. A. & Fong, H. H. S. 1975. "Potensial Value of Plants as Sources of New Antifertility Agent." In: J. Pharmaceut. Sci. 64: 535-598.

- Golub, M.S., Kaufman, F.L., Campbell, M.A., Hong Li. 2004. "Progesterone Hazard Identification". In: Evidence on the Developmental and Reproductive Toxicity of Progesterone.
- Granner, D. K. 1997. "Hormon Gonad." In: Murry, R. K., Granner, D. K., Mayes, P. A. Rodwell, V. W Editors. Harper's Biochemistry 24111 Ed (Terjemahan) Jakarta. Penerbit Buku Kedokteran EGC : 582- 597.
- Hartono, H. 1996. "Keluarga Berencana dan Kontrasepsi." Pustaka Sinar Harapan. Jakarta.
- Herrera, C. L., Ramos, E. V. & Villanueva, B. A. 1984. "Philippine Plants as Possible Sources of Antifertility Agents." The Philippine Journal of Science : 91 – 129.
- Johnson, M. and Eviritt. 1990. "Essensial Reproduction." 3 nd Edition. Blackwell Sci. Pub. Oxford London, Edinburg.
- Jutte, N.H.P.M., Grootegoedja, Rommerts, F.F.G, Van Der Mollen, H.J. 1981."Exogenous Lactate is Essential for Metabolic Activities in Isolated Spermatoocytes and Spermatogenesis. J. Reprod. Fert. 62.: 399-405.
- Koentjoro, S. and Santa. 1983. "Perspective of Male Contraception with regards to Indonesia Tradisional Drugs". Andrology in Perspective Internasional Congress Indonesia. Published by Kenrose Indonesia.
- Koentjoro, S. 1982. "mencari Obat Kontrasepsi Lelaki dengan Meneliti Khasiat Obat-Obat Tradisional". Medika. 12.: 971-980.
- Lohiya, N.K., Manivannan, B., Mishra, P.K. Pathak, N., Sriram, S., Bhande, S.S., Pannerdoss, S. 2002. "Chloroform Extrac of Carica Papaya Seeds Induces Long-Term Reversible Azoospermia In Langur Monkey." Asian J of Androl. 4 (1): 17-26.
- Lohiya, N.K., Pathak, N., Mishra, P.K., Manivannan, B. 1999. "Reversible Contraception with Chloroform Extract of *Carica papaya*, Linn. Seeds in Male Rabbits." Reprod Toxicol. 13 (1) : 59 – 66.
- Mc Lachlan, R.L, Wreford, N.G., Weachem, S.J., de Kretser, D. M. and Robertson, D.M. (1994). "Effect of Testosterone on Spermatogenic Cell Population in Rat. Biol. reprod. (51): 945-955.
- Moeloek, N. 2002. "Perkembangan Kontrasepsi Pria tahun 2002." Pertemuan Ilmiah Tahunan XIV Perkumpulan Andrologi Indonesia. Denpasar : 20-21 Juli.
- Nakamura, M. and Hall, P.F. 1997. Efects 5-Thio-D-Glucose on Proteins Synthesis Invitro by Various Types of Cells from the Testis. J. Reprod. 49: 95-97.
- Niederberger, C.S., Shubhada, S. Kim, S.J. and Lamb, D.J. 2004. "Paracrin Factors and Regulation of Spermatogenesis". Word Journal of Urology. 11. (2) : 120-128.
- O'Donnell, L., Robertson, K.M., Margaret, E., Jones and Simpson, E.V. 2001. "Estrogen and Spermatogenesis. Endocrine Reviews". 22 (3): 289-318
- Santen, R. J. 1994. "The Testis. Endocrinology and Metabolism" : 885-910
- Sirait, M., Hargono, Farouq, Sutarjadi, 1987. "Analisis Obat Tradisional." Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Yakarta.
- Soehadi, K. 1979. "Spermatogenesis". Prosiding Kongres Spermatologi. Pandi. 42: 97-103.
- Sumaryati, A. 2004. "Tahun Ini KB Pria Mulai Digalakkan". Badan Koordinator Keluarga Berencana Nasional. Available from: http://www.bkkbn.go.id/article_detail.php. Accesed, 26, Oct. 2005.

- Sutyarso, Soeradi, Suhana, Nur Asikin, 1992. "Pengaruh Fraksi Buah Pare Terhadap Perkembangan Sel-sel Spermatogenik Tubulus Seminiferus Mencit jJntan dan Masa Pemulihannya." Maj. Kedok Indonesia. Vol. 42. No. 7.
- Turek, P.J.. "Hypothalamic-Pituitary-Gonadal (HPG) Axis and Control of Spermatogenesis". In: Endocrine evaluation. Male Reproductive Laboratory Departement of Urology Universitas of California at San Francisco. San Francisco, California.
- Suweta, I.G.P., Oka, I. B. M., Dwinata, Roekmiati, K.T, Suparman, 1997. "Prevalensi Infeksi Cacing Ascaris Pada Babi di Bali, Dampaknya terhadap Babi Penderita dan Usaha Penanggulangannya. Pengaruh Berbagai Bahan Aktif yang Terkandung Dalam Biji Pepaya Muda terhadap Babi Penderita Ascariasis." Laporan Penelitian Hibah Bersaing.
- Ucha – Nwachi, E.O., Ezeokoli, D.C., Adogwa, A.O., Offiah, V.N., 2001. "Effect of Water Extract of *Carica papaya* Seed on the Germinal Epitelium of the Seminiferous Tubules of Sprague Dewley Rats." Kaibogaku Zasahi. 76 (6) : 517-21.
- Wilopo, S.A. 2006. "Perkembangan Teknologi Kontrasepsi Pria Terkini". Gema Pria. Available from: <http://pikas.bkkbn.go.id/gemapria/article-detail.php>. Accesed, Jun 18, 2006.