

Peningkatan Konsentrasi Testosteron pada Tikus Akibat Paparan Ekstrak Air Biji Pinang

**(THE INCREASED OF TESTOSTERONE CONCENTRATION OF RAT
THAT TREATMENT BY WATER EXTRACT OF BETEL NUT)**

Muslim Akmal¹, Chanif Mahdi², Aulanni'am²

¹Laboratorium Embriologi dan Histologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas
Syiah Kuala, Jln. Tengku H. Hasan Krueng Kalee No.4 Darussalam Banda Aceh 23111
Telp. (0651) 7551536 email: muslim_akmal70@yahoo.com

²Laboratorium Biokimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,
Universitas Brawijaya, Malang

ABSTRACT

Areca catechu which is known in Indonesia as *pinang*, contains alkaloids such as arecoline, arecaine, arecaidine, arecolidine, guvacine, guvacoline, and isoguvanine. Arecoline has an ability to change gonad morfofunction, including shape abnormality of sperm. The aim of this research was to find out the prospect of extract betel nut of *A.catechu* as male anti fertility agents based on its activity to increase the testosterone concentration. Animal models used consisted of 5 groups of 2-3 months male rats (*Rattus norvegicus*, Wistar strain) and induced for 1 week by water extract of betel nut at the dose of 0, 1, 2, 3, and 4 gram/200 gram body weight. Testosterone concentration was determined by ELISA technique. The result showed that extract betel nut of *A. catechu* is potential source of natural and beneficial male anti fertility agents as it can increase the testosterone concentration.

Keywords: Male anti fertility, *Areca catechu*, testosterone, *Rattus norvegicus*

ABSTRAK

Areca catechu merupakan tanaman pinang yang banyak tumbuh di Indonesia. *Areca catechu* mengandung sejumlah alkaloid, seperti *arecoline*, *arecaine*, *arecaidine*, *arecolidine*, *guvacine*, *guvacoline*, and *isoguvanine*. Arecoline diketahui menginduksi morfofungsi gonad dan abnormalitas spermatozoa. Penelitian ini bertujuan mengetahui potensi ekstrak air biji pinang sebagai agen antifertilitas pria berdasarkan aktivitasnya dalam meningkatkan konsentrasi testosteron. Sebanyak 25 ekor hewan coba (*Rattus norvegicus*) strain Wistar berumur 2-3 bulan dengan berat badan 200-250 gram dikelompokkan ke dalam 5 kelompok, yaitu KO, KI, K2, K3, dan K4. Kelompok KO (kontrol) tanpa perlakuan, tikus hanya diberi aquades, sedangkan Kelompok K1, K2, K3, dan K4 tikus dipapar dengan ekstrak biji pinang dengan dosis bertingkat, yaitu 1, 2, 3, dan 4 g/200 g berat badan selama satu minggu. Konsentrasi testosteron diukur dengan menggunakan teknik ELISA. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak *Areca catechu* berpotensi digunakan sebagai sumber antifertilitas pria berbasis bahan alam berdasarkan aktivitasnya dalam meningkatkan konsentrasi testosteron.

Keywords: Antifertilitas pria, *Areca catechu*, testosterone, *Rattus norvegicus*

PENDAHULUAN

Pertumbuhan penduduk dunia setiap tahun mengalami peningkatan yang sangat pesat dan fantastis. Pada tahun 1960, penduduk dunia hanya berjumlah 3 milyar dan pada tahun 2000

telah meningkat secara drastis menjadi 6 milyar jiwa (Crosignani, 2002). Pada Tahun 2006 jumlah penduduk dunia telah mencapai 6,5 milyar jiwa. Diperkirakan pada akhir tahun 2050, jumlah penduduk dunia mencapai 9,5 miliar jiwa (UNDP, 2000), sedangkan jumlah

penduduk Indonesia pada tahun 2025 diperkirakan mencapai 273,65 juta (Fauzi *et al.*, 2005).

Ledakan jumlah penduduk menyebabkan terjadinya sejumlah dampak yang kurang menguntungkan, seperti kerusakan lingkungan, pemanasan global, wabah kelaparan, dan perkembangan penyakit (Page *et al.*, 2008). Untuk mencegah terjadinya “baby booming” di dunia khususnya di Indonesia diperlukan upaya yang sistematis, terarah, dan terukur, yaitu dengan menggalakkan penggunaan kontrasepsi melalui program Keluarga Berencana (KB). Akan tetapi, program KB yang dilaksanakan oleh pemerintah belum dapat berjalan secara optimal akibat partisipasi pria dalam program KB yang masih sangat rendah. Hal tersebut disebabkan belum tersedianya sarana KB yang benar-benar aman dan nyaman bagi pria.

Upaya peningkatan keikutsertaan pria dalam program KB perlu dilakukan melalui penelitian bahan antifertilitas yang dapat digunakan oleh pria. Oleh karena itu, penelitian yang bertujuan untuk mengeksplorasi bahan alam berasal dari tanaman yang berkhasiat sebagai antifertilitas pria hendaknya mendapat dukungan dana dari pemerintah (Aulanni'am *et al.*, 2007).

Salah satu bahan alam yang berkhasiat sebagai kandidat antifertilitas pria adalah biji pinang (*Areca catechu*). Bukti menunjukkan bahwa biji pinang telah lama digunakan secara luas sebagai obat tradisional. Diperkirakan sekitar 500 juta orang di dunia saat ini menggunakan biji pinang secara berkala dalam bentuk berbagai sediaan. Selain itu, diketahui bahwa sekitar 200-600 juta orang di dunia mengkonsumsi pinang selama hidup mereka (Giri *et al.*, 2006). Di Taiwan terdapat sekitar 2 juta orang mengkonsumsi pinang secara aktif (Ko *et al.*, 1992).

Ada kekhawatiran dengan kebiasaan mengkonsumsi pinang berdampak terhadap fertilitas pria. Hal tersebut sesuai dengan hasil penelitian Kiong Er *et al.*, (2006) yang menunjukkan bahwa terjadinya penurunan motilitas spermatozoa manusia akibat paparan *arecoline* secara *in vitro*. Hasil penelitian Akmal *et al.*, (2008^a) menunjukkan terjadinya penurunan motilitas spermatozoa tikus putih akibat paparan fraksi air dan *crude* alkaloid biji pinang. Paparan *crude* alkaloid biji pinang menyebabkan pula terjadinya penurunan konsentrasi spermatozoa tikus putih (Akmal *et al.*, 2008^b).

Biji pinang mengandung *arecoline*, yaitu senyawa alkaloid aktif. *Arecoline* merupakan komponen utama yang terdapat di dalam biji pinang (Shyi-Wu *et al.*, 2008). Menurut Wang *et al.*, (1997), terdapat empat alkaloid utama di dalam biji pinang, yaitu *arecoline* (7,5 mg/g), *arecaidine* (1,5 mg/g), *guvacoline* (2,0 mg/g), dan *guvacine* (2,9 mg/g). Menurut Yang *et al.*, (2001), penelitian tentang efek pemberian *arecoline* terhadap reproduksi manusia masih sangat jarang dilakukan.

Beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian *arecoline* dapat menyebabkan terjadinya sitotoksitas pada berbagai sel mamalia (Jeng *et al.*, 2001). Hasil penelitian Susila (2003) menunjukkan terjadinya nekrosis sel spermatogonia, spermatisit, spermatid, sel Sertoli, dan sel Leydig ayam jantan akibat paparan serbuk biji pinang. Selain itu, hasil penelitian Aulanni'am *et al.*, (2007) menunjukkan bahwa terjadinya apoptosis sejumlah besar sel spermatogenik dan sel Sertoli tikus putih akibat paparan ekstrak biji pinang.

Penelitian ini bertujuan mengetahui efek paparan ekstrak air biji pinang sebagai kandidat antifertilitas pria berdasarkan kajian terhadap konsentrasi testosteron dengan menggunakan tikus putih jantan sebagai hewan coba.

METODE PENELITIAN

Biji pinang yang digunakan adalah yang kulitnya sudah berwarna kuning. Pemilihan pinang jenis ini berdasarkan penelitian Susila (2003). Selain itu, pada jenis pinang tersebut diketahui mempunyai kandungan *arecoline* yang relatif lebih rendah dibandingkan biji pinang muda. Biji pinang yang dipilih harus dalam keadaan baik (tidak busuk) atau pun berjamur. Cara pembuatan ekstrak biji pinang adalah sebagai berikut: pinang dikupas, lalu diambil bijinya dan dihaluskan dengan martil, kemudian dijemur sampai kering. Biji pinang yang sudah kering ditimbang sebanyak 100 gram dan ditambahkan aquades sebanyak 200 ml. Selanjutnya dipanaskan hingga tersisa 100 ml ekstrak biji pinang, sehingga setiap 1 ml mengandung 2 gram ekstrak biji pinang (Aulanni'am *et al.*, 2007).

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang digunakan dalam penelitian ini adalah galur Wistar jantan berumur 2-3 bulan dengan berat badan (BB) antara 200-250 gram dengan diadaptasikan selama 7 hari. Hewan percobaan

dikelompokkan menjadi lima kelompok perlakuan yang mendapat paparan. Kelompok K0 (kontrol) tanpa perlakuan, tikus hanya diberi aquades. Kelompok K1, K2, K3, dan K4 tikus dipapar dengan ekstrak biji pinang dengan dosis bertingkat, yaitu 1, 2, 3, dan 4 g/200 g BB selama satu minggu. Pemberian ekstrak biji pinang dilakukan dengan cara mencekakkan langsung ke lambung dengan menggunakan spuit 5 ml yang sudah dimodifikasi. Semua tikus perlakuan mendapat pakan standar yang mengandung: protein (16%), karbohidrat (66%), lemak (8%), dan air minum diberikan secara *ad libitum*. Pada akhir perlakuan, semua tikus percobaan dikorbankan secara *dislocatio cervicalis*, lalu dilakukan pembedahan pada bagian dada untuk membuka organ jantung. Darah diambil langsung dari jantung yang masih berdenyut dengan menggunakan spuit 5 ml, lalu darah disimpan dalam *freezer* dengan suhu -20°C sampai digunakan. Penghitungan konsentrasi testosteron diukur dengan teknik *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) dengan menggunakan Kit EIA testosteron (cat no: TESTH-250) serta purifikasi serum dengan metode SAS 50%. Pengukuran konsentrasi testosteron dengan teknik ELISA dan purifikasi serum dengan metode SAS 50% adalah sebagai berikut: Darah yang diperoleh langsung dari jantung diendapkan beberapa saat untuk memperoleh serum. Serum darah yang diperoleh kemudian dipurifikasi dengan SAS 50%. SAS ditambahkan ke dalam serum dengan volume yang sama, lalu dibiarkan selama ± 20 menit. Disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu 4°C selama 10 menit. Supernatan dibuang, sedangkan presipitat dicuci dengan SAS 50% (10 x volume) lalu divorteks. Kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu 4°C selama 10 menit. Supernatan dibuang sedangkan presipitat dilarutkan dalam buffer fosfat 0,2 M dengan pH 8 dalam selofan. Selanjutnya didialisis dalam buffer fosfat 0,1 M dalam kondisi dingin selama semalam. Setelah purifikasi serum selesai dilakukan maka dilanjutkan dengan pengukuran kadar testosteron. Pada masing-masing *well* dimasukkan 25 μL larutan standart, sampel, dan kontrol. Kemudian dicampur dengan 100 μL reagen konjugat testosteron-HRP. Selanjutnya pada masing-masing *well* dimasukkan 50 μL reagen *rabbit-anti testosteron*. *Shaker* selama 30 detik, kemudian diinkubasi pada suhu ruang ($18-25^{\circ}\text{C}$) selama 90 menit. Setelah inkubasi, kemudian dicuci 5

kali dengan larutan *Destilated Water*. Selanjutnya, dimasukkan 100 μL larutan *stop solution* (1 N HCl) pada masing-masing *well*. *Shaker* selama 30 detik. Nilai absorbansi dibaca pada *ELISA reader* setelah 15 menit dengan absorbansi 450 nm. Konsentrasi testosteron dianalisis dengan uji ANOVA dan dilanjutkan dengan uji Tukey HSD dengan menggunakan bantuan program software SPSS 13,0 for windows.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pemeriksaan konsentrasi testosteron setelah paparan ekstrak biji pinang dengan teknik ELISA ditampilkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Rataan konsentrasi testosteron akibat paparan ekstrak biji pinang selama satu minggu.

Kelompok perlakuan	Konsentrasi Testosteron (ng/ml)
0 g/200 g BB (K0)	$0,09 \pm 0,005^a$
1 g/200 g BB (K1)	$0,56 \pm 0,010^b$
2 g/200 g BB (K2)	$0,57 \pm 0,011^b$
3 g/200 g BB (K3)	$0,09 \pm 0,003^a$
4 g/200 g BB (K4)	$0,09 \pm 0,005^a$

Keterangan: a,b, Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama memperlihatkan perbedaan yang nyata ($P < 0,05$).

Paparan ekstrak air biji pinang mengakibatkan terjadinya peningkatan konsentrasi testosteron pada kelompok K1 bila dibandingkan kontrol ($0,56 \pm 0,010$ vs $0,09 \pm 0,005$) dan kelompok K2 dibanding kontrol ($0,57 \pm 0,011$ vs $0,09 \pm 0,005$). Akan tetapi, kelompok K3 dan K4 tidak menyebabkan peningkatan konsentrasi testosteron bila dibanding kontrol ($0,09 \pm 0,003$ vs $0,09 \pm 0,005$) dan ($0,09 \pm 0,005$ vs $0,09 \pm 0,005$) (Tabel 1).

Hasil uji statistik dengan uji Tukey HSD menunjukkan bahwa adanya perbedaan yang nyata ($P < 0,05$) antara K1 dan K2 vs K0, K3, dan K4. Akan tetapi, antara K0 vs K3 dan K4, dan K3 vs K4 tidak memperlihatkan perbedaan yang nyata ($P > 0,05$).

Peningkatan konsentrasi testosteron akibat paparan ekstrak biji pinang pada kelompok K1 dan K2 adalah akibat adanya aktivitas bahan alkaloid utama biji pinang, yaitu arecoline pada

saluran reproduksi tikus jantan. Hal tersebut sesuai dengan hasil penelitian Shyi-Wu *et al.*, (2008) yang melaporkan bahwa pemberian arecoline pada tikus akan merangsang produksi testosteron. Hal tersebut terjadi akibat adanya aktivitas arecoline secara langsung pada sel-sel Leydig testis melalui mekanisme yang melibatkan aktivasi *L-type calcium channels*, meningkatnya aktivitas 17α -hidroksisteroid dehidrogenase, dan meningkatnya ekspresi *Steroidogenic acute regulatory protein* (StAR). Hasil penelitian Shyi-Wu *et al.*, (2008) juga melaporkan bahwa pemberian arecoline dapat meningkatkan aktivitas 17α -hidroksi-steroid dehidrogenase (HSD).

Biosintesis hormon steroid di dalam testes diawali dengan adanya pemindahan kolesterol dari luar ke dalam membran mitokondria yang difasilitasi oleh StAR (Miller dan Strauss, 1999). Ekspresi protein StAR ditingkatkan oleh arecoline, meskipun produksi protein ini tidak bertanggung jawab terhadap peningkatan pelepasan testosteron dengan segera dari sel-sel Leydig (Shyi-Wu *et al.*, 2008). Sampai saat ini diketahui bahwa konversi kolesterol menjadi pregnenolon dikatalisasi oleh enzim P450 (Hadley, 2000) yang berlokasi di dalam membran mitokondria (Miller, 1995). Hasil penelitian Shyi-Wu *et al.*, (2008) melaporkan bahwa pemberian arecoline dapat meningkatkan produksi pregnenolon. Hal tersebut menunjukkan bahwa aktivitas enzim P450 dapat ditingkatkan dengan pemberian arecoline.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa rangsangan LH pada steroidogenesis di dalam gonad, misalnya pada sel-sel Leydig adalah melalui ikatan dengan reseptor spesifik, aktivasi *adenylate cyclase*, pembentukan *cyclic adenosine monophosphate* (cAMP), aktivasi protein kinase A (PKA), pergantian fosfolipid, pembentukan *inositol trisphosphate*, dan peningkatan kalsium intraselular (Hall *et al.*, 1981). Peningkatan Ca^{2+} sitoplasmik yang dilepaskan dari retikulum endoplasmik atau yang dibawa dari *calcium channel* di dalam membran sel, dipengaruhi oleh peningkatan produksi testosteron di dalam sel-sel Leydig tikus (Manna *et al.*, 2001).

Carr *et al.*, (1993) melaporkan bahwa biosintesis androgen memerlukan kolesterol sebagai prekursornya. Kolesterol dapat disintesis *de novo* dan kelompok plasma oleh *receptor-mediated endocytosis low-density lipoprotein* (LDL). Selanjutnya Stocco dan Clark (1996) melaporkan bahwa perubahan kolesterol

menjadi testosteron melibatkan sejumlah reaksi enzimatik. Rantai sisi kolesterol dipisah dalam dua langkah untuk mereduksi ukurannya dari 27 menjadi 19 karbon dan satu cincin steroidnya dioksidasi menjadi konfigurasi keto $\Delta^{4,3}$. Reaksi awal dalam proses ini melibatkan transfer kolesterol oleh protein StAR ke dalam membran mitokondria dan mengalami pembelahan rantai sisi oleh CYP11A1 gen yang berperan mengkonversi kolesterol menjadi pregnenolon) menjadi bentuk pregnenolon. Perubahan berikutnya adalah perubahan pregnenolon menjadi testosteron yang melibatkan reaksi enzimatik acak dan pesanan.

Pembelahan rantai sisi kedua berlangsung dengan pembelahan 17 -hidroksilasi dan pembelahan ikatan $17, 20$ menjadi CYP17 (enzim sitokrom P540 yang beraksi pada pregnenolon dan progesteron dengan penambahan suatu gugus hidroksil (-OH) pada 17 karbon cincin D steroid) yang harus terjadi sebelum tereduksinya 17 -keton oleh 17α -hidroksi-steroid dehidrogenase III (17α -HSD-III) (enzim yang terdapat di dalam fraksi mikrosomal sel-sel Leydig testis, berperan mengkonversi perubahan androstenedion menjadi testosteron). Sebaliknya, oksidasi suatu cincin oleh 3β -Hidroksisteroid dehidrogenase tipe II (3β -HSD-II) dapat berlangsung pada proses stadium manapun. 3β -HSD-II merupakan enzim yang memediasi tiga reaksi paralel dehidrogenase/isomerase di dalam adrenal yang berperan mengkonversi pregnenolon menjadi progesteron, 17 -Hidroksipregnenolon menjadi 17 -Hidroksiprogesteron, dan dehidroepiandrosteron (DHEA) menjadi androstenedion. *Pathway* (jalur) utama dalam testis manusia nampaknya adalah *pathway* Δ^5 , cincin oksidasi menjadi reaksi terminal dalam urutannya (Auchus *et al.*, 1999). *Pathway* sintesis testosteron dapat dilihat pada Gambar 1.

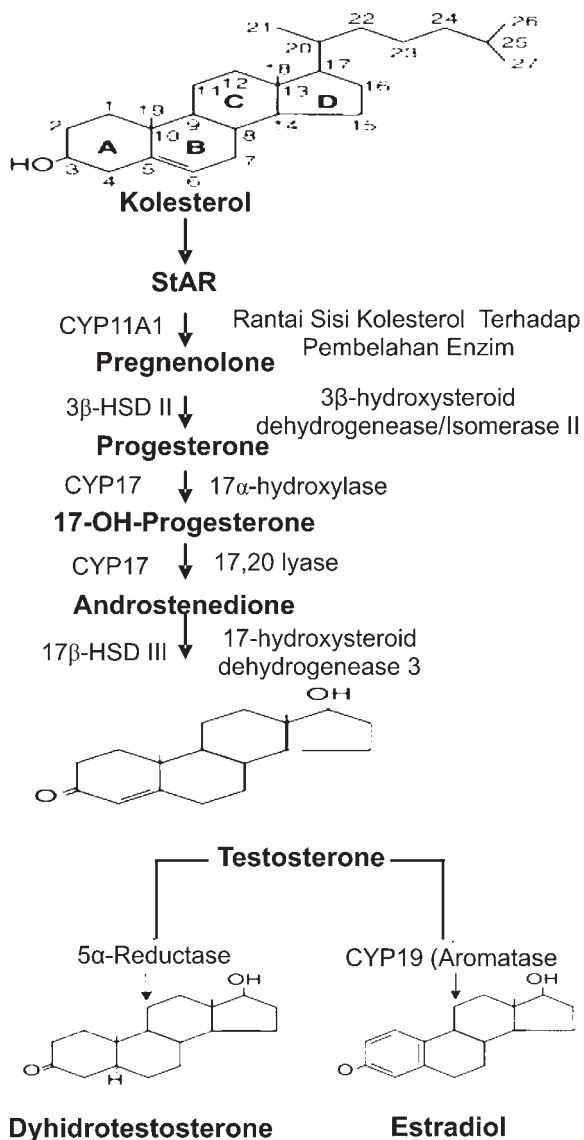
Lamanya waktu reaksi yang dibutuhkan untuk sintesis testosteron disebabkan oleh transpor testosteron ke dalam membran mitokondria. Stocco dan Clark, 1996 melaporkan bahwa pemberian secara akut LH akan menstimulasi sintesis testosteron dengan penambahan pembebasan kolesterol menuju mitokondria melalui protein StAR sedangkan untuk pembelahan rantai sisi dilakukan oleh CYP11A1 (Miller, 1988). Selain itu, LH juga menstimulasi testosteron dengan melakukan penambahan pembentukan CYP11A1 dan sejumlah enzim di dalam *pathway*.

Hasil penelitian ini juga sekaligus membuktikan bahwa ekstrak biji pinang mengandung bahan yang bersifat afrosidiak (meningkatkan gairah seks) yang dibuktikan dengan meningkatnya konsentrasi testosteron di dalam darah. Akan tetapi, konsentrasi testosteron yang terus meningkat di dalam darah dapat memberikan efek yang kurang menguntungkan terhadap spermatogenesis. Hal

ini disebabkan konsentrasi testosteron yang terus meningkat dalam darah akan melakukan umpan balik (*feedback*) negatif terhadap kelenjar hipofisis, sehingga akan berdampak terhadap terhambatnya sekresi *Follicle-Stimulating Hormone* (FSH) dan LH, dan akan menghambat/mengganggu spermatogenesis.

Pada level molekuler diketahui bahwa terhambatnya sekresi FSH akan menyebabkan terganggunya ikatan FSH dengan reseptornya (FSH-R) di dalam sel Sertoli. Hal ini akan berdampak terhadap aktivitas FSH untuk menginduksi lima *pathway* FSH di dalam sel Sertoli, yaitu *pathway mitogen-activated protein kinase* (MAPkinase), *pathway* kalsium, *pathway* phosphatidylinositol 3-kinase, *pathway* Phospholipase A₂ dan *pathway* cAMP (*cyclic adenosine monophosphate*)-protein kinase A (PKA) (Walker dan Cheng, 2005). Selain itu, diketahui pula bahwa terhambatnya sekresi LH akan mengganggu *signaling* LH di dalam sel Leydig untuk mensekresikan testosteron. Hal ini juga akan menyebabkan terganggunya *pathway signaling* testosteron di dalam sel Sertoli, yaitu *pathway* MAP kinase dan *pathway* kalsium (Walker dan Cheng, 2005). Terganggunya *pathway signaling* FSH dan testosteron di dalam sel Sertoli akan berdampak terhadap fosforilasi dua gen penting, yaitu *cAMP element binding protein* (CREB) dan *cAMP responsive element modulator* (CREM). Sejumlah hasil penelitian menunjukkan bahwa gangguan aktivasi fosforilasi CREM akan menyebabkan terjadinya gangguan ekspresi *protamine* yang berperan sebagai *check point* spermatogenesis (Oliva, 2006) dan infertilitas pada pria. Akan tetapi, dalam penelitian ini belum dapat dipastikan *pathway* yang mana dari FSH dan testosteron yang terganggu akibat pemberian ekstrak air biji pinang. Hal ini tentunya membuka peluang yang lebih luas untuk mempelajari efek biji pinang pada level molekuler proses spermatogenesis dalam upaya membuka tabir potensi biji pinang sebagai kandidat antifertilitas pada pria.

Dapat dipahami bahwa ekstrak air biji pinang berpotensi digunakan sebagai kandidat antifertilitas pada pria. Hal ini berdasarkan pada aktivitasnya dalam menginduksi konsentrasi testosteron yang tinggi dalam waktu yang relatif lama sehingga berpotensi mempengaruhi kelenjar hipofisis dalam melepaskan FSH dan LH.



Gambar 1. *Pathway* Pembentukan Testosteron di dalam Testis dan Konversi Testosteron Menjadi Bentuk Metabolit Aktif di dalam Jaringan Perifer. (StAR= *steroidogenic acute regulatory protein*), Griffin *et al.*, 2001).

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa paparan ekstrak biji pinang dengan dosis 1 dan 2 gram/200 gram BB tikus selama satu minggu menyebabkan terjadinya peningkatan konsentrasi testosteron di dalam darah dan ekstrak air biji pinang berpotensi digunakan sebagai kandidat antifertilitas pada pria.

SARAN

Saran yang dapat disampaikan dari penelitian ini adalah: 1) untuk membuktikan aktivitas alkaloid pada jaringan hipofisis, perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk melihat ekspresi FSH dan LH pada jaringan hipofisis dengan menggunakan metode imunohistokimia menggunakan antibodi monoklonal FSH dan LH; 2) pada tahap molekular perlu diketahui lebih lanjut efek paparan ekstrak biji pinang terhadap ekspresi sejumlah protein penting pada spermatogenesis, seperti ekspresi CREB, CREM, dan protamine; 3) untuk membuktikan potensi ekstrak biji pinang sebagai kandidat antifertilitas pria perlu dilakukan uji fertilisasi baik secara *invitro* maupun *invivo*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Satuan Kerja BRR-Pendidikan Tinggi NAD yang telah membiayai penelitian ini dan kepada semua pihak yang telah membantu sehingga terlaksananya penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Akmal M, Aulanni'am, Rasmaidar, Dasrul, Siregar TN, Rahmi E. 2008^a. Efek dekok biji pinang (*Areca catechu*) terhadap motilitas spermatozoa tikus (*Rattus norvegicus*): Upaya menemukan kandidat antifertilitas pria. *Jurnal Kedokteran Hewan*. 2(2):20-24.
- Akmal M, Rosmaidar, Aulanni'am. 2008^b. Profil Konsentrasi Spermatozoa Tikus (*Rattus norvegicus*) Akibat Paparan Fraksi Air dan Crude Alkaloid Biji Pinang (*Areca catechu*). *Pemakalah Oral*. Disampaikan Pada Seminar Nasional Hasil Penelitian Antar Universitas Sains dan Teknologi. Kerjasama Laboratorium Terpadu Universitas Syiah Kuala dan BRR NAD-NIAS Sektor Pendidikan, Banda Aceh 10-12 Maret 2008.
- Auchus RJ, Lee TC, Miller WL. 1998. Cytochrome b5 Augments the 17, 20-lyase activity of human P450c17 without direct electron transfer. *J Biol Chem* 273:3158-3165.
- Aulanni'am, Akmal, M, Rosmaidar. 2007. Efek Anfertilitas Fraksi Air Biji Pinang (*Areca catechu*) Sebagai Agen Apoptosis Pada Sel-Sel Jaringan Testis *Rattus norvegicus*. *Jurnal Media Kedokteran Hewan*. 23(3):179-183.
- Carr BR, Jr. Parker CR, Ohashi M. 1983. Regulation of human fetal testicular-secretion of testosterone low-density lipoprotein-cholesterol and cholesterol synthesized de novo as steroid precursor. *Am J Obstet Gynecol* 146:241-247.
- Crosignani PG. 2002. Hormonal contraception: what is new? *Human Reproduction Update*. 8(4):359-371.
- Fauzi A, Lucianawaty M, Hanifah L, Bernadette N. 2005. Penduduk Indonesia 2025 Akan Capai 273,65 Juta Jiwa. <http://situs.kesrepro.info/info/agu/2005/info02.htm>.
- Giri S, Jeffrey RI, Chi-Chen T, Mark Z, Kristopher WK, Gonzales FJ. 2006. A metabolomic approach to the metabolism of the areca nut alkaloids arecoline and arecaidine in the mouse, *J. Chem Res Toxicol* 19(6):818-827.
- Griffin JE, Wilson JD. 2001. Disorders of the testes. In Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL et al (eds). *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 15th ed. New York, McGraw-Hill, pp 2143-2154.
- Hadley ME. 2000. *Adrenal steroid hormone*. In: *Endocrinology* (5th ed), edited by Hadley ME. Englewood Cliffs, N.J. Prentice-Hall, P. 363-421.
- Hall PF, Osawa S, Mrotek J. 1981. The influence of calmodulin on steroid synthesis in Leydig cells from rat testis. *Endocrinology* 109:1677-1682.
- Jeng JH, Chang MC, Hahn LJ. 2001. Role of areca nut in betel quid-associated chemical carcinogenesis: Current awareness and future perspectives. *Oral Oncol Pathol Med* 28:64-71.

- Kiong Er-Tse, Eing-Mei Tsai, Li-Yu Tsai, Ying-Chin Ko, Jau-Nan Lee. 2006. In vitro effects of arecoline on sperm motility and cyclooxygenase-2 expression. *J Toxicological sciences*. 31: 75-82.
- Ko YC, Chiang TA, Chang SJ, Hsieh SF. 1992. Prevalence of betel quid chewing habit in Taiwan and related sociodemographic factors. *J Oral Pathol Med* 24: 450-453.
- Manna PR, El-Hefnawy T, Kero J, Huhtaniemi IT. 2001. Biphasic action of prolactin in the regulation of murine Leydig tumor cell functions. *Endocrinology*. 142:308-318.
- Miller WL. 1988. Molecular Biology of steroid hormone synthesis. *Endocr Rev* 9:295-318.
- Miller WL. 1995. Mitochondrial specificity of the early steps in steroidogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 55:607-616.
- Miller WL, Strauss JF. 1999. Molecular pathology and mechanism of action of the steroidogenic acute regulatory protein, StAR. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 69:131-141.
- Oliva R. 2006. Protamines and male infertility. *Human Reproduction Update* 12(4): 417-435.
- Page ST, Amory JK, Bremner WJ. 2008. Advances in male contraception. *Endocrine Revies*. 29(4):465-493.
- Shyi-Wu, Guey-Shyang WH, Te-Jung C, Wang PS. 2008. Effects of arecoline on testosterone release in rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 295:E497-E504.
- Stocco DM, Clark BJ. 1996. Regulation of the acute production of steroid in steroidogenic cells. *Endocr Rev* 17:221-244.
- Susila, Y. 2003. Perubahan histologis testis akibat pemberian serbuk pinang sirih (*Areca catechu*) pada ayam. Darussalam Banda Aceh. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala .
- United Nations Population Division (UNDP). 2000. World population prospects: The 2000 revision. New York, United Nations.
- Walker WH, Cheng J. 2005. FSH and testosterone signaling in Sertoli cells. *Reproduction*. 130:15-28.
- Wang CK, Lee WH, Peng CH. 1997. Contents of phenolics and alkaloids in *Areca catechu* Linn. during maturation. *J Agric Food Chem*. 45:1185-1188.
- Yang MJ, Chung TC, Yang MC, Hsu TY, Ko YC. 2001. Betel nut chewing and risk of adverse birth outcomes among aborigines in Eastern Taiwan. *J. Toxicol. Environ Health* 64:465-472.