

Uji Antifertilitas Kombinasi Fraksi Kloroform Biji Pepaya (*Carica papaya* Linn.) dengan Fraksi Metanol Biji Saga (*Abrus precatorius* Linn.) terhadap Spermatogenesis Tikus Jantan Galur Wistar

(Antifertility Study from Combination of Chloroform Fractions of *Carica papaya* and Methanolic Fractions of *Abrus precatorius* in Spermatogenesis of Wistar Male Rat)

Zainah Rajab, Siti Muslichah, Fifteen Aprila Fajrin
Fakultas Farmasi, Universitas Jember
Jln. Kalimantan 37, Jember 68121
e-mail korespondensi: zainahrajab@gmail.com

Abstract

Chloroform fraction of Carica papaya seed (FKCP) and methanol fraction of Abrus precatorius seed (FMAB) have antifertility activity. This study aims to determine the antifertility activity combination of FKCP and FMAB in spermatogenesis and its reversibility on wistar male rats. This research used 40 wistar male rats that were divided into 5 groups, eight animals each group. Grup P0 (control) was administered by CMC Na 1%, group P1 was administered by combination of FKCP dose of 100 mg/kg BW and FMAB dose of 75 mg/kg BW, group P2 was administered by combination of FKCP dose of 100 mg/kg BW and FMAB dose of 50 mg/kg BW, group P3 was administered by combination of FKCP dose of 50 mg/kg BW and FMAB dose of 75 mg/kg BW, grup P4 was administered by combination of FKCP dose of 50 mg/kg BW and FMAB dose of 50 mg/kg BW for 28 days. Reversibility of spermatogenesis was observed in all group after 28 days of withdrawal of treatment. The results showed degenerative changes in the seminiferous tubules of rats given FKCP and FMAB. Conclusion of this research is the combination of these fractions reduced spermatogenesis, but it was reversible.

Keywords: antifertility, saga seed, papaya seed, spermatogenesis, reversibility.

Abstrak

Fraksi kloroform biji *Carica papaya* (FKCP) dan fraksi metanol biji *Abrus precatorius* (FMAB) memiliki sifat antifertilitas yang baik. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antifertilitas kombinasi FKCP dan FMAB terhadap spermatogenesis tikus putih jantan galur wistar, serta mengetahui reversibilitas dari pemberian kombinasi tersebut. Penelitian ini menggunakan 40 ekor tikus jantan galur wistar dibagi menjadi 5 kelompok masing-masing kelompok 8 ekor tikus. Kelompok P0-kontrol diberi CMC Na 1%, kelompok P1-diberikan kombinasi FKCP 100 mg/kgBB dengan FMAB 75 mg/kgBB, kelompok P2-diberikan kombinasi FKCP 100 mg/kgBB dengan FMAB 50 mg/kgBB, kelompok P3-diberikan kombinasi FKCP 50 mg/kgBB dengan FMAB 75 mg/kgBB, kelompok keempat P4-diberikan kombinasi FKCP 50 mg/kgBB dengan FMAB 50 mg/kgBB selama 28 hari. Reversibilitas dari spermatogenesis diamati pada semua kelompok setelah 28 hari penghentian perlakuan. Hasilnya menunjukkan terjadinya perubahan degeneratif pada tubulus seminiferus. Kesimpulan dari penelitian ini bahwa kombinasi fraksi tersebut dapat menurunkan proses spermatogenesis, namun bersifat reversibel.

Kata kunci: antifertilitas, biji saga, biji pepaya, spermatogenesis, reversibilitas.

Pendahuluan

Permasalahan terbesar yang dihadapi hampir di setiap negara berkembang terutama Indonesia yaitu pertumbuhan penduduk yang tidak terkendali. Program Keluarga Berencana (KB) bagi pasangan suami istri merupakan cara untuk menanggulangi laju pertumbuhan penduduk di Indonesia. Salah satu program KB yaitu kontrasepsi untuk pasangan suami istri [1]. Alat kontrasepsi kebanyakan ditujukan pada wanita, sedangkan alat kontrasepsi untuk pria sedikit. Hal ini mengakibatkan rendahnya partisipasi pria dalam KB karena kontrasepsi pria yang tersedia sangat terbatas [2].

Kontrasepsi yang tersedia untuk laki-laki yaitu senggama terputus, kondom, vasektomi [3] namun alat kontrasepsi tersebut memiliki beberapa kekurangan [4]. Keterbatasan alat kontrasepsi tersebut dapat diatasi dengan pencarian kontrasepsi yang aman, efektif, reversibel, dan tidak menurunkan libido.

Tanaman obat sudah lama digunakan oleh masyarakat Indonesia. Penggunaan ekstrak yang berasal dari lebih dari satu tanaman (poliherbal) sering digunakan masyarakat. Poliherbal merupakan kombinasi dua atau lebih tanaman obat yang digunakan untuk terapi berbagai penyakit. Poliherbal memiliki kelebihan efek terapi yang optimum dengan efek samping lebih rendah bila dibandingkan monoterapi [5].

Dua tanaman yang sering dimanfaatkan sebagai antifertilitas yaitu biji saga (*Abrus precatorius*) yang termasuk famili Fabaceae dan biji pepaya (*Carica papaya*) yang termasuk famili Caricaceae. Saga adalah tanaman asli Indonesia yang tumbuh didaerah tropis dan subtropis. Secara tradisional biji saga dimanfaatkan untuk mengobati penyakit kandung kemih [6], diare, kejang, batuk, pilek [7], kontrasepsi [8]. Khasiat antifertilitas disebabkan oleh kandungan kimia yang dimiliki yaitu abrin [7] dengan mekanisme inaktivasi RNA pada sel sehingga menghambat sintesis protein sel sertoli dan sel leydig [9] atau langsung berinteraksi dengan membran mitokondria spermatid menyebabkan penghambatan proses spermatogenesis [6]. Proses spermatogenesis merupakan proses yang kompleks melibatkan pembelahan sel mitosis, meiosis, dan proses spermiogenesis. Akhir dari proses kompleks spermatogenesis akan menghasilkan spermatozoa [10]. Jahan *et al.* [6] melaporkan bahwa biji saga dapat mempengaruhi jumlah spermatogonia, jumlah spermatosid primer, jumlah spermatosid sekunder, jumlah spermatid, jumlah spermatozoa, ketebalan tubulus seminiferus dan diameter tubulus seminiferus.

Tanaman pepaya merupakan tanaman yang hampir seluruh bagian dapat dimanfaatkan. Salah satunya yang dapat dimanfaatkan yaitu biji pepaya yang memiliki khasiat sebagai obat cacing, peluruh haid, gangguan pencernaan, pembesaran hati dan limfa [11]. Kandungan kimia yang terdapat pada biji pepaya yaitu golongan fenol, triterpenoid, flavonoid, alkaloid, dan saponin [12]. Adanya kandungan senyawa aktif tersebut, biji pepaya memiliki sifat antifertilitas dan dapat digunakan sebagai bahan kontrasepsi pria [2]. Basha *et al.* [13] menyatakan biji pepaya dapat mempengaruhi susunan tubulus seminiferus yaitu kerusakan pada epitel germinal, degenerasi spermatosid dan spermatid.

Pada penelitian Muslichah dan Wiratmo. [14] menyatakan fraksi metanol biji saga memiliki khasiat sebagai antifertilitas yang baik pada dosis pemberian 75 mg/Kg BB, sedangkan fraksi kloroform biji pepaya memiliki khasiat antifertilitas yang baik pada dosis pemberian 100 mg/Kg BB. Atas dasar potensi tersebut dilakukan penelitian tentang kombinasi fraksi kloroform biji pepaya (FKCP) dan fraksi metanol biji saga (FMAB) terhadap spermatogenesis tikus putih jantan galur wistar, serta mengetahui reversibilitas dari pemberian kombinasi tersebut.

Metode Penelitian

Biji saga dikeringkan di bawah sinar matahari, kulitnya dipisahkan, biji dihaluskan dengan cara diblender, diayak, dan ditimbang untuk proses selanjutnya. Serbuk simplisia diekstraksi dengan cara remaserasi dengan pelarut metanol. Dilakukan remaserasi sebanyak 3 kali. Maserat disaring dengan kertas saring dengan bantuan corong buchner. Filtrat ditampung dan dipekatkan dengan *rotary vacuum evaporator* 45 °C sampai diperoleh ekstrak metanol. Ekstrak metanol tersebut selanjutnya ditambah air dengan perbandingan 7:3, dimasukkan kedalam corong pisah. Kemudian ditambahkan pelarut n-heksana kedalam corong pisah dengan perbandingan pelarut 1:1, dikocok, campuran dibiarkan hingga membentuk dua lapisan yang terpisah. Lapisan atas merupakan fraksi n-heksana dan lapisan bawah merupakan metanol. Fraksinasi dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali. Fraksi metanol yang didapat ditambah pelarut kloroform dengan perbandingan 1:1. Lapisan atas merupakan fraksi metanol dan lapisan bawah merupakan kloroform. Fraksinasi dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali. Fraksi metanol yang telah terambil kemudian dipekatkan di atas penangas air pada suhu di

bawah titik didih metanol hingga semua pelarut menguap dan didapatkan hasil akhir berupa fraksi metanol biji saga kental. Perlakuan yang sama juga dilakukan pada biji pepaya, namun fraksi terakhir yang terambil yaitu fraksi kloroform.

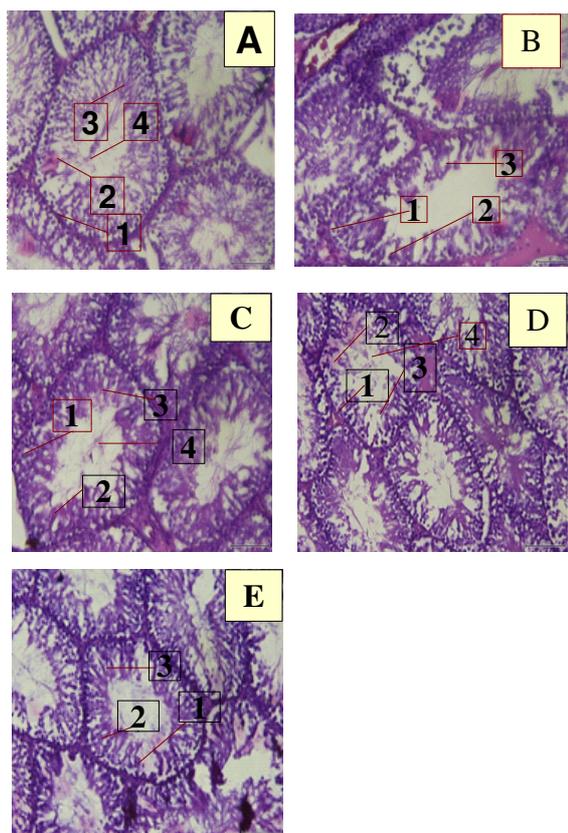
Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental menggunakan 40 ekor tikus jantan galur wistar umur 2-3 bulan dengan berat badan 200-250 gram. Pengelompokan hewan uji dilakukan secara acak menjadi 5 kelompok masing-masing kelompok terdiri dari 8 ekor tikus. Kelompok P0-kontrol dengan CMC Na 1%, kelompok P1-diberikan kombinasi FKCP 100 mg/kgBB dengan FMAB 75 mg/kgBB, kelompok P2-diberikan kombinasi FKCP 100 mg/kgBB dengan FMAB 50 mg/kgBB, kelompok P3-diberikan kombinasi FKCP 50 mg/kgBB dengan FMAB 75 mg/kgBB, kelompok P4-diberikan kombinasi FKCP 50 mg/kgBB dengan FMAB 50 mg/kgBB. Pemberian perlakuan secara peroral selama 28 hari. Pada hari ke-29 4 ekor tikus masing-masing kelompok dibedah untuk pengambilan testis dan dibuat preparat histologi, sedangkan 4 ekor tikus sisanya masing-masing kelompok dihentikan pemberian perlakuan selama 28 hari untuk mengetahui reversibilitas dari spermatogenesis. Setelah 28 hari tanpa perlakuan, semua tikus dibedah untuk pengambilan testis dan dibuat preparat histologi dengan pewarnaan hematosili eosin (HE.)

Histologi testis tikus diamati dengan metode *Jonhsen like-score* yang diadaptasi dari Johnsen [15]. Setiap testis diambil 20 tubulus secara acak untuk evaluasi skor histologi. Data yang diperoleh selama 28 hari dan 28 hari setelah setelahnya dianalisis menggunakan uji *Kruskall-Wallis*, bila terdapat perbedaan dilanjutkan dengan *Mann-whitney*.

Hasil Penelitian

Hasil histologi testis tikus yang diberi perlakuan selama 28 hari tertera pada Gambar 1, sedangkan hasil histologi testis tikus yang selama 28 hari setelah penghentian perlakuan tertera pada Gambar 2. Hasil penilaian skor spermatogenesis pada kelompok yang diberi perlakuan selama 28 harian dan 28 hari setelah penghentian perlakuan tertera pada Tabel 2.

Gambar 1 menggambarkan bahwa histologi testis tikus terjadi perubahan susunan tubulus seminiferus. Pada gambar A menggambarkan susunan tubulus seminiferus masih terdapat banyak spermatozoa, gambar B dan E menggambarkan susunan tubulus seminiferus yang tidak memiliki spermatozoa, gambar C dan D menggambarkan susunan tubulus seminiferus yang terdapat sedikit spermatozoa.

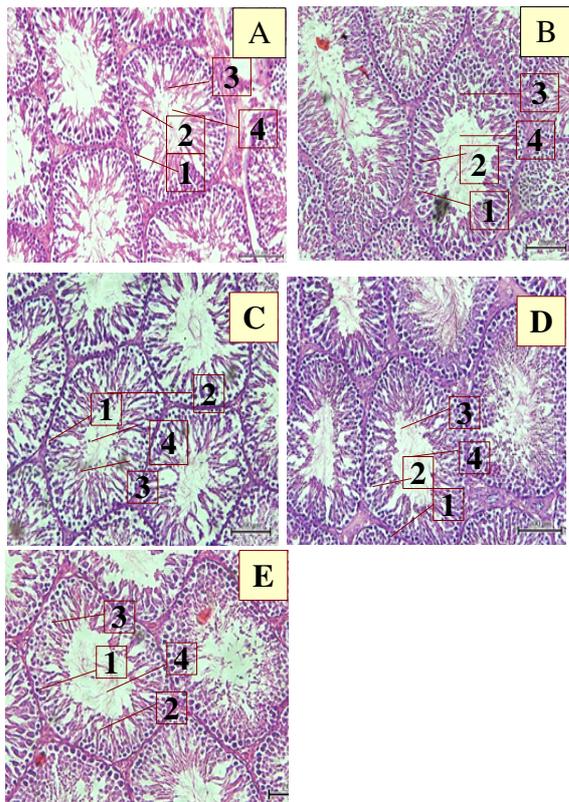


Gambar 1 Gambaran spermatogenesis tikus jantan yang diberi perlakuan selama 28 hari dengan pewarnaan HE (perbesaran 200x); A. Kelompok P0 B. Kelompok P1; C.Kelompok P2; D. Kelompok P3; E. Kelompok P4; 1. Spermatogonia; 2. Spermatosit; 3. Spermatid; 4. Spermatoza.

Gambar 2 menggambarkan bahwa histologi testis tikus terjadi perubahan susunan tubulus seminiferus yang lebih baik dari pada gambar 1. Pada gambar A menggambarkan susunan tubulus seminiferus masih terdapat banyak spermatozoa, gambar B menggambarkan susunan tubulus seminiferus yang memiliki sedikit spermatozoa, gambar C,D, dan E menggambarkan susunan tubulus seminiferus yang terdapat banyak spermatozoa.

Hasil rata-rata skor kelompok yang diberi perlakuan selama 28 hari terdapat pada Tabel 2. Berdasarkan Tabel 2 tersebut diketahui rata-rata skor spermatogenesis terbesar adalah kelompok kontrol yaitu sebesar 9,41. Hal ini menunjukkan bahwa spermatogenesis berlangsung dengan baik tetapi dengan epitelium yang tidak beraturan. Rata-rata skor spermatogenesis masing-masing perlakuan dengan kombinasi fraksi kloroform biji pepaya : fraksi metanol biji saga memiliki hasil yang berbeda. Skor rata-rata spermatogenesis P1 sebesar 7,41 menunjukkan bahwa tidak terdapat sel sperma tetapi banyak spermatid. Skor rata-rata spermatogenesis P2, P3 berturut-turut sebesar 8,46 dan 8,08

menunjukkan bahwa terdapat sedikit spermatozoa.



Gambar 2 Gambaran spermatogenesis tikus jantan selama 28 hari setelah penghentian pemberian perlakuan dengan pewarnaan HE (perbesaran 200x); A. Kelompok P0 B. Kelompok P1; C. Kelompok P2; D. Kelompok P3; E. Kelompok P4; 1. Spermatogonia; 2. Spermatisit; 3. Spermatid; 4. Spermatozoa.

Tabel 2. Skor rata-rata spermatogenesis.

Kelompok	N	Skor (rata-rata)± SEM selama 28 hari	Skor (rata-rata)± SEM selama 28 hari setelah penghentian perlakuan
P0	4	9,41±0,08 ^a	9,26±0,16 ^a
P1	4	7,41±0,60 ^{b,c}	8,54±0,35 ^a
P2	4	8,46±0,22 ^b	8,81±0,23 ^a
P3	4	8,08±0,26 ^b	8,81±0,23 ^a
P4	4	6,78±0,52 ^c	9,12±0,26 ^a

Keterangan : SEM= Standart Error of Mean
Angka yang diikuti dengan huruf yang berbeda menunjukkan berbeda bermakna dengan signifikansi $p < 0,05$

Skor rata-rata spermatogenesis P4 sebesar 6,78 menunjukkan bahwa tidak terdapat sel spermatozoa, tetapi banyak spermatid. Kelompok yang memiliki perbedaan antar kelompok yaitu kelompok P0 dengan kelompok perlakuan P1, P2, P3, P4, kelompok P2 dengan P4, dan kelompok P3 dengan P4.

Hasil rata-rata skor kelompok 28 hari setelah penghentian pemberian perlakuan terdapat pada Tabel 2. Berdasarkan Table 2 tersebut diketahui rata-rata skor

spermatogenesis terbesar adalah kelompok kontrol yaitu sebesar 9,26. Hal ini menunjukkan bahwa spermatogenesis berlangsung dengan baik tetapi dengan epitelium yang tidak beraturan. Rata-rata skor spermatogenesis masing-masing perlakuan dengan kombinasi fraksi kloroform biji pepaya : fraksi metanol biji pepaya memiliki hasil yang berbeda-beda. Skor rata-rata spermatogenesis P1 sebesar 8,54 menunjukkan bahwa terdapat sedikit spermatozoa. Skor rata-rata spermatogenesis P2, P3, dan P4 berturut-turut sebesar 8,81; 9,05 dan 9,12 menunjukkan bahwa spermatogenesis berlangsung dengan baik tetapi dengan epitelium yang tidak beraturan. Semua kelompok tidak memiliki perbedaan.

Pembahasan

Pemberian kombinasi fraksi kloroform biji pepaya dengan fraksi metanol biji pepaya dapat mengakibatkan gangguan pada proses spermatogenesis. Ketika tahap awal perkembangan sel terganggu maka tahapan sel berikutnya akan terpengaruh. Akibatnya skor spermatogenesis dapat mengalami penurunan setelah pemberian kombinasi. Data spermatogenesis yang diperoleh berasal dari tikus jantan galur wistar yang diberi perlakuan selama 28 hari dan 28 hari setelah penghentian perlakuan.

Pemberian kombinasi FKCP dengan FMKB dapat menurunkan proses spermatogenesis yang ditandai dengan penurunan skor. Penurunan skor spermatogenesis dapat diduga karena zat aktif yang terdapat pada kedua fraksi tersebut. Biji pepaya mengandung alkaloid dan steroid memiliki sifat sebagai antifertilitas [2], sedangkan biji pepaya mengandung abrin yang berpotensi sebagai agen antifertilitas [7].

Menurut Eke *et al.* [16] ekstrak kloroform pada biji pepaya mengandung alkaloid, tanin, dan antraquinon, sehingga diduga pada fraksi kloroform biji pepaya mengandung semua senyawa tersebut. Ekstrak metanol pada biji pepaya ditemukan mengandung abrin. Pelarut metanol merupakan pelarut polar dan pelarut tersebut digunakan untuk mendapatkan senyawa polar seperti asam amino dan derivatnya yaitu abrin [17]. Hal ini dapat diduga pada fraksi metanol juga terdapat abrin.

Menurut Susetyarini *et al.* [18] bahwa senyawa antifertilitas dari tumbuhan obat bekerja dengan 2 cara, yaitu melalui efek sitotoksik dan melalui efek hormonal yang menghambat laju metabolisme sel spermiogenesis dengan cara mengganggu keseimbangan sistem hormon. FKCP bekerja dengan cara hormonal yaitu menghambat pengeluaran hormon reproduksi akibatnya

proses spermatogenesis terhambat karena diduga adanya senyawa alkaloid [19]. Ketika hormon FSH menurun maka tidak dapat merangsang sel sertoli. Fungsi dari sel sertoli yaitu membentuk *Blood Testis Barrier* yang menyebabkan terbentuknya *mikroenvironment* yang optimal untuk berlangsungnya proses spermatogenesis. Jika fungsi dari sel sertoli terganggu maka sekresi ABP (*Androgen Binding Protein*), suplai nutrisi, faktor pertumbuhan, asam laktat akan terganggu yang mengakibatkan proses spermatogenesis menurun. Hal ini karena zat-zat tersebut dibutuhkan dalam proses spermatogenesis [2].

FMAB bekerja dengan efek sitotoksik yang diduga adanya senyawa astringen akibatnya sintesis protein dari sel sertoli terhambat, maka akan terjadinya penghambatan pada proses spermatogenesis [8]. Sel sertoli akan mengeluarkan ABP. ABP keluar maka proses spermatogenesis akan maksimal. Selain itu adanya ABP akan berfungsi untuk mengikat testosteron yang ada di membran tubulus menuju lumen untuk digunakan menstimulasi tahap perubahan spermatid menjadi spermatozoa. Ketika sintesis protein pada sel sertoli terhambat maka ABP tidak disekresikan, akibatnya proses spermatogenesis terhambat, transport testosteron dan jumlah spermatid yang berubah menjadi spermatozoa akan terganggu [20].

Semua perlakuan kombinasi FKCP dengan FMAB menghasilkan penurunan rata-rata skor spermatogenesis. Penurunan rata-rata skor spermatogenesis paling rendah pada P4 dengan kombinasi FKCP 50 mg/kgBB dengan FMAB 50 mg/kgBB. Hal ini karena diduga adanya senyawa yang terdapat pada FKCP dan FMAB yang bekerja secara sinergisme, sehingga dengan dosis yang lebih rendah dapat memberikan aktivitas antifertilitas yang baik dan efek samping yang lebih rendah.

Sifat reversibilitas dapat diketahui dengan cara penghentian pemberian perlakuan selama 28 hari, kemudian mengamati proses spermatogenesis pada testis tikus tersebut. Penghentian pemberian kombinasi fraksi tersebut telah menunjukkan proses spermatogenesis yang lebih baik. Proses spermatogenesis yang terjadi pada kelompok kontrol sama dengan kelompok yang diberi perlakuan kombinasi FKCP dengan FMAB, sehingga dapat dikatakan tidak menyebabkan perubahan yang bersifat tetap pada proses spermatogenesis.

Simpulan dan Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang sudah dilakukan dapat disimpulkan bahwa kombinasi FKCP dengan FMAB dapat menurunkan skor

spermatogenesis, penurunan skor paling rendah yaitu pada P4 kombinasi FKCP 50 mg/kgBB dengan FMAB 50 mg/kgBB. Pengaruh pemberian kombinasi FKCP dengan FMAB dapat bersifat reversibel atau tidak tetap terhadap proses spermatogenesis.

Saran pada penelitian ini yaitu perlu dilakukan skrining atau isolasi untuk mengetahui kandungan senyawa aktif dalam FKCP dan FMAB yang berkaitan dengan penghambatan proses spermatogenesis dan perlu dilakukan pengujian tentang kadar hormon FSH dan LH.

Ucapan Terimakasih

Terimakasih kepada DIKTI yang telah mendanai penelitian ini.

Daftar Pustaka

1. BKKBN. Pedoman penggunaan dana alokasi khusus (DAK) bidang keluarga berencana tahun. Badan Kependudukan dan Keluarga Berencana Nasional. 2013; 1-3.
2. Satriyasa BK, Pangkahila IW. Fraksi heksan dan fraksi metanol ekstrak biji pepaya muda menghambat spermatogonia mencit (*Mus Musculus*) jantan. *Journal of Veteriner*. 2010 Maret;11 (1): 36-40.
3. Pokharkar RD, Saraswat RK, Kanawade MG. Contraceptive evaluations of oil extract of seeds of *Abrus precatorius* (L) in male albino rats. 2015 Feb; 3: 905-914.
4. Ekarini SMB. Analisis faktor-faktor yang berpengaruh terhadap partisipasi pria dalam keluarga berencana di Kecamatan Selo Kabupaten Boyolali. Program Pasca Sarjana Universitas Diponegoro; 2008.
5. Atangwho IJ, Ebong PE, Eyong EU, Egbung GE. Combined extracts of *Vernonia amygdalina* and *Azadirachta indica* may substitute insulin requirement in the management of type I diabetes. *Research Journal Medicine and Medical Sciences*. 2010; 5 (1): 35-39.
6. Jahan S, Rasool S, Khan MA, Ahmad M, Zafar M, Abbasi AM. Antifertility effects of ethanolic seed extract of *Abrus precatorius* L. on sperm production and DNA integrity in adult male mice. *Journal Medicinal Plants Research*. 2009AOk; 3 (10): 809-814.
7. Abu SM, Manirul HA, Majid MA, Anwarul IM. Antifertility studies on ethanolic extract of *Abrus precatorius* L. on swiss male albino mice. *International Journal of Pharmaceutical Science and Research*. 2010; 3 (11): 288-292.

8. Jahan S, Naima S, Fasihunnisa I, Mir AK, Mushtaq A, Muhammad Z. Histomorphological study to evaluate anti-fertility effect of *Abrus precatorius* L. in adult male mice. *Journal Medicinal Plants Research*. 2009B; 3 (12):1021–8.
9. Bagaria A, Surendranath K, Ramagopal UA, Ramakumar S, Karande AA. Structure-function analysis and insights into the reduced toxicity of *Abrus precatorius* agglutinin in relation to abrin. *The Journal of Biological Chemistry*. 2006 juni; 281 (45): 34465–34474.
10. De Kretser DM, Loveland KL, Meinhardt A, Simorangkir D, Wreford N. Spermatogenesis. *Human Reproduction*. 1998; 13 (1): 1–8.
11. Siburian J, Marlina J, Johari A. Pengaruh ekstrak biji pepaya (*Carica papaya* L.) pada tahap prakopulasi terhadap fungsi reproduksi mencit (*Mus musculus* L.) Swiss Webster Betina. *Biospecies*. 2012; 1(1).
12. Sukadana IM, Rahayu Santi S, Juliarti NK. Aktivitas Antibakteri Senyawa Golongan Triterpenoid dari Biji Pepaya (*Carica papaya* L.). *Journal Chemistry*. 2008;2(1).
13. Basha H, Lalithamma A, Govardhan Naik A, Changamma C. Evaluation of antifertility efficacy of *Carica papaya* seed extract through histological indices in male albino rats. *International Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences*. 2013 Sept; 4(3).
14. Muslichah S, Wiratmo. Efek antifertilitas fraksi n-Heksana, fraksi kloroform dan fraksi metanol biji saga (*Abrus Precatorius* L.) dan biji pepaya (*Carica Papaya* L.) terhadap tikus jantan galur wistar. Laporan penelitian. 2014.
15. Jhonsen, S.G. Testicular biopsy score count-A method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormones* [Internet]. 1970 [cited 11 Sep 2014]; 1(1):2-25. Available from: <http://www.karger.com/Article/Abstract/178170>.
16. Eke ON, Augustine AU, Ibrahim HF. Qualitative analysis of phytochemicals and antibacterial screening of extracts of *Carica papaya* fruits and seeds. *International Journal of Modern Chemistry*. 2014; 6(1): 48–56.
17. Ratnasooriya WD, Amarasekera AS, Ananda U. Effect of methanolic extract of *Abrus precatorius* seeds on fertility of female rats. *Vidyodaya Journal Science*. 1991; 3(2): 41-46.
18. Susetyarini, RE. Jumlah sel spermatogenesis tikus putih yang diberi tanin daun bluntas (*Pluchea indica*) sebagai sumber belajar. Seminar Nasional X Pendidikan Biologi FKIP UNS. 2013.
19. Winarno, W.M., dan Sundari, D. Informasi tanaman obat untuk kontrasepsi tradisional. Pusat Penelitian dan Pengembangan Farmasi, Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Departemen Kesehatan. 1997;120.
20. Kristijanti W. Penurunan jumlah dan motilitas spermatozoa setelah pemberian ekstrak biji pepaya (kajian potensi biji pepaya sebagai bahan kontrasepsi alternatif). *Jurnal Biosaintifika*. 2009 Maret; 1(1): 19-26.