

INFUSE OF *COSTUS SPECIOSUS* (KOEN.) JE SMITH LEAF AS AN INHIBITOR OF SPERMATOZOA QUANTITY AND QUALITY OF MALE MICE BALB / C

INFUSA DAUN PACING *COSTUS SPECIOSUS* (KOEN.) J.E. SMITH SEBAGAI PENGHAMBAT JUMLAH DAN KUALITAS SPERMATOZOA PADA MENCIT JANTAN BALB/C

Ika Puspita Sari^{1*)}, Siti Rahayu¹, Dicky M. Rizal²

¹Department Pharmacology and Pharmacy Clinic, Faculty of Pharmacy, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, 55281

²Department Physiology, Faculty Medicine, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, 55281

ABSTRACT

Costus speciosus (Koen.) J.E. Smith (Pacing) is a plant widely use as traditional contraception. The objective of this study is to evaluate the effect of pacing leaves infusion on Balb/C mice spermatogenesis and its reversibility. This study was conducted on male mice. Mice was divided into 6 groups, 6 mice each group. Pacing leaves infusion was given orally at dose 275, 550, and 1100 mg/kg body weight for 14 days. The control groups received distilled water and another group received corn oil and andriol 5.2 mg/kg body weight. At day 15, 3 mice from all of groups was euthanized and the rest of mice in all of groups was euthanized in day 28 to evaluate the reversibility of spermatogenesis. The observation of spermatogenesis was conducted on quantity and quality of spermatozoa (motility, viability, and morphology). The result showed that pacing leaves infusion at dose 275, 550, and 1100 mg/kg body weight reduced the number of spermatozoa by 16-38 % ($p < 0.05$), but it did not change the viability and morphology of the spermatozoa. At dose 275 and 550 mg/kg body weight, pacing leaves infusion reduced the motility of spermatozoa by 36-39 % ($p < 0.05$). The ability of pacing leaves infusion in reducing the number and motility of spermatozoa is reversible.

Key word : infusion infusa, pacing leaves, number spermatozoa , qualities spermatozoa

ABSTRAK

Costus speciosus(Koen.)J.E. Smith (Pacing) merupakan tanaman yang dimanfaatkan oleh masyarakat sebagai obat tradisional untuk kontrasepsi. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh infusa daun Pacing terhadap spermatogenesis mencit jantan strain Balb/Cserta reversibilitas efeknya sebagai dasar dari pembuktian secara ilmiah kemampuan daun Pacing sebagai calon obat kontrasepsi khususnya pada individu jantan. Mencit dikelompokkan menjadi 6 kelompok masing-masing terdiri atas 6 ekor mencit. Infusa daun Pacing diberikan dengan variasi dosis yakni 275, 550 dan 1100 mg/kgBB, sementara itu kelompok kontrol terdiri atas kelompok pemberian akuades, kelompok pemberian minyak jagung dan kelompok Andriol dosis 5,2 mg/kgBB. Semua sediaan uji diberikan secara oral setiap hari selama 14 hari. Pada hari ke 15 hewan uji dalam semua kelompok dikorbankan masing-masing 3 ekor mencit kemudian dilakukan pembedahan, 3 ekor mencit sisanya dipelihara hingga hari ke 28 tanpa pemberian sediaan uji untuk mengetahui reversibilitas efek spermatogenesisnya. Pengamatan efek spermatogenesis dilakukan terhadap jumlah dan kualitas spermatozoa (motilitas, viabilitas dan morfologi). Data jumlah dan kualitas spermatozoa dianalisis secara statistik menggunakan uji non-parametrik Kruskal-Wallis, dilanjutkan dengan uji Mann-Whitney pada taraf kepercayaan 95%. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian infusa daun Pacing pada dosis 275, 550 dan 1100 mg/kg BB mampu menurunkan jumlah spermatozoa sebesar 16-38 % ($P < 0,05$), namun tidak mengubah viabilitas dan morfologi spermatozoa. Selain itu, pada dosis 275 dan 550 mg/kg BB, infusa daun Pacing mampu menurunkan motilitas spermatozoa sebesar 36-39% ($P < 0,05$). Kemampuan infusa daun Pacing dalam menurunkan jumlah dan motilitas spermatozoa bersifat reversible setelah 14 hari kemudian.

Kata kunci :infusa, daun Pacing, jumlah spermatozoa, kualitas spermatozoa

PENDAHULUAN

Keberhasilan program pengendalian jumlah kelahiran melalui program Keluarga Berencana (KB) ditentukan baik oleh partisipasi wanita maupun pria pasangan usia subur. Rendahnya angka partisipasi pria terhadap program KB mendorong penelitian-penelitian eksplorasi herbal sebagai obat kontrasepsi pada pria yang diharapkan memiliki efektivitas yang baik tanpa disertai efek samping yang berarti. Beberapa tanaman dilaporkan memiliki kemungkinan untuk dikembangkan sebagai obat kontrasepsi yang sejak lama diteliti yakni Kapas (Anon, 1978). Di Indonesia beberapa tanaman juga diteliti sebagai calon obat kontrasepsi antara lain Pepaya, Gandarusa, Pare, dan Pacing (Muchtarmah, 2009; Satriyasa, 2009; Wahyudi dkk, 1997; Winarno dan Sundari, 1997). Pacing secara empiris digunakan oleh masyarakat sebagai kontrasepsi tradisional, contohnya di Pulau Wawonii Sulawesi Tenggara daun Pacing digunakan untuk KB dan perawatan pasca persalinan dengan cara direbus (Rahayu dkk, 2006; Winarno dan Sundari, 1997). Tanaman Pacing memiliki aktifitas hipolipidemik, hepatoprotektif, antifertilitas, antioksidan, dan antifungi. Secara tradisional tanaman ini juga diketahui memiliki peranan untuk mengobati rheumatik, asma bronkial, dan lepra (Srivastava dkk., 2011). Penelitian yang pernah ada menunjukkan bahwa ekstrak etanol 50% dari rimpang Pacing mampu menghambat produksi spermatozoa secara terbalikkan (Adnan dan Pagarra, 2000). Senyawa kimia yang diduga mampu bersifat antispermatogenesis adalah diosgenin yang terdapat pada beberapa bagian tanaman Pacing. Diosgenin terdapat pada rimpang Pacing sebesar 0,2% sedangkan pada daun 0,37%, pada batang 0,65% dan yang terbanyak ada pada bunga sebesar 1,21% (Srivastava dkk., 2011; Tarigan, 1980). Ekstrak air dari daun dan rimpang Pacing mengandung steroid, tanin, dan fenolik (Devi & Urooj, 2010).

Penelitian ini dilakukan untuk melihat aktivitas penghambat spermatogenesis dari daun Pacing yang diduga memiliki aktivitas seperti halnya rimpang Pacing mengingat adanya kandungan diosgenin baik di dalam rimpang maupun daun Pacing.

^{*)} Correspondence : Ika Puspita Sari
E-mail : ika.puspitasari@gmail.com

METODOLOGI

Bahan dan alat

Daun Pacing diperoleh dari tanaman Pacing yang tumbuh di desa Sardonoarjo, Ngaglik, Sleman, Yogyakarta, diambil pada bulan Maret 2012. Dilakukan determinasi tumbuhan Pacing oleh bagian Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi UGM. Andriol Testocaps® (testosteron undecanoat 40 mg) diimpor dan dipasarkan oleh PT. Organon Indonesia, diproduksi oleh N.V. Organon, Oss, The Netherlands, minyak jagung produksi MOI foods Malaysia, akuades, larutan PBS (*Phosphate Buffered Saline*), pewarna eosin dan nigrosin.

Hewan uji yang digunakan yaitu mencit jantan strain *Balb/C*, umur 2-3 bulan dan belum kawin. Mencit diperoleh dari Laboratorium Farmakologi dan Toksikologi Fakultas Farmasi UGM Yogyakarta.

Digunakan alat berupa spuit oral 1,0 mL, alat-alat bedah, mikroskop (Nikon E600®), dan kamar hitung *Improved Neubauer*.

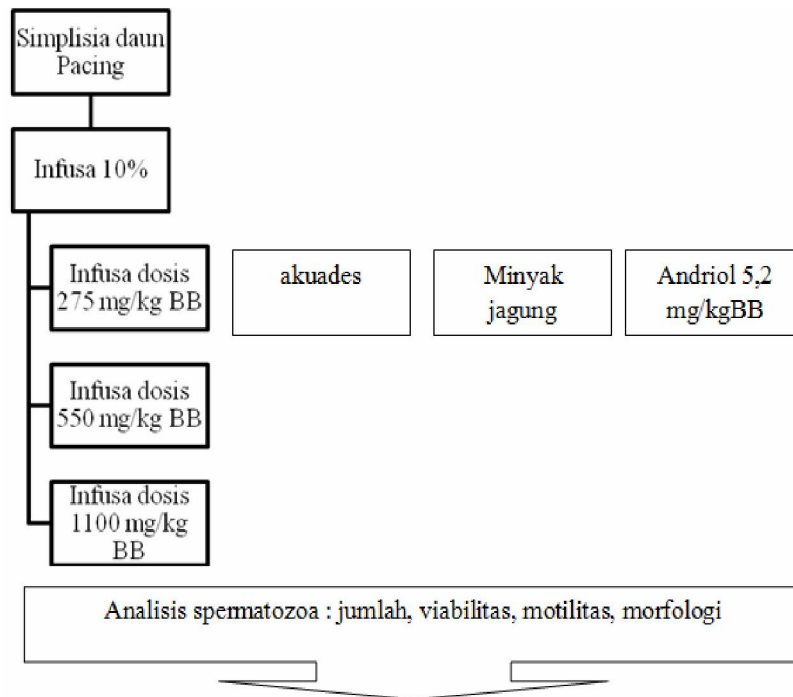
Cara kerja

Daun Pacing dicuci, dikering anginkan, dan ditimbang berat basah, kemudian dilakukan pengecilan ukuran selanjutnya dikeringkan dengan oven pada 55°C selama 8,5 jam dan sinar matahari selama 9 jam dengan ditutup kain hitam. Sebanyak 2350 gram berat basah daun diperoleh 312,21 gram daun kering (persentase berat kering dari berat basah sebesar 13,29%). Infusa daun Pacing dibuat dengan konsentrasi 10% (g/mL). Simplisia dipanaskan dalam panci infusa selama 15 menit dihitung setelah suhu panci bagian atas 90°C sambil sekali-sekali diaduk. Setelah itu diserkai selagi panas dengan kain saring.

Perlakuan pada hewan uji

Mencit diadaptasi terlebih dahulu selama seminggu serta diberi makan dan minum secara *ad libitum*. Mencit dikelompokkan menjadi 6 kelompok dipilih secara acak masing-masing terdiri dari 6 ekor.

- Kelompok I : Pemberian akuades 0,2 mL
- Kelompok II : Pemberian minyak jagung 0,2 mL (kontrol pelarut Andriol)
- Kelompok III : Pemberian Andriol dosis 5,2mg/kgBB (dalam minyak jagung)
- Kelompok IV : Pemberian infusa daun Pacing (P) dosis 275 mg/kgBB
- Kelompok V : Pemberian P dosis 550 mg/kgBB



Gambar 1. Skema penelitian

Kelompok VI :Pemberian P dosis 1100mg/kg BB
Semua senyawa diberikan secara oral satu kali dalam sehari selama 14 hari.

Pada hari ke 15 tiap kelompok dikorbkan 3 ekor mencit dengan cara dislokasi leher kemudian dibedah. Spermatozoa diambil dengan cara memotong vasdeferens kanan dan kiri. Kemudian vasdeferens ditimbang, dimasukkan di dalam gelas arloji yang sudah diisi dengan larutan PBS sebanyak 1,0 mL dan dipotong-potong dengan menggunakan gunting kecil yang tajam dan ujungnya runcing hingga terbentuk suspensi. Suspensi diaduk secara perlahan-lahan agar homogen kemudian diamati di bawah mikroskop.

Perhitungan jumlah sperma dilakukan dalam kamar hitung *Improved Neubauer*. Sampel berupa suspensi diencerkan 10 kali, kemudian diambil sebanyak 5 μ L untuk diamati dengan mikroskop cahaya Nikon pada perbesaran 100 kali. Jumlah sperma dihitung pada 3 kotak pada masing-masing daerah makro (daerah L) atau total 12 kotak daerah L kamar hitung *Improved Neubauer* dengan kedalaman 0,1mm. Volume 12 kotak makro = 7,5x10⁻⁵mL. Rata-rata berat vasdeferens adalah 0,1243 gram disuspensikan dalam 1,0mL, kemudian diencerkan 10 kali. Konsentrasi sperma dalam 12 kotak makro

Improved Neubauer = jumlah spermatozoa 12 kotak x 1,0727 x 10⁶/gram.

Pengamatan karakteristik viabilitas spermatozoa dilakukan dengan cara mengambil 10 μ L sampel suspensi spermatozoa, kemudian ditetaskan di atas kaca benda dan ditambahkan pewarna eosin dan nigrosin sebanyak 10 μ L. Sampel dan pewarna diaduk perlahan dan ditutup dengan kaca penutup selanjutnya diamati di bawah mikroskop cahaya Nikon dengan perbesaran 100 kali. Spermatozoa mati berwarna merah keunguan, sedangkan spermatozoa yang hidup tidak berwarna atau terlihat berwarna putih pada bagian kepala. Persentase spermatozoa yang hidup dihitung dari 100 spermatozoa yang diamati.

Penyiapan sampel spermatozoa untuk penghitungan motilitas dilakukan sama dengan sampel untuk penghitungan jumlah spermatozoa. Sediaan diperiksa dengan perbesaran 100 kali, dihitung persentase motilitas spermatozoa dengan kategori yang dipakai menurut kategori WHO yaitu: spermatozoa digolongkan A bila bergerak cepat dan lurus ke depan, B jika gerakannya lambat lurus, C jika tidak bergerak maju dan D jika sperma tidak bergerak. Persentase motilitas spermatozoa dihitung dengan menghitung jumlah spermatozoa kategori A dan B dibanding jumlah total (Anonim, 1994).

Tabel I. Jumlah spermatozoa mencit jantan akibat pemberian infusa daun Pacing selama 14 hari (rata-rata ± SE)

Kelompok	Sediaan	Jumlah spermatozoa (rata-rata ± SE)	Persen penurunan (dibandingkan terhadap akuades)	Persen kenaikan (dibandingkan terhadap minyak jagung)
I	Akuades 0,2mL	153 ± 27	-	
II	Minyak jagung 0,2mL (kontrol pelarut Andriol)	142 ± 14		-
III	Andriol dosis 5,2 mg/kgBB (dalam minyak jagung)	240 ± 41 ^a		69
IV	Infusa daun Pacing (P) dosis 275mg/kgBB	95 ± 12 ^{a, b}	37,9	
V	Infusa (P) dosis 550mg/kgBB	129 ± 30 ^{a, b}	15,7	
VI	Infusa (P) dosis 1100mg/kgBB	110 ± 11 ^{a, b}	28,1	

Keterangan :

^a berbeda secara signifikan terhadap kelompok akuades dan kelompok minyak jagung

^b berbeda secara signifikan terhadap kelompok Andriol

Tabel II. Viabilitas spermatozoa mencit jantan akibat pemberian infusa daun Pacing selama 14 hari (persen rata-rata ± SE)

Kelompok	Sediaan	Viabilitas spermatozoa (persen rata-rata ± SE)	Persen penurunan (dibandingkan terhadap akuades)	Persen kenaikan (dibandingkan terhadap minyak jagung)
I	Akuades 0,2mL	73 ± 3,7	-	
II	Minyak jagung 0,2mL (kontrol pelarut Andriol)	70 ± 9,6		-
III	Andriol dosis 5,2mg/kgBB (dalam minyak jagung)	91 ± 1,7 ^a		30
IV	Infusa daun Pacing (P) dosis 275 mg/kgBB	71 ± 6,7	2,7	
V	Infusa (P) dosis 550mg/kgBB	66 ± 8,7	9,6	
VI	Infusa (P) dosis 1100 mg/kgBB	61 ± 7,8	16,4	

Keterangan :

^a berbeda secara signifikan terhadap kelompok akuades, kelompok minyak jagung dan kelompok infusa daun Pacing

Penyiapan sampel spermatozoa untuk penghitungan morfologi abnormal spermatozoa dilakukan sama dengan penyiapan sampel untuk penghitungan viabilitas spermatozoa. Sediaan diperiksa dengan perbesaran 100 kali, dihitung persentase jumlah morfologi spermatozoa yang abnormal dari 100 spermatozoa yang diamati.

Untuk mengetahui reversibilitasnya, 3 ekor mencit sisanya tiap kelompok dipelihara hingga hari ke 28 tanpa pemberian sediaan uji, hanya mendapatkan pakan dan minum *ad libitum*, kemudian padahari ke 29 dikorbankan dan dibedah untuk dilakukan analisis jumlah spermatozoa, viabilitas, motilitas, dan morfologi.

Tabel III. Motilitas spermatozoa mencit jantan akibat pemberian infusa daun Pacing selama 14 hari (persen rata-rata \pm SE)

Kelompok	Sediaan	Motilitas spermatozoa (persen rata-rata \pm SE)	Persen penurunan (dibandingkan terhadap akuades)	Persen kenaikan (dibandingkan terhadap minyak jagung)
I	Akuades 0,2mL	28 \pm 2,3	-	
II	Minyak jagung 0,2mL (kontrol pelarut Andriol)	25 \pm 4,8		-
III	Andriol dosis 5,2mg/kgBB (dalam minyak jagung)	45 \pm 4,5 ^a		80
IV	Infusa daun Pacing (P) dosis 275mg/kgBB	17 \pm 0,6 ^{a, b}	39,3	
V	Infusa (P) dosis 550mg/kgBB	18 \pm 2,7 ^{a, b}	35,7	
VI	Infusa (P) dosis 1100mg/kgBB	23 \pm 5,0	17,9	

Keterangan :

^a berbeda secara signifikan terhadap kelompok akuades, kelompok minyak jagung dan infusa daun Pacing dosis 1100 mg/kgBB^b berbeda secara signifikan terhadap kelompok AndriolTabel IV. Abnormalitas morfologi spermatozoa mencit jantan akibat pemberian infusa daun Pacing selama 14 hari (persen rata-rata \pm SE)

Kelompok	Sediaan	Abnormalitas morfologi spermatozoa (persen rata-rata \pm SE)
I	Akuades 0,2 mL	20 \pm 4,0
II	Minyak jagung 0,2 mL (kontrol pelarut Andriol)	17 \pm 2,1
III	Andriol dosis 5,2mg/kgBB (dalam minyak jagung)	15 \pm 1,2
IV	Infusa daun Pacing (P) dosis 275 mg/kgBB	28 \pm 3,5 ^a
V	Infusa (P) dosis 550 mg/kgBB	33 \pm 5,8 ^a
VI	Infusa (P) dosis 1100 mg/kgBB	37 \pm 9,2 ^a

Keterangan :

^a berbeda secara signifikan terhadap kelompok akuades, kelompok minyak jagung dan Andriol

Analisis data

Hasil penghitungan jumlah, motilitas, viabilitas, dan abnormalitas spermatozoa dianalisis dengan menggunakan metode statistik taraf kepercayaan 95%. Analisis statistik dilakukan secara non-parametrik dengan menggunakan uji Kruskal-Wallis dan apabila terdapat perbedaan signifikan dilanjutkan dengan uji Man-Whitney.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pemberian infusa daun Pacing pada dosis 275, 550 dan 1100mg/kg BB mampu menurunkan jumlah spermatozoa 16-38 % (Tabel I.), namun

tidak mengubah viabilitas maupun terjadinya abnormalitas morfologi spermatozoa secara bermakna (Tabel II. dan IV). Parameter kualitatif lainnya yang menurun karena adanya pemberian infusa daun Pacing dosis 275 dan 550mg/kgBB adalah motilitas spermatozoa (Tabel III). Pada rentang dosis 275 dan 550 mg/kg BB, infusa daun Pacing mampu menurunkan motilitas spermatozoa 36-39% ($P < 0,05$).

Fertilitas pria bisa dipengaruhi oleh jumlah, morfologi dan motilitas spermatozoa. Pada keadaan dimana jumlah dan morfologi spermatozoa normal, terjadinya infertilitas masih

Tabel V. Keterbalikan spermatozoa mencit jantan akibat pemberian infusa daun Pacing selama 14 hari dilanjutkan dengan 14 hari tanpa pemberian sediaan uji

Kelompok	Sediaan	Jumlah spermatozoa (rata-rata \pm SE)	Viabilitas spermatozoa (persen rata-rata \pm SE)	Motilitas spermatozoa (persen rata-rata \pm SE)	Abnormalitas morfologi spermatozoa (persen rata-rata \pm SE)
I	Akuades 0,2mL	146 \pm 5	72 \pm 5,9	24 \pm 4,1	25 \pm 7,2
IV	Infusa daun Pacing (P) dosis 275mg/kgBB	158 \pm 22	60 \pm 3,2	26 \pm 8,6	24 \pm 1,5
V	Infusa (P) dosis 550mg/kgBB	196 \pm 39	63 \pm 1,2	31 \pm 3,8	20 \pm 1,3
VI	Infusa (P) dosis 1100mg/kgBB	223 \pm 43	51 \pm 14,5	27 \pm 5,5	14 \pm 1,2

Keterangan:

Tidak terdapat perbedaan signifikan antara kelompok pemberian infusa daun Pacing semua dosis terhadap pemberian akuades.

mungkin terjadi jika spermatozoa tidak motil (Guyton & Hall, 1997). Baik jumlah maupun motilitas spermatozoa yang menurun secara bermakna akibat pemberian infusa daun Pacing, tampaknya memberikan jalan

bagi dikembangkannya infusa daun Pacing sebagai calon obat kontrasepsi. Penurunan jumlah spermatozoa oleh daun Pacing diduga karena adanya kandungan saponin steroid yang mampu menghambat steroidogenesis sebagaimana penelitian Shajeela dkk. (2011) yang menunjukkan bahwa pemberian

ekstrak etanol *Dioscorea esculenta* (L.) Schott dengan kandungan utama saponin steroid selama 14 hari dapat menurunkan kadar testosteron secara signifikan. Penurunan testosteron menyebabkan kinerja sel sertoli menjadi tidak optimal sehingga terjadi gangguan proses spermiogenesis, gangguan metabolisme sel germinal, bahkan bisa menyebabkan apoptosis sel (Henriksen dkk., 1996). Selain penghambatan secara hormonal, beberapa saponin juga mampu menghambat enzim hialuronidase (HAase) yang merupakan enzim terpenting dan ditemukan dalam jumlah tinggi di testes. Glisirisin yang merupakan saponin dari tanaman *Glycyrrhiza glabra* L mampu menghambat aktivitas HAse dari testis sapi secara in vitro sebesar 95% sementara bahan lain seperti ginsenosida, kuersetin, escin dan digitoksin hanya mampu menghambat HAse sebesar 2-18% (Furuya dkk., 1997). Diosgenin yang terdapat dalam infusa daun Pacing sangat mungkin memiliki kemampuan menghambat HAse, namun hal ini perlu dibuktikan dengan penelitian.

Di dalam infusa daun Pacing sangat mungkin selain steroid juga terdapat tanin dan senyawa fenolik seperti pernah dilaporkan oleh Devi & Urooj (2010). Tanin dilaporkan mampu mengikat protein dan ion-ion yang terdapat dalam membrane spermatozoa yang dapat menyebabkan enzim tirosin dan proses fosforilasi dalam membrane spermatozoa terganggu sehingga menyebabkan terjadinya abnormalitas morfologi spermatozoa maupun viabilitas spermatozoa. Putranti dkk. (2010) melaporkan terjadinya abnormalitas spermatozoa 10-12% dan penurunan viabilitas pada spermatozoa kambing Peranakan Ettawa (PE) yang diberi perlakuan *crude tannin* 10-20%.

Senyawa fenolik yang terdapat dalam infusa daun Pacing kemungkinan juga berlaku seperti gosipol yang merupakan senyawa polifenol yang dikembangkan sebagai obat kontrasepsi karena mampu menghambat produksi spermatozoa dalam epididimis (Shandilya dkk, 1982) dan penghambatan pada kanal ion Ca tipe T yang terdapat dalam sel spermatogen (Shi dkk, 2003). Kanal ion Na, K dan Ca sangat penting perannya dalam maturasi dan kapasitas spermatozoa serta reaksi akrosom (Darzson dkk, 1999; Ma & Shi, 1998).

Pengujian reversibilitas pengaruh pemberian infusa daun Pacing terhadap jumlah dan kualitas spermatozoa dilakukan selama 14 hari setelah pemberian sediaan uji. Pada Tabel 5. Tampak bahwa baik jumlah, viabilitas, motilitas serta abnormalitas morfologi dari spermatozoa pada hari ke-29 terbukti sama dengan yang terjadi pada pemberian akuades, hal ini menunjukkan

bahwa pemberian infusa daun Pacing pada dosis 275-1100 mg/kg BB tidak menyebabkan perubahan yang bersifat menetap pada jumlah serta kualitas spermatozoa. Keterbalikan sifat hambatan spermatozoa yang terjadi akibat pemberian infusa daun Pacing ini perlu dibuktikan lebih lanjut dengan melihat kemampuan hewan uji dalam membuntingkan betina.

KESIMPULAN

Infusa daun Pacing pada dosis 275, 550 dan 1100 mg/kg BB mampu menurunkan jumlah spermatozoa sebesar 16-38 % ($P < 0,05$), tanpa mengubah viabilitas dan morfologi spermatozoa. Selain itu, infusa daun Pacing mampu menurunkan motilitas spermatozoa sebesar 36-39% ($P < 0,05$; dosis 275 dan 550 mg/kg BB). Kemampuan infusa daun Pacing dalam menurunkan jumlah dan motilitas spermatozoa bersifat terbalikkan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih peneliti sampaikan kepada Bapak Budi di Ngaglik yang telah memberikan bahan penelitian berupa tanaman Pacing.

DAFTAR PUSTAKA

Adnan & Pagarra, B., 2000, Pengaruh Ekstrak Rimpang Tumbuhan Pacing (*Costus speciosus*, J.E Smith) terhadap Spermatogenesis Mencit (*Mus musculus*) ICR Jantan, *Laporan Penelitian*, Jurusan Biologi FMIPA, Universitas Negeri Makasar.

Anon, A., 1978, Gossypol-a new contraceptive for men, *Chinese Medical Journal*, **4**:417-428

Anonim, 1994, *Penuntun Laboratorium WHO untuk Pemeriksaan Semen Manusia dan Interaksi Sperma-Getah Servik*, Edisi 3, diterjemahkan oleh Arsyad, K. M. & Hayati, L., Bagian Biologi Medik Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya, Palembang.

Darszon A, Labarca P, Nishigaki T, & Espinosa F., 1999, Ion Channels in Sperm Physiology. *Physiology Review* **79**: 481-510

Devi, V. & Urooj, A., 2010, Nutrient Profile and Antioxidant Components of *Costus speciosus* Sm. and *Costus igneus* Nak., *Indian Journal of Natural Products and Resources* **1** (1): 116-118.

Furuya, T., Yamagata, S., Shimoyama, Y., Fujihara, M., Morishima, N., & Ohtsuki, K., 1997, Biochemical Characterization of Glycyrrhizin as an Effective Inhibitor for

Hyaluronidases from Bovine Testis, *Biol.Pharm.Bull* **20**(9):973-977

Guyton, A.C. & Hall, J.E, 1997, *Textbook of Medicinal Physiology*, 9th Edition, W.B. Saunders Company, Philadelphia.

Henriksen, K., Kangasniemi, M., Parvinen, M., Kaipia, A. & Hakovirta, H., 1996, In Vitro, Follicle-Stimulating Hormon Prevents Apoptosis and Stimulates Deoxyribonucleic Acid Synthesis in the Rat Seminiferous Epithelium in a Stage-Specific Fashion. *Endocrinology Journals*, **137** (5): 2141.

Ma X.H, & Shi Y.L. 1998, Ion Channels of Mammalian and Human Sperm Membrane. *Prog Physiol Sci* **29**: 109-14.

Muchtaromah, B., 2009, Potensi Ekstrak Buah Pare (*Momordica charantia* L) Terhadap Spermatogenesis Mencit (*Mus musculus*), *Berkala Penelitian Hayati* **3D**:57-60.

Putranti, O.D., Kastono & Ismaya, 2010, Pengaruh Penambahan *Crude Tannin* pada Sperma Cair Kambing Peranakan Ettawa yang disimpan selama 14 hari terhadap Viabilitas Spermatozoa, *Buletin Peternakan* **34**(1): 1-7.

Rahayu, M., Sunarti, S., Sulistiarini, D., & Prawiroatmodjo, S., 2006, Pemanfaatan Tumbuhan Obat secara Tradisional oleh Masyarakat Lokal di Pulau Wawonii, Sulawesi Tenggara, *Biodiversitas* **7** (3): 245-250.

Satriyasa, B.K., 2009, Fraksi Heksan dan Fraksi Metanol Biji Pepaya Muda Dapat Menghambat Spermatisit Primer Pakhiten Mencit Jantan (*Mus musculus*), *Majalah Obat Tradisional* vol. 14 no.47.

Shajeela, P.S., Mohan, P.R., Jesudas L.L & Soris, P.T., 2011, Antifertility of Ethanol Extract of *Dioscorea seculenta* (L.) Schott on Male albino Rats, *International Journal of PharmTech Research* **3** (2): 946-954.

Shi, Y.L., Bai, J.P. & Wang, W.P., 2003, Ion-channels in Human Sperm Membrane and Contraceptive Mechanisms of Male Antifertility Compounds Derived from Chinese Traditional Medicine, *Acta Pharmacologica Sinica* **24**(1):22-30.

Srivastava, S., Singh, P., Mishra, G., Jha, K.K. & Khosa, R.L., 2011, *Costus speciosus* (Keukand): A review, *Der Pharmacia Sinica* **2** (1): 118-128.

Tarigan, P., 1980, *Beberapa Aspek Kimia Sapogenin Steroid pada Tumbuhan di Indonesia*, Alumni, Bandung.

Wahyudi, R., Sutarjadi, Wardojo, B.P.E., & Hinting, A., Pengaruh ekstrak diklormetan dan metanol daun *Gendarussa vulgaris* Ness terhadap motilitas dan viabilitas spermatozoa manusia *in vitro*. Yogyakarta:

Simposium Bahan Obat Alami IX, Yogyakarta; 1997.
Winarno, M.W. & Sundari D., 1997, Informasi Tanaman Obat untuk Kontrasepsi Tradisional, *Cermin Dunia Kedokteran* No 120: 25-28.