RUMPHIUS PATTIMURA BIOLOGICAL JOURNAL
Vol 2, No 2, 2020, pp 001 – 007
E-ISSN : 2684-804X

EFEK PEMBERIAN SEDUHAN KAYU ULAR (*Strychnos lucida*) TERHADAP PENURUNAN ABNORMALITAS SPERMATOZOA MENCIT (*Mus musculus*) MODEL DIABETES MELITUS

Marissa Beatrix Kunu[1], Chomsa Dintasari Umi Baszary[1*], Amos Killay[1]

[1]Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pattimura, Indonesia

**Corresponding Author* e-mail: chomsa.baszary@fmipa.unpatti.ac.id

ABSTRACT

Diabetes Mellitus (DM), known as diabetes or blood sugar disease, is a group of chronic diseases characterized by increased blood sugar level (hyperglycemia). Prolonged hyperglycemia conditions will cause an increase in ROS (Reactive Oxygen Spesies) production by the mitochondria, which then cause damage to the mitochondrial membrane resulting in loss of function of the mitochondrial membrane potential and can induce sperm cells apoptosis. This study aims to determine effect of kayu ular (*Strychnos lucida*) steeping on decreasing spermatozoa abnormalities of mice (*Mus musculus*) diabetes mellitus model. The result showed that administration of kayu ular steeping at concentration of 2,6gr/50ml was signicantly reduced ($P<0.05$) spermatozoa abnormality. This dose is the most effective concentration to decreased the spermatozoa abnormality of mice. This though to be due to the active compounds found in steeping kayu ular (*Strychnos lucida*) which can counteract free radicals due to diabetes mellitus that decreasing spermatozoa abnormalities.

Keywords : Diabetes mellitus, Spermatozoa abnormalities, Mice, Kayu ular (Strychnos lucida), Steeping

PENDAHULUAN

Indonesia saat ini menjadi negara peringkat ketujuh dengan jumlah penderita DM terbesar di dunia setelah China, India, dan Amerika. Total penderita DM di Indonesia berdasarkan data WHO, saat ini terdapat sekitar 8 juta jiwa, dan diperkirakan jumlahnya melebihi 21 juta jiwa pada tahun 2025 mendatang [1]. Tidak hanya usia diatas 50 tahun yang rentan terserang, kelompok usia produktif sekitar 20-30 tahun, pun rentan terkena DM. Hal ini disebabkan oleh pola hidup yang berubah, karena orang mengkonsumsi berbagai jenis makanan [2].

Diabetes Mellitus (DM) yang juga dikenal sebagai penyakit kencing manis atau penyakit gula darah adalah golongan penyakit kronis yang ditandai dengan peningkatan kadar gula dalam darah (hiperglikemia) sebagai akibat adanya gangguan sistem metabolisme dalam tubuh, ketika organ pankreas tidak mampu memproduksi hormon insulin sesuai kebutuhan tubuh [2]. Keadaan hiperglikemia yang berkepanjangan akan menyebabkan peningkatan produksi ROS (Reactive Oxygen Spesies) oleh mitokondria, yang menyebabkan kerusakan pada membran mitokondria sehingga fungsi potensial membran mitokondria hilang dan menginduksi apostosis sel sperma [3].

Penelitian lain mengungkapkan dampak buruk penyakit diabetes terhadap fertilitas dan umumnya penderita diabetes mengalami gangguan fungsi seksual karena kadar hormon testosteron yang rendah. Rendahnya hormon testosteron menyebabkan menurunnya rasa ketertarikan, hilangnya libido, penurunan aktifitas seksual serta mempengaruhi terjadinya ereksi [4].

Salah satu tumbuhan yang dimanfaatkan masyarakat sebagai obat tradisional adalah kayu ular yang mempunyai nama ilmiah *Strychnos lucida*. Senyawa kimia yang terkandung dalam kayu ular berupa alkaloida (brusina, striknina), tannin, saponin (triterpenoid/steroid), flavonoid [5].

Bagian biji dan kayu tanaman ini mengandung zat alkaloid yang mempunyai daya mikroba dan berperan sebagai antioksidan yang berguna untuk menjaga kesehatan spermatozoa. Zat antioksidan ini dapat menghilangkan radikal bebas dan menurunkan stres oksidatif, sehingga jumlah ROS dan antioksidan berada dalam keadaan seimbang [6].

Antioksidan mampu menangkal radikal bebas dengan cara menetralisir radikal bebas dan menghambat peroksidasi lipid sehingga hormon-hormon pembentukan spermatozoa bisa dijaga untuk mengoptimalkan pembentukan sel spermatozoa. Untuk membuktikan hal ini, perlu dilakukan penelitian untuk menguji efek pemberian seduhan kayu ular (*S. lucida*) terhadap penurunan abnormalitas spermatozoa mencit (*Mus musculus*) model diabetes mellitus. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek pemberian seduhan kayu ular terhadap penurunan abnormalitas spermatozoa mencit model diabetes mellitus.

METODE

Penelitian dilakukan secara eksperimental laboratorik. Penelitian dilaksanakan pada 12 Februari – 12 Maret 2019, bertempat di laboratorium Zoologi Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Pattimura. Penelitian ini menggunakan metode eksperimen dengan menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) yang terdiri dari 5 perlakuan dan 3 kali pengulangan.

Prosedur Kerja

1. Persiapan Hewan Uji

Hewan model yang digunakan dalam penelitian ini adalah hewan mencit jantan dengan umur dua bulan dan berat badan 20 gram sebanyak 15 ekor. Sebelum digunakan sebagai hewan percobaan, semua mencit diaklimatisasi terlebih dahulu selama tujuh hari dalam kandang mencit yang terbuat dari wadah plastik berbentuk kotak dengan beralaskan sedikit sekam sebagai bedding, pakan dan kawat ram sebagai penutup. Bobot badan mencit (*M. musculus*) ditimbang pada awal penelitian

2. Penyiapan Larutan dan Injeksi Streptozotocin

Sebelum diinjeksikan, streptozotocin (STZ) dilarutkan dalam buffer sitrat dengan pH 4,5 (5,25 g larutan buffer sitrat (Na2HNO4) ditimbang dan ditambah 22,5 ml aquades), dihomogenkan kemudian dimasukan 39,8 mg streptozotocin (STZ) sehingga diperoleh kosentrasi akhir larutan streptozotocin (STZ) dalam larutan adalah 22,5 mg/ml STZ. Larutan streptozotocin (STZ) diinjeksikan melalui intraperitonial sebanyak 0,1 ml tiap ekor. Mencit dengan kadar glukosa melebihi 200 mg/dl dianggap diabetes dengan menggunakan glucometer (Easy Touch GCHb) [7].

3. Pembuatan seduhan kayu ular

Penghalusan tanaman kayu ular, dapat dilakukan dengan cara sebagai berikut:

- Kayu ular yang sudah dipotong, dihaluskan dengan menggunakan alat penghalus sampai menjadi serbuk kayu ular.
- Setelah didapatkan serbuk kayu ular kemudian dilakukan proses pembuatan seduhan kayu ular. Serbuk kayu ular ditimbang sebanyak 0,66 gram, 1,3 gram dan 2,6 gram kemudian masing-masing dimasukkan ke dalam dalam beaker glass.
- Aquades sebanyak 150 ml di panaskan di atas hot plate selama ± 15 menit sampai mendidih kemudian angkat dan tuangkan ke dalam beaker gelas yang berisi kayu ular masing-masing sebanyak 50 ml.
- Setelah itu diaduk dan didiamkan selama 15 menit (sampai hangat), kemudian disaring menggunakan kertas saring Whatman sehingga diperoleh seduhan kayu ular.

4. Pembuatan Dosis Seduhan Kayu Ular

Dosis pemakaian seduhan kayu ular adalah 50 ml, maka dilakukan konversi dari manusia ke hewan model mencit dengan perhitungan 0,0026 x 50 ml = 0,13ml/ekor/hari . Berdasarkan hasil di atas maka dosis/volume pemberian yang digunakan adalah sebanyak 0,13ml/ekor/hari dengan konsentrasi seduhan kayu ular terbagi atas, konsentrasi I : 0,65 gr/50 ml, konsentrasi II: 1,3 gr/50 ml, dan konsentrasi III : 2,6 gr/50 ml.

5. Kelompok Perlakuan

Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) yang terdiri atas 15 ekor mencit yang dibagi ke dalam lima kelompok masing-masing 3 ekor mencit. Tiga kelompok selain kontrol negatif yaitu kelompok kontrol positif, perlakuan I, perlakuan II dan perlakuan III diinduksi STZ 0,1 ml/ekor/hari

selama lima hari. Kemudian setelah induksi STZ, 12 ekor mencit diperiksa kadar gula darahnya pada hari ke-6 atau ke-7. Pengukuran kadar glukosa darah dilakukan dengan cara mengambil darah mencit melalui ekor yang terlebih dahulu dibersihkan dengan alkohol. Kemudian darah diteteskan pada strip glukometer (Easy Touch GCHb) dan dimasukan dalam glukometer untuk dibaca kadar glukosanya. Mencit dikatakan diabetes apabila kadar glukosa darah sudah mencapai ≥200mg/dl [7].

Pencekokan seduhan kayu ular dilakukan pada pagi dan sore hari selama 14 hari untuk masing-masing perlakuan. Perlakuan berbeda diberikan pada tiap kelompok yaitu kelompok (P1) diberi seduhan kayu ular konsentrasi 0,65 gr/50 ml, kelompok (P2) diberi seduhan kayu ular konsetrasi 1,3 gr/50 ml dan (P3) diberi seduhan kayu ular konsentrasi 2,6 gr/50 ml dengan dosis/volume pemberian sebanyak 0,13 ml/ekor/hari pada ketiga kelompok perlakuan.

6. Pengambilan spermatozoa

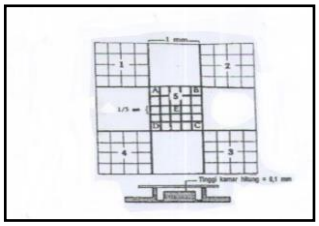
Pada hari ke-15 setelah pemberian seduhan kayu ular, mencit diterminasi/dikorbankan? dengan cara dislokasi leher mencit, kemudian dibedah di bagian bawah abdomen. Sampel spermatozoa diambil dari epididymis yaitu tepatnya 1 cm di bawah cauda epididymis. Di tempat tersebut diklem kemudian dipotong. Bagian yang dipotong dikeluarkan spermanya dengan cara dicacah, kemudian ditetesi NaCl 0,9% sebanyak 2 tetes dan diaduk agar menjadi homogen kemudian digunakan untuk pengamatan motilitas dan morfologi spermatozoa [8].

7. Pengamatan Morfologi Spermatozoa

Perhitungan jumlah dan morfologi spermatozoa dilakukan dengan metode menurut [9]. Jumlah spermatozoa ditentukan sebagai berikut:

a. Suspensi spermatozoa terlebih dahulu dibuat homogen.
b. Selanjutnya diambil sebanyak 10 µl sampel spermatozoa.
c. Campuran spermatozoa dimasukkan ke dalam kotak-kotak kamar hitung Haemocytometer, jumlah spermatozoa pada kotak A, B, C, D, dan dihitung dibawah mikroskop dengan pembesaran 400x.
d. Spermatozoa yang berada dalam 25 kotak kecil dalam segi empat utama pada kamar hitung haemocytometer dijumlahkan untuk mengetahui jumlah dari spermatozoa, kemudian dibagikan dengan faktor koreksi Haemocytometer. Hasil pembagian tersebut merupakan jumlah spermatozoa total dan juta per mL/ejakulat. Rumus jumlah spermatozoa terhitung (s) x 200.000 = juta/ml.

Untuk menentukan morfologi spermatozoa, sampel sperma yang homogen diteteskan menggunakan pipet tetes pada kaca objek sebanyak 1 tetes, kemudian ditetesi larutan pewarna eosin, selanjutnya ditutupi dengan cover gelas.



Gambar 1. Kamar Hitung Haemocytometer [9]

Sampel didiamkan beberapa saat kemudian diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 400x dengan merata pada 5 lapang pandang, untuk ditentukan persentase spermatozoa normal dan abnormal. Ciri spermatozoa normal yaitu bentuk kepala seperti kait pancing dan ekor panjang lurus, sedangkan spermatozoa abnormal mempunyai bentuk kepala tidak beraturan berbentuk seperti pisang atau tidak beraturan (amorphous), terlalu bengkok dan bentuk ekornya tidak lurus, atau tidak berekor atau hanya terdapat ekor saja (tanpa kepala).

Analisis Data

Data hasil pengamatan abnormalitas spermatozoa dianalisis dengan menggunakan ANOVA ($p \leq 0.05$). Bila ada pengaruh dilanjutkan dengan uji beda nyata terkecil (BNT) untuk mengetahui perbedaan setiap perlakuan.

HASIL & PEMBAHASAN

HASIL

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian seduhan kayu ular (*S. lucida*) terhadap penurunan abnormalitas spermatozoa mencit dapat menurunkan abnormalitas spermatozoa. (Tabel 1.)

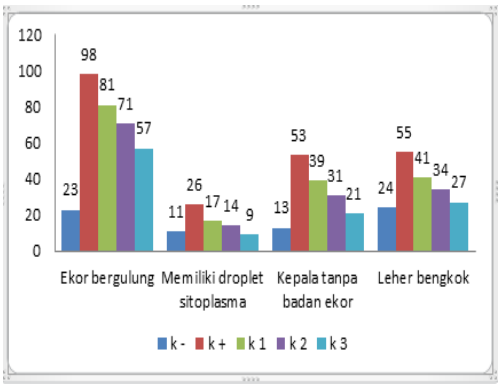
Hasil penelitian menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi kayu ular yang diberikan, menyebabkan terjadinya penurunan abnormalitas spermatozoa pada mencit model diabetes melitus. Berdasarkan hasil Analisis of Varian (ANOVA) satu jalur dengan menggunakan program SPSS 22.0 menunjukkan bahwa pemberian seduhan kayu berpengaruh nyata ($p<0,05$) terhadap penurunan abnormalitas spermatozoa mencit model diabetes mellitus.

Tabel 1. Rata-rata Abnormalitas Spermatozoa Mencit Model Diabetes Mellitus setelah Diberikan Seduhan Kayu Ular *(S. lucida)*.

Konsentrasi Seduhan Kayu Ular (0,13 ml/ekor/hari)	Abnormalitas Spermatozoa (µl) (Rata-rata ± SD)
Kontrol -	23,67 ± 14,8[a]
Kontrol +	77,33 ± 25,0[b]
0,66 gr/50 ml	59,33 ± 21,5[ab]
1,3 gr/50 ml	50,00 ± 19,6[ab]
2,6 gr/50 ml	38,00 ± 16,7[c]

Keterangan: superskrip dengan huruf yang berbeda menunjukkan perbedaan nyata (P≤0.05).

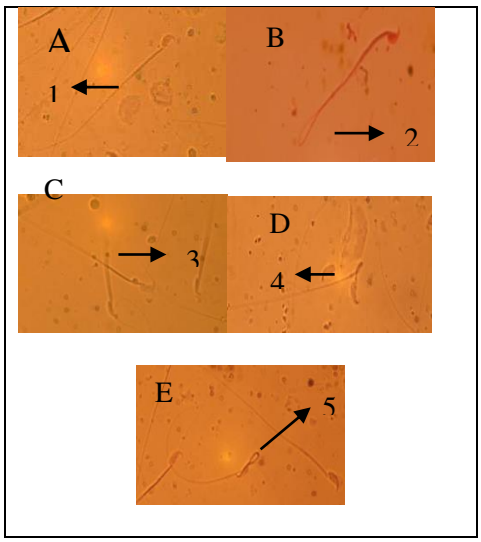
Hasil uji lanjut dengan uji beda nyata terkecil (BNT) menunjukkan bahwa rata-rata penurunan abnormalitas spermatozoa mencit model diabetes melitus setelah diberi seduhan kayu ular pada kelompok mencit kontrol berbeda nyata ($p<0.05$) dengan penurunan abnormalitas spermatozoa pada kelompok mencit yang diberi seduhan kayu ular konsentrasi 0,66gr/50ml, 1,3gr/50ml dan 2,6gr/50ml.



Gambar 2. Diagram penurunan abnormalitas spermatozoa mencit.

Berdasarkan diagram pada Gambar 2, terdapat empat jenis abnormalitas spermatozoa yaitu; spermatozoa ekor bergulung, spermatozoa yang masih memiliki droplet sitoplasma, spermatozoa kepala tanpa badan ekor dan spermatozoa dengan leher bengkok.

Pada hasil diagram di atas menunjukkan bahwa abnormalitas spermatozoa mengalami perbaikan pada setiap konsentrasi seduhan kayu ular. Jenis abnormalitas tertinggi adalah abnormalitas ekor bergulung. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh serangan radikal bebas akibat diabetes mellitus, sehingga jenis abnormalitas ekor bergulung meningkat pada kontrol positif, tetapi dengan pemberian seduhan kayu ular jenis abnormalitas ekor bergulung mengalami penurunan di setiap konsentrasi dan pada konsentrasi 2,6gr/50m efektif memperbaiki abnormalitas spermatozoa.



Gambar 3. Gambar morfologi spermatozoa mencit**.** Keterangan : (1) Spermatozoa normal, (2) Spermatozoa dengan ekor bergulung, (3) Spermatozoa yang masih memiliki droplet sitoplasma, (4) Spermatozoa kepala tanpa badan ekor, (5). Spermatozoa dengan leher bengkok. Perbesaran 400x.

PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil penelitian terlihat bahwa kelompok kontrol positif memiliki rata-rata abnormalitas spermatozoa yang lebih tinggi bila dibandingkan dengan kelompok perlakuan lainnya. Pada kelompok perlakuan konsentrasi 2,6 gr/50ml memiliki rata-rata abnormalitas spermatozoa yang lebih rendah bila dibandingkan dengan kelompok perlakuan konsentrasi 0,66gr/50ml dan konsentrasi 1,3gr/50ml.

Berdasarkan gambar 3. ditemukan spermatozoa dengan kerusakan yang berbeda-beda, diantaranya; spermatozoa ekor bergulung, spermatozoa yang masih memiliki droplet sitoplasma, spermatozoa dengan kepala tanpa badan ekor dan spermatozoa dengan bentuk leher yang bengkok. Kerusakan pada spermatozoa tersebut, diduga disebabkan adanya radikal bebas pada mencit diabetik.

Hadirnya radikal bebas pada organ reproduksi menyebabkan perubahaan jaringan pada testis yang ditandai dengan rusaknya membran mitokondria sel Leydig sehingga proses spermatogenesis menjadi terganggu. Terganggunya proses spermatogenesis akan menyebabkan kualiatas sperma yang dihasilkan menurun [10].

Selain itu, radikal bebas juga dapat merusak integritas DNA pada inti spermatozoa sehingga dapat menginduksi terjadinya apoptosis sel yang dapat mempengaruhi konsentrasi/jumlah spermatozoa, juga mengakibatkan terjadinya perubahan morfologi spermatozoa pada saat proses spermatogenesis [11].

Membran plasma spermatozoa mengandung fosfolipid dan asam lemak tak jenuh dalam jumlah besar, yang sangat rentan terhadap serangan radikal bebas, terutama radikal hidroksil, sehingga ROS dapat dengan mudah menembus masuk membran plasma. Radikal hidroksil itu akan menimbulkan reaksi rantai yang disebut peroksidasi lipid. Akibat akhir dari reaksi rantai ini adalah terputusnya rantai asam lemak menjadi senyawa yang bersifat toksik terhadap sel spermatozoa [12].

Pemberian seduhan kayu ular yang mengandung senyawa aktif tannin, berpotensi dalam menurunkan kadar gula darah. Selain itu tannin mampu meningkatkan transpor glukosa dengan mengaktifkan insulin-mediated signaling pathway. Saponin berfungsi sebagai anti diabetes karena mampu meregenerasi pankreas, sehingga menyebabkan peningkatan jumlah sel beta pankreas yang dapat meningkatkan sekresi insulin.

Pemberian seduhan kayu ular berpengaruh terhadap penurunan abnormalitas spermatozoa mencit model diabetes mellitus. Penurunan abnormalitas spermatozoa pada kontrol positif lebih rendah jika dibandingkan dengan penurunan abnormalitas pada kelompok mencit yang diberi seduhan kayu ular. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa aktif yang terkandung dalam kayu ular dapat menangkal radikal bebas pada diabetes mellitus sehingga menurunkan abnormalitas spermatozoa.

Senyawa aktif triterpenoid (Saponin) pada kayu ular mengakibatkan sekresi hormon testosteron dapat berlangsung dengan baik. Hormon ini memegang peranan penting pada satu tahap proses pembelahan sel-sel germinal untuk pembentukan spermatozoa [13]. Proses glikolisis dalam proses sekresi hormon testosteron akan menghasilkan energi berupa adenosine trifosfat (ATP) yang dimanfaatkan oleh spermatozoa sebagai sumber energi dalam proses pergerakan sehingga tetap motil dan untuk mempertahankan daya hidupnya [14].

Jenis abnormalitas spermatozoa tertinggi adalah ekor bergulung. Hal ini diduga disebabkan proses spermatogenesis yang tidak berjalan dengan baik akibat hadirnya radikal bebas. Setelah diberi perlakuan dengan seduhan kayu ular, terlihat adanya penurunan abnormalitas spermatozoa. Penurunan abnormalitas spermatozoa diduga karena kandungan senyawa aktif yang terdapat pada kayu ular.

Flavonoid yang terdapat pada kayu ular merupakan senyawa antioksidan yang dapat melawan radikal bebas. Mekanisme pengaruh flavonoid sebagai antioksidan adalah memberikan suasana asam pada medium, meregenerasi antioksidan utama, mendeaktifkan kontaminan logam peroksida, menangkap O_2, mengikat O_2 dan mengubahnya menjadi bentuk triplet O_2. Senyawa flavonoid juga merupakan salah satu fitokimia yang dapat menghambat aktivitas enzim aromase yang berperan mengubah androgen (testosterone) menjadi estrogen sehingga terjadi peningkatan hormon testosterone [15].

Senyawa flavonoid juga memiliki aktivitas seperti estrogen yang diduga dapat menekan fungsi hipofisis anterior untuk mensekresikan FSH (Folicle Stimulating Hormon) dan LH (Luteinizing Hormone) [16]. Hormon FSH dan LH memiliki peranan yang sangat penting dalam proses spermatogenesis. Hormon LH berfungsi untuk menstimulasi sel Leydig memproduksi hormon testosteron di dalam testis. Sedangkan fungsi FSH merangsang pertumbuhan testis dan mempertinggi produksi protein pengikat androgen (ABP) oleh sel Sertoli. Peningkatan ABP menyebabkan tingginya konsentrasi testosteron yang penting bagi pembentukan dan pematangan spermatozoa dalam proses spermatogenesis.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kandungan senyawa aktif dari kayu ular berupa alkaloid dan saponin juga berperan sebagai antioksidan yang dapat melawan radikal bebas. Radikal bebas merupakan molekul yang tidak berpasangan. Molekul yang tidak berpasangan ini akan merusak spermatozoa melalui suatu mekanisme yang disebut dengan stres oksidatif. yang terjadi akibat kondisi yang tidak seimbang antara radikal bebas dengan antioksidan di dalam tubuh [17].

Secara biologis, pengertian antioksidan adalah senyawa yang dapat menangkal atau meredam dampak negatif oksidan. Antioksidan bekerja dengan mendonorkan satu elektronnya kepada senyawa oksidan untuk mencegah reaksi oksidasi, sehingga tidak terjadi stres oksidatif dan kerusakan sel [18] Antioksidan juga dapat menghilangkan radikal bebas dan menurunkan stres oksidatif sehingga jumlah ROS dan antioksidan berada dalam keadaan seimbang [6].

Selain itu, alkaloid yang terkandung dalam kayu ular dapat meningkatkan aktivitas enzim ATP-ase yang berada dalam membran sel spermatozoa yang diduga dapat memperbaiki kondisi fisiologis spermatozoa yang mengalami kerusakan akibat adanya kondisi hiperglikemia.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil yang diperoleh, dapat disimpulkan bahwa pemberian seduhan kayu ular (*Strychnos lucida)* dengan tiga konsentrasi yang berbeda berpengaruh terhadap penurunan abnormalitas spermatozoa mencit model diabetes mellitus. Konsentrasi yang paling efektif menyebabkan penurunan abnormalitas spermatozoa mencit adalah konsentrasi 2,6gr/50ml.

PUSTAKA

[1] Kemenkes RI. Survei Kesehatan Dasar Indonesia. Jakarta: Kementrian Kesehatan Republik Indonesia, 2012.
[2] IDF (Internasional Diabetes Federation). Diabetes Atlas. 7th Edition revision 2015.
[3] Yang J, S., lin, G., Wu, M., Liu, X. Luan, Q., LV, He Z. ,Jianmin. Preventive effect of taurin on experimental type II diabetic nephropathy. J of Biomed Sci 17 (1) 546. 2010.
[4] Rachmadi A. Kadar gula darah dan kadar hormon testosteron pada pria penderita diabetes mellitus hubungannya dengan disfungsi seksual dan perbedaannya dengan yang tidak mengalami disfungsi seksual. Tesis. Universitas Diponegoro: 1-79. 2008.
[5] Gusmalina K. dan Sri. Eksplorasi potensi senyawa organik kayu ular (Strychons lucida) sebagai sumber biofarmaka. Pusat Litbang Hasil Hutan, Badan Litbang Kehutanan. Bogor. Volume 1, Nomor 7, Oktober 2015.
[6] Lukacinova A., J, Mojzis, R. Benacka, J. Keller. T. Maguth, P. Kurila. L. vakson. Prefentive effects of flavonoids on alloxan-induced diabetes melitus in rats. Acta Veterina, 77:175-82. 2008.
[7] Dalimartha. Ramuan tradisional untuk pengobatan diabetes mellitus. Jakarta: Penebar Swadaya. hal. 59. 2007.
[8] Fibullah R. M., Sutyarso, H. Busman, S. Rahmanisa. Efek kuratif pemberian jus buah naga putih (Hylocereus undatus) terhadap motilitas, jumlah, dan morfologi spermatozoa tikus putih (Rattus

norvegicus) jantan galur Sprague Dawley yang diinduksi siproteron asetat. J. Agromedicine Unila. 4(9). 2015.
[9] Suparni. Pengaruh pemberian vitamin C terhadap jumlah sperma dan morfologi sperma mencit jantan (Mus musculus) yang dipaparkan Monosodium Glutamate (MSG). Tesis. Sekolah Pascasarjana. Universitas Sumatera Utara. Medan. 2009.
[10] Zhang, Shu-Yun., Ito, Yuki., Yamanoshita, Osamu Permethrin may disrupt testosterone biosynthesis via mitochondrial membrane damage of Leydig Cells in adult male mouse. J. Endocrine Soc. 148:3941-394. 2007.
[11] Faranita O. V. Kualitas spermatozoa pada tikus Wistar jantan diabetes melitus. Laporan Akhir Penelitian Karya Tulis Ilmiah. Semarang : Universitas Diponegoro. 2009.
[12] Zulfa. Pembuatan organoclay dari dentonit dan DI (hidrogenated tallow) dimetrimonium klorida untuk aplikasi nanokomposit. Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatulah Jakarta. 2006.
[13] Ascobat P. Androgen, antiandrogen dan anabolik steroid Dalam : Farmakologi dan terapi ekstrak metanol bunga pepaya jantan (Carica papaya) terhadap Escherichia coli dan Staphylococcus aureus multiresisten antibiotic. Fakultas Farmasi. Universitas Muhammadiyah Surakarta, Surakarta. 2008.
[14] D. F. Souhoka, M. J. Matatula., W. Marlene Messang-Nalley dan M. Rizal. Laktosa mempertahankan daya hidup spermatozoa kambing peranakan Etawah yang dipreservasi dengan plasma semen Domba Priangan. Jurnal Veteriner. Vol 10 No. 3 : 135-142. 2009.
[15] Purnawati. D. Pengaruh pemberian jus buah tomat (Lycoperasicum esculentum mill) terhadap jumlah spermatozoa mencit balb/c jantan yang diberi paparan asap rokok (Skripsi). Fakultas Kedokteran. Universitas Diponegoro. Semarang. 2006.
[16] I. N. Suartha. Ekstrak daun Jung Rahab (Baeckea frute-scens Linn.) menghambat spermatogenesis mencit (Mus musculus). Tesis S-2. Program Pascasarjana. Program Studi Ilmu Kedokteran Reproduksi. Universitas Udayana. 2005.
[17] Hariyatmi. Kemampuan vitamin E sebagai antioksidan terhadap radikal bebas pada lanjut usia. MIPA, 14(1), 52-60. 2004.
[18] K. Sayuti, dan R. Yenrina. Antioksidan alami dan sintetik. Andalas University Press. Padang. 2015.